

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-521448

(P2020-521448A)

(43) 公表日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/13 (2006.01)
C 07 K 16/46 (2006.01)
C 07 K 16/28 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 Q 1/02 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/13
C 07 K 16/46
C 07 K 16/28
C 12 N 5/10
C 12 Q 1/02

テーマコード(参考)

4 B 06 3
4 B 06 5
4 C 08 5
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-564793 (P2019-564793)
(86) (22) 出願日 平成30年5月22日 (2018.5.22)
(85) 翻訳文提出日 令和2年1月20日 (2020.1.20)
(86) 國際出願番号 PCT/US2018/033952
(87) 國際公開番号 WO2018/217799
(87) 國際公開日 平成30年11月29日 (2018.11.29)
(31) 優先権主張番号 62/549, 200
(32) 優先日 平成29年8月23日 (2017.8.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/510, 135
(32) 優先日 平成29年5月23日 (2017.5.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 519288755
ドラゴンフライ セラピューティクス,
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
451, ウォルサム, ゲートハウス
ドライブ 35
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

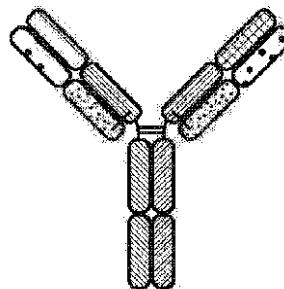
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NKG2D、CD16、およびROR1またはROR2に結合するタンパク質

(57) 【要約】

NKG2D受容体、CD16および腫瘍関連抗原ROR1またはROR2に結合する多重特異性結合タンパク質、ならびにがんの処置に有用な医薬組成物および治療方法が記載される。本発明は、ナチュラルキラー細胞におけるNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原ROR1またはROR2に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。かかるタンパク質は2種類以上のNK活性化受容体と会合することができ、天然リガンドのNKG2Dへの結合を阻止し得る。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいてNK細胞を刺激し得る。一部の実施形態では、タンパク質は、ヒトならびにげっ歯動物およびカニクイザルなどの他の種においてNK細胞を刺激し得る。

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位と、
(b) ROR1またはROR2に結合する第2の抗原結合部位と、
(c) CD16に結合するに十分な抗体Fcドメインもしくはその一部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位と
を含むタンパク質。

【請求項 2】

前記第1の抗原結合部位が、ヒト、非ヒト靈長類、およびげっ歯動物のNKG2Dに結合する、請求項1に記載のタンパク質。 10

【請求項 3】

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

【請求項 4】

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

【請求項 5】

前記第2の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項3または4に記載のタンパク質。 20

【請求項 6】

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

【請求項 7】

前記第1の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する、請求項5または6に記載のタンパク質。 30

【請求項 8】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号1、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85および配列番号93から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインを含む、先行する請求項のいずれか一項に記載のタンパク質。 30

【請求項 9】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号41と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号42と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号49と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号50と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。 40

【請求項 11】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号57と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号58と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号59と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号60と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号61と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号62と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7 50

のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号69と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号70と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 15】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号77と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号78と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 16】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号85と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号86と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 17】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号93と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号94と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 18】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号101と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号102と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 19】

前記第1の抗原結合部位が、配列番号103と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号104と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1から7のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 20】

前記第1の抗原結合部位が、單一ドメイン抗体である、請求項1または2に記載のタンパク質。

【請求項 21】

前記單一ドメイン抗体が、 V_H 断片または V_{NAR} 断片である、請求項20に記載のタンパク質。

【請求項 22】

前記第2の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項1、2、または20から21のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 23】

前記第2の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、請求項22に記載のタンパク質。

【請求項 24】

前記第2の抗原結合部位は、ROR1に結合し、前記第2の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号105と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号109と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～23のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 25】

前記第2の抗原結合部位は、ROR1に結合し、前記第2の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号113と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号117と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～23のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 26】

前記第2の抗原結合部位は、ROR1に結合し、前記第2の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号121と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の

10

20

30

40

50

抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 125 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 27】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 129 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 133 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 28】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 137 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 141 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

10

【請求項 29】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 145 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 149 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 30】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 153 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 157 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

20

【請求項 31】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR2 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 162 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 166 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 32】

前記第 2 の抗原結合部位は、ROR2 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインは、配列番号 170 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 174 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

30

【請求項 33】

前記第 2 の抗原結合部位が、單一ドメイン抗体である、請求項 1 から 4 または 8 から 21 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 34】

前記第 2 の抗原結合部位が、V_H H 断片または V_{N A R} 断片である、請求項 33 に記載のタンパク質。

【請求項 35】

前記タンパク質が、CD16 に結合するに十分な抗体 Fc ドメインの一部分を含み、前記抗体 Fc ドメインが、ヒンジおよび CH2 ドメインを含む、先行する請求項のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

40

【請求項 36】

前記抗体 Fc ドメインが、ヒト IgG1 抗体のヒンジおよび CH2 ドメインを含む、請求項 35 に記載のタンパク質。

【請求項 37】

前記 Fc ドメインが、ヒト IgG1 抗体のアミノ酸 234 ~ 332 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 35 または 36 に記載のタンパク質。

【請求項 38】

前記 Fc ドメインが、ヒト IgG1 の Fc ドメインと少なくとも 90% 同一のアミノ酸

50

配列を含み、Q 3 4 7、Y 3 4 9、L 3 5 1、S 3 5 4、E 3 5 6、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、T 3 6 6、L 3 6 8、K 3 7 0、N 3 9 0、K 3 9 2、T 3 9 4、D 3 9 9、S 4 0 0、D 4 0 1、F 4 0 5、Y 4 0 7、K 4 0 9、T 4 1 1、K 4 3 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置において異なる、請求項37に記載のタンパク質。

【請求項39】

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

【請求項40】

請求項1から38のいずれか一項に記載のタンパク質を発現する1つまたは複数の核酸を含む細胞。

【請求項41】

有効量の、請求項1～38のいずれか1項に記載のタンパク質に、腫瘍細胞およびナチュラルキラー細胞を曝露する工程を包含する、腫瘍細胞死を増強する方法。

【請求項42】

有効量の、請求項1～38のいずれか1項に記載のタンパク質または請求項39に記載の製剤を、患者に投与することを包含する、がんを処置する方法。

【請求項43】

前記タンパク質の前記第2の抗原結合部位は、R O R 1に結合し、処置される前記がんは、悪性黒色腫、前立腺がん、慢性リンパ芽球性白血病、血液悪性腫瘍、卵巣がん、トリプルネガティブ乳がん、非小細胞肺がん、および結腸直腸がんからなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記タンパク質の前記第2の抗原結合部位は、R O R 2に結合し、処置される前記がんは、骨肉腫、腎細胞癌、黒色腫、結腸がん、頭頸部の扁平上皮癌、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、リンパ腫、中皮腫、膵臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮がん、肉腫、および前立腺がんからなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2017年5月23日に出願された米国仮特許出願番号第62/510,135号、および2017年8月23日に出願された米国仮特許出願番号第62/549,200号に基づく利益および優先権を主張し、これらのそれぞれの全体の内容は、すべての目的のために本明細書中に参考として援用される。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子提出された配列表を含み、その全体は、参照により本明細書に組み込まれている。前記ASCIIコピーは2018年5月17日に作成され、DFY-017WO_SL.txtという名称であり、133,432バイトのサイズである。

【0003】

発明の分野

本発明は、NKG2D、CD16、および腫瘍関連抗原R O R 1またはR O R 2に結合する多重特異性結合タンパク質に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

がんは、この疾患を処置するための文献に報告されている十分な研究努力および科学進

10

20

30

40

50

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

【0005】

がん免疫療法は、それらが非常に特異的であり、患者自身の免疫系を使用してがん細胞の破壊を促進することができるので望ましい。二重特異性T細胞エンゲージャーなどの融合タンパク質は、腫瘍細胞の破壊を促進するために腫瘍細胞およびT細胞に結合する、文献に記載されているがん免疫療法である。ある特定の腫瘍関連抗原およびある特定の免疫細胞に結合する抗体は文献に記載されている。例えば、WO 2016/134371およびWO 2015/095412を参照されたい。

10

【0006】

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

20

【0007】

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

30

【0008】

チロシン-プロテインキナーゼ膜貫通受容体ROR1（神経栄養チロシンキナーゼ受容体関連1（NTRKR1）としても公知）は、膜貫通受容体チロシンキナーゼ様タンパク質であり、胚発生の間に細胞において主に発現される。しかし、ROR1は、いくつかのがんの種類（悪性黒色腫、乳がん、前立腺がん、慢性リンパ芽球性白血病、血液悪性腫瘍、卵巣がん、トリプルネガティブ乳がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がん、および他の固形腫瘍が挙げられる）において再発現することが示される。ROR1は、がんの種類および環境に依存した様式で腫瘍形成経路を媒介することによって、がん細胞の生存および増殖を促進する。

40

受容体チロシンキナーゼ（RTK）は、リガンド制御されたチロシンキナーゼ活性を通じて正常な細胞プロセスをモジュレートする細胞表面受容体である。RTK様オーファン受容体（ROR）2は、発生中の胚において発現され、胚性の肢芽、心臓、原始生殖器、発生中の体節、および間葉系細胞に存在するオーファン受容体である。ROR2は、Wntリガンドのシグナル伝達受容体であり、四肢発生において重要な役割を果たすが、成体組織においては公知の必須の役割を有しない。さらに、ROR2は、多くのがん（例えば、骨肉腫、腎細胞癌、悪性黒色腫、結腸がん、頭頸部の扁平上皮癌、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、リンパ腫、中皮腫、膵臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮がん、肉腫、および前立腺がん）において高発現されることが見出される。これらのがんの種類の大部分において、ROR2発現は、より攻撃的な疾患状態と関連する。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2016/134371号

【特許文献2】国際公開第2015/095412号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

要旨

本発明は、ナチュラルキラー細胞におけるNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原ROR1またはROR2に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。かかるタンパク質は2種類以上のNK活性化受容体と会合することができ、天然リガンドのNKG2Dへの結合を阻止し得る。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトにおいてNK細胞を刺激し得る。一部の実施形態では、タンパク質は、ヒトならびにげつ歯動物およびカニクイザルなどの他の種においてNK細胞を刺激し得る。本発明の様々な態様および実施形態を以下にさらに詳細に記載する。

10

【0011】

したがって、本発明の一態様は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位と、腫瘍関連抗原ROR1またはROR2に結合する第2の抗原結合部位と、CD16に結合するに十分な抗体Fcドメイン、その一部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位とを組み込んだタンパク質を提供する。

20

【0012】

抗原結合部位は各々、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメイン（例えば、抗体のように配列されるか、またはscFvを形成するために一緒に融合される）を組み込んでいてもよい、または抗原結合部位の1つもしくは複数は、ラクダ科抗体のようなV_H抗体もしくは軟骨魚類に見出されるもののようなV_{NAR}抗体などの単一ドメイン抗体であってもよい。

20

【0013】

一態様では、本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原ROR1またはROR2に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。NKG2D結合部位は、配列番号1、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85、および配列番号93から選択されるアミノ酸と少なくとも90%同一な重鎖可変ドメインを含む。

