

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6757338号
(P6757338)

(45) 発行日 令和2年9月16日(2020.9.16)

(24) 登録日 令和2年9月1日(2020.9.1)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/62	(2006.01)
C 07 K 19/00	(2006.01)
C 07 K 14/54	(2006.01)
C 07 K 16/00	(2006.01)
C 07 K 14/00	(2006.01)
C 12 N	15/62
C 07 K	19/00
C 07 K	14/54
C 07 K	16/00
C 07 K	14/00

C 12 N 15/62
C 07 K 19/00
C 07 K 14/54
C 07 K 16/00
C 07 K 14/00

請求項の数 24 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-564951 (P2017-564951)
(86) (22) 出願日	平成28年3月7日(2016.3.7)
(65) 公表番号	特表2018-512168 (P2018-512168A)
(43) 公表日	平成30年5月17日(2018.5.17)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/054729
(87) 國際公開番号	W02016/142314
(87) 國際公開日	平成28年9月15日(2016.9.15)
審査請求日	平成31年2月26日(2019.2.26)
(31) 優先権主張番号	15157911.7
(32) 優先日	平成27年3月6日(2015.3.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者 504263381
ドイチュエス・クレーブスフォルシュングス
ツェントルム
DEUTSCHE S KREBS FORS
CHUNGSZENTRUM
ドイツ国、69120 ハイデルベルク、
イム・ノイエンハイマー・フェルト 28
O、シュティフトゥング・デス・オッフェ
ントリヒエン・レヒツ
(73) 特許権者 513008971
エバーハルト カール ウニヴェルジテー
ト テュービンゲン
ドイツ連邦共和国 72074 テュービ
ンゲン ゲシュヴィッシュテル ショール
プラツツ (番地なし)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】結合タンパク質と、IL-15R α に対する低下した親和性を有するインターロイキン15ポリペチドとを含む融合タンパク質、及び、その治療的使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 少なくとも1つの結合部位を含む結合タンパク質であって、結合部位は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する結合タンパク質と、

b) IL-15ポリペチドであって、IL-15ポリペチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の92_94、95_97、98_114、及び/又は115位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことにより、配列番号：1(Uniprotナンバー：P40933-1)の野生型IL-15の親和性と比較して、IL-15R α に対する低下した親和性を有するIL-15ポリペチドとを含み、結合タンパク質が、抗体、二価の抗体フラグメント、一価の抗体フラグメント、又は抗体様結合性を有するタンパク質性結合分子からなる群より選択される、融合タンパク質。

【請求項2】

ターゲット細胞が、腫瘍関連抗原(TAA)及び/又は自己免疫疾患に関連する抗原を発現している、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項3】

TAAが、CD19、CD20、CD10、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD38、CD44v6、CD45、CDw52、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3、CD135)、c-Kit(CD117)、CSF1R、(CD115)、CD123、CD133、PDGFR- γ (CD140a)

10

20

、 P D G F R - (C D 1 4 0 b) 、 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 (C S P G 4 、 メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) 、 M u c - 1 、 E G F R 、 d e 2 - 7 - E G F R 、 E G F R V I I I 、 葉酸遮断タンパク質、 H e r 2 n e u 、 H e r 3 、 P S M A 、 P S C A 、 P S A 、 T A G - 7 2 、 H L A - D R 、 I G F R 、 C D 1 3 3 、 I L 3 R 、 線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) 、 カーボアンヒドラーーゼ I X (M N / C A I X) 、 ガン胎児抗原 (C E A) 、 E p C A M 、 C D C P 1 、 デルリン 1 、 テネシン、 f r i z z l e d 1 ~ 1 0 、 血管抗原 V E G F R 2 (K D R / F L K 1) 、 V E G F R 3 (F L T 4 、 C D 3 0 9) 、 エンドグリン、 C L E C 1 4 、 T e m 1 - 8 、 T i e 2 、 メソセリン、 上皮糖タンパク質 2 (E G P 2) 、 上皮糖タンパク質 4 0 (E G P 4 0) 、 ガン抗原 7 2 - 4 (C A 7 2 - 4) 、 インターロイキン 1 3 レセプター アルファ - 2 サブユニット、 I L 1 3 R 2 、 I g カッパ軽鎖 () 、 G D 3 - ガングリオシド (G D 3) 、 G D 2 - ガングリオシド (G D 2) 、 G D 2 及び G D 3 のアセチル化変異体、 C D 1 7 1 、 N C A M 、 アルファ葉酸レセプター (F R) 、 ルイス (Y) 、 胎児アセチルコリンレセプター (F A R) 、 トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 3 (E R B B 3) 、 トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 4 (E R B B 4) 、 トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 2 (E R B B 2) 、 肝細胞増殖因子レセプター (H G F R / c - M e t) 、 クローディン 1 8 . 2 、 クローディン 3 、 クローディン 4 、 クローディン 1 、 クローディン 1 2 、 クローディン 2 、 クローディン 5 、 クローディン 8 、 クローディン 7 、 クローディン 6 、 膜結合 C E A 、 R o b o 4 、 C D 1 3 8 、 テネシン、 ならびにフィプロネクチンのエクストラドメイン B からなる群より選択される、 請求項 2 記載の融合タンパク質。 10

【請求項 4】

ターゲット細胞が、自己免疫疾患に関連する抗原を発現しており、 同抗原が、 C D 2 0 、 C D 2 2 、 C D 5 2 及び T N F R 、 C D 1 9 、 C D 2 5 、 C D 4 0 からなる群より選択される、 請求項 2 記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

ターゲット細胞が、腫瘍 / ガン細胞及び / 又は B 細胞である、 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

I L - 1 5 ポリペプチドが、 配列番号： 1 に示されたアミノ酸配列の 9 4 、 9 7 、 9 8 、 1 1 4 、 及び / 又は 1 1 5 位に対応する 1 つ以上の位置において、 少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の融合タンパク質。 30

【請求項 7】

少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、 L 9 2 D 、 E 9 4 K 、 L 9 5 D 、 V 9 7 D 、 I 9 8 D 、 L 1 1 4 D 、 L 1 1 4 E 、 I 1 1 5 D 、 I 1 1 5 E からなる群より選択される、 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

I L - 1 5 ポリペプチドが、 I L - 1 5 R に結合しない、 請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

I L - 1 5 ポリペプチドが、 I L - 2 / I L - 1 5 R に結合する、 請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の融合タンパク質。 40

【請求項 10】

I L - 1 5 ポリペプチドが、 全長 I L - 1 5 タンパク質又はそのフラグメントもしくは変異体であり、 同フラグメント又は変異体が、 配列番号： 1 の野生型 I L - 1 5 の親和性と比較して、 I L - 1 5 R に対する低下した親和性を有する、 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

I L - 1 5 ポリペプチドが、 少なくとも、 配列番号： 4 に示されたアミノ酸配列を含み、 同アミノ酸配列は、 配列番号： 4 に示されたアミノ酸配列の 4 4 、 4 6 、 4 7 、 4 9 、 50

50、66、及び／又は67位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項12】

融合タンパク質が、リンカーを更に含む、請求項1～11のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項13】

I L - 2 / I L - 15 R を発現しているエフェクター細胞のターゲット細胞限定活性化に使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項14】

I L - 2 / I L - 15 R を発現しているエフェクター細胞により媒介されるターゲット細胞限定ターゲット細胞殺傷に使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質。 10

【請求項15】

N K 細胞及びT細胞の細胞溶解活性を、非改変結合タンパク質の細胞溶解活性と比較して、向上させるのに使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項16】

疾患の処置に使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項17】

疾患が、増殖性疾患又は自己免疫疾患である、請求項16記載の使用のための融合タンパク質。 20

【請求項18】

処置の副作用が低減される、請求項16～17のいずれか一項記載の使用のための融合タンパク質。

【請求項19】

請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項20】

請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質をコードする、核酸分子。

【請求項21】

ベクターに含まれる、請求項20記載の核酸分子。 30

【請求項22】

請求項20記載の核酸分子又は請求項21記載のベクターを含む、ホスト細胞。

【請求項23】

融合タンパク質の発現のために、融合タンパク質の発現を可能にする条件下において、融合タンパク質をコードする核酸を使用することを含む、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質を製造するための方法。

【請求項24】

請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[背景]

本発明は、結合タンパク質と、I L 15 R に対する低下した親和性を有するインターロイキン15ポリペプチドとを含む融合タンパク質及びその使用、このような融合タンパク質を含む医薬組成物、ならびに、このような融合タンパク質を製造するための方法に関する。

【0002】

[発明の分野]

第2世代のキメラ又はヒト化モノクローナル抗体、例えば、リツキサン及びハーセプチンはそれぞれ、悪性リンパ腫及びH e r 2陽性乳ガンを有する患者の処置を相当改善して 50

きた。しかしながら、一般的には、第2世代抗体の治療活性は限られたものであり、最適化された抗体に基づく試薬の開発についての喫緊の医療的ニーズが存在している（例えば、Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345-352を参照のこと）。

【0003】

Fcレセプター(FcR)陽性免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞をリクルートする能力は、大部分の抗体の治療活性に重要であると考えられている。このため、抗体最適化に使用される戦略の多くは、向上した抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性をもたらすFc部分の改善に焦点が当てられている。原理的には、これは、現在の臨床使用における大部分の抗腫瘍抗体に含有されるグリコシル化パターン及び/又はIgG1-Fc部分のCH2ドメインにおけるアミノ酸配列を遺伝子操作することにより達成することができる(Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. (2003) 「The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity.」 *J Biol Chem.* 278:3466-3473 ; Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. (2006) 「Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4005-4010)。

【0004】

両戦略は、Fc最適化された第3世代抗体の開発のために、製薬業界において使用されてきた(Oflazoglu E, Audoly LP (2010) 「Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology.」 *MAbs* 2:14-19)。Roche (Basel, Switzerland)は、Glycart (Schlieren, Switzerland)と共に、グリコ操作CD20抗体GA101(オビヌツズマブ)を開発した。慢性リンパ球性白血病(CLL)を患う患者についての最近の大規模臨床試験において、この抗体は、リツキサンより優れていた(Goede V et al. (2014) 「Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions.」 *N Engl J Med* 370:1101-1110)。

【0005】

Xencor (Monrovia, CA USA)により開発された、リンパ腫関連抗原であるCD19及びCD30に対する2つの他の抗体(XmAb5574及びXmAb2513)は、アミノ酸交換S239D及びI332E(SDI改変)を有する。GA101と同様に、これらの抗体は、顕著に向上したADCCを発揮することが報告され(Horton et al. (2008) 「Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia.」 *Cancer Res.* 68:8049-8057 ; Foyil KV, Bartlett NL (2010) 「Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma.」 *Curr Hematol Malig Rep* 5:140-147)、現在、臨床試験で評価されている。

【0006】

サイトカインであるIL-2及びIL-15が、ナチュラルキラー(NK)細胞及びT細胞両方の細胞溶解活性を向上させることができが十分確立されている。両サイトカインは、異なる鎖により完成される共通のFcレセプターを使用する。鎖の差動的発現により、サイトカインの生体活性が主に決定される。両方とも、NK細胞及びT細胞を刺激することができる。ただし、IL-2は、Tレギュラトリーサイトカイン(Treg)を刺激するが、IL-15は、例えば、CD8+メモリT細胞の増殖を促進し、Tregを阻害すると考えられる(Ring et al. (2012) 「Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15」 *Nat Immunol*; 13:1187-1195 ; Waldmann (2006) 「The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design」 *Nat Rev Immunol*; 6:595-601 ; Perna et al. (2013) 「Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma」 *Clin Cancer Res* 19:1011-1018)。

10

20

30

40

50

Res; 19:106-117)

【 0 0 0 7 】

今まで、IL-2、腫瘍壞死因子(TNF)、GM-CSF、及びIL-15は、免疫サイトカインの構築に使用されてきた(Kaspar M, Trachsel E, Neri D (2007) 「The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis.」 Cancer Res. 15;67(10):4940-8)。これらの免疫サイトカインは、サイトカイン活性に焦点を当てるのを可能にするために構築され、意図されているサイトカインと抗体との融合タンパク質である。しかしながら、in vivo用途において、腫瘍に特異的に結合する抗体の割合は、1%を下回っている。加えて、従来の融合タンパク質の活性は、その特異的な結合性に依存しない。その結果として、各サイトカインレセプターを発現している免疫細胞に対するターゲット以外への結合により及ぼされるこのような融合タンパク質の副作用は相当なものであり、安全に適用可能な容量が制限されてしまう。例えば、List and Neri (2013) 「Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy」. Clin Pharmacol; 5:29-45、Gillies et al. (1992) 「Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T cell killing of autologous tumor cells」, Proc Natl Acad Sci USA; 89:1428-1432、Albertini et al. (2012) 「Phase II trial of hu14.18-11.2 for patients with metastatic melanoma」. Cancer Immunol Immunother; 61:2261-2271、又はRibas et al. (2009) 「Phase 1/11 open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma」 J Transl Med; 7:68を参照のこと。10

【 0 0 0 8 】

原理的には、IL-15の特定の作用メカニズムが、この問題に対する解決策を提供する可能性がある。IL-2とは対照的に、IL-15は、そのレセプターをトランスにトリガーする。すなわち、単球及び樹状細胞上に発現されたレセプターの鎖は、NK細胞及びT細胞上の/レセプターをトランスに刺激する。理論的には、これは、抗体のターゲット細胞への特異的な結合後にのみIL-15レセプターの複合体(IL-15R)をトリガーするターゲット細胞限定融合タンパク質、例えば、免疫サイトカインの構築に最適な状況である。ただし、この目的では、IL-15のそのレセプターの鎖への結合が防止される必要がある。20

【 0 0 0 9 】

原理的には、その防止は、IL-15及び可溶性リコンビナントIL-15R又はそのフラグメントの結合タンパク質複合体又は融合タンパク質への結合により達成することができる(Bessard A et al. (2009) 「High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer.」 Mol Cancer Ther; 8:2736-2745 ; Vincent M et al. (2013) 「Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency.」 Int J Cancer; 133:757-765 ; Kermel V et al. (2012) 「An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site.」 Mol Cancer Ther.; 11:1279-1288)。しかしながら、驚くべきことに、IL-15及びIL-15RFcの融合タンパク質又は複合体は、サイトカイン単独より効果的であり、IL-15スーパーアゴニストと呼ばれている。このため、このようなタンパク質は、この細胞をターゲットする結合タンパク質に結合させた後に、ターゲット細胞限定活性を発揮することを予測することができない。30

【 0 0 1 0 】

この理由に則して、IL-15スーパーアゴニストの活性は、Fc架橋によっては更に向上することはない(Rubinstein et al. 「Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R.」 Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:9166-9171)。このため、このようなスーパーアゴニストを含有する免疫サイトカインの活性が、上記概説された意味において、ターゲット細胞限定的であろう可能性は極めて低い。40

【0011】

まとめると、ターゲット細胞特異的な方法で作用することができ、及び／又は、副作用を引き起こさず、及び／又は、安全な用量で投与することができる融合タンパク質を提供するニーズが未だに存在する。この課題は、特許請求の範囲に反映され、説明に記載され、本願の実施例及び図面に例示された実施態様により解決される。

【発明の概要】**【0012】**

上記のように、本発明は、

a) 少なくとも1つの結合部位を含む結合タンパク質であって、結合部位は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する結合タンパク質と、

b) IL-15ポリペプチドであって、IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の92、93、94、95、96、97、98、99、100、112、113、114、115、及び／又は116位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、これにより、配列番号：1(Uniprotナンバー：P40933-1)の野生型IL-15の親和性と比較して、IL-15Rに対する低下した親和性を有するIL-15ポリペプチドとを含む、

、融合タンパク質に関する。

【0013】

加えて、本発明は、IL-2/IL-15Rを発現しているエフェクター細胞のターゲット細胞限定活性化に使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。

【0014】

さらに、本発明は、IL-2/IL-15Rを発現しているエフェクター細胞により媒介されるターゲット細胞限定ターゲット細胞殺傷に使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。

【0015】

また、本発明は、NK細胞及びT細胞、好ましくは、NK細胞、ガンマデルタT細胞、NK-T細胞、及びCD8+T細胞の細胞溶解活性を、本明細書で記載された非改変結合タンパク質の細胞溶解能と比較して、向上させるのに使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。

【0016】

加えて、本発明は、疾患の処置に使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。

【0017】

また、本発明は、本発明の融合タンパク質を含む、医薬組成物に関する。

【0018】

加えて、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする、核酸分子に関する。

【0019】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子、又は、本発明の核酸分子を含むベクターを含む、ホスト細胞に関する。

【0020】

加えて、本発明は、融合タンパク質の発現のために、融合タンパク質の発現を可能にする条件下において、融合タンパク質をコードする核酸を使用することを含む、本発明の融合タンパク質を製造するための方法に関する。

【0021】

また、本発明は、本発明の融合タンパク質を含む、キットに関する。

【0022】

本発明のこれらの態様は、下記説明、図面、及び非限定的な実施例を参照して、より完全に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】**【0023】**

【図1】図1. 本発明の例示的な融合タンパク質によるIL-15Rレセプターのタ

10

20

30

40

50

一ゲット細胞限定刺激。本発明の融合タンパク質は、(i) 例えば、腫瘍細胞上のターゲット抗原に対する、例えば、インタクトな二量体抗体分子であることができる結合タンパク質を含む(図1A)。このようなターゲット抗原は、例えば、CD19又はPSMAであることができる。本発明の融合タンパク質は、(ii) 配列番号：1の野生型IL-15の親和性と比較してIL-15Rに対する低下した親和性を有する、及び/又は、IL-15Rにもはや結合することができないIL-15ポリペプチドを更に含む。したがって、本発明のこのような融合タンパク質は、2つの結合特異性、すなわち、a) ターゲット抗原、例えば、CD19又はPSMAと、b) IL-15Rとを有する。ただし、本発明の結合タンパク質は、例えば、CD19に結合する1つの結合部位と、例えば、CD3に結合する第2の結合部位とを有する二重特異性タンパク質、例えば、二重特異性一本鎖Fvフラグメントであることもできる。このような二重特異性タンパク質は、そのN末端又はC末端のいずれかにおいて、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の92、93、94、95、96、97、98、99、100、112、113、114、115、及び/又は116位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むIL-15ポリペプチドと融合させ、3つの結合部位を有する分子をもたらすことができる。図1Aに示された本発明の融合タンパク質の例示に戻って、同融合タンパク質は、結合分子として、定常CH2及びCH3ドメインを有する抗体分子を含有する。このような結合タンパク質は、その非改変対照物と比較して、向上した抗体依存的細胞傷害(ADCC)活性を発揮するように、更に改変させることができる。図1Aに、すなわち、CH2ドメインのいわゆるSDIE改変を含ませることにより、このような改変結合タンパク質をどのようにして得ることができるかについての一例を示す。この変異は、抗体分子のADCC活性を向上させることができると公知である。上記されたように、結合タンパク質部分に加えて、本発明の融合タンパク質は、配列番号：1の野生型IL-15の親和性と比較して、IL-15Rに対する低下した親和性を有するか、又は、同親和性を何ら有さない、IL-15ポリペプチドを含む。また、このようなIL-15ポリペプチドは、図1Aにも模式的に示される。IL-15ポリペプチドは、結合タンパク質に(ペプチド性又は非ペプチド性の)リンカーを介して付着することができる。あるいは、IL-15ポリペプチドは、結合タンパク質に直接融合させることもできる。加えて、本発明の融合タンパク質において、少なくとも1つ(すなわち、1つ、2つ、又はそれ以上、例えば、3つもの)IL-15ポリペプチドが、結合タンパク質に融合される。図1Aの例示において、融合タンパク質は、2つの変異IL-15ポリペプチドを含有する。同IL-15ポリペプチドはそれぞれ、結合タンパク質として使用される抗体分子の重鎖のCH3ドメインに融合される。本発明の融合タンパク質により、IL-15-レセプターのターゲット細胞限定活性化が可能となる。IL-15がその機能を発揮するのがその理由である。生理学的条件下において、IL-15は、2つのターゲットに結合する。同ターゲットは、種々の細胞上で発現される(トランス提示)。第一に、野生型IL-15は、高い親和性で、例えば、単球及び樹状細胞上で発現されるIL15Rレセプターに結合する。第二に、ついで、IL15Rは、(トランスで)結合したIL-15を、IL-2/IL-15Rを発現している反対側の細胞に提示する。生理学的条件下では、IL-2/IL-15Rレセプターは、例えば、メモリCD8+T細胞、ガンマデルタT細胞、NK T細胞、又はNK細胞上で発現される(図1B)。これは、ターゲット細胞の不存在下において、レセプターを、本発明の融合タンパク質によって活性化することができないことを意味する。鎖によるトランス提示が生じ得ないためである(図1C)。図1B及び図1Cに、本発明の融合タンパク質の機能を例示的に示す。結合タンパク質は、ターゲット細胞に結合する。そのIL-15ポリペプチド部分により、ついで、本発明の融合タンパク質は、レセプター陽性細胞、例えば、CD8+T細胞又はNK細胞に同時に結合することができ(上記を参照のこと)、これらの細胞を活性化させることができる。これは、IL-5Rを介したIL-15の提示を模倣している。これは、そのレセプターの複合体に対するIL-15のトランス提示が、IL-15レセプターの部分を発現している細胞ではなく、ターゲット細胞により達成されるためである。IL 10
20
30
40
50

- 15 R に対する内因親和性は、本発明の融合タンパク質において低下する。このため、ターゲット細胞が存在しない場合には、IL - 15 R 媒介提示は生じない。その結果として、レセプター陽性エフェクター細胞は活性化されない。

【図2】図2. 種々のIL - 15 ポリペプチドを含む種々の融合タンパク質のIL - 15 R に対する結合性(A)及び細胞溶解活性(B)。(A): CD19陽性NALM16細胞を、示された濃度の別個の融合タンパク質と共にインキュベーションし、リコンビナントHisタグ付きIL - 15 R - Fc融合タンパク質、ビオチンラベル抗His抗体、最後に、ストレプトアビジンPEコンジュゲートにより染色した。ついで、細胞を、フローサイトメトリーにより分析した。特に、融合タンパク質CD19 - IL15wt(wt = 野生型)は、野生型ヒトIL - 15(hIL - 15)に融合した、Fc最適化ヒトIgG1定常領域(本明細書で記載されたSDIE変異)を有するCD19抗体4G7を含んだ。そしてここで、hIL - 15は、CH3ドメインに、2つのアミノ酸リンカー、すなわち、グリシン - セリンリンカー(本明細書において、「短いリンカー」とも呼ばれる)を介して、直接結合している。この融合タンパク質は、対照として機能した。更に試験された融合タンパク質は、CD19 - IL15 - E46K、CD19 - IL15 - V49D、又はCD19 - IL15 - I50Dと呼ばれ、Fc最適化(SDIE)ヒトIgG1定常領域(本明細書で記載されたSDIE変異)を有する4G7抗体を含んだ。IL - 15 ポリペプチドは、示された位置において変異していた。これらの位置は、図5に示されたように、配列番号: 2 及び配列番号: 4 に示された位置に相当する。さらに、これらのアミノ酸位置は、配列番号: 1 に関するアミノ酸置換E94K(E46Kについて)、V97D(V49Dについて)、及びI98D(I50Dについて)に相当する(本明細書においてもより詳細に記載)。これら全ての融合タンパク質において、hIL - 15は、2つのアミノ酸グリシン - セリンリンカーを介して、CH3ドメインに直接結合している。種々のアミノ酸置換を含むIL - 15 ポリペプチドがIL - 15 R に結合するその能力を残していたかどうかを分析するために、Hisタグ付きIL - 15 R - Fc - 融合タンパク質(R&D systems)を、培養物に加えた。このため、融合タンパク質のIL - 15 ポリペプチド部分がIL - 15 R に結合するその能力を残していた場合、加えられたHisタグ付きIL - 15 R - Fc - 融合タンパク質は、(融合タンパク質を介して)NALM16細胞に結合するであろう。このため、ビオチンラベル抗His抗体(Qiagen)及びストレプトアビジンPEコンジュゲート(Life technologies)の添加に基づいて、検出可能なシグナルが生成されるであろう。このシグナルを、フローサイトメトリーにより測定した(平均蛍光強度; MFI; 図2 A の y 軸)。図2 A に、CD19 - IL15 - wt(4G7 - IL15 - wt; wt = 野生型)融合タンパク質(対照)について検出されたMFIが、300MFI付近であることを示す。通常、IL - 15 は、ILR - 15 に結合するために、このシグナルは、IL - 15 のIL - 15 R への結合についての証拠を提供する。CD19 - IL15 - V49D(4G7 - IL15 - V49D)融合タンパク質は、対照と比較した場合、同様のシグナルを示した。これにより、この融合タンパク質は、わずかに低い親和性ではあるがILR に結合することが示される。融合タンパク質 CD19 - IL15 - E46K(4G7 - IL15 - E46K)及びCD19 - IL15 - I50D(4G7 - IL15 - I50D)は、150付近のMFIシグナルを示した。このことは、IL - 15 R に対する結合が、強力に減少させられる(又は更に、存在しなくなる)ことを示す。図2 A 中の破線は、バックグラウンド染色、すなわち、(IL15含有融合タンパク質を含まない)ラベル検出抗体による細胞の染色を示す。このため、アミノ酸置換E46K及びI50Dを含むIL - 15 ポリペプチドは、結合タンパク質を含む融合タンパク質内で使用された場合、ILR - 15 結合を強力に減少させ、又は更に、無くしたことを示した。図2 Bにおいて、NALM16細胞を、図2 A に示された実験にも使用された各融合タンパク質及び健康なボランティアの抹消血単核球(PBMC)と共にインキュベーションした。2日後、増殖を、³H - チミジン取込みアッセイ法を使用して評価した。融合タンパク質及びPBMCの不存在下での増殖を、増殖の阻害が0%である100%増殖と定義した。通常、このようなPBMC細胞は