30

【0014】

NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位は、一部の実施形態では、例えば配列番号1と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一のアミノ酸配列を有すること、ならびに/または、配列番号1のCDR1（配列番号186）、CDR2（配列番号187）、およびCDR3（配列番号188）配列と同一のアミノ酸配列を組み込むことにより、配列番号1に関連する重鎖可変ドメインを組み込んでいてもよい。配列番号1に関する重鎖可変ドメインは、種々の軽鎖可変ドメインと結びついてNKG2D結合部位を形成することができる。例えば、配列番号1に関する重鎖可変ドメインを組み込む第1の抗原結合部位はさらに、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、および40に関する配列のうちのいずれか1つから選択される軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第1の抗原結合部位は、配列番号1と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一なアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、および40から選択される配列のうちのいずれか1つと少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%）

40

50

、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一なアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを組み込む。

【0015】

代替的に、第1の抗原結合部位は、配列番号41に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号42に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号41と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または列番号41のCDR1（配列番号43）、CDR2（配列番号44）、およびCDR3（配列番号45）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号42と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号42のCDR1（配列番号46）、CDR2（配列番号47）、およびCDR3（配列番号48）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

10

【0016】

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

20

【0017】

代替的に、第1の抗原結合部位は、例えば、それぞれ、配列番号57と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一である、および配列番号58と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列を有することによって、配列番号57に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号58に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。別の実施形態では、第1の抗原結合部位は、配列番号59に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号60に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号59と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号59のCDR1（配列番号180）、CDR2（配列番号181）、およびCDR3（配列番号182）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号60と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号60のCDR1（配列番号183）、CDR2（配列番号184）、およびCDR3（配列番号185）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

30

【0018】

NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位は、一部の実施形態では、配列番号61に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号62に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号61と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号61のCDR1

40

50

(配列番号 6 3)、 C D R 2 (配列番号 6 4)、 および C D R 3 (配列番号 6 5) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 6 2 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 6 2 の C D R 1 (配列番号 6 6)、 C D R 2 (配列番号 6 7)、 および C D R 3 (配列番号 6 8) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 6 9 に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号 7 0 に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 6 9 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 6 9 の C D R 1 (配列番号 7 1)、 C D R 2 (配列番号 7 2)、 および C D R 3 (配列番号 7 3) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 7 0 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 7 0 の C D R 1 (配列番号 7 4)、 C D R 2 (配列番号 7 5)、 および C D R 3 (配列番号 7 6) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。
10

【0 0 1 9】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 7 7 に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号 7 8 に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 7 7 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 7 7 の C D R 1 (配列番号 7 9)、 C D R 2 (配列番号 8 0)、 および C D R 3 (配列番号 8 1) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 7 8 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 7 8 の C D R 1 (配列番号 8 2)、 C D R 2 (配列番号 8 3)、 および C D R 3 (配列番号 8 4) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。
20

【0 0 2 0】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 8 5 に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 8 5 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 8 5 の C D R 1 (配列番号 8 7)、 C D R 2 (配列番号 8 8)、 および C D R 3 (配列番号 8 9) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、 C D R 2 (配列番号 9 1)、 および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。
30

【0 0 2 1】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 9 3 に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号 9 4 に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 9 3 の C D R 1 (配列番号 9 5)、 C D R 2 (配列番号 9 6)、 および C D R 3 (配列番号 9 7) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 9 4 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 %) 同一であり、かつ / または配列番号 9 4 の C D R 1 (配列番号 9 8)、 C D R 2 (配列番号 9 9)、 および C D R 3 (配列番号 9 10) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。
40

10

20

30

40

50

6%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号94のCDR1（配列番号98）、CDR2（配列番号99）、およびCDR3（配列番号100）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0022】

一部の実施形態では、第1の抗原結合部位は、例えば、それぞれ、配列番号101と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一である、および配列番号102と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列を有することによって、配列番号101に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号102に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。一部の実施形態では、第1の抗原結合部位は、例えば、それぞれ、配列番号103と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一である、および配列番号104と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であるアミノ酸配列を有することによって、配列番号103に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号104に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。

10

【0023】

代替的に、ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号105に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号109に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号105と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号105のCDR1（配列番号106）、CDR2（配列番号107）、およびCDR3（配列番号108）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号109と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号109のCDR1（配列番号110）、CDR2（配列番号111）、およびCDR3（配列番号112）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

20

30

【0024】

代替的に、ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号113に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号117に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号113と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号113のCDR1（配列番号114）、CDR2（配列番号115）、およびCDR3（配列番号116）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号117と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号117のCDR1（配列番号118）、CDR2（配列番号119）、およびCDR3（配列番号120）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

40

【0025】

ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号121に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号125に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号121と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号121のCDR1（配列番号122）、CDR2（配列番号123）、およびCDR3（配列番号124）

50

配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号125と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号125のCDR1（配列番号126）、CDR2（配列番号127）、およびCDR3（配列番号128）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0026】

ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号129に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号133に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号129と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号129のCDR1（配列番号130）、CDR2（配列番号131）、およびCDR3（配列番号132）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号133と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号133のCDR1（配列番号134）、CDR2（配列番号135）、およびCDR3（配列番号136）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

10

【0027】

ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号137に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号141に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号137と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号137のCDR1（配列番号138）、CDR2（配列番号139）、およびCDR3（配列番号140）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号141と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号141のCDR1（配列番号142）、CDR2（配列番号143）、およびCDR3（配列番号144）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

20

30

【0028】

代替的に、ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号145に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号149に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号145と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号145のCDR1（配列番号146）、CDR2（配列番号147）、およびCDR3（配列番号148）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号149と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号149のCDR1（配列番号150）、CDR2（配列番号151）、およびCDR3（配列番号152）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

40

【0029】

代替的に、ROR1に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号153に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号157に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号153と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%）同一であり、かつ／または配列番号153のCDR1（配列番号154）、CDR2（配列番号155）、およびCDR3（配列番号156）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

50

、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号153のCDR1（配列番号154）、CDR2（配列番号155）、およびCDR3（配列番号156）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号157と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号157のCDR1（配列番号158）、CDR2（配列番号159）、およびCDR3（配列番号160）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0030】

ROR2に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号162に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号166に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号162と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号162のCDR1（配列番号163）、CDR2（配列番号164）、およびCDR3（配列番号165）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号166と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号166のCDR1（配列番号167）、CDR2（配列番号168）、およびCDR3（配列番号169）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0031】

ROR2に結合する第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号170に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号174に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号170と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号170のCDR1（配列番号171）、CDR2（配列番号172）、およびCDR3（配列番号173）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号174と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ／または配列番号174のCDR1（配列番号175）、CDR2（配列番号176）、およびCDR3（配列番号177）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

本発明の別の態様は、患者のがんを処置する方法を提供する。本方法は、それを必要とする患者に、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質を治療有効量で投与することを

10

20

30

40

50

含む。R O R 1 を標的とする多重特異性結合タンパク質を使用して処置するがんとして、R O R 1 を発現する任意のがん、例えば、悪性黒色腫、前立腺がん、慢性リンパ球性白血病、血液悪性腫瘍、卵巣がん、トリプルネガティブ乳がん、非小細胞肺がん、および結腸直腸がんが挙げられる。R O R 2 を標的とする多重特異性結合タンパク質を使用して処置するがんとして、R O R 2 を発現する任意のがん、例えば、骨肉腫、腎細胞癌、黒色腫、結腸がん、頭頸部の扁平上皮癌、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、リンパ腫、中皮腫、膵臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮がん、肉腫、および前立腺がんが挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、ヘテロ二量体の多重特異性抗体の図である。各アームは、N K G 2 D 結合ドメインまたはR O R 1 またはR O R 2 の結合ドメインのいずれかを表し得る。一部の実施形態では、N K G 2 D 結合ドメインおよび抗原結合ドメインは、共通の軽鎖をもつ場合がある。

【0037】

【図2】図2は、ヘテロ二量体の多重特異性抗体の図である。N K G 2 D 結合ドメインまたはR O R 1 またはR O R 2 への結合ドメインのいずれかは、s c F v フォーマット(右アーム)をとることができる。

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

【図10】図10は、天然リガンドR a e - 1 デルタと競合することによる、組換えマウスN K G 2 D - F c に対するN K G 2 D 結合ドメイン(クローナンとして列記されている)の特異的結合親和性を示す線グラフである。

【0046】

10

20

30

40

50

【図11】図11は、ヒトNKG2D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF-陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるヒトNKG2Dの活性化を示す棒グラフである。

【0047】

【図12】図12は、マウスNKG2D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF-陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるマウスNKG2Dの活性化を示す棒グラフである。

【0048】

【図13】図13は、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

10

【0049】

【図14】図14は、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0050】

【図15】図15は、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0051】

【図16】図16は、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

20

【0052】

【図17】図17は、腫瘍細胞に対するNKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）の細胞傷害作用を示す棒グラフである。

【0053】

【図18】図18は、示差走査型蛍光定量法によって測定された、NKG2D結合ドメイン（クローナンとして列記されている）の融解温度を示す棒グラフである。

【0054】

【図19】図19A～19Cは、CD16およびNKG2D結合を使用したNK細胞の相乗的活性化の棒グラフである。図19AはCD107aのレベルを示し、図19BはIFNのレベルを示し、図19CはCD107aおよびIFNのレベルを示す。グラフは平均（n = 2）± SDを示している。データは、5名の異なる健康なドナーを使用した、5つの独立した実験を代表するものである。

30

【0055】

【図20】図20は、IgG様形状を維持する三機能性の二重特異性抗体であるTrioma b形態におけるTriNKETの図である。このキメラは、2つの親抗体に由来する2つの半抗体からなり、各半抗体が1本の軽鎖および1本の重鎖を有する。Trioma b形態は、ラット抗体の1/2およびマウス抗体の1/2を含有するヘテロ二量体構築物であり得る。

【0056】

【図21】図21は、ノブ・イントゥ・ホール（KIH：knobs-in-to-holes）技術を用いるKIH共通軽鎖（LC）形態におけるTriNKETの図である。KIHは、標的1および2に結合する2つのFab、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体である。KIHフォーマットにおけるTriNKETは、2つの異なる重鎖と、両方の重鎖と対合する共通の軽鎖とを含有する、標的1および標的2に結合する2つのFabを有するヘテロ二量体構築物であり得る。

40

【0057】

【図22】図22は、自然起源の可動性リンカーを介して2つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせ、四価のIgG様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））形態におけるTriNKETの図である。DVD-Ig（商標）とは、抗原2を標的とする可変ドメインが、抗原1を標的とするFabの可変ドメインのN末端に融合しているホモ二量体構築物である。構築物は通常のFcを含有す

50

る。

【0058】

【図23】図23は、Fcに融合した標的1および標的2に結合する2つのFabを含有するヘテロ二量体構築物である、直交性Fab界面（オルト-Fab）形態におけるTriNKEETの図である。LC-HCの対合は、直交界面によって確実になっている。ヘテロ二量体化は、Fcにおける突然変異によって確実になっている。