10

20

30

40

50

、リンパ球、単球、及びマクロファージを含む、リンパ球の一部、特に、NK細胞は、Fcレセプターと、IL-15が結合することができる（上記を参照のこと）IL-2/IL-15レセプターの及び共通の鎖を発現する。このため、融合タンパク質の両者（NALM16細胞はCD19結合タンパク質（4G7：CD19特異的抗体）を介して、NK細胞はIL15を介して）への結合に基づいて、NALM16細胞を殺傷することができる。IL-15のIL-15Rへの結合は、NK細胞を活性化し、抗体媒介殺傷を向上させる。図2Aに示された実験に関して、別個の融合タンパク質の細胞溶解活性を分析した。図2Bから分かるように、CD19-IL15-wt（4G7-IL15-wt、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）及びCD19-IL15-E46K（4G7-IL15-E46K、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）の融合タンパク質は両方とも、約80～85%の阻害を生じさせた。CD19-IL15-V49D（4G7-IL15-V49D、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）のタンパク質は、同様のレベルに達したが、より低い濃度ではほとんど有効ではなかった。CD19-IL15-I50D（4G7-IL15-I50D、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）の融合タンパク質及び融合したIL-15タンパク質を含まない非改変CD19-SDIE（4G7-SDIE）抗体は、増殖の約60%の阻害をもたらした。このため、変異IL-15を有する融合タンパク質群から、IL-15ポリペプチド中にE46Kアミノ酸置換を含有する融合タンパク質は、CD19発現ターゲット細胞に対する最も高い細胞溶解活性を示したため、その後の実験に使用した。図2に示されたデータからのまとめ：評価された3つの変異IL-15ポリペプチドの内の2つE46K及びI50Dは、CD19ターゲット融合タンパク質内で使用した場合、IL-15R結合性を欠いていた（A）。E46Kアミノ酸置換を含有する融合タンパク質は、CD19発現ターゲット細胞に対する最も高い細胞溶解活性を有した（B）。

【図3】図3.NK92細胞（図3A）及びPBM C（図3B）において種々の融合タンパク質により誘引された増殖。図2に示された実験は、短いリンカーを含有する融合タンパク質により行われたが、図3で表わされた実験は、長いリンカー（L）を含有する融合タンパク質を更に使用した。長いリンカーを有する融合タンパク質は、20個のアミノ酸長のアミノ鎖ストレッチ（4-グリシン 1-セリン）₄を含む。短いリンカーを含む融合タンパク質において、hIL-15は、短いグリシン-セリンリンカーを介して、CH3ドメインに直接結合している。長いリンカー又は短いリンカーを含有する融合タンパク質を、NK92細胞（図3A）又はPBM C（図3B）細胞と共に、2日間インキュベーションした。ついで、細胞を、³Hチミジンでパルスし、3日目にフィルタマット上に収集し、液体シンチレーションカウンターでカウントした。図3Aにおいて、NK92細胞を、種々の濃度の別個の融合タンパク質と共に、示されたようにインキュベーションした（図3A中のx軸及び図の凡例）。NK92細胞は、ナチュラルキラー細胞であり、CD19結合タンパク質が結合するCD19を発現しない（Gong et al. (1994)「Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells」 Leukemia; 8(4):652-8）。このため、この細胞培養物は、ターゲット細胞を欠いている。y軸（図3A）に示されたように、³H-チミジンカウントにより増殖を測定することにより、エフェクター細胞における増殖を誘引する融合タンパク質の能力を、概ね評価する。CD19-IL15-wt（4G7-IL15wt；短いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）及びCD19-IL15-wt-L（4G7-IL15wt-L；長いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）により、約25000の³Hチミジンカウントがもたらされた。ただし、長いリンカーを有するタンパク質は、より低い濃度で、かなり活性であった。これにより、短いリンカーは、IL-15の活性に影響を及ぼすことが示される。同様に、本発明の融合タンパク質のIL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質

10

20

30

40

50

は、野生型 IL - 15 タンパク質を含有する融合タンパク質よりほとんど活性でなかった。このため、E 46K 変異は、予想通りに、IL - 15 活性を減少させる。これらの融合タンパク質が、IL - 15R により提示することができないためである。加えて、IL - 15 活性は、短いリンカーによる融合により更に減少される。また、同様の結果が、図 3B に示された実験において得られた。ここでは、PBMC 細胞を、種々の濃度の別個の融合タンパク質と共に、示されたようにインキュベーションした（図 3B 中の x 軸及び図の凡例）。一部の PBMC（例えば、B 細胞）も、CD19 を発現する。CD19 は、CD19（ここでは、4G7）結合タンパク質により検出される。特に、PBMC 培養物は、一部の有力なエフェクター細胞、例えば、NK 細胞等も含む。図 3A におけるのと同様に、増殖を、y 軸（図 3B）に示されたように、³H - チミジンカウントにより決定した。これらの実験において、CD19 - IL15 - wt (4G7 - IL15wt；短いリンカー) 及び CD19 - IL15 - wt - L (4G7 - IL15wt - L；長いリンカー及び野生型 (wt) IL - 15 を含有) それぞれにより、約 6000 及び 12000 の ³H チミジンカウントがもたらされた。再度、CD19 - IL15 - E46K (4G7 - IL15 - E46K、そしてここで、4G7 は、SDIE 改変を有するFc 最適化 4G7 抗体である）により、より少ない程度の増殖が提供された（約 4500 カウント ³H チミジン）、一方、融合タンパク質 CD19 - IL15 - E46K - L (4G7 - IL15 - E46K - L；長いリンカーを含有、そしてここで、4G7 は、SDIE 改変を有するFc 最適化 4G7 抗体である）により、野生型 IL - 15 融合タンパク質に類似する増殖の検出がもたらされた（約 8500 カウント；図 3B）。このため、この実験では、CD19 - IL15 - E46K - L (4G7 - IL15 - E46K - L) により、CD19 - IL15 - E46K (4G7 - IL15 - E46K) 融合タンパク質より高い、細胞の増殖 / 活性化が誘引された。これにより、NK92 細胞について得られた結果が確認される。図 3 に示されたデータからのまとめ：(i) アミノ酸置換 E46K を含む IL - 15 を有する融合タンパク質は、野生型 IL - 15 を含む融合タンパク質より活性が低い。及び、(ii) 長いリンカー (L) を有する融合タンパク質は、短いリンカーを有する融合タンパク質より活性である。このため、長いリンカーを含有する融合タンパク質を、その後の実験に使用した。

【図 4 A】図 4. PBMC 培養物中の種々の融合タンパク質によるターゲット細胞限定 NK 細胞活性化（図 4 A）及び B 細胞殺傷（図 4 B）。生成された融合タンパク質のターゲット細胞限定を評価するために、正常な PBMC を、野生型 IL - 15 及び、CD19 抗原及び前立腺特異的膜抗原（PSMA）それぞれに関連する B 細胞をターゲットとする種々の融合タンパク質に含まれ、野生型 IL - 15 より IL - 15R に対する低下した親和性を有する IL - 15 ポリペプチドと共にインキュベーションした。B 細胞が PBMC 培養物中に存在するため、CD19 は、この環境において、関連するターゲット抗原として機能する。一方、PSMA は機能性せず、このため関連しない。PBMC を、示された融合タンパク質 (0.1 μg/ml) 及び、3 日間インキュベーションし、ついで、フローサイトメトリーにより分析した。図 4 A において、NK 細胞活性化及び B 細胞殺傷を、CD69 を発現している CD56 陽性細胞 (CD56+ / CD69+ ダブルポジティブ細胞) 数を測定することにより評価した。CD69 は、活性化された NK 細胞により発現される。一方、CD56 は、停止している NK 細胞によっても発現される。ダブルポジティブ細胞 (CD56+ / CD69+) を選択することにより、活性化された NK 細胞のみを測定する。図 4 A において、細胞数を、y 軸に提供し、利用された種々の融合タンパク質を、x 軸に示す。対照 PBMC 培養物（「PBMCのみ」）では、約 12000 個の細胞が、CD56 を発現し (CD56+)、約 1000 個が、CD56 及び CD69 について、ダブルポジティブ (CD56+ / CD69+) であった。CD19 をターゲットし、SDIE 変異を含む 4G7 結合タンパク質 (CD19 - SDIE) の添加により、活性化された NK 細胞数がわずかに増大した (CD19 - SDIE : SDIE 改変を有するFc 最適化 4G7 抗体、それに付着した IL - 15 ポリペプチドを有さない)。対照的に、PBMC 培養物内で活性化された NK 細胞数は、CD19 - SDIE - IL15wt - L 50

融合タンパク質（4G7-IL15wt-L、長いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）の添加の結果として、大きくなれた。活性化されたNK細胞数において、顕著ではないが、それでもかなりの増大が、CD19-SDIE-IL15-E46K-L融合タンパク質（4G7-IL15-E46K-L、長いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE改変を有するFc最適化4G7抗体である）によっても観察された。PSMAをターゲットする融合タンパク質について、さらに実験を行った。PSMAは、PBM C細胞により発現されない。ここでは、PSMA-IL15-E46K-L融合タンパク質の添加（長いリンカーを含有）は、細胞の組成を明らかには変化させなかった。対照的に、PSMA-IL15wt融合タンパク質（長いリンカーを含有）の添加は、CD56陽性細胞プール内の活性化されたNK細胞数を顕著に増大させた。これらの結果から、本発明のIL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である、すなわち、結合タンパク質は、CD19をターゲットし、PSMAをターゲットせず、NK細胞を活性化し、B細胞を殺傷すると、まとめることができる。野生型IL-15を含む融合タンパク質の添加に基づいて、NK細胞のターゲット細胞限定活性化は、明らかに顕著ではない。これは、野生型IL-15がIL-15Rによりトランス提示され、融合タンパク質のターゲット細胞への結合を必要としないためである。図4Bにおいて、NK細胞活性化及びB細胞殺傷を、CD20+B細胞数を測定することにより評価した。CD20は、B細胞により専ら発現される。この実験では、融合タンパク質を何ら加えずPBM C細胞のみを含有する細胞培養物を、対照として機能させた。ここでは、約12000個のCD20陽性（CD20+）B細胞をカウントした。CD19-SDIE対照の添加により、CD20陽性B細胞の（約4000個の細胞への）減少がもたらされた。特に、CD19-SDIE-IL15wt-L（長いリンカーを含む）及びCD19-SDIE-IL-15E46K-L（長いリンカーを含む）融合タンパク質により、CD20陽性B細胞の最も大きい減少がもたらされた（約2000個の細胞）。対照的に、PSMA-IL-15wt融合タンパク質の添加により、約6000個の細胞への減少が示された。特に、PSMA-IL-15-E46K-L融合タンパク質は、「PBM Cのみ」の対照と比較して、CD20陽性B細胞数を変化させなかった。このため、結合タンパク質-IL-15ポリペプチド融合タンパク質によるCD20+細胞数の減少（B細胞枯渇）は、Fc最適化CD19抗体（CD19SDIE）単独による減少より、顕著であった（図4B）。さらに、PSMA指向融合タンパク質は、IL-15-E46K-L融合タンパク質がCD20陽性B細胞において何ら効果を示さなかつことを示した。このため、ターゲット細胞限定B細胞殺傷は、IL-15-E46K-L融合タンパク質を使用して最も顕著である。一方、野生型IL-15を含む融合タンパク質は、ほとんど顕著でないか、又は更に、存在しない、B細胞のターゲット細胞限定殺傷を示した（図4B）。図4Cにおいて、NK細胞活性化を、B細胞枯渇PBM C培養物において評価した。B細胞を、CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を使用する磁気細胞分取（MACS）により枯渇させた。図4A及び図4Bにおけるように、細胞数の決定のために、等量のBD陰性ビーズ（BD Biociencesからの陰性ビーズ）を、各サンプルに加えた。フローサイトメトリー測定中に、同じ数のBD陰性ビーズを、全てのサンプルについて取得した。これにより、1つの実験からの種々のサンプル間での細胞の定量及び細胞数の直接比較が可能であった。これらの実験から、NK細胞活性化は、E46K変異IL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質の存在下において、顕著に低下し、PSMAをターゲットする対応タンパク質のレベルにほぼ達した。これは、ターゲット抗原CD19を有する細胞が枯渇していたためである。野生型IL-15を含有する融合タンパク質の活性は、ほとんど影響を受けなかった。図4に表わされたデータからのまとめ：a. 本発明のIL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である。すなわち、CD19をターゲットするが、PSMAをターゲットしないタンパク質は、NK細胞を活性化し、B細胞を殺傷する。変異IL-15ポリペプチドを含むCD19ターゲット融合タンパク質によるNK細胞活性化は、B細胞がPBM Cから枯渇

された場合、減少した(図4C)。b. 野生型IL-15を含有する両融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的ではない。すなわち、両融合タンパク質は、NK細胞活性化及びターゲットされた抗原に無関係な少なくとも幾らかのB細胞殺傷を誘引する。c. 本発明の融合タンパク質によるB細胞枯渇は、Fc最適化CD19抗体(4G7SDIE)単独による枯渇より顕著である(図4B)。

【図4B】図4. PBMC培養物中の種々の融合タンパク質によるターゲット細胞限定NK細胞活性化(図4A)及びB細胞殺傷(図4B)。生成された融合タンパク質のターゲット細胞限定を評価するために、正常なPBMCを、野生型IL-15及び、CD19抗原及び前立腺特異的膜抗原(PMSA)それぞれに関連するB細胞をターゲットする種々の融合タンパク質に含まれ、野生型IL-15よりIL-15Rに対する低下した親和性を有するIL-15ポリペプチドと共にインキュベーションした。B細胞がPBMC培養物中に存在するため、CD19は、この環境において、関連するターゲット抗原として機能する。一方、PMSAは機能性せず、このため関連しない。PBMCを、示された融合タンパク質(0.1 μg/ml)と共に、3日間インキュベーションし、ついで、フローサイトメトリーにより分析した。図4Aにおいて、NK細胞活性化及びB細胞殺傷を、CD69を発現しているCD56陽性細胞(CD56+/CD69+ダブルポジティブ細胞)数を測定することにより評価した。CD69は、活性化されたNK細胞により発現される。一方、CD56は、停止しているNK細胞によっても発現される。ダブルポジティブ細胞(CD56+/CD69+)を選択することにより、活性化されたNK細胞のみを測定する。図4Aにおいて、細胞数を、y軸に提供し、利用された種々の融合タンパク質を、x軸に示す。対照PBMC培養物(「PBMCのみ」)では、約12000個の細胞が、CD56を発現し(CD56+)、約1000個が、CD56及びCD69について、ダブルポジティブ(CD56+/CD69+)であった。CD19をターゲットし、SDIE変異を含む4G7結合タンパク質(CD19-SDIE)の添加により、活性化されたNK細胞数がわずかに増大した(CD19-SDIE: SDIE変更を有するFc最適化4G7抗体、それに付着したIL-15ポリペプチドを有さない)。対照的に、PBMC培養物内で活性化されたNK細胞数は、CD19-SDIE-IL15wt-L融合タンパク質(4G7-IL15wt-L、長いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE変更を有するFc最適化4G7抗体である)の添加の結果として、大きく増大した。活性化されたNK細胞数において、顕著ではないが、それでもかなりの増大が、CD19-SDIE-IL15-E46K-L融合タンパク質(4G7-IL15-E46K-L、長いリンカーを含有、そしてここで、4G7は、SDIE変更を有するFc最適化4G7抗体である)によっても観察された。PMSAをターゲットする融合タンパク質について、さらに実験を行った。PMSAは、PBMC細胞により発現されない。ここでは、PMSA-IL15-E46K-L融合タンパク質の添加(長いリンカーを含有)は、細胞の組成を明らかには変化させなかった。対照的に、PMSA-IL15wt融合タンパク質(長いリンカーを含有)の添加は、CD56陽性細胞プール内の活性化されたNK細胞数を顕著に増大させた。これらの結果から、本発明のIL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である、すなわち、結合タンパク質は、CD19をターゲットし、PMSAをターゲットせず、NK細胞を活性化し、B細胞を殺傷すると、まとめることができる。野生型IL-15を含む融合タンパク質の添加に基づいて、NK細胞のターゲット細胞限定活性化は、明らかに顕著ではない。これは、野生型IL-15がIL-15Rによりトランス提示され、融合タンパク質のターゲット細胞への結合を必要としないためである。図4Bにおいて、NK細胞活性化及びB細胞殺傷を、CD20+B細胞数を測定することにより評価した。CD20は、B細胞により専ら発現される。この実験では、融合タンパク質を何ら加えずPBMC細胞のみを含有する細胞培養物を、対照として機能させた。ここでは、約12000個のCD20陽性(CD20+)B細胞をカウントした。CD19-SDIE対照の添加により、CD20陽性B細胞の(約4000個の細胞への)減少がもたらされた。特に、CD19-SDIE-IL15wt-L(長いリンカーを含む)及びCD19

10

20

30

40

50

- S D I E - I L - 1 5 E 4 6 K - L (長いリンカーを含む) 融合タンパク質により、 C D 2 0 陽性 B 細胞の最も大きい減少がもたらされた (約 2 0 0 0 個の細胞)。対照的に、 P S M A - I L - 1 5 w t 融合タンパク質の添加により、約 6 0 0 0 個の細胞への減少が示された。特に、 P S M A - I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質は、「 P B M C のみ」の対照と比較して、 C D 2 0 陽性 B 細胞数を変化させなかった。このため、結合タンパク質 - I L - 1 5 ポリペプチド融合タンパク質による C D 2 0 + 細胞数の減少 (B 細胞枯渇) は、 F c 最適化 C D 1 9 抗体 (C D 1 9 S D I E) 単独による減少より、顕著であった (図 4 B)。さらに、 P S M A 指向融合タンパク質は、 I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質が C D 2 0 陽性 B 細胞において何ら効果を示さなかつことを示した。このため、ターゲット細胞限定 B 細胞殺傷は、 I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質を使用して最も顕著である。一方、野生型 I L - 1 5 を含む融合タンパク質は、ほとんど顕著でないか、又は更に、存在しない、 B 細胞のターゲット細胞限定殺傷を示した (図 4 B)。図 4 Cにおいて、 N K 細胞活性化を、 B 細胞枯渇 P B M C 培養物において評価した。B 細胞を、 C D 1 9 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を使用する磁気細胞分取 (M A C S) により枯渇させた。図 4 A 及び図 4 B におけるように、細胞数の決定のために、等量の B D 陰性ビーズ (BD Biociencesからの陰性ビーズ) を、各サンプルに加えた。フローサイトメトリー測定中に、同じ数の B D 陰性ビーズを、全てのサンプルについて取得した。これにより、1つの実験からの種々のサンプル間での細胞の定量及び細胞数の直接比較が可能であった。これらの実験から、 N K 細胞活性化は、 E 4 6 K 変異 I L - 1 5 ポリペプチドを含有する融合タンパク質の存在下において、顕著に低下し、 P S M A をターゲットする対応タンパク質のレベルにほぼ達した。これは、ターゲット抗原 C D 1 9 を有する細胞が枯渇していたためである。野生型 I L - 1 5 を含有する融合タンパク質の活性は、ほとんど影響を受けなかった。図 4 に表わされたデータからのまとめ：a. 本発明の I L - 1 5 ポリペプチドを含有する融合タンパク質による N K 細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である。すなわち、 C D 1 9 をターゲットするが、 P S M A をターゲットしないタンパク質は、 N K 細胞を活性化し、 B 細胞を殺傷する。変異 I L - 1 5 ポリペプチドを含む C D 1 9 ターゲット融合タンパク質による N K 細胞活性化は、 B 細胞が P B M C から枯渇された場合、減少した (図 4 C)。b. 野生型 I L - 1 5 を含有する両融合タンパク質による N K 細胞活性化は、ターゲット細胞限定的ではない。すなわち、両融合タンパク質は、 N K 細胞活性化及びターゲットされた抗原に無関係な少なくとも幾らかの B 細胞殺傷を誘引する。c. 本発明の融合タンパク質による B 細胞枯渇は、 F c 最適化 C D 1 9 抗体 (4 G 7 S D I E) 単独による枯渇より顕著である (図 4 B)。

【図 4 C】図 4 . P B M C 培養物中の種々の融合タンパク質によるターゲット細胞限定 N K 細胞活性化 (図 4 A) 及び B 細胞殺傷 (図 4 B)。生成された融合タンパク質のターゲット細胞限定を評価するために、正常な P B M C を、野生型 I L - 1 5 及び、 C D 1 9 抗原及び前立腺特異的膜抗原 (P M S A) それぞれに関連する B 細胞をターゲットする種々の融合タンパク質に含まれ、野生型 I L - 1 5 より I L - 1 5 R に対する低下した親和性を有する I L - 1 5 ポリペプチドと共にインキュベーションした。B 細胞が P B M C 培養物中に存在するため、 C D 1 9 は、この環境において、関連するターゲット抗原として機能する。一方、 P S M A は機能性せず、このため関連しない。P B M C を、示された融合タンパク質 (0.1 μg/ml) 及び、3日間インキュベーションし、ついで、フローサイトメトリーにより分析した。図 4 Aにおいて、 N K 細胞活性化及び B 細胞殺傷を、 C D 6 9 を発現している C D 5 6 陽性細胞 (C D 5 6 + / C D 6 9 + ダブルポジティブ細胞) 数を測定することにより評価した。C D 6 9 は、活性化された N K 細胞により発見される。一方、 C D 5 6 は、停止している N K 細胞によっても発見される。ダブルポジティブ細胞 (C D 5 6 + / C D 6 9 +) を選択することにより、活性化された N K 細胞のみを測定する。図 4 Aにおいて、細胞数を、 y 軸に提供し、利用された種々の融合タンパク質を、 x 軸に示す。対照 P B M C 培養物 ('P B M C のみ') では、約 1 2 0 0 0 個の細胞が、 C D 5 6 を発現し (C D 5 6 +)、約 1 0 0 0 個が、 C D 5 6 及び C D 6 9 について、ダブルポジティブ (C D 5 6 + / C D 6 9 +) であった。C D 1 9 をターゲットし、 S D 40

50

I E 变異を含む 4 G 7 結合タンパク質 (CD 1 9 - S D I E) の添加により、活性化された N K 細胞数がわずかに増大した (CD 1 9 - S D I E : S D I E 改変を有する F c 最適化 4 G 7 抗体、それに付着した I L - 1 5 ポリペプチドを有さない)。対照的に、P B M C 培養物内で活性化された N K 細胞数は、 CD 1 9 - S D I E - I L 1 5 w t - L 融合タンパク質 (4 G 7 - I L 1 5 w t - L 、長いリンカーを含有、そしてここで、 4 G 7 は、 S D I E 改変を有する F c 最適化 4 G 7 抗体である) の添加の結果として、大きく増大した。活性化された N K 細胞数において、顕著ではないが、それでもかなりの増大が、 CD 1 9 - S D I E - I L 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質 (4 G 7 - I L 1 5 - E 4 6 K - L 、長いリンカーを含有、そしてここで、 4 G 7 は、 S D I E 改変を有する F c 最適化 4 G 7 抗体である) によっても観察された。 P S M A をターゲットする融合タンパク質について、さらに実験を行った。 P S M A は、 P B M C 細胞により発現されない。ここでは、 P S M A - I L 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質の添加 (長いリンカーを含有) は、細胞の組成を明らかには変化させなかった。対照的に、 P S M A - I L 1 5 w t 融合タンパク質 (長いリンカーを含有) の添加は、 C D 5 6 陽性細胞プール内の活性化された N K 細胞数を顕著に増大させた。これらの結果から、本発明の I L - 1 5 ポリペプチドを含有する融合タンパク質による N K 細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である、すなわち、結合タンパク質は、 C D 1 9 をターゲットし、 P S M A をターゲットせず、 N K 細胞を活性化し、 B 細胞を殺傷すると、まとめることができる。野生型 I L - 1 5 を含む融合タンパク質の添加に基づいて、 N K 細胞のターゲット細胞限定活性化は、明らかに顕著ではない。これは、野生型 I L - 1 5 が I L - 1 5 R によりトランス提示され、融合タンパク質のターゲット細胞への結合を必要としないためである。図 4 B において、 N K 細胞活性化及び B 細胞殺傷を、 C D 2 0 + B 細胞数を測定することにより評価した。 C D 2 0 は、 B 細胞により専ら発現される。この実験では、融合タンパク質を何ら加えず P B M C 細胞のみを含有する細胞培養物を、対照として機能させた。ここでは、約 1 2 0 0 0 個の C D 2 0 陽性 (C D 2 0 +) B 細胞をカウントした。 C D 1 9 - S D I E 対照の添加により、 C D 2 0 陽性 B 細胞の (約 4 0 0 0 個の細胞への) 減少がもたらされた。特に、 C D 1 9 - S D I E - I L 1 5 w t - L (長いリンカーを含む) 及び C D 1 9 - S D I E - I L - 1 5 E 4 6 K - L (長いリンカーを含む) 融合タンパク質により、 C D 2 0 陽性 B 細胞の最も大きい減少がもたらされた (約 2 0 0 0 個の細胞) 。対照的に、 P S M A - I L - 1 5 w t 融合タンパク質の添加により、約 6 0 0 0 個の細胞への減少が示された。特に、 P S M A - I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質は、「 P B M C のみ」の対照と比較して、 C D 2 0 陽性 B 細胞数を変化させなかつた。このため、結合タンパク質 - I L - 1 5 ポリペプチド融合タンパク質による C D 2 0 + 細胞数の減少 (B 細胞枯渇) は、 F c 最適化 C D 1 9 抗体 (C D 1 9 S D I E) 単独による減少より、顕著であった (図 4 B) 。さらに、 P S M A 指向融合タンパク質は、 I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質が C D 2 0 陽性 B 細胞において何ら効果を示さなかつたことを示した。このため、ターゲット細胞限定 B 細胞殺傷は、 I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質を使用して最も顕著である。一方、野生型 I L - 1 5 を含む融合タンパク質は、ほとんど顕著でないか、又は更に、存在しない、 B 細胞のターゲット細胞限定殺傷を示した (図 4 B) 。図 4 C において、 N K 細胞活性化を、 B 細胞枯渇 P B M C 培養物において評価した。 B 細胞を、 C D 1 9 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を使用する磁気細胞分取 (M A C S) により枯渇させた。図 4 A 及び図 4 B におけるように、細胞数の決定のために、等量の B D 陰性ビーズ (BD Biociences からの陰性ビーズ) を、各サンプルに加えた。フローサイトメトリー測定中に、同じ数の B D 陰性ビーズを、全てのサンプルについて取得した。これにより、 1 つの実験からの種々のサンプル間での細胞の定量及び細胞数の直接比較が可能であった。これらの実験から、 N K 細胞活性化は、 E 4 6 K 变異 I L - 1 5 ポリペプチドを含有する融合タンパク質の存在下において、顕著に低下し、 P S M A をターゲットする対応タンパク質のレベルにほぼ達した。これは、ターゲット抗原 C D 1 9 を有する細胞が枯渇していたためである。野生型 I L - 1 5 を含有する融合タンパク質の活性は、ほとんど影響を受けなかつた。図 4 に表わされたデータからのまとめ： a . 本発明の I L - 10

20

30

40

50

15ポリペプチドを含有する融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である。すなわち、CD19をターゲットするが、PSMAをターゲットしないタンパク質は、NK細胞を活性化し、B細胞を殺傷する。変異IL-15ポリペプチドを含むCD19ターゲット融合タンパク質によるNK細胞活性化は、B細胞がPBM Cから枯渇された場合、減少した(図4C)。b. 野生型IL-15を含有する両融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的ではない。すなわち、両融合タンパク質は、NK細胞活性化及びターゲットされた抗原に無関係な少なくとも幾らかのB細胞殺傷を誘引する。c. 本発明の融合タンパク質によるB細胞枯渇は、Fc最適化CD19抗体(4G7SDIE)単独による枯渇より顕著である(図4B)。

【図5-1】図5. 種々の配列の表示。野生型hIL-15の配列は、配列番号：1に示される。下線が引かれたこの配列の最初の48個のアミノ酸は、長さが48個のアミノ酸シグナルペプチドを含む。同シグナルペプチドは、hIL-15の分泌中に開裂され、IL-15Rへの結合に重要な対応するアミノ酸(図5に示されたように、配列番号：2、3、及び配列番号：4に示す)を、灰色に強調している。配列番号：1において、灰色に強調された部分は、Ring et al. (2012) (Ring et al. (2012) 「Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15」 Nat Immunol; 13:1187-1195)に記載されたように、受容体結合に重要なアミノ酸である。特に、

受容体結合に重要なアミノ酸は、配列番号：1のアミノ酸位置55、56、58、59、109、113、116、117、156、157、160に対応するアミノ酸である。

IL15R 又は 受容体結合に重要なアミノ酸位置を、以下の表1及び表2にも示す。また、抗CD19抗体4G7のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：5)、抗CD19抗体4G7のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：6)、抗FLT3抗体BV10のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：7)、抗FLT3抗体BV10のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：8)、抗FLT3抗体4G8のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：9)、抗FLT3抗体4G8のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：10)、抗PSMA抗体J591のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：11)、抗PSMA抗体J591のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：12)、抗エンドグリン抗体Kro23のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：25)、抗エンドグリン抗体Kro23のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：26)のアミノ酸配列も示される。CDR配列に下線が引かれている。

【図5-2】図5. 種々の配列の表示。野生型hIL-15の配列は、配列番号：1に示される。下線が引かれたこの配列の最初の48個のアミノ酸は、長さが48個のアミノ酸シグナルペプチドを含む。同シグナルペプチドは、hIL-15の分泌中に開裂され、IL-15Rへの結合に重要な対応するアミノ酸(図5に示されたように、配列番号：2、3、及び配列番号：4に示す)を、灰色に強調している。配列番号：1において、灰色に強調された部分は、Ring et al. (2012) (Ring et al. (2012) 「Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15」 Nat Immunol; 13:1187-1195)に記載されたように、受容体結合に重要なアミノ酸である。特に、

受容体結合に重要なアミノ酸は、配列番号：1のアミノ酸位置55、56、58、59、109、113、116、117、156、157、160に対応するアミノ酸である。

IL15R 又は 受容体結合に重要なアミノ酸位置を、以下の表1及び表2にも示す。また、抗CD19抗体4G7のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：5)、抗CD19抗体4G7のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：6)、抗FLT3抗体BV10のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：7)、抗FLT3抗体BV10のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：8)、抗FLT3抗体4G8のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：9)、抗FLT3抗体4G8のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：10)、抗PSMA抗体J591のシングル重鎖可変ドメイン(配列番号：11)、抗PSMA抗体J591のシングル軽鎖可変ドメイン(配列番号：12)、抗エンドグリン抗体Kro2

10

20

30

40

50

3 のシングル重鎖可変ドメイン（配列番号：25）、抗エンドグリン抗体 Krō23 のシングル軽鎖可変ドメイン（配列番号：26）のアミノ酸配列も示される。CDR 配列に下線が引かれている。

【図6】図6 . S D I E 改変を含む抗エンドグリン Ig G 1 (Krō23) 重鎖と IL 15 变異体との融合タンパク質（配列番号：27）及び抗エンドグリン Ig G 1 (Krō23) の軽鎖（配列番号：28）の表示。配列番号：27 の表示において、VH 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。続けて、CH1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く CH2 領域は、再度、強調されていない。その後の CH3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、IL15 变異体 (IL15mut) であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、IL15 变異体の変異アミノ酸に下線が引かれている。この変異は、配列番号：4 の E46K 变異に相当する。配列番号：26 において、VL 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。一方、CL 領域は、強調されていない。

【図7 - 1】図7 . S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と野生型 IL15 とのグリシン - セリンリンカー（短いリンカー）による融合タンパク質（配列番号：29）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 E46K 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：30）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 V49D 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：31）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 I50D 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：32）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と野生型 IL15 との（グリシン₄ - セリン₁）₄ リンカー（長いリンカー）による融合タンパク質（配列番号：33）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 E46K 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：34）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 V49D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：35）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 I50D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：36）、さらに、抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 軽鎖（配列番号：37）の表示。配列番号：30 ~ 37 の表示において、VH 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。続けて、CH1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く CH2 領域は、再度、強調されていない。その後の CH3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、IL15 变異体 (IL15mut) であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、IL-15 变異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号 4 の E46K（配列番号：30 及び 34）、V49D（配列番号：31 及び 35）、又は I50D（配列番号：32 及び 36）変異それぞれに相当する。配列番号：37 において、VL 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。一方、CL 領域は、強調されていない。

【図7 - 2】図7 . S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と野生型 IL15 とのグリシン - セリンリンカー（短いリンカー）による融合タンパク質（配列番号：29）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 E46K 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：30）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 V49D 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：31）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と IL15 I50D 变異体との短いリンckerによる融合タンパク質（配列番号：32）、S D I E 改変を含む抗 CD19 Ig G 1 (4G7) 重鎖と野生型 IL15

10

20

30

40

50

との(グリシン₄-セリン₁)₄ リンカー(長いリンカー)による融合タンパク質(配列番号: 33)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 E46 K 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 34)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 V49D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 35)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 I50D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 36)、さらに、抗 CD19 IgG1(4G7)軽鎖(配列番号: 37)の表示。配列番号: 30~37 の表示において、VH 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。続けて、CH1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く CH2 領域は、再度、強調されていない。その後の CH3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、IL15 变異体(IL15 mut)であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、IL-15 变異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号 4 の E46K(配列番号: 30 及び 34)、V49D(配列番号: 31 及び 35)、又は I50D(配列番号: 32 及び 36) 变異それぞれに相当する。配列番号: 37 において、VL 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。一方、CL 領域は、強調されていない。

【図 7-3】図 7. SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と野生型 IL15 とのグリシン-セリンリンカー(短いリンカー)による融合タンパク質(配列番号: 29)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 E46 K 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 30)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 V49D 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 31)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 I50D 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 32)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と野生型 IL15 との(グリシン₄-セリン₁)₄ リンカー(長いリンカー)による融合タンパク質(配列番号: 33)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 E46 K 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 34)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 V49D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 35)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 I50D 变異体との長いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 36)、さらに、抗 CD19 IgG1(4G7)軽鎖(配列番号: 37)の表示。配列番号: 30~37 の表示において、VH 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。続けて、CH1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く CH2 領域は、再度、強調されていない。その後の CH3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、IL15 变異体(IL15 mut)であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、IL-15 变異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号 4 の E46K(配列番号: 30 及び 34)、V49D(配列番号: 31 及び 35)、又は I50D(配列番号: 32 及び 36) 变異それぞれに相当する。配列番号: 37 において、VL 領域は、灰色で強調されている。その中で、CDR に下線が引かれている。一方、CL 領域は、強調されていない。

【図 7-4】図 7. SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と野生型 IL15 とのグリシン-セリンリンカー(短いリンカー)による融合タンパク質(配列番号: 29)、SDIE 改変を含む抗 CD19 IgG1(4G7)重鎖と IL15 E46 K 变異体との短いリンカーによる融合タンパク質(配列番号: 30)、SDIE 改変を含

10

20

30

40

50

む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 V 4 9 D 変異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：3 1）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 I 5 0 D 変異体との短いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：3 2）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と野生型 I L 1 5 との（グリシン₄-セリン₁）₄ リンカー（長いリンカー）による融合タンパク質（配列番号：3 3）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 E 4 6 K 変異体との長いリンカーによる融合タンパク質（配列番号：3 4）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 V 4 9 D 変異体との長いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 5）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 I 5 0 D 変異体との長いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 6）、さらに、抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 軽鎖（配列番号：3 7）の表示。配列番号：3 0～3 7 の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く C H 2 領域は、再度、強調されていない。その後の C H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカ－配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L - 1 5 変異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号 4 のE 4 6 K（配列番号：3 0 及び 3 4）、V 4 9 D（配列番号：3 1 及び 3 5）、又は I 5 0 D（配列番号：3 2 及び 3 6）変異それぞれに相当する。配列番号：3 7において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。

【図 7 - 5】図 7 . S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と野生型 I L 1 5 とのグリシン-セリンリンカ－（短いリンカ－）による融合タンパク質（配列番号：2 9）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 E 4 6 K 変異体との短いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 0）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 V 4 9 D 変異体との短いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 1）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 I 5 0 D 変異体との短いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 2）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と野生型 I L 1 5 との（グリシン₄-セリン₁）₄ リンカ－（長いリンカ－）による融合タンパク質（配列番号：3 3）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 E 4 6 K 変異体との長いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 4）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 V 4 9 D 変異体との長いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 5）、S D I E 改変を含む抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 重鎖と I L 1 5 I 5 0 D 変異体との長いリンカ－による融合タンパク質（配列番号：3 6）、さらに、抗 C D 1 9 I g G 1 (4 G 7) 軽鎖（配列番号：3 7）の表示。配列番号：3 0～3 7 の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続く C H 2 領域は、再度、強調されていない。その後の C H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカ－配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L - 1 5 変異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号 4 のE 4 6 K（配列番号：3 0 及び 3 4）、V 4 9 D（配列番号：3 1 及び 3 5）、又は I 5 0 D（配列番号：3 2 及び 3 6）変異それぞれに相当する。配列番号：3 7において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。

10

20

30

40

50

【図8】図8 . S D I E 改変を含む抗 F L T 3 Ig G 1 (B V 1 0) 重鎖と I L 1 5 変異体との融合タンパク質（配列番号：38）、さらに、抗 F L T 3 Ig G 1 (B V 1 0) 軽鎖（配列番号：39）の表示。配列番号：38の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続くC H 2 領域は、再度、強調されていない。その後のC H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L 1 5 変異体の変異アミノ酸に下線が引かれている。この変異は、配列番号：4のE 4 6 K 変異に相当する。配列番号：39において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。
10

【図9】図9 . S D I E 改変を含む抗 F L T 3 Ig G 1 (4 G 8) 重鎖と I L 1 5 変異体との融合タンパク質（配列番号：40）、さらに、抗 F L T 3 Ig G 1 (4 G 8) 軽鎖（配列番号：41）の表示。配列番号：40の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続くC H 2 領域は、再度、強調されていない。その後のC H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L 1 5 変異体の変異アミノ酸に下線が引かれている。この変異は、配列番号：4のE 4 6 K 変異に相当する。配列番号：41において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。
20

【図10 - 1】図10 . S D I E 改変を含む抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 重鎖と野生型 I L 1 5 との融合タンパク質（配列番号：42）、S D I E 改変を含む抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 重鎖と I L 1 5 E 4 6 K 変異体との融合タンパク質（配列番号：43）、さらに、抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 軽鎖（配列番号：44）の表示。配列番号：42及び43の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続くC H 2 領域は、再度、強調されていない。その後のC H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L - 1 5 変異体を含む融合タンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号：4のE 4 6 K（配列番号：43）変異に相当する。配列番号：44において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。
30

【図10 - 2】図10 . S D I E 改変を含む抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 重鎖と野生型 I L 1 5 との融合タンパク質（配列番号：42）、S D I E 改変を含む抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 重鎖と I L 1 5 E 4 6 K 変異体との融合タンパク質（配列番号：43）、さらに、抗 P S M A Ig G 1 (J 5 9 1) 軽鎖（配列番号：44）の表示。配列番号：42及び43の表示において、V H 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D R に下線が引かれている。続けて、C H 1 領域は、強調されていない。ヒンジ領域は、再度、灰色で強調されており、イタリック体により表わされている。一方、それに続くC H 2 領域は、再度、強調されていない。その後のC H 3 領域は、灰色で強調されており、ボールド体により表わされている。続くリンカー配列は、強調されていない。最後の部分は、I L 1 5 変異体（I L 1 5 mut）であり、再度、灰色で強調されており、ボールドのイタリック体により表わされている。そしてここで、I L - 1 5 変異体を含む融合タ
40
50

ンパク質における変異アミノ酸に下線が引かれている。これらの変異は、配列番号：4のE 4 6 K（配列番号：4 3）変異に相当する。配列番号：4 4において、V L 領域は、灰色で強調されている。その中で、C D Rに下線が引かれている。一方、C L 領域は、強調されていない。

【0 0 2 4】

[詳細な説明]

【表1】

表1：

配列番号：1に関するアミノ酸位置	92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115, 116	10
配列番号：4に関するアミノ酸位置	44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 64, 65, 66, 67, 68	

表1：IL-15R α 結合に重要な配列

【0 0 2 5】

【表2】

表2：

配列番号：1に関するアミノ酸位置	55, 56, 58, 59, 109, 113, 116, 117, (β 鎖結合) 156, 157, 160 (γ 鎖結合)	20
配列番号：4に関するアミノ酸位置	7, 8, 10, 11, 61, 65, 68, 69 (β 結合), 108, 109, 112 (γ 結合)	

表2：IL-15R $\beta\gamma$ 結合に重要な配列

【0 0 2 6】

配列番号：4のアミノ酸配列は、配列番号：1のフラグメントであり、同フラグメント中において、IL-15R 及びIL-2 / IL-15R 結合に重要なアミノ酸位置は、図5でも強調されている。

【0 0 2 7】

本願は、（これらのターゲット細胞の）ターゲット細胞限定殺傷することができる融合タンパク質を提供する。そしてここで、これらの融合タンパク質は、2「種類の機能的な部分」、すなわち、第1の部分として、（本明細書で詳細に記載された）結合タンパク質と、第2の部分として、IL-15R に対する低下した親和性、好ましくは、配列番号：1（UniProtアクセションナンバー：P 4 0 9 3 3）の野生型IL-15の親和性と比較して、ヒトIL-15R に対する低下した親和性を有するIL-15ポリペプチド、好ましくは、ヒトIL-15ポリペプチドとを含有する。本発明者らは、このようなIL-15ポリペプチドが配列番号：1に示されたアミノ酸配列の9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、及び／又は1 1 6位に対応する1つ以上の位置において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことを、見出した。この文脈において、「IL-15R」という用語は、インターロイキン15レセプター アルファサブユニットを指すのに、その通常の意味で使用されることが留意される。同サブユニットは、高い親和性でIL-15に結合するインターロイキン15レセプターのサブユニットを意味し、IL-15レセプターの2つの他のサブユニットCD122及びCD132とは独立している（IL-15レセプターは、IL-2に対するレセプターを共有している）。「IL-15R」のアミノ酸配列は、多くの種について公知であり、ヒト「IL-15R」の配列は、UniProtアクセションナンバーQ 1 3 2 6 1で登録されている。

【0 0 2 8】

10

20

30

40

50

また、「IL-15」又は「IL15」という用語は、インターロイキン15を指すのに、その通常の意味で使用される。「IL-15」のアミノ酸配列は、多くの種について公知である。ヒト「IL-15」の配列は、アイソフォームIL15-S48AAとして、UniProtアクセッションナンバーP40933及びGeneBankアクセッションナンバーDQ893709それぞれで登録されており、配列番号：1に示される。

【0029】

原理的には、このようなIL-15ポリペプチドを含む融合タンパク質において、ターゲット結合タンパク質は、IL-15レセプターの鎖の機能を置き換えることにより、例えば、腫瘍細胞上に発現されるそのターゲット抗原への結合タンパク質の結合性により決まる、鎖のターゲット細胞限定刺激をもたらす。このため、オフターゲット作用が減少し、例えば、十分なNK及びT細胞活性化を達成することができる、*in vivo*におけるより高い用量の適用が可能となる。活性化されると、例えば、NK細胞を、例えば、本発明の融合タンパク質(図1)に含まれるFc最適化ターゲット結合タンパク質により、効果的にリクルートすることができる。

【0030】

本発明の融合タンパク質は、IL-15と可溶性リコンビナントIL-15R又はそのフラグメントとの公知の複合体又は融合タンパク質を上回る、有益な代替物である。これに関しては、例えば、Bessard et al. (2009) 「High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer」 Mol Cancer Ther; 8:2736-2745、Vincent et al. (2013) 「Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency.」 Int J Cancer; 133:757-765、又はKermer et al. (2012) 「An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site」 Mol Cancer Ther; 11:1279-1288)を参照のこと。
これらの参考文献に記載されたリコンビナントIL-15R又はそのフラグメントは全て、いわゆる、「sushiドメイン」を含む。同ドメインは、IL-15RへのIL-15の結合に重要である(Wei et al. (2001) 「The Sushi Domain of Soluble IL-15 Receptor Is Essential for Binding IL-15 and Inhibiting Inflammatory and Allo genic Responses In Vitro and In Vivo」 The Journal of Immunology; vol. 167, no. 1, p. 277-282を参照のこと)。IL-15のみを含む構築物については、同構築物は、IL-15R及びIL-2/IL-15Rの両方への結合を介してのみ機能することが明らかである。理論に拘束されるものではないが、2つのレセプター(及び)へのこの二重依存性により、これらの野生型IL-15構築物の作用が、ほとんどターゲット細胞特異的でなくなると考えられる。また、このことは、本願の実施例において、本発明の融合タンパク質が野生型IL-15を含む融合タンパク質より非常にターゲット限定的な方法で作用するのが示されたことによっても証明される。

【0031】

また、IL-15とIL-15R Fcとの融合タンパク質又は複合体は、サイトカイン単独より、メモリ表現型CD8+細胞及びNK細胞の増殖を刺激するのに効果的であることも示されている。したがって、それらの融合タンパク質は、「IL-15スーパーアゴニスト」と呼ばれている。IL-15/IL-15R複合体の予期せぬスーパーアゴニスト機能のために、その作用が、例えば、腫瘍関連抗原をターゲットする抗体への融合により、ターゲット細胞限定的になることは、全くありそうもない。「IL-15スーパーアゴニスト」の活性は、Fc架橋によって更に向上されることはない(Rubinstein et al. (2006) supports this notion. 「Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R」 Proc Natl Acad Sci USA; 103:9166-9171)。対照的に、ここで記載された、結合タンパク質と変異IL-15変異体とを含む本融合タンパク質は、それらがターゲット細胞に結合タンパク質に結合する限りにおいて、顕著に低下したIL-15活性を示す。

【0032】

10

20

30

40

50

特に、本発明は、

a) 少なくとも 1 つの結合部位を含む結合タンパク質であって、結合部位は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する結合タンパク質と、

b) I L - 1 5 ポリペプチドであって、I L - 1 5 ポリペプチドは、配列番号：1 に示されたアミノ酸配列の 9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、及び / 又は 1 1 6 位に対応する 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み、これにより、配列番号：1 (Uniprotナンバー：P 4 0 9 3 3 - 1) の野生型 I L - 1 5 の親和性と比較して、I L - 1 5 R に対する低下した親和性を有する I L - 1 5 ポリペプチドとを含む、融合タンパク質に関する。

【 0 0 3 3 】

10

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合することができる任意のタンパク質であることができる。結合タンパク質は、抗体分子、例えば、インタクトな抗体、二価の抗体フラグメント、又は一価の抗体フラグメントであることができる。あるいは、結合タンパク質は、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子であることができる。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用する場合、「抗体分子」は、全長抗体、リコンビナント抗体分子、又は完全にヒトの抗体分子であることができる。全長抗体は、任意の天然の抗体である。また、「抗体」という用語は、免疫グロブリン (I g) の種々のクラス (すなわち、I g A、I g G、I g M、I g D、及び I g E) 及びサブクラス (例えば、I g G 1、I g G 2 等) も含む。このような全長抗体は、種々の動物、例えば、種々の哺乳類等から単離することができる。「リコンビナント抗体分子」は、その遺伝子がクローニングされ、ホスト細胞又は生物中において、遺伝子操作の周知の方法を使用して、組換え的に生成される、抗体分子を意味する。典型的には、リコンビナント抗体分子は、天然には見出されないアミノ酸配列を含むように遺伝子改変されている。このため、リコンビナント抗体分子は、キメラ抗体分子又はヒト化抗体分子であることができる。好ましい実施態様では、融合タンパク質は、本明細書で記載された免疫グロブリンの重鎖と本明細書で記載された I L - 1 5 変異体とを含む。同重鎖と同 I L - 1 5 変異体とは、本明細書で記載されたリンカーを介して結合させることができる。この配置において、免疫グロブリン部分は、I L - 1 5 変異体の N 末端に位置するのが好ましい。このような融合タンパク質において、抗体分子の軽鎖は、任意の通常の抗体又は抗体フラグメントにおけるのと同様に、抗体重鎖と対応している (この点で、図 1 A も参照のこと)。

20

【 0 0 3 5 】

30

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、「抗体フラグメント」であることもできる。このような抗体フラグメントは、(抗原) 結合部位を形成する抗体のそれらの部分を少なくとも含む。このような抗体フラグメントの実例は、名称を少しだけ挙げると、一本鎖可変フラグメント (s c F v) 、F v フラグメント、シングルドメイン抗体、例えば、V H H (ラクダ科) 抗体等、d i - s c F v s 、フラグメント抗原結合領域 (F a b) 、F (a b')₂ フラグメント、F a b' フラグメント、ディアボディ、ドメイン抗体 (Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM. Domain antibodies: proteins for therapy. Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90) 、又は、国際公開公報第 2 0 1 3 / 0 9 2 0 0 1 号に記載され、C H 2 ドメインを介して F a b フラグメントに結合している一本鎖 F v フラグメントを含む二重特異性「F a b s c」抗体分子である。

40

【 0 0 3 6 】

上記で示されたように、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、抗体又は異なる特異性を有する 2 つの結合部位を含む二価抗体フラグメントであることができる。例えば、一つの特異性は、腫瘍関連抗原、例えば、F L T 3、C D 2 0、C D 1 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 5、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 7、C D 3 8、又は C D 4 4 v 6 (以下も参照のこと) 、及び、エフェクター細胞、例えば、T 細胞又は N K

50

細胞に存在するレセプター、例えば、CD3又はCD16に対するものである。このような二価の抗体フラグメントに使用することができるフォーマットの非限定的な例は、国際公開公報第2013/092001号に記載された、(Fab)₂'-フラグメント、二重特異性一本鎖Fvフラグメント、bsFc-1/2-二量体、又はbsFc-CH3-1/2二量体を含む。また、例えば、Lamerisa et al. (2014) 「Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy」 Crit Rev Oncol Hematol. S1040-8428(14)00135-8、Kontermann (2012) 「Dual targeting strategies with bispecific antibodies」 Landes Bioscience mAbs Vol. 4, Issue 2 182-197に記載された二重特異性（又は三重特異性）抗体分子を利用することもできる。あるいは、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、二価のタンパク質性人工結合分子、例えば、リポカリン突然変異タンパク質であることもできる。リポカリン突然変異タンパク質は、「デュオカリン」としても公知である。

【0037】

ただし、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、1つの結合部位のみを有することができる、すなわち、一価であることができる。一価の結合タンパク質の例は、一価の抗体フラグメント、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子を含むが、これらに限定されない。このような一価の抗体フラグメントの例は、Fabフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(scfv)、又はscFv-Fcフラグメントを含むが、これらに限定されない。

【0038】

上記で説明されたように、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、代替的に、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子であることができる。結合タンパク質として使用することができる抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子の実例は、アブタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質（その商品名「Anticalin（登録商標）」でも公知の例示的なリポカリン突然変異タンパク質は、例えば、国際公開公報第99/16873号、同第00/75308号、同第03/029471号、同第03/029462号、同第03/029463号、同第2005/019254号、同第2005/019255号、同第2005/019256号、同第2006/56464号、もしくは同第2008/015239、又は、Skerra, A. (2001) Rev. Mol. Biotechnol. 74, 257-275のレビュー文献に記載されている）、グルボディ、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、アビマー、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン、G1aドメイン、SRCRドメイン、クーニッツ/ボバイン臍臓トリプシン阻害ドメイン、テンダミスタッフ、kazal型セリンプロテアーゼ阻害ドメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、フォンビルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型リピート、LDLレセプタークラスAドメイン、Sushidomain（補体調節タンパク質（CCP）モジュール）、Linkドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメイン、又は免疫グロブリン様ドメイン（例えば、ドメイン抗体又はラクダ重鎖抗体）、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォンビルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、F5/8C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「Kappa bodieis」（III-CR1、Gonzales JN, Houtz EK, Ludwig JR, Melcher ED, Hale JE, Pournand R, Keivens VM, Myers L, Beidler K, Stuart P, Cheng S, Radhakrishnan R. Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions. Protein Eng. 1997 Aug;10(8):949-57）、「ミニボディ」（Martin F1, Toniatti C, Salvati AL, Venturini S, Ciliberto G, Cortese R, Sollazzo M. The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. EMBO J. 1994 Nov 15;13(22):5303-9）、「Janus