【0059】

【図24】図24は、2in1 IgフォーマットにおけるTriNKEETの図である。

【0060】

【図25】図25は、Fcに融合した標的1および標的2に結合する2つの異なるFabを含有するヘテロ二量体構築物である、ES形態におけるTriNKEETの図である。ヘテロ二量体化は、Fcにおける静電的ステアリング突然変異によって確実になっている。

【0061】

【図26】図26は、Fabアーム交換形態におけるTriNKEET、すなわち、重鎖および結合した軽鎖（半分子）を別の分子の重-軽鎖対とスワップすることによりFabアームを交換した結果、二重特異性抗体となった抗体の図である。Fabアーム交換形態（cFab）は、標的1および2に結合する2つのFab、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体である。

【0062】

【図27】図27は、標的1および2に結合する2つのFab、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体である、SEED Body形態におけるTriNKEETの図である。

【0063】

【図28】図28は、2つの異なるHCのヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーを使用する、LuZ-Y形態におけるTriNKEETの図である。LuZ-Y形態は、Fcに融合した標的1および2に結合する2つの異なるscFabを含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、FcのC末端に融合したロイシンジッパーモチーフによって確実になっている。

【0064】

【図29】図29は、Cov-X-Body形態におけるTriNKEETの図である。

【0065】

【図30】図30Aおよび30Bは、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcに融合した2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である、-Body形態におけるTriNKEETの図である。抗原1を標的とするFab1はカッパLCを含有し、一方、抗原2を標的とする第2のFab2はラムダLCを含有する。図30Aは、-Bodyの一形態の例示的な図であり、図30Bは、別の-Bodyの例示的な図である。

【0066】

【図31】図31は、Fcに融合した、標的1に結合するFabと、標的2に結合するscFabとを含む、Oasc-Fabヘテロ二量体構築物である。ヘテロ二量体化は、Fcにおける突然変異によって確実になっている。

【0067】

【図32】図32は、抗原1および2に結合する2つの異なるFab、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体構築物である、DuetMabである。Fab1および2は、軽鎖（LC）および重鎖（HC）の正確な対合を確実にする特異な（differential）S-S架橋を含有する。

【0068】

【図33】図33は、ヘテロ二量体化によって安定化されたFcに融合した標的1および2に結合する2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である、CrossmAbである。CLドメインおよびCH1ドメインと、VhドメインおよびVLドメインとが切

10

20

30

40

50

り換わっており、例えば、C H 1 は、V L とインラインで融合しており、一方、C L は、V H とインラインで融合している。

【0069】

【図34】図34は、抗原2に結合するF a bが、抗原1に結合するF a bのH CのN末端に融合しているホモ二量体構築物である、F i t - I gである。この構築物は、野生型F cを含有する。

【発明を実施するための形態】

【0070】

詳細な説明

本発明は、ナチュラルキラー細胞上のN K G 2 D受容体およびC D 1 6受容体、ならびに腫瘍関連抗原R O R 1またはR O R 2に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質はさらに、腫瘍関連抗原に結合するさらなる抗原結合部位を含む。本発明は、かかる多重特異性結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびに、がんの処置などの目的のためのかかる多重特異性タンパク質および医薬組成物を使用する治療方法も提供する。本発明の様々な態様を複数のセクションに分けて以下に記述する。しかしながら、1つの特定のセクションに記載される本発明の態様は、いずれかの特定のセクションに限定されるものではない。

10

【0071】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および句を以下に定義する。

20

【0072】

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

【0073】

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

30

【0074】

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

40

【0075】

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

50

【0076】

本明細書中で使用される場合、「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な化合物（例えば、本発明の化合物）の量を指す。有効量は、1回または複数回の投与、適用または投薬量で投与されてもよく、特定の製剤または投与経路に限定されることを意図しない。本明細書中で使用される場合、「処置する」という用語は、何らかの効果、例えば、状態、疾患、障害などの好転をもたらす、減少、低減、モジュレート、改善もしくは除去、またはそれらの症状の改善を含む。

【0077】

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

10

【0078】

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

20

【0079】

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

30

【0080】

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

30

【0081】

例示的な塩には、限定されないが、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウウノウ酸塩、ショウウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアノ酸塩、トシリ酸塩、ウンデカン酸塩などが含まれる。塩の他の例には、Na⁺、NH₄⁺ および NW₄⁺（式中、WはC₁~₄アルキル基である）などの適切なカチオンと配合された本発明の化合物のアニオンが含まれる。

40

【0082】

治療的使用のために、本発明の化合物の塩は、薬学的に許容されると意図される。しかしながら、薬学的に許容されない酸および塩基の塩も、例えば、薬学的に許容される化合

50

物の調製または精製において使用することができる。

【0083】

組成物が特定の成分を有する、含む (including)、もしくは含む (comprising) と記載されているか、またはプロセスおよび方法が特定のステップを有する、含む (including)、もしくは含む (comprising) と記載されている説明全体にわたって、さらに、列挙された成分から本質的になる、またはそれからなる本発明の組成物が存在すること、ならびに列挙されたプロセスステップから本質的になる、またはそれからなる本発明によるプロセスおよび方法が存在することが意図される。

【0084】

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

I. タンパク質

【0085】

本発明は、ナチュラルキラー細胞における NKG2D 受容体および CD16 受容体、および腫瘍関連抗原 ROR1 または ROR2 に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載の医薬組成物および治療方法において有用である。ナチュラルキラー細胞の NKG2D 受容体および CD16 受容体に多重特異性結合タンパク質が結合すると、ROR1 または / および ROR2 抗原を発現する腫瘍細胞の破壊を目的としたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。ROR1 または ROR2 発現細胞に多重特異性結合タンパク質が結合すると、がん細胞がナチュラルキラー細胞に近接するため、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的な破壊が容易になる。一部の例示的な多重特異性結合タンパク質のさらなる記載を以下に提供する。

【0086】

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

【0087】

多重特異性結合タンパク質の第2成分は、ROR1 または ROR2 に結合する。ROR1 発現細胞は、例えば、悪性黒色腫、前立腺がん、慢性リンパ球性白血病、血液悪性腫瘍、卵巣がん、トリプルネガティブ乳がん、非小細胞肺がん、および結腸直腸がんにおいて見出され得る。ROR2 発現細胞は、例えば、骨肉腫、腎細胞癌、黒色腫、結腸がん、頭頸部の扁平上皮癌、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、リンパ腫、中皮腫、膵臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮がん、肉腫、および前立腺がんにおいて見出され得る。

【0088】

多重特異性結合タンパク質の第3の構成要素は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、マスト細胞、および濾胞性樹状細胞を含む白血球の表面にあるFc受容体であるCD16を発現する細胞に結合する。

【0089】

本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、様々なフォーマットをとることができる。例えば、1つのフォーマットは、第1の免疫グロブリン重鎖、第1の免疫グロブリン軽鎖、第2の免疫グロブリン重鎖、および第2の免疫グロブリン軽鎖を含む、ヘテロ二量体の多重特異性抗体(図1)である。第1の免疫グロブリン重鎖は、第1のFc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメインと、第1の重鎖可変ドメインと、必要に応じて第1のCH1重鎖ドメインとを含む。第1の免疫グロブリン軽鎖は、第1の軽鎖可変ドメインおよび第1の軽鎖定常ドメインを含む。第1の免疫グロブリン軽鎖は、第1の免疫グロブリン重鎖と一緒に、NKG2Dに結合する抗原結合部位を形成する。第2の免疫グロブリン重鎖は、第2のFc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメインと、第2の重鎖可変ドメインと、必要に応じて第2のCH1重鎖ドメインとを含む。第2の免疫グロブリン軽鎖は、第2の軽鎖

10

20

30

40

50

可変ドメインおよび第2の軽鎖定常ドメインを含む。第2の免疫グロブリン軽鎖は、第2の免疫グロブリン重鎖と一緒に、ROR1またはROR2に結合する抗原結合部位を形成する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒にCD16に結合することができる(図1)。一部の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖は、第2の免疫グロブリン軽鎖と同一である。

【0090】

別の例示的フォーマットは、第1の免疫グロブリン重鎖、第2の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含む、ヘテロ二量体の多重特異性抗体(図2)に関する。第1の免疫グロブリン重鎖は、対合し、NKG2Dに結合する、またはROR1およびROR2から選択される抗原に結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインから構成された一本鎖可変断片(scfv)に、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して融合している、第1のFc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、第2のFc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメインと、第2の重鎖可変ドメインと、必要に応じてCH1重鎖ドメインとを含む。この免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリン軽鎖と対合し、NKG2Dに結合する、またはROR1またはROR2に結合する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒にCD16に結合することができる(図2)。

10

【0091】

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

20

【0092】

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

【0093】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ノブ・イントウ・ホール(KiH)技術を用いるKiH共通軽鎖(LC)形態である。KiHは、ヘテロ二量体化を促進するために、CH3ドメインを工学操作して各重鎖に「ノブ」または「ホール」のいずれかを作出することを伴う。「ノブ・イントウ・ホール(KiH)」Fc技術の背後にある概念は、小さな残基を嵩高の残基で置換することにより、1つのCH3ドメイン(CH3A)に「ノブ」(例えば、EU付番でT366W_{CH3A})を導入することであった。この「ノブ」に適応するように、他方のCH3ドメイン(CH3B)において、ノブに最も近い隣接残基をより小さな残基に置き換えること(例えば、T366S/L368A/Y407V_{CH3B})により、相補的な「ホール」表面が作出された。「ホール」突然変異は、構造情報に基づくファージライラリスクリーニング(Atwell S, Ridgway J B, Wells J A, Carter P., Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library, J Mol Biol (1997年) 270巻(1号): 26~35頁)によって最適化された。KiH Fc変異体のX線結晶構造(Elliott J M, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess Cら、Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. J Mol Biol (2014年) 426巻(9号): 1947~57頁、Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structur

30

40

50

e of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcRs. Mol Immunol (2014年) 58巻(1号): 132~8頁)は、CH3ドメイン間のコア界面では、立体的相補性によって推進される疎水性相互作用がヘテロ二量体化に熱力学的に有利に働くが、ノブ-ノブおよびホール-ホールの界面は、それぞれ立体障害および好ましい相互作用の妨害が原因でホモ二量体化に有利に働くことを示した。

【0094】

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

10

【0095】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、直交性Fab界面(オルト-Fab)形態におけるものである。オルト-Fab IgGアプローチ(Lewis SM、Wu X、Pustilnik A、Sereno A、Huang F、Rick H Lら、Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat. Biotechnol. (2014年) 32巻(2号): 191~8頁)では、構造に基づく領域デザインにより、一方のFabにおけるLCおよびHC_{VH}-CH₁の界面にのみ相補的突然変異が導入され、他方のFabが変化することはない。

20

【0096】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2 in 1 Igフォーマットにおけるものである。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Fcに融合した標的1および標的2に結合する2つの異なるFabを含有するヘテロ二量体構築物である、ES形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、Fcにおける静電的ステアリング突然変異によって確実になっている。

30

【0097】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcに融合した2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である、

-Body形態におけるものである。抗原1を標的とするFab1はカッパLCを含有し、一方、抗原2を標的とする第2のFabはラムダLCを含有する。図30Aは、-Bodyの一形態の例示的な図であり、図30Bは、別の-Bodyの例示的な図である。

40

【0098】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Fabアーム交換形態(重鎖および結合した軽鎖(半分子)を別の分子の重鎖-軽鎖対とスワップすることによりFabアームを交換した結果、二重特異性抗体となった抗体)である。

【0099】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、SEED Body形態におけるものである。SEED(strand-exchange engineered domain)プラットフォームは、天然抗体の治療用途を広げる可能性がある非対称かつ二重特異性抗体様の分子を生成するためにデザインされた。このタンパク質工学操作プラットフォームは、保存されたCH3ドメインにおける免疫グロブリンの構造的に関連した配列の交換に基づく。SEEDデザインは、AGおよびGA SEED CH3ドメインのホモ二量体化を回避しつつ、AG/GAヘテロ二量体の効果的な生成を可能にする(Muda M.ら、Protein Eng. Des. Sel. (2011年、24巻(5号): 447~54頁))。

【0100】

50

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2つの異なるH C のヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーを使用する、L u Z - Y 形態におけるものである (W r a n i k , B J . ら、J . B i o l . C h e m . (2 0 1 2 年) 、 2 8 7 卷 : 4 3 3 3 1 ~ 9 頁) 。

【 0 1 0 1 】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、C o v - X - B o d y 形態におけるものである。二重特異性C o v X - B o d y では、分枝状のアゼチジノンリンカーを使用して2つの異なるペプチドをひとつに結合させ、温和な条件下にてスキヤフォールド抗体に部位特異的様式で融合させる。機能的活性に関与するのはファルマコフォアだが、抗体スキヤフォールドは長い半減期およびI g 様の分布をもたらす。最適化された、または独特的二重特異性抗体を生成するために、ファルマコフォアは化学的に最適化するか、または他のファルマコフォアに置き換えることができる (D o p p a l a p u d i V R ら、P N A S (2 0 1 0 年) 、 1 0 7 卷 (5 2 号) ; 2 2 6 1 1 ~ 2 2 6 1 6 頁) 。

10

【 0 1 0 2 】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F c に融合した、標的1に結合するF a b と、標的2に結合するs c F a b とを含む、O a s c - F a b ヘテロ二量体形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、F c における突然変異によって確実になってい 20 る。

【 0 1 0 3 】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原1および2に結合する2つの異なるF a b 、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたF c を含有するヘテロ二量体構築物である、D u e t M a b 形態におけるものである。F a b 1 および2は、L C およびH C の正確な対合を確実にする特異なS - S 架橋を含有する。

20

【 0 1 0 4 】

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

30

【 0 1 0 5 】

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

【 0 1 0 6 】

表1は、組み合わせてN K G 2 D と結合することができる重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのペプチド配列を記載している。N K G 2 D 結合ドメインは、N K G 2 D に 対するそれらの結合親和性において変動し得、にも拘わらず、それらは全て、ヒトN K G 2 D およびN K 細胞を活性化する。

【表1-1】

表1		
クローン	重鎖可変領域のアミノ酸配列	軽鎖可変領域のアミノ酸配列
ADI- 27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (配列番号2)
ADI- 27724	CDR1 (配列番号186) – GSFSGYYWS CDR2 (配列番号187) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (配列番号188) – ARARGPWSFDP	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV

10

20

30

【表1-2】

	RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号3)	YYCQQYGSSPITFGGGTKVEI K (配列番号4)
ADI- 27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQYHSFYTFGGGTKEIK (配列番号6)
ADI- 27741	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQSNSYYTFGGGTKEIK (配列番号8)
ADI- 27743	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWSYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQYNSYPTFGGGTKVEIK (配列番号10)
ADI- 28153	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWGFDPWGQGTLTVSS (配列番号11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDFRSGS GSGTDFTLTISSSLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGQQGTKEIK (配列番号12)
ADI- 28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWSYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQYGSFPITFGGGTKEIK (配列番号14)

10

20

30

40

【表1-3】

ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPDDFATY YCQQSKEVPWTFGQGKVEIK (配列番号16)	10
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (配列番号18)	20
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (配列番号20)	30
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (配列番号22)	40
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (配列番号24)	
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG	

【表 1 - 4】

	KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 25)	SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (配列番号 26)	
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (配列番号 28)	10
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (配列番号 30)	20
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (配列番号 32)	30
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (配列番号 34)	40
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTVISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (配列番号 36)	

【表1-5】

ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQYELYSYTFGGTKVEIK (配列番号38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISWLAQYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSSLQPDDFATY YCQQYDTFITFGGGTKEIK (配列番号40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GDSSIRHAYYYYGMDVWGQGTTV TVSS (配列番号41) CDR1(配列番号43)- GTFSSYAI CDR2(配列番号44)- GIPIFGTANYAQKFQG CDR3(配列番号45)- ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLA QQKPGQPPKLLIYWASTRES VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQQYYSTPITFGG GTKVEIK (配列番号42) CDR1(配列番号46)- KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2(配列番号47)- WASTRES CDR3(配列番号48)- QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPLVKPSETSLTCTVS GGSISSSYYWGIRQPPGKGLEWI GSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG SDRFHPYFDYWGQGTLTVSS (配列番号49) CDR1(配列番号51)- GSISSSSYYWG	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAQYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (配列番号50) CDR1(配列番号54)- RASQSVSRYLA

10

20

30

40

【表 1 - 6】

	CDR2 (配列番号 52) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (配列番号 53) – ARGSDRFHPYFDY	CDR2 (配列番号 55) – DASN RAT CDR3 (配列番号 56) – QQFDTWPPT
ADI- 29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (配列番号 57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (配列番号 58)
ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR RGRKASGSFYYYYGMDVWGQGTT VTVSS (配列番号 59)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKPLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQNDYSYPYTFG QGTKLEIK (配列番号 60)
	CDR1 (配列番号 180) – GTFSSY AIS CDR2 (配列番号 181) – GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (配列番号 182) – ARRGRKASGSFYYYYGMDV	CDR1 (配列番号 183) – ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (配列番号 184) – WASTRES CDR3 (配列番号 185) – QNDYSYPY
ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTS YAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYY CARGAPNYGDTTHDYYMDVWG KGTT VTVSS (配列番号 61)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGA STRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGTKVEI K (配列番号 62)
	CDR1 (配列番号 63) - YTFTSYYMH	CDR1 (配列番号 66) - RASQSVSSNL A

【表 1 - 7】

	CDR2 (配列番号 64) - IINPSGGSTSQAQKFQG CDR3 (配列番号 65) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV	CDR2 (配列番号 67) - GASTRAT CDR3 (配列番号 68) - QQYDDWPFT	
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCK ASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLE WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCARDTGEYYDTDDHGMDVWG QGTTTVSS (配列番号 69) CDR1 (配列番号 71) - YTFTGYYMH CDR2 (配列番号 72) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (配列番号 73) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKEI K (配列番号 70) CDR1 (配列番号 74) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 75) - GASTRAT CDR3 (配列番号 76) - QQDDYWPP	10
ADI- 27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTV SS (配列番号 77) CDR1 (配列番号 79) - FTFSSYAMS CDR2 (配列番号 80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (配列番号 81) - AKDGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSSLQPEDFATY YCQQGVSYPRTFGGGTKEIK (配列番号 78) CDR1 (配列番号 82) - RASQGIDSWLA CDR2 (配列番号 83) - AASSLQS CDR3 (配列番号 84) - QQGVSYPR	20 30 40
ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSSLQPEDFATY	

【表1-8】

	ARGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVT VSS (配列番号85) CDR1 (配列番号87) - FTFSSYSMN CDR2 (配列番号88) - SISSSSYIYYADSVKG CDR3 (配列番号89) - ARGAPMGAAAGWFDP	YCQQGVSFPTFGGTKVEIK (配列番号86) CDR1 (配列番号90) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号91) - AASSLQS CDR3 (配列番号92) - QQGVSFPT	10
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCK ASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSQAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYY CAREGAGFAYGMDYYYMDVWGK GTTVTVSS (配列番号93) CDR1 (配列番号95) - YTFTSYYMH CDR2 (配列番号96) - IINPSGGSTSQAQKFQG CDR3 (配列番号97) - AREGAGFAYGMDYYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVY YCQQQSDNWPFTFGGTKVEIK (配列番号94) CDR1 (配列番号98) - RASQSVSSYLA CDR2 (配列番号99) - DASN RAT CDR3 (配列番号100) - QQSDNWPFT	20
			30

【0107】

代替的に、U S 9 , 2 7 3 , 1 3 6において説明されているように、配列番号101によって表される重鎖可変ドメインを、配列番号102によって表される軽鎖可変ドメインと対合させて、N K G 2 Dに結合することができる抗原結合部位を形成してもよい。

【化1】

配列番号101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFI
RYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGL
GDGTYFDYWGQGTTVTVSS

配列番号102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCGSSSNIGNNAVNWYQQLPKGAPKLLIYYDDL
LPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTK
LTVL

【0108】

代替的に、U S 7 , 8 7 9 , 9 8 5において説明されているように、配列番号103によって表される重鎖可変ドメインを、配列番号104によって表される軽鎖可変ドメインと対応させて、N K G 2 Dに結合することができる抗原結合部位を形成してもよい。

【化2】

配列番号103

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYS
GSANYNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWG
QGTMVTVSS

10

配列番号104

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSPWTFGQGTKVEIK

【0109】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のN K G 2 D受容体およびC D 1 6受容体、ならびに抗原R O R 1に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表2は、組み合わせて、R O R 1に結合し得る重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのいくつかの例示的配列を列記する。

20

【表2-1】

表2		
供給源	重鎖可変領域のアミノ酸配列	軽鎖可変領域のアミノ酸配列
国際公開 WO2016187220	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISDSTNTI YYADSVKGRFTVSRDNPKN SLYLQMISLRAEDTAVYYC ARAVGAGEGFDHWGQGTL VTVSS (配列番号105)	AIRMTQSPSSLSASVGDRV ITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFFTISSLQP EDIATYYCQQYDNLPLTFG GGTKVEIKR (配列番号109) CDR1 (配列番号110)- QASQDISNYLN

30

40

【表2-2】

	CDR1 (配列番号106) - DYYMS CDR2 (配列番号107) - YISDSTNTIYYADSVK CDR3 (配列番号108) - AVGAGEGFDH	CDR2 (配列番号111) - DASNLET CDR3 (配列番号112) - QQYDNLPLT	10
国際公開 WO2016187220	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFSDYYMGWVR QAPGKGLKWLSYISDRAHT IYDTDSVKGRFTISRDDAKS SLYLRMNNLRVEDTAVYY CARAVGAGEGFDYWGQGT LTVSS (配列番号113) CDR1 (配列番号114) - DYYMG CDR2 (配列番号115) - YISDRAHTIYDTDSVK CDR3 (配列番号116) - AVGAGEGFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYCQQYDNLPLTFG GGTKLEIKR (配列番号117) CDR1 (配列番号118) - QASQDISNYLN CDR2 (配列番号119) - DASNLET CDR3 (配列番号120) - QQYDNLPLT	20
米国特許第 9,938,350号	EVKLVESGGGLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYAMSWVR QIPEKRLEWVASISRGGTTY YPDSVKGRFTISRDNVRNIL YLQMSSLRSEDTAMYYCGR YDYDGYYAMDYWGQGTS VTVSS (配列番号121) CDR1 (配列番号122) - GFTFSSYA CDR2 (配列番号123) - ISRGGTT CDR3 (配列番号124) -	DIKMTQSPSSMYASLGERV TITCKASPDINSYLSWFQQK PGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGGGSGQDYSLTINSLE YEDMGIYYCLQYDEFPYTF GGGTKLEMK (配列番号125) CDR1 (配列番号126) - PDINSY CDR2 (配列番号127) - RAN CDR3 (配列番号128) - LQYDEFPYT	30 40