10

20

30

40

50

ins」(Traunecker A, Lanzavecchia A, Karjalainen K. Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells. EMBO J. 1991 Dec;10(12):3655-9、及び、Traunecker A, Lanzavecchia A, Karjalainen K. Janusins: new molecular design for bispecific reagents. Int J Cancer Suppl. 1992;7:51-2)、ナノボディ、アドネクチン、テトラアネクチン、ミクロボディ、アフィリン、アフィボディ、又はアンキリン、クリスタリン、ノッチン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質、アンキリン又はアンキリンリピートタンパク質、又はロイシンリッチリピートタンパク質、アビマー (Silverman J1, Liu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. Nat Biotechnol. 2005 Dec;23(12):1556-61. Epub 2005 Nov 20) ; 及びSilverman et al. (Silverman J, Liu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. Nat Biotechnol. 2005 Dec;23(12):1556-61. Epub 2005 Nov 20) にも記載されたヒトレセプタードメインのファミリーのエキソンシャッフリングにより進化された多価アビマータンパク質を含むが、これらに限定されない。 10

【0039】

本発明の融合タンパク質における「結合タンパク質」という用語は、非タンパク質性アプタマーも含む。このようなアプタマーは、特定のターゲット分子に結合するオリゴ核酸である。これらのアプタマーは、通常、それらを大きなランダム配列プールから選択することにより作製されるが、天然のアプタマーも存在する。より具体的には、アプタマーは、DNA又はRNAアプタマーとして分類することができる。それらは、(通常短い)鎖のオリゴヌクレオチドからなる。したがって、上記されたタンパク質性アプタマーは、タンパク質部分に加えて、オリゴヌクレオチド部分も含むことができる。 20

【0040】

このため、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子であることができる。同タンパク質性結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質、グルボディ、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、又はアビマーからなる群より選択される。 30

【0041】

結合タンパク質により結合される(レセプター)タンパク質は、本明細書で記載されたターゲット細胞に関連する任意の抗原であることができる。本発明によるこの文脈において、結合タンパク質のターゲットとして本明細書で選択されたレセプタータンパク質のリガンドも、(ターゲット)タンパク質であることが想定される。同レセプタータンパク質は、本明細書で記載されたターゲット細胞に関連する。ターゲット細胞に関連するレセプタータンパク質に結合するこのような天然又はリコンビナントリガンドについての例は、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3)、レセプター型チロシン-タンパク質キナーゼFLT3、又は胎児肝臓キナーゼ-2(Flk2)としても公知のCD135である。CD135は、サイトカインFlt3リガンド(FLT3L)についてのレセプターである。このため、FLT3Lも、FLT-3に結合する結合タンパク質として使用することができる。一方、FLT-3レセプターも、FLT-3Lに結合する結合タンパク質として使用することができる。 40

【0042】

ここから、本発明の融合タンパク質の生理学的作用に切り替えて、Fcレセプター(FcR)陽性免疫エフェクター細胞、例えば、NK細胞をリクルートする能力は、本発明の融合タンパク質の治療活性に重要であると見られる。融合タンパク質は、結合タンパク質(融合タンパク質の「部分a」)として、例えば、定常CH2及びCH3ドメインを有す 50

る抗体分子を、この目的で使用することができるが、融合タンパク質の結合タンパク質の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を向上させるのに使用することができる種々の戦略が、当業者に公知であることが留意される（Beck et al. (2010) 及び Natsume et al. (2009) (Beck A et al. (2010) 「Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies.」 Nat Rev Immunol; 10:345-352 ; Natsume A, Niwa R, Satoh M. 「Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC」 Drug Des Devel Ther. 2009;3:7-16) に例示的にまとめられる）。ただし、Fcレセプター陽性免疫エフェクター細胞をリクルートする能力は、結合タンパク質が抗体／免疫グロブリンに基づく融合タンパク質に限定されることを意味するものではない。むしろ、例えば、結合タンパク質として、ADCC活性を提供する（CH2及び／又はCH3ドメインを含むことができる）Fcポリペプチドの一部と融合した他のタンパク質性分子、例えば、リポカリシン突然変異タンパク質を使用することも可能である。次に、Fcポリペプチドは、本明細書で記載された変異IL-15ポリペプチドと融合される。このような融合タンパク質において、Fc部分／ポリペプチドは、「ADCC活性」提供部分だけでなく、同時に、結合タンパク質と変異IL-15ポリペプチドとの間のリンクーとしても機能する。

【0043】

このため、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、非改変の結合タンパク質と比較して、向上した抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を有するように改変することができる。ADCC活性は、周知の試験、例えば、aCella（商標）-TOX、GAPDH放出アッセイ法等により測定することができる。aCella（商標）-TOXは、例えば、Promega又はInterchimから得ることができる。あるいは、ADCCは、本明細書における実施例に記載されたようにも測定することもできる。このため、本発明の融合タンパク質における改変結合タンパク質は、（同じであるが）改変を含まない非改変結合タンパク質と比較した場合、向上したADCC活性を有することができる。例えば、実施例中に本明細書で記載された改変4G7抗体は、そのFc部分にSDIE改変を含まない「正常な」4G7抗体より、向上したADCC活性を有する。

【0044】

本発明の融合タンパク質の細胞殺傷活性を改善するための1つの戦略は、例えば、従来のキメラ化及び「SDIE変異」を含有するFc最適化抗体分子の使用ができる。後者の抗体は、顕著に向上した抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介することが公知である（Lazar et al. (2006) 「Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.」 Proc Nat Acad Sci USA 2006; 103:4005-4010 ; Horton et al. (2008) 「Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia」 Cancer Res; 68:8049-8057 ; Foyil and Bartlett (2010) 「Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma」 Curr Hematol Malig Rep; 5:140-147）。

【0045】

したがって、本発明の融合タンパク質の改変結合タンパク質は、Fc最適化させることができる。この改変は、非改変結合タンパク質のADCC活性と比較して、向上した抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性をもたらす。改変結合タンパク質は、例えば、インタクトな抗体、scFv-Fcフラグメント、bsFc-1/2二量体、又はbsFc-CH3-1/2二量体であることができる。後者の2つの抗体フォーマットは、国際公開公報第2013/092001号に記載されている。

【0046】

特に、Fc最適化は、アミノ酸置換を含むことができる。同アミノ酸置換は、F243L及び／又はD270E及び／又はR292P及び／又はS298A及び／又はS298N及び／又はY300L及び／又は305I及び／又はA330V及び／又はA330L及び／又はI332E及び／又はE333A及び／又はK334A及び／又はP396L及び／又はS239Dからなる群より選択される。そしてここで、位置ナンバリングは、

10

20

30

40

50

E U インデックスによる。使用されるアミノ酸のナンバリングは、K a b a t ナンバリング [E U インデックス] による配列位置に対応する。F c 最適化改変結合タンパク質は、Hofmann et al. (2012) 「Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia」 Leukemia ; 26:1228-1237に記載された「S D I E」変異を含むこともできる。このため、F c 最適化は、S 2 3 9 D 及び I 3 3 2 E を含むアミノ酸置換を含むことができる。そしてここで、位置ナンバリングは、E U インデックスによる。また、F c 最適化は、アミノ酸置換 F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、及び P 3 9 6 L を含むこともできる。そしてここで、位置ナンバリングは、E U インデックスによる。また、F c 最適化は、アミノ酸置換 F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L を含むこともできる。そしてここで、位置ナンバリングは、E U インデックスによる。
10

【 0 0 4 7 】

また、示されたアミノ酸置換は、示されたアミノ酸位置に対応することも想定される。このことは、例えば、F c ドメインを含む抗体フラグメント又は結合タンパク質において、示されたアミノ酸の位置ナンバリングが異なる場合があるが、それでもより詳細に記載された類似する隣接アミノ酸を有する場合がある。

【 0 0 4 8 】

上記で説明されたように、F c レセプター (F c R) 陽性免疫エフェクター細胞、例えば、N K 細胞をリクルートする能力は、ほとんどの抗体の治療活性に重要であると考えられている。非改変結合タンパク質と比較して、向上した抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性を有する改変結合タンパク質を得るための別の戦略は、改変結合タンパク質のグリコシル化パターンの遺伝子操作により達成される。
20

【 0 0 4 9 】

このため、対応する抗体分子が結合タンパク質として使用される場合、本発明の融合タンパク質におけるこのような改変結合タンパク質は、非改変結合タンパク質のF c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンとは異なる、F c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンを有することができる。特に、改変結合タンパク質は、非改変結合タンパク質より少なくフコシル化されている。改変結合タンパク質は、フコシル化されていないこともできる。例えば、改変結合タンパク質のF c 結合オリゴ糖は、非改変結合タンパク質のF c 結合オリゴ糖より、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は100%少なくフコシル化されていることができる。一般的には、タンパク質のフコシル化は、当業者に公知の技術により測定することができる。例えば、Life TechnologiesからのClick-iT (登録商標) フコースアルキン、又は、欧州特許第2 4 8 3 6 9 3号に記載された方法を使用することができる。
30

【 0 0 5 0 】

本発明の融合タンパク質における改変結合タンパク質は、F c 最適化及び、非改変結合タンパク質のF c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンとは異なるF c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンの両方を含むこともできる。

【 0 0 5 1 】

このため、原理的には、本発明の結合タンパク質の向上したA D C C は、グリコシル化パターン及び / 又は現在臨床使用されているほとんどの抗腫瘍抗体に含有されるI g G - F c 部分におけるC H 2 ドメインのアミノ酸配列の遺伝子操作により達成することができる (Shinkawa et al. (2003) 「The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity」 J Biol Chem; 278:3466-3473 ; Lazar et al. (2006) 「Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function」 Proc Nat Acad Sci USA; 103:4005-4010)。
40

【 0 0 5 2 】

両戦略は、F c 最適化された第3世代抗体の開発のために、製薬業界において以前から使用してきた (Oflazoglu & Audoly (2010) 「Evolution of anti-CD20 monoclonal an
50

tibody therapeutics in oncology.」 MAbs 2:14-19)。Roche (Basel, Switzerland) は、Glycart (Schlieren, Switzerland) と共同で、グリコ操作 CD 20 抗体 GA101 (オビヌツズマブ) を開発した。慢性リンパ球性白血病 (CLL) を患う患者についての最近の大規模臨床試験において、この抗体は、リツキサンより優れていた (Goede et al. (2014) 「Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions.」 N Engl J Med 370:1101-1110)。Xencor (Monrovia, CA USA) により開発された、抗原 CD 19 及び CD 30 に関連するリンパ腫に対する 2 つの他の抗体 (XmAb 5574 及び XmAb 2513) は、アミノ酸交換 S 239D 及び I 332E (SDIE 改変) を有する。GA101 と同様に、これらの抗体は、顕著な ADCCC を発揮することが報告され (Horton et al. (2008) 「Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia.」 Cancer Res; 68:8049-8057 ; Foyil, Bartlett NL (2010) 「Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma.」 Curr Hematol Malig Rep 5:140-147)、現在、臨床試験で評価されている。このような市販の結合タンパク質は、ペルツズマブ (抗 CD 20 抗体)、オクレリズマブ (抗 CD 20)、オクラツズマブ (抗 CD 20 抗体)、オビヌツズマブ (抗 CD 20 抗体)、XmAb 5574 (抗 CD 19 抗体)、及び XmAb 2513 (抗 CD 20 抗体) を含む。

【0053】

原理的には、任意の市販の結合タンパク質を、本発明の融合タンパク質に使用することができる。本発明の融合タンパク質に使用することができる更なる例示的、かつ、純粹に例示となる結合タンパク質は、リツキシマブ (抗 CD 20 抗体)、イブリツモマブ (抗 CD 20 抗体)、チウキセタン (抗 CD 20 抗体)、トシツモマブ (抗 CD 20 抗体)、オファツムマブ (抗 CD 20 抗体)、ブレンツキシマブベドチン (抗 CD 30 抗体)、ゲムツズマブ (抗 CD 33 抗体)、オゾガマイシン (抗 CD 33 抗体)、IGN101 (抗 E pCAM 抗体)、アデカツムマブ (抗 E pCAM 抗体)、ラベツズマブ (抗 CEA 抗体)、ミネツモマブ (抗 TAG-72 抗体)、J591 (抗 PSMA 抗体)、hu3S193 (抗ルイス Y 抗体)、IgN311 (抗ルイス Y 抗体)、IM-2C6 (抗 VEGF 抗体)、CDP791 (抗 VEGF 抗体)、ブレバシズマブ (抗 VEGF 抗体)、トラスツズマブ (抗 ERBB2 抗体)、ペルツズマブ (抗 ERBB2 抗体)、MM-121 (抗 ERBB3 抗体)、セツキシマブ (抗 EGFR 抗体)、パニツムマブ (抗 EGFR 抗体)、ニモツズマブ (抗 EGFR 抗体)、806 (抗 EGFR 抗体)、シブロツズマブ (抗 FAP 抗体)、F19 (抗 FAP 抗体)、及び 81C6 (抗テネシン抗体) を含む。本発明により、市販の結合タンパク質が、その非改変対照物と比較して、向上した ADCCC 活性を有するように改変することができる、更に企図される。

【0054】

上記で言及されたように、本明細書で記載されたターゲット細胞に関連する抗原に結合する 1 つの結合部位を有し、一方で、二重特異性結合タンパク質の第 2 の結合部位がエフェクター細胞又はターゲット細胞に関連する抗原に結合する、二重特異性結合タンパク質も想定される。エフェクター細胞に関連する抗原は、例えば、CD3 又は CD16 を含むことができる。

【0055】

種々の二重特異性抗体及び二価抗体フラグメントが、臨床環境において以前から使用されている。本発明の融合タンパク質に使用することもできるこのような二重特異性抗体及び二価抗体フラグメントの例は、BiMAb (抗 CD 16 × 抗 CD 30 二重特異性モノクローナル抗体)、HRS-3/A9 (抗 CD 16 × 抗 CD 30 抗体)、カツマキソマブ (removab、抗 E pCAM × 抗 CD 3)、エルツマキソマブ (抗 HER2 × 抗 CD 3)、SHR-1 (抗 CD 3 × 抗 CD 19)、ブリナツモマブ、CBA-CEACD3 (CD3 × CEA)、BIS-1 (抗 EGFR-2 × 抗 CD 3)、MT-110 (抗 E pCAM × 抗 CD 3)、EGFR Bi (抗 CD 3 × 抗 EGFR BiAb)、CD20 Bi (抗 CD 3 × 抗 CD 20 BiAb)、MGD006 (抗 CD 123 × 抗 CD 3)、FBTA0

5（抗CD20×抗CD3）、MGD007（抗gpA33×抗CD3）、MOR209/E S 414（抗PSMA×抗CD3）、BAY2010112（抗PSMA×抗CD3）、トリオマブ抗体、例えば、抗CD3×抗EpCAMトリオマブ及びEGFR×CD3bsFab₂（Jung et al. Int J Cancer 「Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ T-cell activation and therapeutic efficacy.」 Jan 15;91(2):225-30, 2001）を含む。1つの特定の例では、二重特異性抗体分子は、CD3及びCD19に結合する。このような二重特異性CD3×CD19抗体分子の例は、国際公開公報第99/54440号及び同第2004/106381号に記載された、それらの一本鎖抗体分子を含む。このような市販の結合タンパク質を、それらが本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して向上したADC活性を示すように、改変することもできる。
10

【0056】

ここで、本明細書で記載された任意のこのような結合タンパク質（抗体分子又は抗体様特性を有するタンパク質性結合タンパク質、例えば、「Anticalin（登録商標）」）と本明細書で使用される変異IL-15ポリペプチドとの融合を行うことは、タンパク質の発現及び精製の分野における当業者の知識の範囲内であることが留意される。典型的には、この目的で、発現に基づいて、結合タンパク質のC末端又はN末端のいずれかに変異IL-15ポリペプチドを融合させることができる核酸が生成される。本発明の融合タンパク質における両部分の機能性を維持しながら、変異IL-15ポリペプチドが結合タンパク質にどのようにして融合させるかを（経験的に）決定することは、当業者の知識の範囲内である。
20

【0057】

1つの具体的な実施態様では、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、配列番号：5（4G7における重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、4G7抗体の結合部位を含むことが、更に想定される。本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、追加的に又は代替的に、配列番号：6（4G7における軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、4G7抗体の結合部位も含むことができる。また、これらの結合タンパク質は、本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して、向上したADC活性を示すように改変することもできる。
30

【0058】

また、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、配列番号：7（BV10における重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、BV10抗体の結合部位を含むことも想定される。本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、追加的に又は代替的に、配列番号：8（BV10における軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、BV10抗体の結合部位も含むことができる。また、これらの結合タンパク質は、本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して、向上したADC活性を示すように改変することもできる。
40

【0059】

また、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、配列番号：9（4G8における重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する、4G8抗体の結合部位を含むことができる。
50

9 %、又は100 %の配列同一性を有する、4G8抗体の結合部位を含むことも想定される。本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、追加的に又は代替的に、配列番号：10（4G8における軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80 %、又は少なくとも85 %、又は少なくとも90 %、又は少なくとも95 %、又は少なくとも98 %、又は少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、4G8抗体の結合部位も含むことができる。また、これらの結合タンパク質は、本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して、向上したADC活性を示すように改変することもできる。

【0060】

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、配列番号：11（J591における重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80 %、又は少なくとも85 %、又は少なくとも90 %、又は少なくとも95 %、又は少なくとも98 %、又は少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、J591抗体の結合部位を含むことが、更に想定される。本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、追加的に又は代替的に、配列番号：12（J591における軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80 %、又は少なくとも85 %、又は少なくとも90 %、又は少なくとも95 %、又は少なくとも98 %、又は少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、J591抗体の結合部位も含むことができる。J591抗体は、米国特許第6,107,090号に記載されており、アクセションナンバーATCC HB-12126で登録もされている。また、これらの結合タンパク質は、本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して、向上したADC活性を示すように改変することもできる。上記で言及されたように、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、少なくとも1つの結合部位を含む。ただし、結合タンパク質は、2つ以上（例えば、3つ又は4つ）の結合部位を含むこともできる。

【0061】

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、配列番号：25（K-ro23における重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80 %、又は少なくとも85 %、又は少なくとも90 %、又は少なくとも95 %、又は少なくとも98 %、又は少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、K-ro23抗体の結合部位を含むことが、更に想定される。本発明の融合タンパク質における結合タンパク質は、追加的に又は代替的に、配列番号：26（K-ro23における軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも80 %、又は少なくとも85 %、又は少なくとも90 %、又は少なくとも95 %、又は少なくとも98 %、又は少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、K-ro23抗体の結合部位も含むことができる。また、これらの結合タンパク質は、本明細書で記載された非改変結合タンパク質と比較して、向上したADC活性を示すように改変することもできる。

【0062】

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質の結合部位は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する。ターゲット細胞は、例えば、腫瘍関連抗原（TAA）及び/又は自己免疫疾患に関連する抗原を発現することができる。このようなTAAの非限定的な例は、CD19、CD20、CD10、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD38、CD44v6、CD45、CDw52、Fms様チロシンキナーゼ3（FLT-3、CD135）、c-Kit（CD117）、CSF1R、（CD115）、CD123、CD133、PDGFR-（CD140a）、PDGFR-（CD140b）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4（CSPG4、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）、Muc-1、EGFR、de2-7-EGFR、EGFRvIII、葉酸遮断タンパク質、Her2neu、Her3、PSMA、PSCA、PSA、TAG-72、HLA-DR、IGFR、CD133、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、カーボアンヒドラーIX（MN/CA IX）、ガン胎児抗原（CEA）、EpCAM、CDCP1、デルリン1、テネシン、frizzled1-10、血管抗原VEGFR2（KDR/FLK1）、VEGFR3（F50

L T 4、C D 3 0 9)、エンドグリン、C L E C 1 4、T e m 1 - 8、T i e 2、メソセリン、上皮糖タンパク質2(E G P 2)、上皮糖タンパク質4 0(E G P 4 0)、ガン抗原7 2 - 4(C A 7 2 - 4)、インターロイキン1 3レセプター アルファ-2サブユニット、I L 1 3 R 2、I g カッパ軽鎖()、G D 3 - ガングリオシド(G D 3)、G D 2 - ガングリオシド(G D 2)、G D 2 及びG D 3のアセチル化変異体、C D 1 7 1、N C A M、アルファ葉酸レセプター(F R)、ルイス(Y)、胎児アセチルコリンレセプター(F A R)、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ3(E R B B 3)、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ4(E R B B 4)、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ2(E R B B 2)、肝細胞増殖因子レセプター(H G F R / c - M e t)、クローディン1 8 . 2、クローディン3、クローディン4、クローディン1、クローディン1 2、クローディン2、クローディン5、クローディン8、クローディン7、クローディン6、膜結合C E A、R o b o 4、及びC D 1 3 8を含む。
10

【0063】

自己免疫疾患に関連する例示的な抗原は、C D 2 0、C D 2 2、C D 5 2、及びT N F R、C D 1 9、C D 2 5、C D 4 0を含む。ターゲット細胞は、腫瘍／ガン細胞及び／又はB細胞であることができる。

【0064】

本発明の融合タンパク質は、変異I L - 1 5ポリペプチドも含む。そしてここで、I L - 1 5ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、及び／又は1 1 6位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。このような変異により、配列番号：1(Uniprotナンバー：P 4 0 9 3 3 - 1)の野生型I L - 1 5の親和性と比較して、I L - 1 5 Rに対する低下した親和性を有する、I L - 1 5ポリペプチドがもたらされる。また、I L - 1 5ポリペプチドは、I L - 1 5 Rに全く結合しないこともできる。本発明により、I L - 1 5ポリペプチドは、I L - 2 / I L - 1 5 Rに結合することができることが、更に想定される。ただし、原理的には、配列番号：1の野生型I L - 1 5の親和性と比較して、I L - 1 5 Rに対する低下した親和性を有するI L - 1 5ポリペプチドをもたらす任意のアミノ酸置換／欠失が、本発明により企図される。
20

【0065】

本発明に基づいて使用される場合、「位置」という用語は、本明細書で示されたアミノ酸配列内でのアミノ酸の位置を意味する。本明細書で使用する場合、「対応する」という用語も、位置が先のアミノ酸のナンバーによってのみ決定されないことを含む。置換することができる本発明に基づく所定のアミノ酸の位置は、例えば、(変異又はフラグメントの)I L - 1 5ポリペプチドにおけるどこかでの、欠失又は更なるヌクレオチドにより変化する場合がある。同様に、置換することができる本発明に基づく所定のアミノ酸の位置は、例えば、(変異、フラグメント、又は野生型の)I L - 1 5ポリペプチドにおけるどこかでの、アミノ酸の欠失又は付加により変化する場合がある。
30

【0066】

このため、本発明で使用する場合、「対応する位置」は、アミノ酸が示された位置と異なる場合があるが、それでも、類似する隣接アミノ酸を有する場合があることが理解される。交換され、欠失され、又は付加することができるアミノ酸も、「対応する位置」という用語に含まれる。具体的には、参照配列(サブジェクト配列)、例えば、配列番号：1を、対象となるアミノ酸配列(クエリ配列)とアライメントする場合、当業者は、例えば、本明細書で特定されたアミノ酸位置(すなわち、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の9 3及び／又は1 1 2位に対応する位置)を探す際に、配列番号：4の配列(又は、このタンパク質をコードする対応する核酸配列それぞれ)について、対象となる配列を調査することができる。
40

【0067】

より具体的には、前記位置のアミノ酸「L」又は「E」がそれぞれ、置換の対象である
50

。例えば、前記「L」又は「E」が、別のアミノ酸により置き換えられる。例えば、前記位置の「L」は、「L」以外のアミノ酸により置換される。また、例えば、前記位置の「E」は、「E」以外のアミノ酸により置換される。

【0068】

所定の(変異、フラグメントの)IL-15ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基が、配列番号：1のアミノ酸配列における特定の位置に対応するかどうかを決定するために、当業者であれば、当技術分野において周知の手段及び方法、例えば、手作業又はコンピュータプログラム、例えば、BLAST2.0を使用することによるアライメントを使用することができます。BLAST2.0は、Basic Local Alignment Search ToolもしくはClustalW、又は、配列アライメントを生成するのに適した任意の他の適切なプログラムを表わす。

10

【0069】

本発明の融合タンパク質におけるIL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたIL-15ポリペプチドに対して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%の同一性を有することができる。

【0070】

本発明において使用する場合、「配列同一性」又は「同一性」という用語は、場合により、本発明のIL-15ポリペプチドにおける配列と当該配列との(ホモロジー)アライメントに従って、これら2つの配列のより長い方における残基数に関して、対で同一の残基の割合を意味する。特定は、同一の残基数を残基総数で割り、結果に100を掛けることにより測定される。典型的には、本明細書で特定されたIL-15ポリペプチド配列の配列同一性は、配列番号：1に示されたタンパク質配列におけるアミノ酸と同一の候補配列(対象となる配列)におけるアミノ酸の割合として定義される。

20

【0071】

配列同一性は、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列をアライメントし、必要に応じて、ギャップを導入した後に、配列同一性の一部として保存的置換を何ら考慮することなく、決定することができる。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアライメントは、当業者の範囲内にある種々の方法において、例えば、公衆に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、アライメントを測定するのに適したパラメータを決定することができる。同パラメータは、比較される配列の全長にわたる最大アライメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む。例えば、BLAST2.0(Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHomeも参照のこと)を、ローカル配列アライメントを検索するのに使用することができる。

30

【0072】

IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の93、94、97、98、99、100、114、及び/又は115位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むこともできる。IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の94、97、99、及び/又は100位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むこともできる。IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の94、97、及び/又は98位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むこともできる。IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の94及び/又は98位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むこともできる。