【表2-3】

YDYDGYYAMDY		
<p>ROR1 抗体 (国際公開 WO2016055592; エングマブ Ag (Mab ROR1))</p>	<p>QEQLVESGGRLVTPGGSLT LSCKASGFDFSAYYMSWVR QAPGKGLEWIATIYPSSGKT YYATWVNGRFTISSLNAQN TVDLQMNSLTAADRATYFC ARDSYADDGALFNIWGPGT LVTIIS (配列番号 129) CDR1 (配列番号 130) – AYYM CDR2 (配列番号 131) – TIYPSSGKTYYATWVNG CDR3 (配列番号 132) – DSYADDGALFNI</p>	<p>ELVLTQSPSV SAALGSPAKI TCTLSSAHKTDTIDWYQQL QGEAPRYLMQVQSDGSYT KRPGVPDRFSGSSSGADRY LIIPSVQADDEADYYCGAD YIGGYVFGGGTQLTVTG (配列番号 133) CDR1 (配列番号 134) – TLSSAHKTDTID CDR2 (配列番号 135) – GSYTKRP CDR3 (配列番号 136) – GADYIGGYV</p>
<p>ROR1 抗体 (国際公開 WO2016055592; エングマブ Ag (Mab2))</p>	<p>EVKLVESGGGLVKPGGSLK LSCAASGFTFSSYAMSWVR QIPEKRLEWVASISRGGTTY YPDSVKGRFTISRDNVRNIL YLQMSSLRSEDTAMYYCGR YDYDGYYAMDYWGQQGTS VTVSS (配列番号 137) CDR1 (配列番号 138) – SYAMS CDR2 (配列番号 139) – SISRGGTTYYPDSVKKG CDR3 (配列番号 140) – YDGYYAMDY</p>	<p>DIKMTQSPSSMYASLGERV TITCKASPDINSYLSWFQQK PGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGGGSGQDYSLTINSLE YEDMGIYYCLQYDEFPYTF GGGTKLEMK (配列番号 141) CDR1 (配列番号 142) – ITCKASPDINSYLS CDR2 (配列番号 143) – RANRLVD CDR3 (配列番号 144) – LQYDEFPY</p>

【表2-4】

ROR1 抗体 (国際公開 WO2016055592; エングマブ Ag (Mab3))	QSLEESGGRLVTPGTPLTLT CTVSGIDLNSHWMSWVRQ APGKGLEWIGIIAASGSTYY ANWAKGRFTISKTSTTVDL RIASPTTEDTATYFCARDYGDYRLVTFNIWGPGLTVVS S (配列番号 145) CDR1 (配列番号 146) - SHWMS CDR2 (配列番号 147) - IIAASGSTYYANWAKG CDR3 (配列番号 148) - DYRLVTFNI	ELVMTQTPSSVSAAVGGTV TINCQASQSIGSYLAWYQQ KPGQPPKLLIYYASNLASGV PSRFSGSGSGTEYTLTISGV QREDAATYYCLGSLNSNDN VFGGGTELEIL (配列番号 149) CDR1 (配列番号 150) - QASQSIGSYLA CDR2 (配列番号 151) - YASNLAS CDR3 (配列番号 152) - LGSLNSNDNV	10
	QSVKESEGDLVTPAGNLTL TCTASGSDINDYPISWVRQA PGKGLEWIGFINSGGSTWY ASWVKGRFTISRTSTTVDLK MTSLTTDDTATYFCARGYS TYYCDFNIWGPGLTVTISS (配列番号 153)	ELVMTQTPSSTSGAVGGTV TINCQASQSIDSNLAWFQQK PGQPPTLLIYRASNLAAGVP SRFSGSRSGTEYTLTISGVQ REDAATYYCLGGVGNVSY RTSFGGGTEVVVK (配列番号 157)	30
	CDR1 (配列番号 154) - DYPIS CDR2 (配列番号 155) - FINSGGSTWYASWVKGCDR 3 (配列番号 156) - GYSTYYCDFNI	CDR1 (配列番号 158) - QASQSIDSNL CDR2 (配列番号 159) - RASNLA CDR3 (配列番号 160) - LGGVGNVSYRTS	40

【0110】

代替的に、ROR1 に結合することができる新規の抗原結合部位は、配列番号 161 によって定義されるアミノ酸配列への結合についてスクリーニングすることによって特定することができる。

【化3】

配列番号161

MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSY
LTLDPMNNITSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAVVQEPRRLSFRSTIYGSR
LRIRNLDTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQP
YRGIACARFIGNRTVYMEMLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHY
AFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE 10
SPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHT
FTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKM
EILYILVPSVAIPLAIALLFFFICVCRNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMLNAYK
PKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFHKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNPQQ
WTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQQVCMLFYINQGDLHEFLIMRSPHSDV
GCSSDEDGTVKSSLHDGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIGEQLHV
DLGLSREIYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSSSDIWSFGVVLWEIFSFG
LQYYGFSNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIH
VRLRS 20
WEGLSSHTSSTTPSGNATTQTTSLASPVSNLSPRYPNMFPSQGITPQGQIAGFIG
PPIPQNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPP
KSRSPSSASGSTSTGHV
TSLPSSGSNQEANIPLPHMSIPNHPGMGITVFGNKSQPKYKIDS
KQASLLGDANIH
GHTESMISAEI

【0111】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに抗原ROR2に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表3は、組み合わせて、ROR2に結合し得る重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのいくつかの例示的ペプチド配列を列記する。 30

【表3-1】

表3		
供給源	重鎖可変領域のアミノ酸配列	軽鎖可変領域のアミノ酸配列
国際公開 WO2016142768	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYYIHWVRQA PGQGLEWMGWMNPNSGNSV SAQKFQGRVTMTRDTSINTA YMELSSLTSDDTAVYYCARN SEWHPWGYDYWGQGTLVT VSS (配列番号 162)	SSELTQDPAVSVALGQTVRI TCQGDSDLRSYYASWYQQKP GQAPVLVIYGKNNRPSGIPD RFSGSSSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSRDSSGNHLV FGGGTKLTVLG (配列番号 166)

【表3-2】

	CDR1 (配列番号163) - GYTFTDYY CDR2 (配列番号164) - MNPNSGNS CDR3 (配列番号165) - ARNSEWHPWGYYDY	CDR1 (配列番号167) - SLRSYY CDR2 (配列番号168) - GKN CDR3 (配列番号169) - NSRDSSGNHLV	10
国際公開 WO2016142768	EVQLVQSGAEVKPGESLKIS CQGSGYRFSKYWIGWVRQM PGKGLEWMGIYPGDSDTRYSP PSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYCARSFSS FIYDYWGQGTLVTVSS (配列番号170)	ETTLTQSPGTLVSPGERAT LSCRASQSVSSNLAWYQQK RGQAPRLLIYGASTRATGIP VRFSGSGSGTEFTLTISRLGP EDFAVYYCQQYGRSPLTFG GGTKVDIKR (配列番号174)	20
	CDR1 (配列番号171) - GYRFSKYW CDR2 (配列番号172) - IYPGDSDT CDR3 (配列番号173) - ARSFSSFIYDY	CDR1 (配列番号175) - QSVSSN CDR2 (配列番号176) - GAS CDR3 (配列番号177) - QQYGRSPLT	30

【0112】

代替的に、ROR2に結合することができる新規の抗原結合部位は、配列番号178によって定義されるアミノ酸配列への結合についてスクリーニングすることによって特定することができる。

【化4】

配列番号178

MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLSVSRTSGEVEVLDPNPPLGPLDGQDGPIPTL
 KGYFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVVQEPRRIIRKTE
 YGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFQDDYHED
 GFCQPYRGIACARFIGNRTIYVDSLQMGEIENRITAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSF
 CHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLESDLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALP
 10 MPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTAATTSGHQCQPWALQHP
 HSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGQMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSSK
 MGILYILVPSIAIPLVIACLFFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQDMEMPLINQ
 HKQAKLKEISLSAVRFMEELGEDRGKVKYKGHLFGPAPGEQTQAVAIKTLKDKAEG
 PLREEFRHEAMLRARLQHPNVVCLLGVVTKDQPLSMIFSYCSHGDLHEFLVMRSPHS
 DVGSTDDDRTVKSALEPPDFVHLVAQIAAGMEYLSSHHVVKDLATRNVLVYDKL
 NVKISDLGLFREVYAADYYKLLGNSLLPIRWMAPAIMYGKFSIDSDIWSYGVVLWE
 20 VFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPCPDDCPAWVYALMIECWNEFPSRRPRFK
 DIHSRLRAWGNLSNYNSAQTSAGASNTTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGPKQKAPPFP
 QPQFIPMKGQIRPMVPPPQLYVPVNGYQPVPAYGAYLPNFYPVQIPMQMAPQQVPPQ
 MVPKPSSHSGSGSTSTGYVTTAPSNTSMADRAALLSEGADDTQNAPEGAQSTVQ
 EAEEEEEGSVPETELLGDCDTLQVDEAQVQLEA

【0113】

Fcドメイン内で、CD16結合はヒンジ領域およびCH2ドメインによって媒介される。例えば、ヒトIgG1内で、CD16との相互作用は主に、アミノ酸残基Asp²⁶⁵～Glu²⁶⁹、Asn²⁹⁷～Thr²⁹⁹、Ala³²⁷～Ile³³²、Leu²³⁴～Ser²³⁹、およびCH2ドメインにおける炭水化物残基N-アセチル-D-グルコサミンに焦点が当てられている(Sondermannら、Nature、406巻(6793号):267～273頁を参照されたい)。既知のドメインに基づいて、突然変異は、ファージディスプレイライブリもしくは酵母表面ディスプレイcDNAライブリを使用することなどによって、CD16に対する結合親和性を増強もしくは低減さるよう選択され得るか、または相互作用の既知の三次元構造に基づいてデザインされ得る。

【0114】

ヘテロ二量体抗体重鎖の構築は、同じ細胞内で2つの異なる抗体重鎖配列を発現させることによって達成することができ、これにより、各抗体重鎖のホモ二量体の構築およびヘテロ二量体の構築をもたらすことができる。ヘテロ二量体の選択的構築の促進は、US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480および、US14/830336に示されているように、各抗体重鎖定常領域のCH3ドメイン内に異なる突然変異を組み込むことによって達成することができる。例えば、突然変異は、ヒトIgG1に基づき、これらの2つの鎖が互いに選択的にヘテロ二量体化することを可能にする第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド内にアミノ酸置換の異なる対を組み込んでいるCH3ドメイ

10

20

20

30

40

50

ン内で作製され得る。以下に例示したアミノ酸置換の位置は、Kabatにおけるように、すべてEUIインデックスに従って番号付けしている。

【0115】

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

10

【0116】

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

20

【0117】

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

30

【0118】

代替的に、アミノ酸置換は以下の表4にされる置換のセットから選択され得る。

40

【表4】

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

10

20

30

40

【0119】

代替的に、アミノ酸置換は以下の表5に示される置換のセットから選択され得る。

【表5】

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

■

【0120】

代替的に、アミノ酸置換は以下の表6に示される置換のセットから選択され得る。

【表6】

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

5

10

【0121】

代替的に、各ポリペプチド鎖における少なくとも1つのアミノ酸置換は表7から選択され得る。

【表7】

表7	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D およびT411E	10

20

30

【0122】

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

【表8】

表8	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
K392, K370, K409またはK439	D399, E356またはE357	20

40

【0123】

代替的に、以下の表9におけるセットから少なくとも1つのアミノ酸置換を選択してもよく、ここで「第1のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の負に帶電したアミノ酸によって置き換えられ、「第2のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の負に帶電したアミノ酸によって置き換えられる。

【表9】

表9	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
D399, E356またはE357	K409, K439, K370またはK392

【0124】

代替的に、アミノ酸置換は、以下の表10に示されるセットから選択してもよい。

【表10】

表10	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
T350V, L351Y, F405AおよびY407V	T350V, T366L, K392LおよびT394W

【0125】

代替的にまたは付加的に、ヘテロ多量体タンパク質の構造安定性は、第1または第2のポリペプチド鎖のいずれかにS354Cを導入し、反対のポリペプチド鎖にY349Cを導入することによって増加させることができ、これにより、2つのポリペプチドの界面内で人工ジスルフィド架橋が形成する。

【0126】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366位においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368およびY407からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0127】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368およびY407からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366位においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0128】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405、およびT411からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0129】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405、およびT411からなる群より選択される1またはこれより多くの位置においてIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、D 3 9 9、S 4 0 0 およびY 4 0 7 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6、N 3 9 0、K 3 9 2、K 4 0 9 およびT 4 1 1 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6、N 3 9 0、K 3 9 2、K 4 0 9 およびT 4 1 1 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、D 3 9 9、S 4 0 0 およびY 4 0 7 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

10

【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、Y 3 4 9、K 3 6 0、およびK 4 0 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9 およびF 4 0 5 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

20

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9 およびF 4 0 5 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、K 3 6 0、Q 3 4 7 およびK 4 0 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9 およびK 4 3 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7 およびD 3 9 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

30

【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7 およびD 3 9 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9 およびK 4 3 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

40

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 およびD 3 9 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 およびK 4 0 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 7 】

50

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 およびK 4 0 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 およびD 3 9 9 からなる群より選択される 1 またはこれより多くの位置において Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0 1 3 8】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、S 3 5 4 C 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9 C 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

10

【0 1 3 9】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9 C 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、S 3 5 4 C 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0 1 4 0】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 6 0 E およびK 4 0 9 W 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、O 3 4 7 R、D 3 9 9 V およびF 4 0 5 T 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

20

【0 1 4 1】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、O 3 4 7 R、D 3 9 9 V およびF 4 0 5 T 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 6 0 E およびK 4 0 9 W 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0 1 4 2】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 W 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 S、T 3 6 8 A、およびY 4 0 7 V 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

30

【0 1 4 3】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 S、T 3 6 8 A、およびY 4 0 7 V 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、ここで抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 W 置換だけ Ig G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0 1 4 4】

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

40

【0 1 4 5】

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

【0 1 4 6】

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

50

得る。例えば、第1の免疫グロブリン重鎖をコードする第1の核酸配列を第1の発現ベクターにクローニングすることができ、第2の免疫グロブリン重鎖をコードする第2の核酸配列を第2の発現ベクターにクローニングすることができ、免疫グロブリン軽鎖をコードする第3の核酸配列を第3の発現ベクターにクローニングすることができ、第1、第2および第3の発現ベクターと一緒に宿主細胞に安定にトランスフェクトして多量体タンパク質を産生することができる。

【0147】

多重特異性タンパク質の最も高い収率を達成するために、第1、第2および第3の発現ベクターの異なる比率を調べて宿主細胞へのトランスフェクションのための最適比率を決定することができる。トランスフェクション後、限界希釈、ELISA、FACS、顕微鏡法、またはClonepixなどの当技術分野において公知の方法を使用して、細胞バンク生成のために単一クローニングを単離することができる。

10

【0148】

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

I I . 多重特異性タンパク質の特徴

【0149】

本明細書で記載される多重特異性タンパク質は、NKG2D結合部位、CD16結合部位、およびROR1またはROR2の結合部位を含む。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、NKG2Dおよび/またはCD16を発現する細胞（例えば、NK細胞）ならびに上記の抗原のうちのいずれか1つを同時に発現する腫瘍細胞に結合する。NK細胞への多重特異性タンパク質の結合は、がん細胞の破壊に向けたNK細胞の活性を増強し得る。

20

【0150】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、抗原ROR1またはROR2に、同じそれぞれの抗原結合部位を有するモノクローナル抗体の親和性に類似の親和性で結合する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、その抗原（複数可）を発現する腫瘍細胞の殺滅において、対応するそれぞれのモノクローナル抗体より有効である。

30

【0151】

ある特定の実施形態では、NKG2D結合部位およびROR1またはROR2の結合部位を含む本明細書で記載される多重特異性タンパク質は、ROR1またはROR2を発現する細胞と共に培養すると、初代ヒトNK細胞を活性化する。NK細胞活性化は、CD107a脱颗粒およびIFN- γ サイトカイン産生の増加によって示される。さらに、対応するそれぞれのモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、抗原ROR1またはROR2を発現する細胞の存在下において、ヒトNK細胞の優れた活性化を示し得る。

【0152】

ある特定の実施形態では、NKG2D結合部位およびROR1またはROR2の結合部位を含む本明細書で記載される多重特異性タンパク質は、ROR1またはROR2を発現する細胞と共に培養して、ヒト休止およびIL-2活性化NK細胞の活性を増強する。

40

【0153】

ある特定の実施形態では、ROR1またはROR2に結合する対応するモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、中程度レベルおよび低レベルのROR1またはROR2を発現する腫瘍細胞を標的とするにあたって利点を提供する。

I I I . 治療用途

【0154】

本発明は、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質および/または本明細書に記載の医薬組成物を使用してがんを処置するための方法を提供するその方法は、ROR1また

50

は R O R 2 を発現する種々のがんを処置するために使用され得る。R O R 1 を標的とする多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんは、悪性黒色腫、前立腺がん、慢性リンパ芽球性白血病、血液悪性腫瘍、卵巣がん、トリプルネガティブ乳がん、非小細胞肺がん、または結腸直腸がんであり得る。R O R 2 を標的とする多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんは、骨肉腫、腎細胞癌、黒色腫、結腸がん、頭頸部の扁平上皮癌、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、リンパ腫、中皮腫、肺臓がん、卵巣がん、肺がん、子宮がん、肉腫、または前立腺がんであり得る。

【 0 1 5 5 】

一部の他の実施形態では、処置されるがんとしては、脳がん、直腸がん、および子宮がんが挙げられる。さらに他の実施形態では、がんは、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、黒色腫、神経芽細胞腫、肉腫（例えば、血管肉腫または軟骨肉腫）、喉頭がん、耳下腺がん、胆道がん、甲状腺がん、末端黒子型黒色腫、日光角化症、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、腺様囊胞癌（adenoid cystic carcinoma）、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、肛門管がん、肛門がん、肛門直腸がん、星細胞系腫瘍、バルトリリン腺癌、基底細胞癌、胆管がん、骨がん、骨髄がん、気管支がん、気管支腺癌、カルチノイド、胆管細胞癌、軟骨肉腫（chondrosarcoma）、脈絡叢乳頭腫 / 細胞腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、明細胞癌、結合組織がん、囊胞腺腫、消化器系がん、十二指腸がん、内分泌系がん、卵黄囊腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、内皮細胞がん、上衣がん、上皮細胞がん、ユーイング肉腫、眼および眼窓のがん、女性性器がん、限局性結節性過形成、胆囊がん、胃噴門がん、胃底部がん、ガストリン産生腫瘍、神経膠芽腫、グルカゴン産生腫瘍、心臓がん、血管芽腫（hemangioblastoma）、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝胆道がん、肝細胞癌、ホジキン病、回腸がん、インスリノーマ、上皮内新生物、上皮間扁平細胞新生物（interepithelial squamous cell neoplasia）、肝内胆管がん、浸潤性扁平上皮癌、空腸がん、関節がん、カポジ肉腫、骨盤がん、大細胞癌、大腸がん、平滑筋肉腫、悪性黒子由来黒色腫、リンパ腫、男性生殖器がん、悪性黒色腫、悪性中皮腫、髓芽腫、髓上皮腫、髓膜がん、中皮がん、転移性癌、口がん、粘表皮癌、多発性骨髓腫、筋肉がん、鼻腔がん、神経系がん、神経上皮腺癌結節性黒色腫、非上皮性皮膚がん、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起膠細胞がん、口腔がん、骨肉腫、漿液性乳頭腺がん、陰茎がん、咽頭がん、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、直腸がん、腎細胞癌、呼吸器系がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性細胞腫、副鼻腔がん、皮膚がん、小細胞癌、小腸がん、平滑筋がん、軟部組織がん、ソマトスタチン分泌腫瘍、脊椎がん、扁平上皮癌、横紋筋がん、中皮下がん、表在拡大型黒色腫、T細胞白血病、舌がん、未分化癌、尿管がん、尿道がん、膀胱がん、泌尿器系がん、子宮頸部がん、子宮体がん、ぶどう膜黒色腫、腫がん、疣状癌、VIP産生腫瘍、外陰部がん、高分化癌、またはウィルムス腫瘍である。

【 0 1 5 6 】

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

I V . 併用療法

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

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

【0158】

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

10

20

30

40

【0159】

がんを処置する際の併用療法の一部として使用され得る薬剤のさらなるクラスは免疫チェックポイント阻害剤である。例示的な免疫チェックポイント阻害剤には、(i)細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA4)、(ii)プログラム細胞死タンパク質1(PD1)、(iii)PDL1、(iv)LAG3、(v)B7-H3、(vi)B7-H4、および(vii)TIM3のうちの1つまたは複数を阻害する薬剤が含まれる。CTL4阻害剤であるイピリムマブは、黒色腫を処置するために米国食品医薬品局によって承認されている。