40

【0073】

アミノ酸置換は、この位置でのアミノ酸の変化をもたらす、任意のアミノ酸置換であることができる。一実施態様において、アミノ酸は、酸性アミノ酸、例えば、アスパラギン

50

酸、グルタミン酸、又は、塩基性アミノ酸、例えば、リシンにより置換される。本発明により、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の94位に対応するアミノ酸は、塩基性アミノ酸により置換されることも想定される。塩基性アミノ酸は、例えば、アルギニン、リシン、又はヒスチジン、好ましくは、リシンからなる群より選択することができる。

【0074】

本発明により、少なくとも1つのアミノ酸置換は、L44D、E46K、L47D、V49D、I50D、L66D、L66E、I67D、及びI67Eからなる群より選択される。これらのアミノ酸置換のナンバリングは、配列番号：2、配列番号：3、及び配列番号：4のポリペプチド配列（図5）に対応する。このため、これらのアミノ酸置換は、配列番号：1に関するアミノ酸置換L92D、E94K、L95D、V97D、I98D、L114D、L114E、I115D、及びI115Eに対応する。以下の表3及び表4を参照のこと。10

【0075】

【表3】

表3：

配列番号：1に関するアミノ酸置換のアミノ酸位置	図5における配列番号：2及び配列番号：4に関するアミノ酸置換の対応するアミノ酸位置
L92D	L44D
E94K	E46K
L95D	L47D
V97D	V49D
I98D	I50D

表3：種々の配列番号に関するアミノ酸置換のアミノ酸位置

【0076】

【表4】

表4：

配列番号：1に関するアミノ酸置換のアミノ酸位置	図5における配列番号：3及び配列番号：4に関するアミノ酸置換の対応するアミノ酸位置
L114D	L66D
L114E	L66E
I115D	I67D
I115E	I67E

表4：種々の配列番号に関するアミノ酸置換のアミノ酸位置

【0077】

少なくとも1つのアミノ酸置換は、図5に示された配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸位置の対応において、E46K、V49D、及び/又はI50Dからなる群より選択することもできる。少なくとも1つのアミノ酸置換は、図5に示された配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸位置の対応において、E46K及び/又はI50Dからなる群より選択することもできる。少なくとも1つのアミノ酸置換は、図5に示された配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸位置の対応において、E46Kからなる群より更に選択することもできる。

【0078】

10

20

30

40

50

少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、配列番号：1 のアミノ酸位置の対応において、E 9 4 K、V 9 7 D、及び / 又は I 9 8 D からなる群より選択することもできる。少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、配列番号：1 のアミノ酸位置の対応において、E 9 4 K 及び / 又は I 9 8 D からなる群より選択することもできる。少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、配列番号：1 のアミノ酸位置の対応において、E 9 4 K からなる群より更に選択することができる。

【 0 0 7 9 】

本発明の融合タンパク質における IL - 15 ポリペプチドは、全長 IL - 15 タンパク質又はその任意のフラグメントもしくは変異体であることができ、そしてここで、フラグメント及び又は変異体は、配列番号：1 の野生型 IL - 15 の親和性と比較して、IL - 15 R に対する低下した親和性を有する。本発明により、フラグメント又は変異体は、IL - 2 / IL - 15 R に対する結合能を更に有することができるが、更に想定される。10

【 0 0 8 0 】

このため、IL - 15 ポリペプチド及びその変異体又はフラグメントは、2 つの機能を有する、一方では、IL - 2 / IL - 15 R に結合することができ、一方では（及び同時に）、配列番号：1 の野生型 IL - 15 の親和性と比較して、IL - 15 R に対する低下した親和性を有する。

【 0 0 8 1 】

IL - 15 ポリペプチドフラグメントは、IL - 2 / IL - 15 R に結合し、一方では（及び同時に）、配列番号：1 の野生型 IL - 15 の親和性と比較して、IL - 15 R に対する低下した親和性を有する、IL - 15 ポリペプチドの任意のフラグメントであることができる。フラグメントは、本発明の融合タンパク質の IL - 15 ポリペプチドより少ないアミノ酸を含むことができる。このようなフラグメントは、配列番号：1 に関するアミノ酸欠失を含むことができる。IL - 15 ポリペプチドフラグメントは、162 個未満のアミノ酸長、例えば、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、又は更に、50 個未満のアミノ酸長を有することができる。例示的なフラグメントは、配列番号：4 に示されたアミノ酸配列からなる、又は、同配列を少なくとも含む、IL - 15 ポリペプチドであることができる。同 IL - 15 ポリペプチドは、配列番号：4 に示されたアミノ酸配列の 40、41、42、43、44、45、46、47、48、60、61、62、63、及び / 又は 64 位に対応する 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。このような IL - 15 フラグメントは、当然、（配列番号：4 における各配列位置に対応する）配列番号：1、2、又は 3 に関して、本明細書で記載されたアミノ酸置換を含むことができる。IL - 15 ポリペプチドフラグメントは、配列番号：1 の レセプター結合に重要なアミノ酸を、少なくとも含むことができる。例えば、IL - 15 ポリペプチドフラグメントは、配列番号：1 のアミノ酸位置 55、56、58、59、116、117、156、157、160 を含むアミノ酸配列を有することができる。30

【 0 0 8 2 】

IL - 15 ポリペプチド変異体は、本発明の融合タンパク質における IL - 15 ポリペプチドに関して、更なるアミノ酸置換又は挿入を含むことができる。このため、IL - 15 ポリペプチドは、配列番号：1 に示された IL - 15 ポリペプチドに対して、少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は 99% の同一性を有することができる。40

【 0 0 8 3 】

一般的には、「親和性」という用語は、エピトープと結合タンパク質の結合部位との間の相互作用強度を意味する。所定の結合タンパク質 / IL - 15 ポリペプチドの親和性を決定するための方法は、当業者に周知である。変異 IL - 15 ポリペプチドの結合親和性は、複数の方法、例えば、蛍光滴定、競合的 E L I S A、又は表面プラズモン共鳴（BIAcore（商標））により測定することができる。IL - 15 R に対する低下した親和性を50

有する IL - 15 ポリペプチドは、配列番号：1の野生型 IL - 15 の IL - 15 R に対する親和性と比較して、IL - 15 R に対するより低い親和性を有する。本発明により、本発明の融合タンパク質における IL - 15 ポリペプチドは、配列番号：1の野生型 IL - 15 の IL - 15 R に対する親和性より、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%低い、IL - 15 R に対する親和性を有することも想定される。

【0084】

本明細書で記載された結合タンパク質及び IL - 15 ポリペプチドについて、結合親和性が 10^{-7} M超である場合、結合は、特異的であると考えられる。特に、結合親和性が約 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ M (K_D) 又は約 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ M以上である場合、結合は特異的であると考えられる。このため、第1の結合部位及び / 又は第2の結合部位を有する結合タンパク質と IL - 15 ポリペプチドとは、ピコモル濃度 (10^{-12} Mの K_D を有する)においても、本発明に包含される。

【0085】

IL - 2 / IL - 15 R を、本発明の薬学的使用によるエフェクター細胞により発現することができることも、本発明により想定される。このことは、エフェクター細胞が IL - 2 / IL - 15 R を発現することができることを意味する。例示定なエフェクター細胞は、NK 細胞又はT 細胞、例えば、CD8+ 細胞、ガンマデルタ T 細胞、又はNK T 細胞を含む。エフェクター細胞は、CD8+ T 細胞又はNK 細胞であることもできる。

【0086】

本発明の融合タンパク質における結合タンパク質及び IL - 15 ポリペプチドは、リンカーを更に含むことができる。このことは、リンカーが存在しない場合があること、及び、IL - 15 ポリペプチドが結合タンパク質に直接結合する場合があることも意味する。ただし、リンカーは、結合タンパク質と IL - 15 ポリペプチドとを結合するのに存在することもできる。

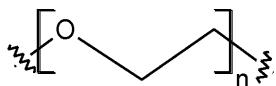
【0087】

後者の場合、リンカーは、原理的に、結合タンパク質及び IL - 15 ポリペプチドのあらゆる箇所に、通常、融合タンパク質の一方の部分のC末端と他方の部分のN末端との間に付着することができる。適切なリンカーは、当技術分野において公知であり、例えば、Chen et al. (2013) 「Fusion protein linkers: property, design and functionality」 Adv Drug Deliv Rev; 65(10):1357-69に記載されている。したがって、リンカーは、当技術分野において公知の任意のリンカーであることができる。

【0088】

リンカーは、例えば、活性化された側鎖基、例えば、アミノ、チオール、又はヒドロキシル基を介して、両パートナーに結合する直鎖又は分岐の炭化水素系部分であることができる。リンカーは、環状部分を含むこともできる。リンカー部分が炭化水素系部分である場合、リンカーの主鎖は、炭素原子のみを含むことができるが、ヘテロ原子、例えば、酸素 (O)、窒素 (N)、又は硫黄 (S) 原子を含有することもできる。リンカーは、例えば、 $C_1 \sim C_{20}$ 炭素原子鎖又はポリエーテル系鎖、例えば、 $-(O-CH_2-CH_2)$ - 繰返し単位を含むポリエチレングリコール系鎖を含む。炭化水素系リンカーの典型的な実施態様では、結合部分は、1 ~ 約 150、1 ~ 約 100、1 ~ 約 75、1 ~ 約 50、又は1 ~ 約 40、又は1 ~ 約 30、又は1 ~ 約 20、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、及び 19 個を含む主鎖原子を含むことができる。例えば、リンカーは、

【化1】



10

20

30

40

50

[式中、nは、0～20又は1～10又は1～5の整数であるか、あるいは、nは、3である。このため、例えば、nは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20であることができる]を含むことができる。

【0089】

ただし、リンカーは、リンカーが本融合タンパク質の一方又は両方の部分の機能と干渉しない限り、任意の適切な長さのペプチドリンカーであることもできる。リンカーは、2つ以上、5つ以上、10個以上、15個以上、又は20個以上のアミノ酸残基を含むことができる。ペプチドリンカーは、任意のアミノ酸残基を含むことができる。一実施態様において、ペプチドリンカーは、小型又は極性アミノ酸、例えば、Gly及びSerを豊富に含んでいることができるが、柔軟性を維持するための更なるアミノ酸、例えば、Thr及びAla、ならびに、安定性を改善するための極性アミノ酸、例えば、Lys及びGluを含有することができる。例示となる柔軟なリンカーは、(GGGGS)_n(式中、nは、1～7の数字であることができる)(配列番号：13)、KESGSVSSSEQLAQFRSLD(配列番号：14)、及びEGKSSGSGSESKST(配列番号：15)、(Gly)₈(配列番号：16)、GSAGSAAAGSGEF(配列番号：17)、(Gly)₆(配列番号：18)を含むが、これらに限定されない。

【0090】

例示となる剛直なリンカーは、A(EAAAAK)_nA(式中、nは、1～7の数字であることができる)(配列番号：19)、(XP)_n(式中、nは、1～13の数字であることができ、Xは、任意のアミノ酸、好ましくは、Ala、Lys、又はGlu、(Ala-Pro)₇を指定することができる(配列番号：20)、又は、-Glu-Pro-もしくは-Lys-Pro-の繰返しを含有する33個の残基のペプチドを含むが、これらに限定されない。例示となるin vivo開裂性リンカーは、例えば、LEAGCKNFFPRSFSCGSL(配列番号：21)、G-S-S-T(配列番号：22)、CRRRRRREAEAC(配列番号：23)を含む。

【0091】

一実施態様において、本発明の融合タンパク質は、リンカーを含み、同リンカーは、グリシン及びセリンを含む。リンカーは、例えば、アミノ酸配列GGGGSGGGGGSGGGSGS((4-グリシン-1-セリン)₄;配列番号：24)を含むことができる。例えば、「グリシン-セリン」リンカーのN末端及び/又はC末端のいずれかには、IL-15ポリペプチド及び/又は結合タンパク質間に配列される、更なるアミノ酸を含有させることができ。これらの更なるアミノ酸は、例えば、本発明の融合タンパク質を生成するのに使用されるクローニング戦略のために存在させる場合がある。1つのこのような実例において、「グリシン-セリン」リンカー、例えば、(GGGGS)₄リンカーは、更なるN末端セリンを有することができる(例えば、図6に示された融合タンパク質を参照のこと)。

【0092】

ただし、リンカーは、結合タンパク質及びIL-15ポリペプチドの1つ以上の実際の結合部位には付着しないであろう。例えば、リンカーは、多くの場合、抗体又は抗体フラグメントのCDR3領域に付着しないであろう。

【0093】

抗体系結合タンパク質について、リンカーは、例えば、抗体分子(結合タンパク質)のFab部分又はFc部分に付着することができる。とりわけ、リンカーは、本発明の融合タンパク質における結合タンパク質のCH3、CH2、又はCH1ドメインに付着することができる。このため、リンカーは、結合タンパク質における最外部である領域に付着することができる。このことは、例えば、リンカーが、例えば、CH3欠失結合タンパク質におけるCH2ドメインに、又は、CH2/CH3欠失結合タンパク質におけるCH1に付着することができる。2つのリンカーが、結合タンパク質、例えば、抗体の2つのCH

10

20

30

40

50

3領域に付着していることも、本発明により想定される。これにより、各CH3ドメインは、付着した1つのリンカーを有する。ただし、リンカーは、所定の結合タンパク質の一方のみのCH3領域に付着することもできる。一実施態様において、IL-15ポリペプチドは、結合タンパク質のCH3ドメインに、リンカーを介して結合している。

【0094】

ただし、例えば、結合タンパク質が抗体のV_H及びV_L鎖のみからなる場合には、リンカーは、2つの鎖を連結しているヒンジ領域に付着していることもできる。二重特異性結合タンパク質、例えば、BiTE構築物、例えば、ブリナツモマブ等の場合には、リンカーは、2種類の結合部位を連結しているリンカーに付着することもできる。

【0095】

本明細書で指摘されたように、典型的には、リンカーは、本明細書で記載された結合タンパク質のFcドメインに付着している。特に、典型的には、このようなドメインを含まない結合タンパク質に、CH1、CH2、及び/又はCH3ドメインを融合させることが付加的に可能である。例えば、これは、本明細書で記載された抗体様結合性を有するタンパク質性結合分子について、又は、本明細書で記載された免疫レセプターもしくはそのリガンドについて行うことができる。例えば、このようなCH1、CH2、及び/又はCH3ドメインは、リポカリン分子に、例えば、タンパク質性結合分子をコードする配列に対してこれらのドメインをクローニングすることにより融合させることができる。このような場合、例えば、1つのリンカー又は2つ以上のリンカーが、これらのCH1、CH2、及び/又はCH3ドメインに付着することもできる。

【0096】

1つの例示的な実施態様では、本発明の融合タンパク質は、抗原として、エンドグリン(CD105)に結合することができ、このため、エンドグリン結合する結合タンパク質を含むことができる。結合タンパク質は、例えば、抗体分子又はリポカリン突然変異タンパク質であることができる。エンドグリンは、内皮細胞において過剰発現しており、血管新生に必須のタンパク質であるため、腫瘍成長、ガン細胞の生存及び身体内の他の場所への転移に重要なタンパク質である。エンドグリンは、血管新生内皮細胞上に、高密度で選択的に発現され、低酸素誘引因子-1a(HIF-1a)の誘引による低酸素によりアップレギュレーションされる。エンドグリン発現は、VEGF経路の阻害後に、腫瘍内皮細胞においてもアップレギュレーションされる。固体腫瘍を有する患者において、エンドグリン免疫組織化学により評価された高い腫瘍微小血管密度が、乏しい予後に関連している。本発明の融合タンパク質に使用することができる例示的なエンドグリン結合抗体は、K-ro23である。K-ro23は、Schwartz, K, doctoral thesis, 2013, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany, 「Generierung, praklinische Charakterisierung und Optimierung monoklonaler Antikörper zur anti-angiogenetischen Therapie solider Tumoren」に記載されている。本発明の融合タンパク質に使用することができる別の例示的なエンドグリン結合抗体は、TRC05と呼ばれる抗体である。同抗体の可変ドメインは、Seon et al., (2011), Endoglin targeted cancer therapy, Curr Drug Deliv, 8(1):135-143に記載されている。抗体TRC105は、現在、多発性個体腫瘍型の処置用の臨床試験において研究されおり、第1相及び第2相臨床試験が完了している。したがって、本発明の融合タンパク質は、好ましくは、K-ro23又はTRC105の抗体結合部位を含むことができる。この抗体結合部位は、配列番号：27に対して、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも85%、好ましくは、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、好ましくは、少なくとも99%、好ましくは、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、又は好ましくは、同アミノ酸配列からなることができる。前記融合タンパク質は、配列番号：28に対して、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも85%、好ましくは、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、好ましくは、少なくとも98%、好ましくは、少なくとも99%、好ましくは、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、又は好ましくは、同アミノ酸配列からなるIgG軽鎖に更に付着することができ、好ましくは、同

10

20

30

40

50

軽鎖に共有結合することができる。

【0097】

本発明の融合タンパク質に含まれる結合部位についての別の好ましい結合パートナーは、フィブロネクチン、好ましくは、フィブロネクチンのエクストラドメイン - B である。エクストラドメイン - B 含有フィブロネクチン (E D B - F N) は、細胞接着及び遊走を媒介する高分子量糖タンパク質である。 E D B - F N の発現は、数多くのガン関連生物学的プロセス、例えば、腫瘍形成、血管新生、表皮から中皮への転移 (E M T) に関連する。このため、本発明の融合タンパク質の好ましい実施態様は、フィブロネクチン、好ましくは、フィブロネクチンのエクストラドメイン - B に特異的に結合する抗体分子と、本明細書で記載された I L - 1 5 変異体とを含むことができる。別の好ましい実施態様では、結合パートナーは、国際公開公報第 2 0 1 1 / 0 6 9 9 9 2 号に記載され、フィブロネクチンのエクストラドメイン B に結合するリポカリン突然変異タンパク質であることができる。
10

【0098】

本発明の融合タンパク質に含まれる結合部位についての更に好ましい結合パートナーは、テナシン、好ましくは、種々のアイソマーのテナシン C である。テナシン C (T N - C) は、ヒトにおいて、 T N C 遺伝子によりコードされる糖タンパク質である。テナシン C は、数多くの種類のガン、例えば、骨肉腫、軟骨肉腫、膀胱ガン、及びグリオblastoma に関する。グリオblastoma 細胞において、テナシン - C 発現は、ガンの予後及び腫瘍進行に関して、非常に臨床的及び機能的有意差を提供する。このため、本発明の融合タンパク質の好ましい実施態様は、テナシン、好ましくは、テナシン c に特異的に結合する抗体分子と、本明細書で記載された I L - 1 5 変異体とを含むことができる。
20

【0099】

本発明の融合タンパク質に含まれる更に好ましい結合パートナーは、炭水化物抗原、例えば、ガングリオシド G D 2 及び G D 3 、ならびにそのアセチル化変異体である。このような抗原は、大部分のガンの細胞表面上で発現されており、正常組織でのその発現は、多く場合、制限されている。 G D 2 抗体及びそれから得られる免疫サイトカインは、神経芽細胞種を有する小児の処置に成功して使用してきた（例えば、 Navid et al, Immune Therapies for Neuroblastoma, Cancer Biol Ther. 2009 May; 8(10): 874-882 を参照のこと。同文献では、抗 G D 2 抗体、例えば、マウスモノクローナル抗 G D 2 抗体 3 F 8 又はキメラ抗体 C h 1 4 . 1 8 及び免疫サイトカイン c h 1 4 . 1 8 - I L - 2 (抗体 1 4 . 1 8 の F c 部分は、 I L - 2 に結合した) についての臨床試験の結果が報告されている）
30
。

【0100】

また、本発明は、 I L - 2 / I L - 1 5 R を発現しているエフェクター細胞のターゲット細胞限定活性化に使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。「ターゲット細胞限定エフェクター細胞活性化」という用語は、 I L - 2 / I L - 1 5 R 発現エフェクター細胞がターゲット細胞の存在下において活性化されることを意味する。この活性化は、本発明の融合タンパク質により達成される。一方、本発明の融合タンパク質は、本明細書で記載された I L - 1 5 ポリペプチドを含む。同 I L - 1 5 ポリペプチドは、 I L - 2 / I L - 1 5 R 発現エフェクター細胞に結合する。加えて、本発明の融合タンパク質は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する少なくとも 1 つの結合部位を含む結合タンパク質を含む。このため、理論に拘束されるものではないが、エフェクター細胞とターゲット細胞とを互いに近づけることにより、エフェクター細胞は、その機能、例えば、ターゲット細胞特異的な方法でターゲット細胞殺傷を媒介することができる。このため、本発明は、 I L - 2 / I L - 1 5 R を発現しているエフェクター細胞により媒介されるターゲット細胞限定ターゲット細胞殺傷に使用するための、本発明の融合タンパク質にも関する。例えば、本発明の融合タンパク質は、本明細書で記載された向上した A D C C 活性を有さない非改変結合タンパク質を含む融合タンパク質の細胞溶解活性と比較して、 N K 細胞及び T 細胞、好ましくは、 N K 細胞、ガンマデルタ T 細胞、 N K T 細胞、及
40
50

び C D 8 + T 細胞の細胞溶解活性を向上させるのに使用することができる。

【 0 1 0 1 】

また、本発明は、疾患の処置に使用するための、本発明の融合タンパク質に関する。この処置は、エフェクター細胞の結合に基づく任意の処置であることができる。さらに、この用語は、エフェクター細胞の結合による特異的なターゲット細胞関連抗原に対する任意の治療を意味する。例えば、疾患の処置は、増殖性疾患又は自己免疫疾患の処置であることができる。

【 0 1 0 2 】

増殖性疾患の例示的かつ非限定的な例は、副腎ガン、肛門ガン、胆管ガン、膀胱ガン、骨ガン、脳及び脊髄腫瘍、乳ガン、キャッスルマン病、子宮頸ガン、結腸ガン、子宮内膜ガン、食道ガン、ユーイング腫瘍、眼ガン、胆嚢ガン、消化管カルチノイド、消化管間質腫瘍（G I S T）、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カポジ肉腫、腎臓ガン、喉頭部及び下咽頭ガン、白血病、急性リンパ球性白血病（A L L）、急性骨髓性白血病（A M L）、慢性リンパ球性白血病（C L L）、慢性骨髓性白血病（C M L）、慢性骨髓単球性白血病（C M M L）、肝臓ガン、肺ガン、非小細胞肺ガン、小細胞肺ガン、肺カルチノイド、リンパ腫、皮膚のリンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群、鼻腔及び副鼻腔ガン、上咽頭ガン、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔及び口咽頭ガン、骨肉腫、卵巣ガン、膵臓ガン、陰茎ガン、下垂体腫瘍、前立腺ガン、直腸ガン、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺ガン、肉腫、皮膚ガン、基底細胞及び扁平上皮細胞ガン、メラノーマ、メルケル細胞ガン、小腸ガン、胃ガン、精巣ガン、胸腺ガン、甲状腺ガン、子宮肉腫、腫瘍ガン、外陰ガン、ワルデンシュトライム型マクログロブリン血症、又はウィルムス腫瘍を含む。増殖性疾患は、白血病又はリンパ腫であることもできる。

10

【 0 1 0 3 】

自己免疫疾患の非限定的な例は、全身性エリテマトーデス（S L E）、グッドパスチャーリー症候群、サルコイドーシス、強皮症、関節リウマチ、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、強皮症、皮膚筋炎、乾癬、白斑症、円形脱毛症、I 型糖尿病、自己免疫性脾炎、橋本甲状腺炎、アジソン病、多発性硬化症、重症筋無力症、結節性多発動脈炎、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、抗リン脂質抗体症候群、悪性貧血、胃腸疾患、セリアック病、炎症性腸疾患、自己免疫性肝炎、又は原発性胆汁性肝硬変を含む。

20

【 0 1 0 4 】

30

本発明の融合タンパク質について、一般的には、ヒトの患者への I L - 1 5 の適用後に観察される副作用を減少させることを意図している（Conlon et al. (2015) 「Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer.」 J Clin Oncol. 33(1):74-82）。特に、これらの「副作用」は、患者に有益でないネガティブな副作用である。理論に拘束されるものではないが、このようなネガティブな副作用は、非特異的な（ターゲット細胞特異的でないことを意味する）エフェクター細胞活性化によると考えられる。このため、本発明の融合タンパク質は、エフェクター細胞のターゲット細胞限定活性化を提供するために、これらの副作用を、減らし、又は更に、減少させることができる。

40

【 0 1 0 5 】

したがって、エフェクター細胞の「非特異的エフェクター細胞活性化」又は「オフターゲット活性化」は、本明細書で記載された結合タンパク質のターゲット細胞に関連する抗原への結合に関連しないエフェクター細胞の任意の活性化であることができる。このため、例えば、オフターゲットエフェクター細胞活性化は、ターゲット細胞非依存性エフェクター細胞活性化であることができる。一実施態様において、非特異的エフェクター細胞活性化は、ターゲット細胞の不存在下におけるエフェクター細胞の活性化を含む。

【 0 1 0 6 】

副作用の実例は、輸注反応、体温上昇 / 発熱、呼吸困難、循環系の問題、免疫原性、過敏症反応、免疫サプレッション、感染、貧血、自己免疫性悪性貧血、白血球減少症、血小

50

板減少症、汎血球減少症、血球減少症、心不全の悪化、腫瘍溶解、サイトカイン放出症候群、甲状腺障害、心毒性、局所的な皮膚反応、肝臓トランスマニナーゼの上昇、低血圧、血清病、皮膚粘膜反応、肝炎再活動化、進行性多巣性白質脳症（PML）、腎毒性、心不整脈を含む。

【0107】

本発明の融合タンパク質は、本発明の融合タンパク質の結合タンパク質と、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の92、93、94、95、96、97、98、99、100、112、113、114、115、及び／又は116位に対応する1つ以上の位置に少なくとも1つのアミノ酸置換を含まないIL-15ポリペプチドとを含む融合タンパク質に使用される用量と比較して、投与される融合タンパク質の用量を増大させるのに使用することもできる。 10

【0108】

再度、本願の背景にある合理的な根拠は、本発明の融合タンパク質のターゲット細胞限定的な作用モードである。融合分子の活性がよりターゲット限定的であるほど、予測される副作用がより小さくなるため、投与量をより多くすることができる。このため、本発明の融合タンパク質は、本明細書で記載された結合タンパク質と（例えば、配列番号：1の）野生型IL-15ポリペプチドとを含む融合タンパク質に使用される用量と比較して、投与される本発明の融合タンパク質の用量を増大させるような方法で、処置に使用することができる。 20

【0109】

投与される本発明の融合タンパク質の「用量」は、所望の予防的效果又は治療的応答を達成するのに、広い範囲内で変動させることができる。例えば、用量は、選択されたターゲットに対する結合タンパク質の親和性、及び、結合タンパク質／IL-15ポリペプチドとターゲット抗原との間の複合体のin vivoにおける半減期により決まるであろう。さらに、最適な用量は、本発明の融合タンパク質の生体分布、投与方式、処置される疾患／障害の重症度、及び、対象／患者の健康状態により決まるであろう。例えば、局所投与用の軟膏に使用される場合、高濃度の本発明の融合タンパク質を使用することができる。 30

【0110】

任意の適切な用量の本発明の融合タンパク質を使用することができる。例えば、本発明の融合タンパク質の適切な用量を経験的に決定することは、当業者の知識の範囲内である。例示的な実施態様では、本融合タンパク質は、患者の体重1kgあたりに約0.3mg、体重1kgあたりに約0.5mg、体重1kgあたりに約1mg、体重1kgあたりに約2mg、最高20mg/kgの用量、又は、更に高い用量で使用することができる。この用量は、最高20mg/m²/日、15mg/m²/日、10mg/m²/日、7.5mg/m²/日、6mg/m²/日、4mg/m²/日以下であることもできる。 30

【0111】

また、本発明は、本発明の融合タンパク質と、場合により、薬学的に許容し得る賦形剤とを含む、医薬組成物に関する。したがって、本発明の融合タンパク質は、薬学的に許容し得る成分と、確立された調製法（Gennaro, A.L. and Gennaro, A.R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）とを使用して、組成物に配合することができる。医薬組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機又は有機の賦形剤を使用することができる。例えば、丸剤、粉末剤、ゼラチンカプセル剤、又は坐剤を調製するために、例えば、ラクトース、タルク、ステアリン酸及びその塩、脂肪、ロウ、固体状又は液状のポリオール、天然油及び硬化油を使用することができる。液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル混合物、又は、使用前に液剤又はエアロゾル混合物に再構成するための粉末剤の製造に適した賦形剤は、水、アルコール、グリセロール、ポリオール、及びそれらの適切な混合物、ならびに、植物油を含む。 40

【0112】

本医薬組成物は、添加剤、例えば、充填材、バインダー、湿潤剤、滑剤、安定剤、保存剤、乳化剤、及び更に、溶媒、もしくは溶解剤、又は、貯蔵効果を達成するための作用物質等を含有することもできる。後者は、融合タンパク質が遅効性もしくは持続性放出、又は、ターゲット送達システム、例えば、リポソーム及びマイクロカプセルに包含させることができる。

【0113】

この製剤は、細菌保持フィルタによるろ過を含めた数多くの手段により、又は、滅菌水もしくは他の無菌媒体中に使用直前に溶解させ、又は、分散させることができる無菌の固体組成物の形態で滅菌剤を包含させることにより、滅菌することができる。本発明の融合タンパク質についての数多くの可能性のある用途が、医学に存在している。

10

【0114】

また、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子に関する。本核酸分子は、DNA又はRNAであることができ、ゲノム又は合成起源のものであることができ、一本鎖又は二本鎖であることができる。核酸の例は、mRNA、cRNA、合成RNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、DNAとRNAとのコポリマー、オリゴヌクレオチド等を含む。各核酸は、非天然ヌクレオチド類似物を更に含有することができ、及び/又は、親和性タグ又はラベルに結合させることができる。同タグ又はラベルを、例えば、本融合タンパク質に含ませることもできる。このような親和性タグは、hisタグ、flagタグ、strepタグ、HAタグ、カルモデュリンタグ、又はGFPタグであることができる。また、本発明の核酸分子は、例えば、ベクターに含ませることができる。また、本発明は、本発明の核酸分子又は本明細書で記載されたベクターを含む、ホスト細胞に関する。

20

【0115】

また、本発明は、融合タンパク質の発現のために、融合タンパク質の発現を可能にする条件下において、融合タンパク質をコードする核酸を使用することを含む、本発明の融合タンパク質を製造するための方法に関する。一実施態様において、本融合タンパク質は、ホスト細胞により、又は、細胞フリー系において発現される。

【0116】

また、本発明は、治療的に有効量の本発明の融合タンパク質を、対象に投与することを含む、疾患を処置する方法に関する。疾患は、例えば、本明細書で記載された増殖性又は自己免疫疾患であることができる。

30

【0117】

「投与」という用語は、治療的に有効な用量の融合タンパク質を、対象に投与することを意味する。「投与すること」という用語も、融合タンパク質を生物の組織内に包含させる方法に関する。種々の経路の投与が可能である。本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を、例えば、種々の方法、例えば、(好ましくはタンパク質性)薬剤について治療的に有効な任意の非経口又は非経口以外(経腸又は局所)経路により投与することができる。非経口投与法は、例えば、注射液、注入液、又はチンキの形態における、例えば、皮下、筋肉内、脳内、脳室内、くも膜下腔内、鼻内、心房内、腹腔内、又は静脈内への注射及び注入技術を含む。非経口以外の送達方式は、例えば、丸剤、錠剤、カプセル剤、液剤、又は懸濁剤の形態における、例えば、経腸送達方式、例えば、経口送達、又は、例えば、坐剤の形態での直腸にである。ただし、非経口送達が好ましい。局所投与経路は、皮膚上又は吸入投与を含む。肺薬剤送達、すなわち、(鼻内投与にも使用することができる)エアロゾルの吸入又は気管内点滴のいずれかについての概観は、Patton et al. (2004)、例えば、(J.S. Patton et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. Proc. Amer. Thoracic Soc. 2004 Vol. 1 pages 338-344)に提供される。一般的には、本発明の融合タンパク質及び医薬組成物は、必要に応じて、本明細書で記載された従来の無毒性の薬学的に許容し得る賦形剤又は担体、添加剤及び媒体を含有する製剤において投与することができる。

40

【0118】

50

特に、「治療的」又は「治療効果」という用語は、異常な状態を引き起こし又は同状態に関与している因子の阻害又は活性化を意味する。例えば、治療効果は、エフェクター細胞により媒介されるターゲット細胞の殺傷であることができる。このため、このような治療効果を、例えば、本発明の融合タンパク質又は医薬組成物の投与前の対象と比較して、本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を受けた対象における、例えば、腫瘍サイズの減少又はB細胞量の減少を測定することにより、測定することができる。

【0119】

本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を、他の治療との同時処置に使用することもできる。このような同時処置は、好ましくは、医薬の形態における、本発明の融合タンパク質又は医薬組成物の、疾患、例えば、増殖性又は自己免疫疾患を患う対象への投与と、別の医薬／薬剤の投与とを含むことができる。このような更なる薬剤の例は、化学療法、放射線療法に使用される薬剤、血管新生阻害剤、又はガンワクチンである。このような更なる薬剤の更なる例は、甲状腺補充、ビタミン、例えば、B12、又はインスリン注入、免疫サプレッション、例えば、コルチゾール、ナタリズマブ、又はインフリキシマブである。

10

【0120】

本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を、対象に投与することもできる。「対象」という用語は、ヒト又は動物を意味することもできる。対象は、ガン又は自己免疫疾患を患っている対象であることもできる。対象は、脊椎動物、より好ましくは、哺乳類であることができる、哺乳類は、家畜動物、競技動物、ペット、靈長類、マウス、及びラットを含むが、これらに限定されない。好ましくは、哺乳類は、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、マウス、ラット等であり、特に好ましくは、人間である。このため、一実施態様において、対象は、脊椎動物、好ましくは、人間である。

20

【0121】

また、本発明は、疾患を有する対象を処置するための医薬の製造における、本発明の融合タンパク質又は本発明の医薬組成物の使用に関する。

【0122】

また、本発明は、本発明の融合タンパク質を含む、キットに関する。このようなキットは、

- a) 1つ以上のバッファー、
- b) 1つ以上のプロトコール

30

を更に含むことができる。

【0123】

適切なバッファーは、本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を保存することができ、又は、本発明の融合タンパク質又は医薬組成物を対象に直接投与することができる、バッファーを含む。後者の場合、このようなバッファーは、無毒性の生理学的許容し得るバッファーである。

【0124】

また、本発明は、治療における非特異的なターゲット細胞活性化を減少させるための方法であって、治療が、本発明の融合タンパク質を対象に投与することを含む、方法に関する。

40

【0125】

加えて、本発明は、治療における副作用を減少させるための方法であって、治療が、本発明の融合タンパク質を対象に投与することを含む、方法に関する。副作用の実例は、輸注反応、体温上昇／発熱、呼吸困難、循環系の問題、免疫原性、過敏症反応、免疫サプレッション、感染、貧血、白血球減少症、血小板減少症、心不全の悪化、腫瘍溶解、サイトカイン放出症候群、甲状腺障害、心毒性、局所的な皮膚反応、甲状腺障害、肝臓トランスアミナーゼの上昇、低血圧、血清病、皮膚粘膜反応、肝炎再活動化、進行性多巣性白質脳症（PML）、腎毒性、心不整脈の内の少なくとも1つを含む。

【0126】

50

また、本発明は、治療における融合タンパク質の用量を増大させる方法にも関し、該治療は対象に本発明の融合タンパク質を投与することを含む。

【0127】

また、本発明は、治療における融合タンパク質の用量を増大させるための方法であって、治療が、本発明の融合タンパク質を対象に投与することを含む、方法に関する。

【0128】

本発明は、下記項により更に特徴付けられる。

【0129】

1. a) 少なくとも1つの結合部位を含む結合タンパク質であって、結合部位は、ターゲット細胞に関連する抗原に結合する結合タンパク質と、
10

b) IL-15ポリペプチドであって、IL-15ポリペプチドは、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の92、93、94、95、96、97、98、99、100、112、113、114、115、及び／又は116位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことにより、配列番号：1(Uniprotナンバー：P40933-1)の野生型IL-15の親和性と比較して、IL-15Rに対する低下した親和性を有するIL-15ポリペプチドとを含む、

融合タンパク質。

【0130】

2. 結合タンパク質が、抗体、二価の抗体フラグメント、一価の抗体フラグメント、又は抗体様結合性を有するタンパク質性結合分子からなる群より選択される、項1記載の融合タンパク質。
20

【0131】

3. 二価の抗体フラグメントが、(Fab)2'フラグメント、二価の一本鎖Fvフラグメント、bsFc-1/2-二量体、又はbsFc-CH3-1/2二量体である、項2記載の融合タンパク質。

【0132】

4. 一価の抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(scfv)、又はscFv-Fcフラグメントからなる群より選択される、項2記載の融合タンパク質。

【0133】

5. 抗体様結合性を有するタンパク質性結合分子が、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づく突然変異タンパク質、グルボディ(glubody)、アンキリン足場に基づくタンパク質、結晶性足場に基づくタンパク質、アドネクチン、アビマー、又は(リコンビナント)レセプタータンパク質からなる群より選択される、項2記載の融合タンパク質。
30

【0134】

6. 結合タンパク質が、非改変結合タンパク質と比較して、向上した抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を有するように改変されている、項2～4のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0135】

7. 改変結合タンパク質が、Fc最適化されている、項6記載の融合タンパク質。
40

【0136】

8. 改変結合タンパク質が、抗体、scFv-Fcフラグメント、bsFc-1/2二量体、又はbsFc-CH3-1/2二量体である、項7記載の融合タンパク質。

【0137】

9. Fc最適化が、アミノ酸置換を含み、同アミノ酸置換が、F243L及び／又はD270E及び／又はR292P及び／又はS298A及び／又はS298N及び／又はY300L及び／又はS305I及び／又はA330V及び／又はA330L及び／又是I332E及び／又是E333A及び／又是K334A及び／又是P396L及び／又是S239D、好ましくは、S239D及びI332Eからなる群より選択され、そしてここで
50

、位置ナンバリングが、E U インデックスによる、項 7 又は 8 記載の融合タンパク質。

【 0 1 3 8 】

1 0 . 改変結合タンパク質が、非改変結合タンパク質の F c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンとは異なる、F c 結合オリゴ糖のグリコシル化パターンを有する、項 6 記載の融合タンパク質。

【 0 1 3 9 】

1 1 . 改変結合タンパク質が、非改変結合タンパク質より少なくフコシル化されている、項 1 0 記載の融合タンパク質。

【 0 1 4 0 】

1 2 . 改変結合タンパク質が、フコシル化されていない、項 1 1 記載の融合タンパク質

。

【 0 1 4 1 】

1 3 . 組合タンパク質が、4 G 7 抗体の結合部位を含み、同結合部位が、配列番号：5（4 G 7 の重鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 8 5 %、又は少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、項 2 ~ 4 、6 ~ 1 2 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【 0 1 4 2 】

1 4 . 組合タンパク質が、4 G 7 抗体の結合部位を含み、同結合部位が、配列番号：6（4 G 7 の軽鎖の可変ドメイン配列）に対して、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 8 5 %、又は少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、項 2 ~ 4 、6 ~ 1 3 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【 0 1 4 3 】

1 5 . ターゲット細胞が、腫瘍関連抗原（T A A）及び / 又は自己免疫疾患に関連する抗原を発現している、項 1 ~ 1 4 のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【 0 1 4 4 】

1 6 . T A A が、C D 1 9 、C D 2 0 、C D 1 0 、C D 2 1 、C D 2 2 、C D 2 5 、C D 3 0 、C D 3 3 、C D 3 4 、C D 3 7 、C D 3 8 、C D 4 4 v 6 、C D 4 5 、C D w 5 2 、F m s 様チロシンキナーゼ 3 (F L T - 3 、C D 1 3 5) 、c - K i t (C D 1 1 7) 、C S F 1 R 、(C D 1 1 5) 、C D 1 2 3 、C D 1 3 3 、P D G F R - (C D 1 4 0 a) 、P D G F R - (C D 1 4 0 b) 、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 (C S P G 4 、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) 、M u c - 1 、E G F R 、d e 2 - 7 - E G F R 、E G F R v I I I 、葉酸遮断タンパク質、H e r 2 n e u 、H e r 3 、P S M A 、P S C A 、P S A 、T A G - 7 2 、H L A - D R 、I G F R 、C D 1 3 3 、I L 3 R 、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) 、カーボアンヒドラーイゼ I X (M N / C A I X) 、ガン胎児抗原 (C E A) 、E p C A M 、C D C P 1 、デルリン 1 、テネシン、f r i z z l e d 1 ~ 1 0 、血管抗原 V E G F R 2 (K D R / F L K 1) 、V E G F R 3 (F L T 4 、C D 3 0 9) 、エンドグリン、C L E C 1 4 、T e m 1 - 8 、T i e 2 、メソセリン、上皮糖タンパク質 2 (E G P 2) 、上皮糖タンパク質 4 0 (E G P 4 0) 、ガン抗原 7 2 - 4 (C A 7 2 - 4) 、インターロイキン 1 3 レセプター アルファ - 2 サブユニット、I L 1 3 R 2 、I g カップ軽鎖 () 、G D 3 - ガングリオシド (G D 3) 、G D 2 - ガングリオシド (G D 2) 、G D 2 及び G D 3 のアセチル化変異体、C D 1 7 1 、N C A M 、アルファ葉酸レセプター (F R) 、ルイス (Y) 、胎児アセチルコリンレセプター (F A R) 、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 3 (E R B B 3) 、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 4 (E R B B 4) 、トリ赤芽血症ウイルスのガン遺伝子ホモログ 2 (E R B B 2) 、肝細胞増殖因子レセプター (H G F R / c - M e t) 、クローディン 1 8 . 2 、クローディン 3 、クローディン 4 、クローディン 1 、クローディン 1 2 、クローディン 2 、クローディン 5 、クローディン 8 、クローディン 7 、クローディン 6 、膜結合 C E A 、R o b o 4 、C D 1 3 8 、テネシン、なら

10

20

30

40

50

びにフィプロネクチンのエクストラドメインBからなる群より選択される、項15記載の融合タンパク質。

【0145】

17. ターゲット細胞が、自己免疫疾患に関連する抗原を発現しており、同抗原が、CD20、CD22、CD52及びTNFR、CD19、CD25、CD40からなる群より選択される、項15記載の融合タンパク質。

【0146】

18. ターゲット細胞が、腫瘍／ガン細胞及び／又はB細胞である、項1～17のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0147】

19. IL-15ポリペプチドが、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の93、94、97、98、99、100、114、及び／又は115位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項1～18のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0148】

20. IL-15ポリペプチドが、配列番号：1に示されたアミノ酸配列の94、97、99、及び／又は100位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項19記載の融合タンパク質。

【0149】

21. 94位に対応するアミノ酸が、塩基性アミノ酸により置換されている、項19又は20記載の融合タンパク質。

【0150】

22. 塩基性アミノ酸が、アルギニン、リシン、及びヒスチジンからなる群より選択される、項21記載の融合タンパク質。

【0151】

23. 少なくとも1つのアミノ酸置換が、L92D、E94K、L95D、V97D、I98D、L114D、L114E、I115D、I115E、及び／又は、好ましくは、E94K、V97D、及び／又はI98D、最も好ましくは、E94Kからなる群より選択される、項1～18のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0152】

24. IL-15ポリペプチドが、IL-15Rに結合しない、項1～23のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0153】

25. IL-15ポリペプチドが、IL-2/IL-15Rに結合する、項1～24のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0154】

26. IL-15ポリペプチドが、全長IL-15タンパク質又はそのフラグメントもしくは変異体であり、同フラグメント又は変異体が、配列番号：1の野生型IL-15の親和性と比較して、IL-15Rに対する低下した親和性を有する、項1～25のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0155】

27. フラグメント又は変異体が、IL-2/IL-15Rに対する結合能を更に有する、項26記載の融合タンパク質。

【0156】

28. IL-15ポリペプチドが、少なくとも、配列番号：4に示されたアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号：4に示されたアミノ酸配列の44、45、46、47、48、49、50、51、52、64、65、66、67、及び／又は68位に対応する1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、項1～27のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0157】

10

20

30

40

50

29. IL-2 / IL-15R が、エフェクター細胞により発現される、項25記載の融合タンパク質。

【0158】

30. エフェクター細胞が、IL-2 / IL-15R を発現する、項29記載の融合タンパク質。

【0159】

31. エフェクター細胞が、NK細胞又はT細胞、好ましくは、NK細胞、CD8+T細胞、ガンマデルタT細胞、又はNK-T細胞である、項30記載の融合タンパク質。

【0160】

32. 融合タンパク質が、リンカー、好ましくは、ペプチドリンクを更に含む、項1～31のいずれか一項記載の融合タンパク質。 10

【0161】

33. リンカーが、グリシン及びセリンを含む、項32記載の融合タンパク質。

【0162】

34. リンカーが、2個以上、5個以上、10個以上、15個以上、又は20個以上のアミノ酸を含み、好ましくは、リンカーが、20個のアミノ酸を含む、項32又は33記載の融合タンパク質。

【0163】

35. リンカーが、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGGGGGS ((4 - グリシン 1 - セリン) 4) を含む、項33又は34記載の融合タンパク質。 20

【0164】

36. IL-15ポリペプチドが、結合タンパク質のCH3ドメインに、リンカーを介して結合している、項32～35のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0165】

37. ターゲット細胞に関連する抗原が、エンドグリンである、項1～36のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0166】

38. 融合タンパク質が、配列番号：27に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項37記載の融合タンパク質。 30

【0167】

39. 融合タンパク質が、配列番号：28に対して、少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むIgG軽鎖に共有結合している、項38記載の融合タンパク質。

【0168】

40. IL-2 / IL-15R を発現しているエフェクター細胞のターゲット細胞限定活性化に使用するための、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0169】

41. IL-2 / IL-15R を発現しているエフェクター細胞により媒介されるターゲット細胞限定ターゲット細胞殺傷に使用するための、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質。 40

【0170】

42. NK細胞及びT細胞、好ましくは、NK細胞、ガンマデルタT細胞、又はNK-T細胞、及びCD8+T細胞の細胞溶解活性を、項6で定義された非改変結合タンパク質の細胞溶解活性と比較して、向上させるのに使用するための、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【0171】

43. 疾患の処置に使用するための、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質 50

。

【 0 1 7 2 】

4 4 . 疾患が、増殖性疾患又は自己免疫疾患である、項 4 3 記載の使用のための融合タンパク質。

【 0 1 7 3 】

4 5 . 増殖性疾患が、副腎ガン、肛門ガン、胆管ガン、膀胱ガン、骨ガン、脳及び脊髄腫瘍、乳ガン、キャッスルマン病、子宮頸ガン、結腸ガン、子宮内膜ガン、食道ガン、ユーリング腫瘍、眼ガン、胆嚢ガン、消化管カルチノイド、消化管間質腫瘍（ G I S T ）、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カポジ肉腫、腎臓ガン、喉頭部及び下咽頭ガン、白血病、急性リンパ球性白血病（ A L L ）、急性骨髓性白血病（ A M L ）、慢性リンパ球性白血病（ C L L ）、慢性骨髓性白血病（ C M L ）、慢性骨髓単球性白血病（ C M M L ）、肝臓ガン、肺ガン、非小細胞肺ガン、小細胞肺ガン、肺カルチノイド、リンパ腫、皮膚のリンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群、鼻腔及び副鼻腔ガン、上咽頭ガン、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔及び口咽頭ガン、骨肉腫、卵巣ガン、脾臓ガン、陰茎ガン、下垂体腫瘍、前立腺ガン、直腸ガン、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺ガン、肉腫、皮膚ガン、基底細胞及び扁平上皮細胞ガン、メラノーマ、メルケル細胞ガン、小腸ガン、胃ガン、精巣ガン、胸腺ガン、甲状腺ガン、子宮肉腫、腫瘍、外陰ガン、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、又はウィルムス腫瘍からなる群より選択される、項 4 4 記載の使用のための融合タンパク質。

10

【 0 1 7 4 】

4 6 . 自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス（ S L E ）、グッドパスチャーリー症候群、サルコイドーシス、強皮症、関節リウマチ、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、強皮症、皮膚筋炎、乾癬、白斑症、円形脱毛症、 I 型糖尿病、自己免疫性脾炎、橋本甲状腺炎、アジソン病、多発性硬化症、重症筋無力症、結節性多発動脈炎、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、抗リン脂質抗体症候群、悪性貧血、胃腸疾患、セリアック病、炎症性腸疾患、自己免疫性肝炎、又は原発性胆汁性肝硬変からなる群より選択される、項 4 4 記載の使用のための融合タンパク質。

20

【 0 1 7 5 】

4 7 . 処置の副作用が低減される、項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項記載の使用のための融合タンパク質。

30

【 0 1 7 6 】

4 8 . 副作用が、輸注反応、体温上昇 / 発熱、呼吸困難、循環系の問題、免疫原性、過敏症反応、免疫サプレッション、感染、貧血、自己免疫性悪性貧血、白血球減少症、血小板減少症、汎血球減少症、血球減少症、心不全の悪化、腫瘍溶解、サイトカイン放出症候群、甲状腺障害、心毒性、局所的な皮膚反応、肝臓トランスアミナーゼの上昇、低血圧、血清病、皮膚粘膜反応、肝炎再活動化、進行性多巣性白質脳症（ P M L ）、腎毒性、心不整脈の内の少なくとも 1 つを含む、項 4 7 記載の使用のための融合タンパク質。

【 0 1 7 7 】

4 9 . 処置において、投与される融合タンパク質の用量が、項 1 ~ 3 6 のいずれか一項記載の融合タンパク質の結合タンパク質、及び、配列番号： 1 に示されたアミノ酸配列の 9 2 、 9 3 、 9 4 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 、 9 9 、 1 0 0 、 1 1 2 、 1 1 3 、 1 1 4 、 1 1 5 、及び / 又は 1 1 6 位に対応する 1 つ以上の位置に少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含まない I L - 1 5 ポリペプチドを含む融合タンパク質に使用される用量と比較して増大する、項 4 3 ~ 4 8 のいずれか一項記載の使用のための融合タンパク質。

40

【 0 1 7 8 】

5 0 . 項 1 ~ 3 9 のいずれか一項記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【 0 1 7 9 】

5 1 . 項 1 ~ 3 9 のいずれか一項記載の融合タンパク質をコードする、核酸分子。

50

【0180】

52. ベクターに含まれる、項51記載の核酸分子。

【0181】

53. 項51記載の核酸分子又は項52記載のベクターを含む、
ホスト細胞。

【0182】

54. 融合タンパク質の発現のために、融合タンパク質の発現を可能にする条件下において、融合タンパク質をコードする核酸を使用することを含む、
項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を製造するための方法。

【0183】

55. 融合タンパク質が、ホスト細胞により、又は、細胞フリー系において発現される
、項54記載の方法。

【0184】

56. 治療的に有効量の、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を、対象に投与することを含む、
疾患を処置する方法。

【0185】

57. 疾患が、増殖性又は自己免疫疾患である、項56記載の方法。

【0186】

58. 疾患を有する対象を処置するための医薬の製造における、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質又は項50記載の医薬組成物の使用。

【0187】

59. 対象が、脊椎動物、好ましくは、人間である、項56記載の方法又は項58記載の使用。

【0188】

60. 項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を含む、
キット。

【0189】

61. キットが、

- a) 1つ以上のバッファー、
- b) 1つ以上のプロトコール

を更に含む、項60記載のキット。

【0190】

62. 治療における非特異的なターゲット細胞活性化を減少させるための方法であって、
、
治療が、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む
、
方法。