【0160】

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

【0161】

抗がん剤のさらに他のカテゴリーには、例えば、(i)ALK阻害剤、ATR阻害剤、A2Aアンタゴニスト、塩基除去修復阻害剤、Bcr-Ab1チロシンキナーゼ阻害剤、ブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤、CDC7阻害剤、CHK1阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、DNA-PK阻害剤、DNA-PKおよびmTORの両方の阻害剤、DNMT1阻害剤、DNMT1阻害剤+2-クロロ-デオキシアデノシン、HDAC阻害剤、ヘッジホッギングシグナル伝達経路阻害剤、IDO阻害剤、JAK阻害剤、mTOR阻害剤、MEK阻害剤、MELK阻害剤、MTH1阻害剤、PARP阻害剤、ホスホイノシチド3-キナーゼ阻害剤、PARP1およびDHODHの両方の阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼ-II阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、VEGFR阻害剤、ならびにWEE1阻害剤から選択される阻害剤；(ii)OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25、またはICOSのアゴニスト；ならびに(iii)IL-12、IL-15、GM-CSF、およびG-CSFから選択されるサイトカインが含まれる。

【0162】

本発明のタンパク質はまた、原発病巣の外科的除去の補助として使用され得る。

【0163】

多重特異性結合タンパク質およびさらなる治療剤の量ならびに投与の相対的タイミング

50

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

V. 医薬組成物

【0164】

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

【0165】

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

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

ある特定の実施形態では、pH緩衝溶液中に本開示のタンパク質を含む水性製剤が調製

10

20

30

40

50

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

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

洗剤または界面活性剤もまた、製剤に添加してもよい。例示的な洗剤としては、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20、80など)またはポロクサマー(例えば、ポロクサマー188)などの非イオン性洗剤が挙げられる。添加される洗剤の量は、製剤化された抗体の凝集を低減させ、かつ/または製剤中の微粒子の形成を最低限に抑え、かつ/または吸着を低減させるようなものである。ある特定の実施形態では、製剤は、ポリソルベートである界面活性剤を含み得る。ある特定の実施形態では、製剤は、洗剤のポリソルベート80またはTween 80を含有し得る。Tween 80は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエートを表すために使用される用語である(Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf、第4版、1996年を参照されたい)。ある特定の実施形態では、製剤は、約0.1mg/mlから約10mg/mlの間のポリソルベート80、または約0.5mg/mlから約5mg/mlの間を含有し得る。ある特定の実施形態では、約0.1%のポリソルベート80が製剤に添加され得る。

10

20

30

40

50

【0173】

実施形態では、本開示のタンパク質産物は、液体製剤として製剤化される。液体製剤は、ゴム栓で閉じ、アルミニウムクリンプシールクロージャで密封した、U S P / P h E u r いずれかのタイプ I 5 0 R バイアルにおいて、1 0 m g / m L の濃度で提供され得る。栓は、U S P および P h E u r に準拠したエラストマーで作られていてもよい。ある特定の実施形態では、6 0 m L の採取容量を可能にするために、バイアルに6 1 . 2 m L のタンパク質産物溶液が充填され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、0 . 9 % の生理食塩水で希釈され得る。

【0174】

ある特定の実施形態では、本開示の液体製剤は、安定化レベルで糖と組み合わせた1 0 m g / m L 濃度溶液として調製され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は水性担体中で調製され得る。ある特定の実施形態では、安定剤は、静脈内投与に望ましくないまたは不適切な粘度をもたらし得る量以下の量で添加され得る。ある特定の実施形態では、糖は、二糖、例えば、スクロースであり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、および保存剤のうちの1 つまたは複数を含み得る。

10

【0175】

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

20

【0176】

凝集に加えて、脱アミドは、発酵、採取/細胞清澄化、精製、薬物物質/薬物製品貯蔵の間および試料分析の間に発生し得るペプチドおよびタンパク質の一般的な産物のバリアントである。脱アミドは、加水分解を受け得るスクシンイミド中間体を形成するタンパク質からのN H₃の喪失である。スクシンイミド中間体は、親ペプチドの1 7 ダルトンの質量減少をもたらす。その後の加水分解は、1 8 ダルトンの質量増加をもたらす。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下での不安定性に起因して困難である。したがって、脱アミドは、典型的に1 ダルトンの質量増加として検出可能である。アスパラギンの脱アミドは、アスパラギン酸またはイソアスパラギン酸のいずれかを生じる。脱アミドの速度に影響を及ぼすパラメータには、p H 、温度、溶媒誘電率、イオン強度、一次配列、局所ポリペプチド立体配座および三次構造が含まれる。ペプチド鎖におけるA s n に隣接するアミノ酸残基は、脱アミド化速度に影響を及ぼす。タンパク質配列におけるA s n に続くG l y およびS e r は、脱アミドに対してより高い感受性を生じる。

30

【0177】

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

【0178】

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

40

【0179】

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

【0180】

静脈内(I V)製剤は、患者が、移植後に入院しており、I V 経路を介してすべての薬物を受けている場合などの特定の場合に好ましい投与経路であり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、投与前に0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液により希釈される。ある特定の実施形態では、注射のための希釈された薬物製品は等張であり、静脈内注入による投与に適している。

50

【0181】

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

【0182】

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

10

【0183】

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

【0184】

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

20

【0185】

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

30

【0186】

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

【0187】

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

【0188】

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

40

【0189】

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

【0190】

50

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

【 0 1 9 1 】

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

〔 0 1 9 2 〕

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥薬物製品は、注射用滅菌水、U S P (S W F I) または 0 . 9 % の塩化ナトリウム注射液、U S P のいずれかで再構成される。再構成の間、凍結乾燥粉末は溶液に溶解する。

〔 0 1 9 3 〕

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

〔 0 1 9 4 〕

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

〔 0 1 9 5 〕

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

【 0 1 9 6 】

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

【0197】

10

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

【0198】

20

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

【実施例】

【0199】

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

(実施例 1)

NKG2D 結合ドメインは NKG2D に結合する

NKG2D 結合ドメインは 精製した組換え NKG2D に結合する

【0200】

30

ヒト、マウスまたはカニクイザル NKG2D 細胞外ドメインの核酸配列を、ヒト IgG1 Fc ドメインをコードする核酸配列と融合させ、発現させる哺乳動物細胞に導入した。精製後、NKG2D - Fc 融合タンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させた。非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した後、NKG2D 結合ドメインを滴定し、NKG2D - Fc 融合タンパク質を予め吸着させたウェルに添加した。一次抗体結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、Fc 交差反応を回避するためにヒトカッパ軽鎖を特異的に認識する二次抗体を使用して検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼに対する基質である 3,3',5,5' - テトラメチルベンジジン (TMB) をウェルに添加して結合シグナルを可視化し、その吸光度を 450 nm にて測定し、540 nm にて補正した。NKG2D 結合ドメインクローン、アイソタイプ対照または陽性対照 (配列番号 101 ~ 104、または eBioscience にて入手可能な抗マウス NKG2D クローン MI-6 および CX-5 から選択した重鎖および軽鎖可変ドメインを含む) を各ウェルに添加した。

40

【0201】

アイソタイプ対照は組換え NKG2D - Fc タンパク質に対してわずかな結合を示したが、陽性対照が組換え抗原に対して最も強く結合した。クローン毎に親和性は異なったが、すべてのクローンによって産生された NKG2D 結合ドメインが、ヒト、マウス、およびカニクイザルの組換え NKG2D - Fc タンパク質のすべてで結合を示した。概して、各抗 NKG2D クローンは、ヒト (図 3) およびカニクイザル (図 4) の組換え NKG2D - Fc に同様の親和性で結合したが、マウス (図 5) の組換え NKG2D - Fc に対す

50

る親和性は比較的低かった。

NKG2D結合ドメインはNKG2Dを発現する細胞に結合する

【0202】

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

10

【0203】

すべてのクローンによって産生されたNKG2D結合ドメインが、ヒトおよびマウスのNKG2Dを発現するEL4細胞に結合した。陽性対照抗体(配列番号101~104、またはeBioscienceにて入手可能な抗マウスNKG2DクローンMI-6およびCX-5から選択される重鎖および軽鎖可変ドメインを含む)が最も良好なFOB結合シグナルをもたらした。各クローンのNKG2D結合親和性は、ヒトNKG2Dを発現する細胞(図6)とマウスNKG2Dを発現する細胞(図7)との間で同様であった。

(実施例2)

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

20

【0204】

組換えヒトNKG2D-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を低減するためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した。飽和濃度のULBP-6-His-ビオチン(配列番号189として開示される「6-His」)をウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインクローンを添加した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、NKG2D-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったULBP-6-His-ビオチン(配列番号189として開示される「6-His」)を、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびTMB基質とコンジュゲートしたストレプトアビシンによって検出した。吸光度を450nMにて測定し、540nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、ウェル中のNKG2D-Fcタンパク質への結合を阻止されたULBP-6-His-ビオチン(配列番号189として開示される「6-His」)のパーセンテージから計算した。陽性対照抗体(配列番号101~104から選択される重鎖および軽鎖可変ドメインを含む)および種々のNKG2D結合ドメインは、NKG2DへのULBP-6結合を阻止したが、アイソタイプ対照はULBP-6との競合をほとんど示さなかった(図8)。

30

【0205】

ULBP-6配列は、配列番号179により表される。

【化5】

MAAAAIPELLCLPLFLFGWSRARDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVD
EKTFHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWFQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMK
EKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRA
TATTLILCCLLIILPCFILPGI(配列番号179)

40

MICAとの競合

【0206】

組換えヒトMICA-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異

50

的結合を低減させるためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した。NKG2D-Fc-ビオチンをウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、MICA-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったNKG2D-Fc-ビオチンを、ストレプトアビシン-HRPおよびTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nMにて測定し、540nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、MICA-Fcでコーティングされたウェルへの結合を阻止されたNKG2D-Fc-ビオチンのパーセンテージから計算した。陽性対照抗体（配列番号101～104から選択される重鎖および軽鎖可変ドメインを含む）および種々のNKG2D結合ドメインはNKG2DへのMICA結合を阻止したが、アイソタイプ対照はMICAとの競合をほとんど示さなかった（図9）。

10

Rae-1デルタとの競合

【0207】

組換えマウスRae-1デルタ-Fc（R&D Systemsから購入した）をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を低減させるためにウェルをウシ血清アルブミンで阻止した。マウスNKG2D-Fc-ビオチンをウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、Rae-1デルタ-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったNKG2D-Fc-ビオチンを、ストレプトアビシン-HRPおよびTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nMにて測定し、540nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、Rae-1デルタ-Fcでコーティングされたウェルへの結合を阻止されたNKG2D-Fc-ビオチンのパーセンテージから計算した。陽性対照抗体（配列番号101～104、またはeBioscienceにて入手可能な抗マウスNKG2DクローニーMI-6およびCX-5から選択される重鎖および軽鎖可変ドメインを含む）および種々のNKG2D-結合ドメインクローニーはマウスNKG2DへのRae-1デルタ結合を阻止したが、アイソタイプ対照抗体はRae-1デルタとの競合をほとんど示さなかった（図10）。

20

（実施例3）

NKG2D結合ドメインクローニーはNKG2Dを活性化させる

30

【0208】

CD3ゼータシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に、ヒトおよびマウスNKG2Dの核酸配列を融合させて、キメラ抗原受容体（CAR）構築物を得た。次に、ギブソンアセンブリを使用してNKG2D-CAR構築物をレトロウイルスベクターにクローニングし、レトロウイルス産生のためにexp293細胞にトランスフェクトした。8μg/mlのポリブレンと共にNKG2D-CARを含有するウイルスにEL4細胞を感染させた。感染の24時間後、EL4細胞中のNKG2D-CARの発現レベルをフローサイトメトリーによって分析し、細胞表面で高レベルのNKG2D-CARを発現するクローニーを選択した。