【0191】

63. 治療における副作用を減少させるための方法であって、

治療が、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む
、
方法。

【0192】

64. 副作用が、輸注反応、体温上昇／発熱、呼吸困難、循環系の問題、免疫原性、過敏症反応、免疫サプレッション、感染、貧血、白血球減少症、血小板減少症、心不全の悪化、腫瘍溶解、サイトカイン放出症候群、甲状腺障害、心毒性、局所的な皮膚反応、甲状腺障害、肝臓トランスアミナーゼの上昇、低血圧、血清病、皮膚粘膜反応、肝炎再活動化、進行性多巣性白質脳症（PML）、腎毒性、心不整脈の内の少なくとも1つを含む、項63記載の方法。

10

20

30

40

50

【0193】

65. 治療における融合タンパク質の用量を増大させるための方法であって、
治療が、項1～39のいずれか一項記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む
、
方法。

【実施例】

【0194】

本発明は、以下の非限定的な実施例により更に例示される。

【0195】

実施例1：融合タンパク質の生成

10

Fc最適化SDIE改変抗体の構築は、Hofmann et al. (2012) 「Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia」 Leukemia 26:1228-1237に記載されている。ヒトIL-15配列を含有するプラスミドを、DKFZ Genomics and Proteomics Core facility(ベクター：pENTR 22.1、hIL-15 GeneBankアクセスションナンバー：DQ893709、配列番号：1にも示す)から得た。特に、この配列の最初の48個のアミノ酸は、長さ48個のアミノ酸シグナルペプチドを含む。同シグナルペプチドは、hIL-15の分泌中に開裂され、IL-15融合タンパク質の一部ではない。BspEI及びSphIの制限部位を、PCRにより、IL-15配列の5'及び3'端に加えた。その後、同配列を、pJett1.2 bluntベクター内にクローニングした。第1の工程において、IL-15配列内のBspEI制限部位を、変異誘発PCRを使用して除去した。第2の工程において、3種類のIL-15ポリペプチドを、変異誘発PCRにより生成した(E46K、V49D、及びI50D、これらの変異は、配列番号：1に関するアミノ酸置換E94K、V97D、及びI98Dに相当する。本明細書で記載された表3も参照のこと)。4種類のIL-15ポリペプチドを、BspEI及びSphI制限部位により、4G7(抗CD19/CD19)についての可変ドメイン及びFc最適化ヒトIgG1定常領域を含有する発現ベクター内に導入した。すなわち、定常ドメインは、アミノ酸交換S239D及びI332E(EUナンバリング)を有する。これらの構築物において、hIL-15は、グリシン-セリン(短いリンカー)を介して、CH3ドメインに直接連結している(図1)。

20

【0196】

PSMA-IL-15wt及びPSMA-IL-15-E46K構築物を、J591(抗PSMA)についての配列を含有する発現ベクターに基づいて生成した。長いリンカーを有する構築物を、下記のようにして生成した。長さ20個のアミノ酸の長いリンカー(4-グリシン-1-セリン)₄をコードする配列+IL-15配列の最初の39個のヌクレオチドを、Eurofins Genomics, Ebersberg, Germanyにおいて、DNAフラグメント(5'BspEI及び3'BglII制限部位を含有)として合成した。IL-15配列は、BglII制限部位を、ヌクレオチド位置39に含有する。このため、(4G-1S)₄リンカーを、BspEI及びBglIIにより、種々のIL-15を含有する発現ベクター内にライゲーションした。同様に、エンドグリン-IL-15wt及びエンドグリンIL-15-E46K構築物を、K-ro23(キメラ抗エンドグリン抗体)についての配列を含有する発現ベクター使用して生成した。

30

【0197】

全ての重鎖プラスミドを、適切な軽鎖ベクターと共に、SP2/0細胞内にトランスフェクションした。1つの抗体を生成するクローンを増殖させ、抗体を、上清からプロテインAによる親和性クロマトグラフィーにより精製した。

40

【0198】

実施例2：IL-15Rに対する結合性

CD19陽性NALM16細胞を、種々の濃度の別個の融合タンパク質と共にインキュベーションし、リンコンビナントHisタグ付きIL-15R--Fc-融合タンパク

50

質 (R&D systems)、ビオチンラベル抗H_is抗体 (Qiagen)、及び最後に、ストレプトアビジン - P E コンジュゲート (Life technologies) により染色した。ついで、細胞を、フローサイトメトリー (BD FACS Calibur) により分析した。最も適した融合タンパク質を選択するために、CD19陽性N A L M 1 6細胞を、示された濃度の別個の融合タンパク質 (図2A及び図2Bのy軸)と共にインキュベーションした。

【0199】

融合タンパク質 CD19 - I L 1 5 w t は、野生型ヒトI L - 1 5 に融合した、F c 最適化ヒトI g G 1 定常領域 (上記されたS D I E 変異) を有する4 G 7 抗体 (抗CD19抗体) を含んだ。そしてここで、h I L - 1 5 は、グリシン - セリン (短いリンカー) を介して、C H 3 ドメインに直接結合している。この融合タンパク質を、対照として機能させた。F c 最適化 (S D I E) ヒトI g G 1 定常領域を有する4 G 7 抗体を含んだ、CD19 - I L 1 5 - E 4 6 K (4 G 7 - I L 1 5 - E 4 6 K) 、CD19 - I L 1 5 - V 4 9 D (4 G 7 - I L 1 5 - V 4 9 D) 、又は CD19 - I L 1 5 - I 5 0 D (4 G 7 - I L 1 5 - I 5 0 D) と名付けた融合タンパク質を更に試験した。このI L - 1 5 ポリペプチドは、示されたアミノ酸置換をそれぞれ含んだ。これらのアミノ酸置換は、配列番号：2 (図5に示す) のナンバリングに対応している。これら全ての融合タンパク質において、h I L - 1 5 は、グリシン - セリン (短いリンカー) を介して、C H 3 ドメインに直接結合している。
10

【0200】

CD19結合タンパク質 (ここでは、4 G 7 抗体) がCD19に対するために、同タンパク質は、このアッセイ法において、N A L M 1 6 細胞に結合するであろう。融合タンパク質のI L - 1 5 ポリペプチドがI L - 1 5 R に結合するその能力を残していたかを理解するために、H i s タグ付きI L - 1 5 R - F c - 融合タンパク質 (R&D systems) を、培養物に加えた。このため、融合タンパク質のI L - 1 5 ポリペプチドがI L - 1 5 R に結合するその能力を残していた場合、加えられたH i s タグ付きI L - 1 5 R - F c - 融合タンパク質は、融合タンパク質を介して、N A L M 1 6 細胞に結合したままである。このため、ビオチンラベル抗H i s 抗体 (Qiagen) 及びストレプトアビジンP E - コンジュゲート (Life technologies) の添加に基づいて、検出可能なシグナルが生じるであろう。このシグナルを、平均蛍光強度 (M F I ; 図2Aのy軸) により測定した。
20

【0201】

図2Aに、CD19 - I L 1 5 - w t (4 G 7 - I L - 1 5 - w t) 融合タンパク質について検出されたM F I は、約3 0 0 MFIであることを示す。I L - 1 5 は通常、I L R - 1 5 R に結合するため、このシグナルにより、I L - 1 5 のI L R - 1 5 への結合の証拠が提供される。CD19 - I L 1 5 - V 4 9 D (4 G 7 - I L 1 5 - V 4 9 D) 融合タンパク質では、対照と同程度に顕著には生じなかった。このことにより、この融合タンパク質は、CD19 - I L - 1 5 - w t 融合タンパク質と比較してわずかに低下して、I L R - 1 5 に結合したことが示される。対照的に、融合タンパク質 CD19 - I L 1 5 - E 4 6 K 及び CD19 - I L 1 5 - I 5 0 D は、約1 5 0 のM F I シグナルを示した。このことは、CD19 - I L - 1 5 - w t 融合タンパク質と比較して、I L R - 1 5 に対する結合性が強力に減少している (又は更に存在しない) ことを示している。このため、評価された3つの内の2つのI L - 1 5 ポリペプチドE 4 6 K 及びI 5 0 D は、本発明の融合タンパク質内で使用された場合、I L - 1 5 R に対する結合性を減少させ / 欠いていた (図2A)。
30

【0202】

実施例3：種々のI L - 1 5 ポリペプチドを含有する種々の融合タンパク質の細胞溶解活性

次の実験において、実施例2で試験された融合タンパク質の細胞溶解アッセイを分析した。この分析を達成するために、N A L M 1 6 細胞を、各融合タンパク質とインキュベーションした。加えて、健康なボランティアの末梢血単核球 (P B M C) を、この培養物に加えた。通常、このようなP B M C細胞は、リンパ球、単球、及びマクロファージを含む
40

。一部のリンパ球、例えば、NK細胞、CD8+T細胞、又はNK-T細胞等は、(IL-15鎖に加えて) IL-15が結合することができる、IL-2/IL-15レセプターの及び共通の鎖を発現している。このため、融合タンパク質のCD19(4G7)結合タンパク質を介した両NALM16細胞への結合、及び、融合タンパク質のIL-15ポリペプチドを介した陽性細胞への結合に基づいて、NALM16(CD19発現)ターゲット細胞を殺傷することができる。

【0203】

細胞溶解活性を分析するために、NALM16ターゲット細胞の増殖を、³H-チミジン取込みアッセイ法を使用して、2日後に評価した。これに関して、融合タンパク質及びPBM Cの不存在下での増殖を、100%増殖と定義した。この増殖は、増殖の0%阻害を意味する。このため、検出された増殖の阻害量が多いほど、このアッセイ法において、より少ない増殖が起こっている。同様に、増殖量が少ないほど、融合タンパク質の細胞溶解活性が高い。

【0204】

図2Bから分かるように、CD19-IL15-wt及びCD19-IL15-V49D融合タンパク質は両方とも、約80~85%を示した。一方、変異タンパク質の場合には、同等の活性を達成するのに、より高い濃度を必要とした。CD19-IL15-SDIE(4G7SDIE)抗体により得られた阻害と比較して、約60%の増殖阻害がもたらされた。特に、CD19-IL15-E46K融合タンパク質は、野生型タンパク質と共に、増殖の最も高い阻害を提供した(図2B)。このため、E46Kアミノ酸置換を有するIL-15ポリペプチドを含有する融合タンパク質は、CD19発現ターゲット細胞に対する全ての変異タンパク質の中で、最も高い細胞溶解活性を示したため、その後の実験に使用した。

【0205】

実施例4：NK92細胞及びPBM C細胞において種々の融合タンパク質により誘引された増殖

長いリンカー(L)対短いリンカーの重要性を試験するために、IL15応答性細胞の増殖を、実施例3で記載された³H-チミジン取込みアッセイ法を使用して評価した。応答性細胞は、NK92細胞(図3A)又はPBM C(図3B)のいずれかとした。短いリンカーを含む融合タンパク質において、hIL-15は、グリシン-セリン(短いリンカー)を介して、CH3ドメインに直接結合している。長いリンカーを有する融合タンパク質は、20個のアミノ酸の長いリンカー(4-グリシン 1-セリン)4を含み、このリンカーにより、hIL-15がCH3ドメインに直接結合している。

【0206】

長い又は短いリンカーを含有する融合タンパク質を、NK92細胞(図3A)又はPBM C(図3B)細胞と共に、2日間インキュベーションした。ついで、細胞を、³H-チミジンでパルスし、3日目にフィルタマット上で収集し、液体シンチレーションカウンターでカウントした。

【0207】

図3Aにおいて、NK92細胞を、種々の濃度の別箇の融合タンパク質と共に、示されたように(x軸及び図中の凡例)インキュベーションした。NK92細胞は、ナチュラルキラーリンパ腫細胞であり、CD19(4G7)結合タンパク質が結合するCD19を発現しない(Gong et al. (1994) 「Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells」 Leukemia; 8(4):652-8)。このため、この細胞培養物は、ターゲット細胞を含んでいない。y軸に示された増殖³H-チミジンカウントを測定することにより(図3A)、エフェクター細胞の増殖を誘引する融合タンパク質の能力を、概ね評価した。

【0208】

CD19-IL15wt及びCD19-IL15wt-L(長いリンカーを含有)

10

20

30

40

50

は、約 25000 ^3H -チミジンカウントをもたらした。一方、変異タンパク質の場合には、同等の活性を達成するのに、より高い濃度が必要である。CD19-IL15-E46Kにより、細胞培養物中におけるより少ない量の増殖が提供された（約5000カウント ^3H -チミジン）。特に、融合タンパク質 CD19-IL15-E46K-L（長いリンカーを含有）は、約20000カウントの増殖を誘引した（図3A）。このため、融合タンパク質 CD19-IL15-E46K-Lは、CD19-IL15-E46K融合タンパク質より高い増殖／活性化を誘引した。

【0209】

同様の結果が、図3Bにおいても得られた。ここでは、PBM C細胞を、種々の濃度の別箇の融合タンパク質と共に、示されたように（図3B中のx軸及び図中の凡例）インキュベーションした。一部のPBM C（例えば、B細胞）も、CD19を発現する。CD19は、4G7結合タンパク質により検出される。特に、PBM C培養物は、一部の強力なエフェクター細胞、例えば、NK細胞等も含む。図3Aにおけるのと同様に、増殖を、y軸に示されたように、 ^3H -チミジンカウントにより決定した（図3B）。

10

【0210】

これらの実験において、CD19-IL15wt及びCD19-IL15wt-L（長いリンカーを含有し、野生型（wt）IL-15である）はそれぞれ、約6000及び12000 ^3H -チミジンカウントをもたらした。再度、CD19-IL15-E46Kにより、より少ない程度の増殖が提供された（約4500カウント ^3H -チミジン）。一方、融合タンパク質 CD19-IL15-E46K-L（長いリンカーを含有）は、IL-15野生型融合タンパク質に類似する増殖の検出をもたらした（約8500カウント；図3B）。このため、この実験では、CD19-IL15-E46K-Lは、CD19-IL15-E46K融合タンパク質より高い、細胞の増殖／活性化を誘引した。

20

【0211】

実施例5：ターゲット細胞限定NK細胞活性化及びターゲット細胞殺傷

生成された融合タンパク質のターゲット細胞限定活性を評価するために、正常なPBM Cを、B細胞関連CD19抗原及び前立腺特異的膜抗原（PSMA）をターゲットする融合タンパク質に含まれる野生型IL-15及び変異IL-15ポリペプチドと共にインキュベーションした。B細胞が、PBM C培養物中に存在するため、CD19は、この環境において、関連するターゲット抗原として機能する。一方、PSMAは機能せず、このため、関係がない。PBM Cを、示された融合タンパク質（0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と、3日間インキュベーションし、ついで、フローサイトメトリーにより分析した。

30

【0212】

図4Aにおいて、NK細胞活性化を、CD69を発現しているCD56陽性細胞（CD56+/CD69+ダブルポジティブ細胞）数を測定することにより評価した。CD69は、活性化されたT細胞及びB細胞により発現され、マクロファージ及びNK細胞を活性化させる。一方、CD56は、NK細胞によってのみ発現される。ダブルポジティブ細胞（CD56+/CD69+）を選択することにより、活性化されたNK細胞のみを測定する。

40

【0213】

図4Aにおいて、細胞数は、y軸に提供される。利用された種々の融合タンパク質は、x軸に示される。対照のPBM C培養物（「PBM Cのみ」）において、約15000個の細胞が、CD56を発現し（CD56+）、約1000個が、CD56及びCD69についてダブルポジティブであった（CD56+/CD69+）。CD19-SDIE（SDIE変異を含む4G7抗体；4G7-SDIE）の添加により、細胞組成がわずかにのみ変化した（約2500個の活性化NK細胞）。対照的に、PBM C培養物内の活性化NK細胞数は、CD19-SDIE-IL15wt-L融合タンパク質の添加の結果として、約20,000個の活性化NK細胞に、大幅に増大した。活性化NK細胞数において、ほとんど目立たないが、それでも顕著な増大（約12,000個）が、CD19-

50

S D I E - I L 1 5 - E 4 6 K - L 構築物により観察された。

【 0 2 1 4 】

更なる実験を、 P S M A をターゲットする融合タンパク質について行った。 P S M A は、 P B M C 細胞により発現されない。ここでは、 P S M A - I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質の添加により、 N K 細胞は活性化されなかった。対照的に、 P S M A - I L - 1 5 w t 構築物の添加により、 C D 5 6 陽性細胞プール内の活性化 N K 細胞数も、顕著に増大した。これらの結果から、 I L - 1 5 R に対する低下した親和性を有する I L - 1 5 ポリペプチドを含有する構築物による N K 細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である、すなわち、 C D 1 9 をターゲットするが、 P S M A をターゲットしない融合タンパク質は、 N K 細胞を活性化し、 B 細胞を殺傷すると、まとめることができる。対照的に、野生型 I L - 1 5 を含む（ I L - 1 5 R に対して正常な親和性を有する）融合タンパク質の添加に基づいて、 N K 細胞の細胞限定的活性化は、ほとんど目立たず、又は更に存在しない。これは、野生型 I L - 1 5 が I L 1 5 R によりトランス提示されるため、その能力を発揮するのに、ターゲット細胞結合を必要としないためである。
10

【 0 2 1 5 】

図 4 B において、 B 細胞殺傷を、 C D 2 0 + B 細胞数を測定することにより評価した。 C D 2 0 は、 B 細胞において専ら発現される。このため、細胞培養物中に存在する B 細胞が少ないほど、 C D 1 9 結合タンパク質（ 4 G 7 ; 抗 C D 1 9 抗体）を含む融合タンパク質の B 細胞殺傷がより効果的である。
20

【 0 2 1 6 】

この実験においても、 P B M C のみを含有し、融合タンパク質を何ら加えなかった細胞培養物を、対象として機能させた。ここでは、約 1 2 0 0 0 個の C D 2 0 陽性（ C D 2 0 + ） B 細胞をカウントした。 C D 1 9 - S D I E 対照の添加により、 C D 2 0 陽性 B 細胞の減少がもたらされた（約 5 0 0 0 個の細胞）。特に、 C D 1 9 - 1 5 w t - L 及び C D 1 9 - I L 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質により、 C D 2 0 陽性 B 細胞の最大の減少がもたらされた（約 2 0 0 0 個の細胞）。対照的に、 P S M A - I L 1 5 w t 融合タンパク質の添加により、約 6 0 0 0 個の細胞への減少が示された。特に、 P S M A - I L 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質によっては、「 P B M C のみ」対照と比較して、 C D 2 0 陽性 B 細胞数は変化しなかった。
30

【 0 2 1 7 】

このため、結合タンパク質 / I L - 1 5 融合タンパク質による C D 2 0 + 細胞数の減少（ B 細胞枯渇）は、 F c 最適化 C D 1 9 抗体（ C D 1 9 - S D I E ; 4 G 7 S D I E ）単独により達成された減少より顕著であった（図 4 B ）。さらに、 P S M A に対する融合タンパク質である P S M A - I L 1 5 - E 4 6 K - L は、 C D 2 0 陽性 B 細胞に対して何ら効果を有さなかった。 P S M A - I L 1 5 - w t 融合タンパク質は、中程度の効果を有した。このため、ターゲット細胞限定 B 細胞殺傷は、 I L - 1 5 - E 4 6 K - L 融合タンパク質を使用した場合、最も顕著であった。一方、野生型 I L - 1 5 を含む融合タンパク質は、ほとんど目立たないか、又は更に存在しない、 B 細胞のターゲット細胞限定殺傷を示した（図 4 B ）。

【 0 2 1 8 】

図 4 C において、 N K 細胞活性化を、 B 細胞枯渇 P B M C 培養物において評価した。 B 細胞を、 CD19MicroBads (Miltenyi Biotec) を使用する磁気細胞分離装置（ M A C S ）により枯渇させた。図 4 B に示されたように、細胞数の決定のために、等量の B D 陰性ビーズ（ BD Biociences からの陰性ビーズ）を、各サンプルに加えた。フローサイトメトリー測定中に、同じ数の B D 陰性ビーズを、全てのサンプルについて取得した。これにより、1つの実験からの種々のサンプル間での細胞の定量及び細胞数の直接比較が可能であった。 C D 6 9 は、活性化 T 細胞及び B 細胞、活性化マクロファージ、ならびに N K 細胞により発現され、 C D 5 6 は、 N K 細胞によってのみ発現されるため、 B 細胞の枯渇により、これらの細胞プールは、 T 細胞及び N K 細胞に限定される。 C D 1 9 発現細胞がこれらの実験において枯渇されるため、変異 I L - 1 5 を含有する C D 1 9 ターゲット融合タンパ
40
50

ク質の活性は強力に低下するが、野生型タンパク質を含有する融合タンパク質では低下しない。

【0219】

まとめ：野生型IL-15（配列番号：1）のIL-15Rに対する低下した親和性を有するIL-15ポリペプチドを含む融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的である。すなわち、CD19をターゲットするが、PSMAをターゲットしないタンパク質は、NK細胞を活性化し、B細胞を殺傷する。その結果として、CD19ターゲット融合タンパク質によるNK細胞活性化は、B細胞がPBM Cから枯渇された場合、低下した（図4C）。

a. 野生型IL-15を含有する両融合タンパク質によるNK細胞活性化は、ターゲット細胞限定的ではない。すなわち、両融合タンパク質は、NK細胞活性化を誘引し、ターゲットされた抗原に無関係のB細胞を少なくともいくらか殺傷する。 10

b.（野生型IL-15よりIL-15Rに対する低下した親和性を有する）結合タンパク質/IL-15融合タンパク質によるB細胞枯渇は、Fc最適化CD19抗体（CD19-SEID）単独による枯渇より顕著である（図4B）。

【0220】

特に断りない限り、説明及び特許請求の範囲を含む本明細書で使用された下記用語は、以下で与えられた定義を有する。

【0221】

本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、明確に他の方法で示されない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。このため、例えば、「試薬（a reagent）」への言及は、1つ以上のこののような種々の試薬を含む。「方法（the method）」への言及は、本明細書で記載された方法について修正し、又は、置換することができる、当業者に公知の同等の工程及び方法への言及を含む。 20

【0222】

当業者であれば、過度の思考錯誤をすることなく、本明細書で記載された本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は、確認することができるであろう。このような均等物は、本発明に包含されることを意図している。

【0223】

特に断りない限り、一連の要素に先立つ「少なくとも」という用語は、一連における全ての要素を意味すると理解されたい。当業者であれば、過度の思考錯誤をすることなく、本明細書で記載された方法及び使用の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は、確認することができるであろう。このような均等物は、本発明に包含されることを意図している。 30

【0224】

複数の文献が、本開示の文章全体を通して引用される。（全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造仕様書、説明書等を含めた）本明細書で引用された文献はそれぞれ、前記又は下記であるかに関わらず、その内容全体が参照により組み入れられる。参照により組み入れられる情報が本明細書を否定し、又は、本明細書と矛盾する程度において、本明細書が、任意のこののような情報に対して優先されるであろう。本明細書において、本発明が、従来の発明によるこのような開示に新規性があると認めると、解釈されるべきではない。 40

【0225】

本明細書及びそれに続く特許請求の範囲全体を通して、特に断りない限り、「含む（comprise）」という語、及び、変形例、例えば、「含む（comprises）」及び「含むこと（comprising）」は、記述された整数もしくは工程、又は、整数もしくは工程の群の包含を意味するが、任意の他の整数もしくは工程、又は、整数もしくは工程の群の除外を意味しないと理解されるであろう。本明細書で使用する場合、「含むこと（comprising）」という用語は、「含有すること（containing）」という用語により置き換えることができ、又は場合により、本明細書で使用する場合、「有すること（having）」という用語により置き換えることができる。 50

【0226】

本明細書で使用する場合、「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲の要素において特定されなかった、任意の要素、工程、又は成分を除外する。本明細書で使用する場合、「本質的になる (consisting essentially of)」は、特許請求の範囲の基礎的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又は工程を除外しない。本明細書における各例において、「含む (comprising)」、「本質的になる (consisting essentially of)」及び「からなる (consisting of)」は、他の2つの用語のいずれかにより置き換えることができる。

【0227】

本明細書で使用する場合、複数の言及された要素間の「及び／又は」という結合用語は、個々の選択肢及び組み合わせられた選択肢の両方を包含すると理解される。例えば、2つの要素が「及び／又は」により連結されている場合、第1の選択肢は、第2の要素を含まない第1の要素の適用性を意味する。第2の選択肢は、第1の要素を含まない第2の要素の適用性を意味する。第3の選択肢は、第1の要素と第2の要素とを組み合わせた適用性を意味する。これらの選択肢のいずれか1つが、その意味の範囲内にあり、したがって、本明細書で使用される「及び／又は」という用語の要求を満たすと理解される。2つ以上の選択肢の同時適用性も、その意味の範囲内にあり、したがって、本明細書で使用される「及び／又は」という用語の要求を満たすと理解される。

【0228】

本明細書で使用する場合、「約」という語は、当業者により決定された特定の値についての、許容し得る誤差範囲内にある値を意味する。同許容範囲は、一部において、その値がどのようにして測定され、又は、決定されるかにより、すなわち、測定系の限界により決まるであろう。例えば、「約」は、当技術分野における実務に関して、1以内又は1を超える標準偏差を意味することができる。また、「約」という用語は、当該量又は値が指定された値、又は、その値に近似する幾らかの他の値であることができることを示すのにも使用される。この表現は、類似する値が本発明の同等の結果又は効果を促進することを伝えることを意図している。この文脈において、「約」は、最大10%の上下範囲を意味することができる。「約」という語は、一部の実施態様では、特定の値の上下範囲、すなわち、その値の上下最大5%、例えば、最大2%、最大1%、又は最大0.5%を意味する。一実施形態において、「約」は、所定の値の上下最大0.1%の範囲を意味する。

【0229】

参考文献の列記

10

20

30

【表5】

1. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345-352.
2. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2003; 278:3466-3473. 10
3. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:4005-4010.
4. Oflazoglu E, Audoly LP. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology. *MAbs.* 2010; 2:14-19.
5. Valentin Goede, M.D., Kirsten Fischer, M.D., Raymonde Busch, M.S., Anja Engelke, M.D., Barbara Eichhorst, M.D., Clemens M. Wendtner, M.D., Tatiana Chagorova, M.D., Javier de la Serna, M.D., Marie-Sarah Dilhuydy, M.D., Thomas Ilimer, M.D., Stephen Opat, M.D., Carolyn J. Owen, M.D., Olga Samoylova, M.D., Karl-Anton Kreuzer, M.D., Stephan Stilgenbauer, M.D., Hartmut Döhner, M.D., Anton W. Langerak, Ph.D., Matthias Ritgen, M.D., Michael Kneba, Elina Asikanus, M.Sc., Kathryn Humphrey, B.Sc., Michael Wenger, M.D., and Michael Hallek, M.D. Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engt J Med* 2014; 370:1101-1110. 20
6. Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, Richards JO, Vostiar I, Joyce PF, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 2008; 68:8049-8057.
7. Foyil KV, Bartlett NL. Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 2010; 5:140-147. 40
8. Ring AM, Lin JX, Feng D, Mitra S, Rickert M, Bowman GR, Pande VS, Li P, Moraga I, Spolski R, Ozkan E, Leonard WJ, Garcia KC. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunof* 2012; 13:1187-1195.

9. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:595-601.
10. Perna K, De Angelis B, Pagliara D, Hasan ST, Zhang L, Mahendravada A, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, Dotti G, Savoldo B. Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19:106-117.
11. Liu RB, Engels B, Schreiber K, Ciszewski C, Schietinger A, Schreiber H, Jabri B. IL-15 in tumor microenvironment causes rejection of large established tumors by T cells in a noncognate T cell receptor-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:8158-8163. 10
12. List T, Neri D. Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clin Pharmacol* 2013; 5:29-45.
13. Gillies SD, Reilly EB, Lo KM, Reisfeld RA. Antibody-targeted interleukin 2 stimulates Tcell killing of autologous tumor cells. *Proc Nati Acad Sci USA* 1992; 89:1428-1432. 20
14. Albertini MR, Hank JA, Gadbaw 8, Kostlevy J, Haldeman J, Schalch H, Gan J, Kim K, Eickhoff J, Gillies SD, Sondel PM. Phase II trial of hu14.18-11.2 for patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:2261-2271.
15. Ribas A, Kirkwood JM, Atkins MB, Whiteside TL, Gooding W, Kovar A, Gillies SD, Kashala O, Morse MA. Phase 1/11 open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J Transl Med* 2009; 7:68. 30
16. Bessard A, Sole V, Bouchaud G, Quernener A, Jacques Y. High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (1L-15)-1L-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2736-2745.
17. Vincent M, Bessard A, Cochonneau D, Teppaz G, Sold V, Mailiasson M, BirkId S, Garrigue-Antar L, Quernener A, Jacques Y. Tumor targeting of the 1L-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int J Cancer* 2013; 133:757-765. 40
18. Kermer V, Baum V, Hornig N, Kontermann RE, Müller D. An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11:1279-1288.

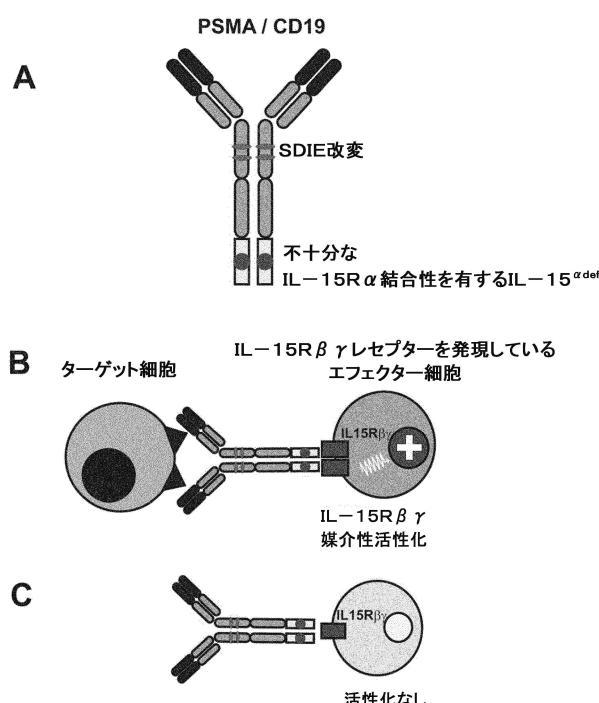
19. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho JH, Boyman O, Surh CD, Sprent J. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:9166-9171.
20. Bernard J, Harb C, Mortier E, Quemener A, Meloen RH, Vermot-Desroches C, Wijdeness J, van Dijken P, Grötzingen J, Slootstra JW, Plet A, Jacques Y. Identification of an interleukin-15 α receptor-binding site an human interleukin-15. J Biol Chem 2004; 279:24313-24322. 10
21. Quemener A, Bernard J, Mortier E, Plet A, Jacques Y, Tran V. Docking of human interleukin-15 to its specific receptor alpha chain: correlation between molecular modeling and mutagenesis experimental data. Proteins 2006; 65:623-636
22. Hofmann M, Grosse-Hovest L, Nubling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, Buhring HJ, Schwartz K, Haen SP, Schilbach K, Rammensee HG, Salih HR, Jung G. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. Leukemia 2012; 26:1228-1237. 20
23. Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 2003 Nov; 21(11):484-90
24. III CR, Gonzales JN, Houtz EK, Ludwig JR, Melcher ED, Hale JE, Pourmand R, Keivens VM, Myers L, Beidler K, Stuart P, Cheng S, Radhakrishnan R. Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions. Protein Eng. 1997 Aug;10(8):949-57 30
25. Martin F, Toniatti C, Salvati AL, Venturini S, Ciliberto G, Cortese R, Sollazzo M. The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. EMBO J. 1994 Nov 15;13(22):5303-9
26. Traunecker A, Lanzavecchia A, Karjalainen K. Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells. EMBO J. 1991 Dec;10(12):3655-9
27. Traunecker A, Lanzavecchia A, Karjalainen K. Janusin: new molecular design for bispecific reagents. Int J Cancer Suppl. 1992;7:51-2 40
28. Silverman J, Liu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. Nat Biotechnol. 2005 Dec;23(12):1556-61. Epub 2005 Nov 20

29. Silverman J, Liu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol.* 2005 Dec;23(12):1556-61. Epub 2005 Nov 20.
30. Lamerisa et al. "Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy" *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014; S1040-8428(14)00135-8
31. Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402 10
32. Chen et al. "Fusion protein linkers: property, design and functionality" *Adv Drug Deliv Rev;* 2013; 65(10):1357-69
33. Gennaro, A.L. and Gennaro, A.R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA
34. J.S. Patton et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc. Amer. Thoracic Soc.* 2004 Vol. 1 pages 338-344 20
35. Jung et al. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy *Int J Cancer* Jan 2001; 15;91(2):225-30,
36. Natsume A, Niwa R, Satoh M. "Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC" *Drug Des Devel Ther.* 2009; 3:7-16.
37. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells" *Leukemia;* 1994,8(4):652-8 30
38. Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300
39. Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410
40. Kontermann (2012) "Dual targeting strategies with bispecific antibodies" Landes Bioscience mAbs Vol. 4, Issue 2 182-197
41. Kaspar M, Trachsel E, Neri D. "The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis." *Cancer Res.* 2007 May 15;67(10):4940-8. 40
42. Conlon KC, Lugli E1, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, Fleisher TA, Dubois SP, Perera LP, Stewart DM, Goldman CK, Bryant BR, Decker JM, Chen J, Worthy TA, Figg WD Sr, Peer CJ, Sneller MC, Lane HC, Yovandich JL, Creekmore

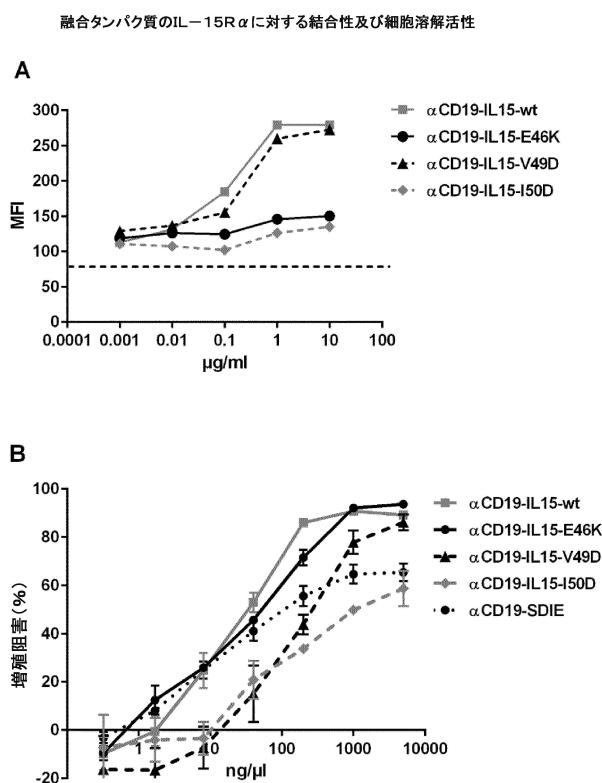
SP, Roederer M, Waldmann TA "Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer." J Clin Oncol. 2015 Jan 1;33(1):74-82.

43. Navid et al, Immune Therapies for Neuroblastoma, Cancer Biol Ther. 2009 May; 8(10): 874–882,

【図1】

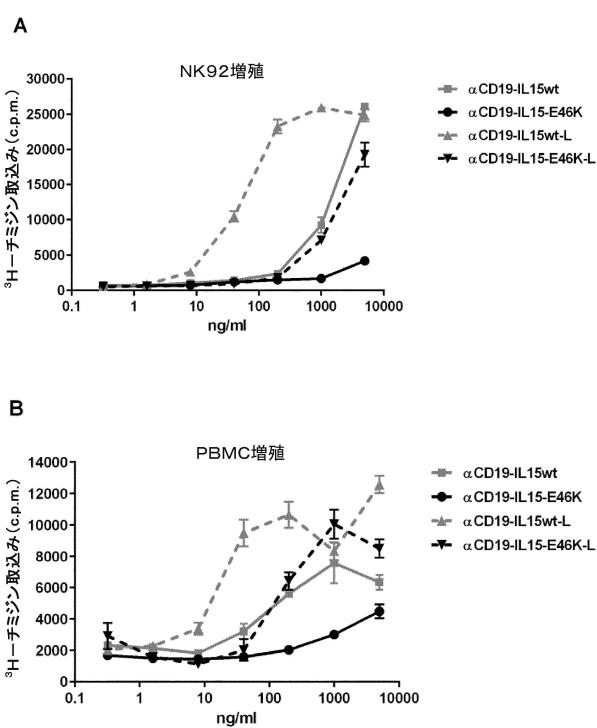


【図2】



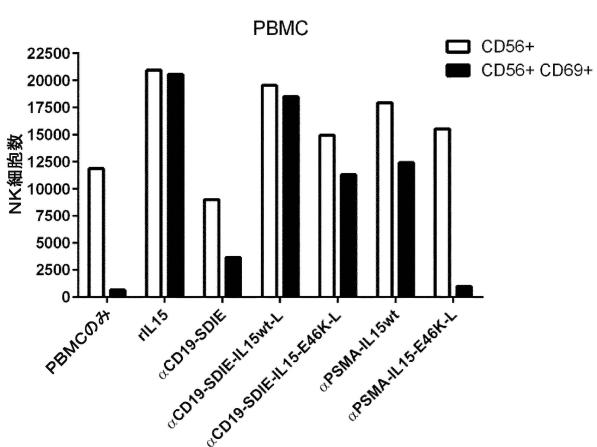
【図3】

リンカーの選択

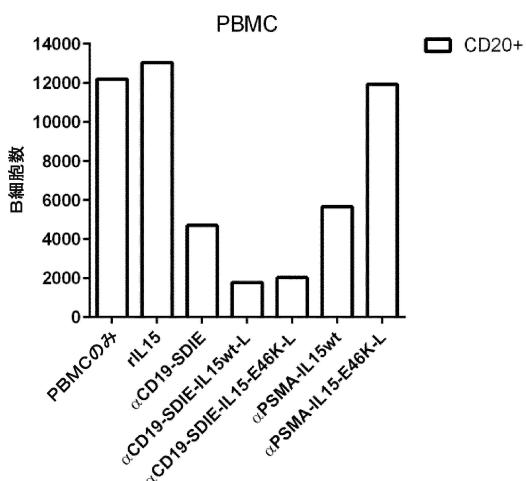


【図4 A】

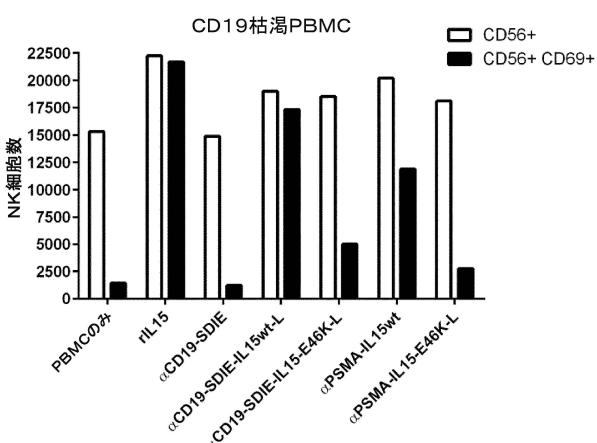
ターゲット細胞限定NK細胞活性化及びターゲット細胞殺傷



【図4 B】



【図4 C】



【図5-1】

配列番号:1

MIRSKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWNVNISDLKKIE
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLLELQVISLESQDASIHDTVENLILANNSL
SSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTS

配列番号:2 "LLELQVISL⁵²" (α 結合性)配列番号:3 "ENLI⁵³" (α 結合性)

配列番号:4

1 NWNVNISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLLELQVISLESQDASIH6
61 DTVENLILANNNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTS 114

配列番号:5=抗CD19シングル可変ドメインVH(クローン4G7)(CDR領域に下線)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPCQGLEWIGYINPYNDGTYK
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCARGTYYYYGSRVFDYWQGGTTLVSS

配列番号:6=抗CD19シングル可変ドメインVL(クローン4G7)(CDR領域に下線)

DIVMTQAPSIPVTPGESVSICRSSLNLNSQNCNTLYWFLQRPGQSPKLIIYRMSNLASG
VPDRFSGSGSGTAFTRISRVEADVGVYYCMQHLEYPTFGAGTKLEK

配列番号:7 抗FLT3シングル可変ドメインVH(クローンBV10)

QVQLQQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFLSTNYGLHWVRQSPGKCLEWLGVIWSGGSTDYN
AAFISSLISKDMSQVFFKMSNLQADDIYCARHGKGGIYANHYAMDYWGQGTSTVTS
S

配列番号:8 抗FLT3シングル可変ドメイン(クローンBV10)、VL CDR領域に下線

DIVMTQSPSSLSVAGEKVTMSCSKSSQSLNSQNCNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVPDFRTGSGSTDFTLTISVAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLEK

配列番号:9 抗FLT3キメラシングル可変ドメイン重鎖(クローン4G8) VH

QVQLQQPGPQELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYVMHWVRQRPQHGLEWIGEIDPDSDSYKD
NOQFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSLTSDDDAVYYCARAITTTPDFWGGTTLVSS

配列番号:10 抗FLT3キメラシングル可変ドメイン軽鎖(クローン4G8) VL

DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIISGSPRSF
GSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGTKLEIK

【図5-2】

配列番号:11 抗PSMAシングル可変ドメイン重鎖(クローンJ591) VH

EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNI
NPNNNGGTINYQKFEDKATLTVDKSSSTAYMLRSLTSEDAVYYCAAGWNF
DYWGQGTTLVSS

配列番号:12 抗PSMAシングル可変ドメイン軽鎖(クローンJ591) VL

NIVMTQSPKSMMSMSVGERTVLTCKASENVVTVWSWYQQKPEQSPKLLIYGA
SNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGT KLEK

配列番号:25 抗エンドグリンシングル可変ドメイン重鎖(クローンK-ro23) VH

EVQLQQSGADLVRSGAAVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPQHGLEWIGWIDPENGDT
APKFQDKATMTADSSNTAYQLNLSLTSEDTGVVYCNTTRYGTSSACWQGGTTLVSS

配列番号:26 抗エンドグリンシングル可変ドメイン軽鎖(クローンK-ro23) VL

QIVLTQSPALMSASPGEKVMTCSASSVSYMMWYQQRPRSSPKWIYLTSNLASGVPARF
SGSGSGTSTSITISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEK

【図6】

配列番号:27 SDIE変改を有する抗エンドグリンIgG1 (K-ro23) 重鎖とIL15変異体との融合タンパク質

EVQLQQSGADLVRSGAAVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPQHGLEWIGWIDPENGDT
TEYAPKFQDKATMTADSSN
K-ro23 VH

TAYLQLNLSLTSEDTGVYYCNTRYGTSSACWQGGTTLVSSASTKPGSPVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTV
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTVPSSGLQTQYICNVNHHPSNTVKDKKVERPKSCDKTHTCP
CapeLLGG ピンジ

PDFLFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWVYDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLHQDWLN
CH2

GKEYCKVSNKALPAPEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
NSNGQOPENNYKTT
CH3

PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMEHALHNHYTQKLSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGSNNW
リンクー

NVSDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLLELQVISLESQDASHD
TVENLILANNSSNGNVTESGCKECEEEKNIKEFLQSFVHV
IL15mut

ECEEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTS

配列番号:28 抗エンドグリンIgG1 (K-ro23) 軽鎖

QIVLTQSPALMSASPGEKVMTCSASSVSYMMWYQQRPRSSPKWIYLTSNLASGVPARFSGSGSGTSTS
ISSIONMEAED
K-ro23 VL

AATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAVPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
CL

VTEQDSKDKDSTYLSLTLISKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNGEC

【図7-1】

配列番号:29 SDIE変改を有する抗CD19 IgG1 (4G7) 重鎖と野生型IL15との短いリンクーによる融合タンパク質

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYKNEFKGKATLTS
DKSSNT
4G7-VH

AYMELSSLTSEDAVYYCARGTYYGSRVFDYWQGGTTLVSSASTKPGSPVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTV
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVPSSSLGTQYICNVNHHPSNTVKDKV
FPKSCDKTHTCP
CapeLLGG ピンジ

PDVFLFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVV
SVLHQDWLN
CH2

GKEYCKVSNKALPAPEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
NSNGQOPENNYKTT
CH3

PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMEHALHNHYTQKSLSPGKGSNNW
VNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
リンクー

LYTESDVHPSCVTAMKCFLLELQVISLESQDASHD
TVENLILANNSSNGNVTESGCKECEEEKNIKEFLQSFVHV
IL15mut

QMFINTS

配列番号:30 SDIE変改を有する抗CD19 IgG1 (4G7) 重鎖とIL15(E46K) 変異体との短いリンクーによる融合タンパク質

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYKNEFKGKATLTS
DKSSNT
4G7-VH

【図7-2】

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
リンクー
LYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQVISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEENIKEFLQSFVHIV
IL15mut
QMFIINTS

配列番号:31 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖とIL15(V49D)変異体との短いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
リンクー
LYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEENIKEFLQSFVHIV
IL15mut
QMFIINTS

QMFIINTS

【図7-4】

ECEEELEENIKEFLQSFVHIVQMFIINTS

配列番号:34 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖とIL15(E46K)変異体との長いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKGSGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCK
IL15mut
ECEEELEENIKEFLQSFVHIVQMFIINTS

配列番号:35 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖とIL15(V49D)変異体との長いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGSNWV

【図7-3】

配列番号:32 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖とIL15(I50D)変異体との短いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
リンクー
LYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEENIKEFLQSFVHIV
IL15mut
QMFIINTS

QMFIINTS

配列番号:33 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖と野生型IL15との長いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKGSGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCK
IL15mut

【図7-5】

リンクー

NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCK
IL15mut

ECEEELEENIKEFLQSFVHIVQMFIINTS

配列番号:36 SDIE変異を有する抗CD19 IgG1(4G7)重鎖とIL15(I50D)変異体との長いリンクーによる融合タンパク質

EVLQQSGPELIKPGASVMSCKASGYFTSYVMIHWVKQPGQGLEWIGYINPYNDGKYNEFKFGKATLTSKSSST
4G7-VH
AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1
WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKVVEPKSCDKTHTCPCTPAPELLGG
ヒンジ
PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLHQDWLN
CH2
GKEYCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
CH3
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLILQDISLESGDASIHDVTENLIIANNSLSSNGNVTESGCK
IL15mut
ECEEELEENIKEFLQSFVHIVQMFIINTS

配列番号:37 抗CD19 IgG1(4G7)軽鎖

DIVMTQAAPSIPTPGEVSISCRSSKSLINNSNGNTLYWFQRLPGQSPQLIYRMSNLASGVPDFSGSGSGTAFTRISRVEA
4G7-VL
DVGVYYCMQHLEYPTFAGTICKELKRTVAAPSFIFPSPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
CL
VTEQDSKDSTSYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFSNRGEC

【図8】

配列番号:38 SDIE変改を有する抗FLT3 IgG1(BV10)重鎖とIL15変異体との融合タンパク質

```
QVQLKQSGPGIVQPSQLSITCTVGSFLTNYGLHWWVRQSPGKLEWLGVIWGGSTDYNAAFISRLSISKDNKSQVFFKVM
BV10-VH

SIADDATIYCARCGGIYANHYAMDWGQGTSVITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1

WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTVKDKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELGG
ヒンジ

PDVLFPPPKDLMISRTPEVCFNWWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
CH2

KEYKCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTP
CH3

PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー

NIVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAHKCFLKLQVISLESGDASHDVTENLILANNLSSNGNVTESGCK
IL15mut

ECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIINTS
```

配列番号:39 抗FLT3 IgG1(BV10)軽鎖

```
DIVMTQSPSSLVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPKLIIYGASTRESGVPDFTGSGSGTDETLTISV
Kro23-VL

QAEELAVYYCQNDHSYPLTFAGTKEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
CL

VTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

【図9】

配列番号:40 SDIE変改を有する抗FLT3 IgG1(4G8)重鎖とIL15変異体との融合タンパク質

```
QVQLQQPGEALVKPGASLKLCKSSGYFTSYWMIWVRQRPGHGLEWIGEDPSDSYKDYNQFKDKATLTVDSSNT
4G8-VH

AYMHLLSSLSDDAVYYCARAITTPEDEWGQGTTTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1

WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTVKDKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELGG
ヒンジ

PDVLFPPPKDLMISRTPEVCFNWWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
CH2

GKEYKCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTP
CH3

PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー

NIVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAHKCFLKLQVISLESGDASHDVTENLILANNLSSNGNVTESGCK
IL15mut

ECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIINTS
```

配列番号:41 抗FLT3 IgG1(4G8)軽鎖

```
DIVLTQSPATLSVTGDSVSLCRASQSIISNNIHWYQQKSHGKSHPRLLIKYASQISGIPSRFGSGSGTDFTLSINSVETED
4G8-VL

FGVYFCQQSNNTWPYTFGGGTKEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
CL

VTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

【図10-1】

配列番号:42 SDIE変改を有する抗PSMA IgG1(J591)重鎖と野生型IL15との融合タンパク質

```
EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFETYIHWVKOSHGSLEWIGNINPNNGGTYNQKFEDKATLTVDSSSTJ591-VH

AYMELRSLTSEDAVYYCAAGWNFDYWGGQTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1

WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTVKDKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELGG
ヒンジ

PDVLFPPPKDLMISRTPEVCFNWWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
CH2

KEYKCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTP
CH3
```

【図10-2】

PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー

NIVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAHKCFLKLQVISLESGDASHDVTENLILANNLSSNGNVTESGCK
IL15mut

ECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIINTS

配列番号:43 SDIE変改を有する抗PSMA IgG1(J591)重鎖とIL15(E46K)変異体との融合タンパク質

```
EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFETYIHWVKOSHGSLEWIGNINPNNGGTYNQKFEDKATLTVDSSSTJ591-VH

AYMELRSLTSEDAVYYCAAGWNFDYWGGQTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDVFPEPVTVS
CH1

WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTVKDKVEPKSCDKTHTCPGCPAPELGG
ヒンジ

PDVLFPPPKDLMISRTPEVCFNWWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN
CH2

GKEYKCKVSNKALPAPEEKTISAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTP
CH3

PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGKSGGGGGGGGGGGGGGSNWV
リンクー

NIVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAHKCFLKLQVISLESGDASHDVTENLILANNLSSNGNVTESGCK
IL15mut

ECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFIINTS
```

配列番号:44 抗PSMA IgG1(J591)軽鎖

```
NIVMTQSPKMSMSVGERTLTCKASENVVTVSWYQQKPEQSPKLIYGA$NRYTGVPDFRTGSGSATDFLTISVQAED
J591-VL

LADYHCGOGYSPYTFGGGTKEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
CL

VTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

【配列表】

0006757338000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	2/00	(2006.01)	C 0 7 K	2/00	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/62	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/62	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 N	15/24	

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ギュントラム, ユング

ドイツ国、72108 ロッテンブルク、シュヴァプシュトラーセ 30

(72)発明者 サリフ, ヘルムート

ドイツ国、70180 シュトゥットガルト、シュロッサー・シュトラーセ 5

(72)発明者 リントナー, コーネリア

ドイツ国、72076 テュービンゲン、エンゲルフリー・シュバルデ 102

(72)発明者 ロッホマン, ベリト

ドイツ国、68305 マンハイム、アルゼンヴェーク 26

審査官 堂畠 厚志

(56)参考文献 特表2007-528726 (JP, A)

特表2008-523132 (JP, A)

Reviews in Molecular Biotechnology, 2001年, vol. 74, pp. 257-275

Journal of Molecular Recognition, 2000年, vol. 13, no. 4, pp. 167-187

Oncoimmunology, 2012年, vol. 1, no. 7, p. 1213-1214

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

A 6 1 K

C 0 7 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

(66)

JP 6757338 B2 2020.9.16

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
G e n e S e q / P D B / D D B J / U n i p r o t
P u b M e d