40

【0209】

NKG2D結合ドメインがNKG2Dを活性化させるかどうかを判定するために、それらをマイクロプレートのウェルに吸着させ、抗体断片でコーティングされたウェルにおいてNKG2D-CAR EL4細胞をプレフェルシン-Aおよびモネンシンの存在下で4時間にわたって培養した。NKG2D活性化の指標である細胞内TNF-産生をフローサイトメトリーによってアッセイした。陽性対照で処置した細胞に対してTNF-陽性細胞のパーセンテージを正規化した。すべてのNKG2D結合ドメインがヒトNKG2D（図11）およびマウスNKG2D（図12）の両方を活性化させた。

（実施例4）

NKG2D結合ドメインはNK細胞を活性化させる
初代ヒトNK細胞

50

【0210】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞（P B M C）を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを使用してP B M CからN K細胞（C D 3⁻ C D 5 6⁺）を単離した。単離されたN K細胞の純度は典型的には> 9 5 %であった。次に、単離されたN K細胞を、1 0 0 n g / m LのI L - 2を含有する培地中で2 4 ~ 4 8時間にわたって培養した後、それらを、N K G 2 D結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗C D 1 0 7 a抗体、ブレフェルジン - A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。培養後、C D 3、C D 5 6、およびI F N - に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによってN K細胞をアッセイした。C D 3⁻ C D 5 6⁺細胞におけるC D 1 0 7 aおよびI F N - の染色を分析して、N K細胞の活性化を評価した。C D 1 0 7 a / I F N - 二重陽性細胞の増加は、1つの受容体ではなく2つの活性化受容体の会合による、より良好なN K細胞の活性化を示す。N K G 2 D結合ドメインおよび陽性対照（例えば、配列番号1 0 1または配列番号1 0 3によって表される重鎖可変ドメイン、および配列番号1 0 2または配列番号1 0 4によって表される軽鎖可変ドメイン）は、アイソタイプ対照よりも高いパーセンテージのN K細胞がC D 1 0 7 a⁺およびI F N -⁺になることを示した（図1 3および図1 4は、N K細胞の調製のために異なるドナーのP B M Cをそれぞれ使用した、2つの独立した実験のデータを表す）。

初代マウスN K細胞

【0 2 1 1】

C 5 7 B 1 / 6マウスから脾臓を得、7 0 μ mのセルストレイナーを通して押しつぶして、単一細胞懸濁液を得た。細胞をペレット化し、A C K溶解緩衝液（Thermo Fisher Scientificから購入した、# A 1 0 4 9 2 0 1；1 5 5 m M 塩化アンモニウム、1 0 m M 炭酸水素カリウム、0 . 0 1 m M E D T A）に再懸濁して赤血球を除去した。残りの細胞を1 0 0 n g / m Lのh I L - 2と共に7 2時間にわたって培養し、その後採取し、N K細胞単離の準備をした。次に、磁気ビーズを用いたネガティブディイプリーション技術を使用し、典型的には> 9 0 %の純度で脾臓細胞からN K細胞（C D 3⁻ N K 1 . 1⁺）を単離した。精製されたN K細胞を、1 0 0 n g / m Lのm I L - 1 5を含有する培地中で4 8時間にわたって培養した後、N K G 2 D結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗C D 1 0 7 a抗体、ブレフェルジン - A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。N K G 2 D結合ドメインでコーティングされたウェルにおいて培養した後、C D 3、N K 1 . 1、およびI F N - に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによってN K細胞をアッセイした。C D 3⁻ N K 1 . 1⁺細胞におけるC D 1 0 7 aおよびI F N - の染色を分析して、N K細胞の活性化を評価した。C D 1 0 7 a / I F N - 二重陽性細胞の増加は、1つの受容体ではなく2つの活性化受容体の会合による、より良好なN K細胞の活性化を示す。N K G 2 D結合ドメインおよび陽性対照（e B i o s c i e n c eから入手可能な抗マウスN K G 2 DクローンM I - 6およびC X - 5から選択される）は、アイソタイプ対照よりも高いパーセンテージのN K細胞がC D 1 0 7 a⁺およびI F N -⁺になることを示した（図1 5および図1 6は、N K細胞の調製のために異なるマウスをそれぞれ使用した、2つの独立した実験のデータを表す）。

（実施例5）

N K G 2 D結合ドメインは標的腫瘍細胞の細胞傷害性を可能にする

【0 2 1 2】

ヒトおよびマウス初代N K細胞活性化アッセイは、N K G 2 D結合ドメインとのインキュベーション後、N K細胞にある増加した細胞傷害性マーカーを示す。これが腫瘍細胞溶解の増加につながるかどうかに対処するために、各N K G 2 D結合ドメインが単一特異的抗体になる細胞ベースのアッセイを利用した。F c領域を1つの標的化アームとして使用し、一方、F a b領域（N K G 2 D結合ドメイン）はN K細胞を活性化するための別の標的化アームとして作用した。ヒト起源であり、高レベルのF c受容体を発現するT H P - 1細胞を腫瘍標的として使用し、P e r k i n E l m e r D E L F I A細胞傷害性キ

10

20

30

40

50

ットを使用した。THP-1細胞をBATA試薬で標識化し、 10^5 / mLにて培養培地に再懸濁した。次に、標識化したTHP-1細胞をNKG2D抗体と合わせ、マイクロタイタープレートのウェル中で37にて3時間、マウスNK細胞を単離した。インキュベーション後、 $20\mu l$ の培養上清を取り出し、 $200\mu l$ のユーロピウム溶液と混合し、暗所で15分間振盪しながらインキュベートした。時間分解蛍光モジュール（励起337nm、発光620nm）を備えたPheraStarプレートリーダーによって蛍光を経時的に測定し、キットの説明書に従って特異的溶解率を計算した。

【0213】

NKG2Dに対する天然リガンドである陽性対照のULBP-6は、マウスNK細胞によるTHP-1標的細胞の特異的溶解率の増加を示した。NKG2D抗体も、THP-1標的細胞の特異的溶解率を増加させたが、アイソタイプ対照抗体は特異的溶解率の低減を示した。点線は、抗体を添加していないマウスNK細胞によるTHP-1細胞の特異的溶解率を示す（図17）。（実施例6）

NKG2D抗体は高い熱安定性を示す

【0214】

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

（実施例7）

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

【0215】

密度勾配遠心分離を使用し、末梢ヒト血液軟膜から末梢血単核細胞（PBMC）を単離した。ネガティブ磁気ビーズ（StemCell #17955）を使用してPBMCからNK細胞を精製した。NK細胞は、フローサイトメトリーによって決定して $>90\%$ のCD3⁻CD56⁺であった。次に、細胞を、活性化アッセイに使用する前に $100\text{ng}/\text{mL}$ のhIL-2（Peptech #200-02）を含有する培地で48時間増殖させた。抗体を、 $100\mu\text{l}$ の滅菌PBS中で $2\mu\text{g}/\text{mL}$ （抗CD16、Biologegend #302013）および $5\mu\text{g}/\text{mL}$ （抗NKG2D、R&D #MAB139）の濃度にて4で一晩、96ウェル平底プレート上にコーティングし、続いてウェルを十分に洗浄して過剰の抗体を除去した。脱顆粒の評価のために、IL-2活性化NK細胞を、 $100\text{ng}/\text{mL}$ のhIL-2および $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のAPCコンジュゲート抗CD107a mAb（Biologegend #328619）を補充した培養培地に 5×10^5 個の細胞/mLにて再懸濁した。次に、 1×10^5 個の細胞/ウェルを、抗体でコーティングされたプレート上に添加した。タンパク質輸送阻害剤であるブレフェルジンA（BFA、Biologegend #420601）およびモネンシン（Biologegend #420701）を、それぞれ $1:1000$ および $1:270$ の最終希釈にて添加した。播いた細胞を、37にて4時間にわたって $5\% \text{CO}_2$ においてインキュベートした。IFN- γ の細胞内染色のために、NK細胞を、抗CD3（Biologegend #300452）および抗CD56 mAb（Biologegend #318328）で標識化し、続いて固定し、透過処理し、抗IFN- γ mAb（Biologegend #506507）で標識化した。NK細胞を、生CD56⁺CD3⁻細胞においてゲーティングした後、フローサイトメトリーによってCD107aおよびIFN- γ の発現について分析した。

【0216】

受容体の組合せの相対的効力を調査するため、プレート結合刺激により、NKG2DまたはCD16の架橋および両受容体の共架橋を行った。図19（図19A～19C）に示したように、CD16およびNKG2Dの組み合わせた刺激は、CD107a（脱顆粒）レベル（図19A）および/またはIFN- γ 产生レベル（図19B）の大きな上昇をもたらした。点線は、各受容体の個々の刺激の相加効果を表す。

【0217】

10

20

30

40

50

抗CD16、抗NKGD2Dまたは両方のモノクローナル抗体の組合せを用いた4時間のプレート結合刺激の後、IL-2活性化NK細胞のCD107aレベルおよび細胞内IFN- γ 産生を分析した。グラフは平均($n=2$) \pm SDを示している。図19AはCD107aのレベルを示し、図19BはIFN- γ のレベルを示し、図19CはCD107aおよびIFN- γ 産生のレベルを示す。図19A～19Cに示したデータは、5名の異なる健康なドナーを使用した、5つの独立した実験を代表するものである。

参照による組み込み

【0218】

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

10

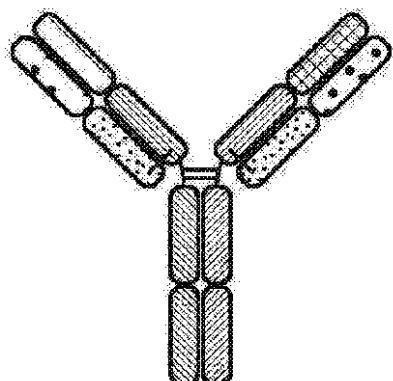
等価物

【0219】

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

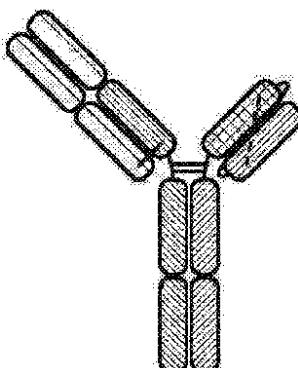
【図1】

FIG. 1



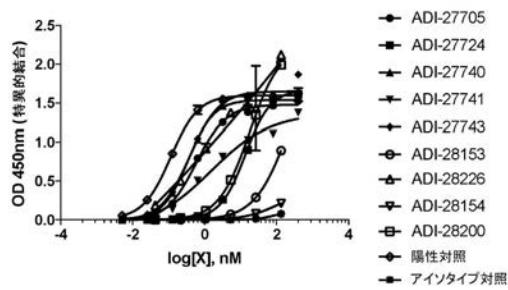
【図2】

FIG. 2



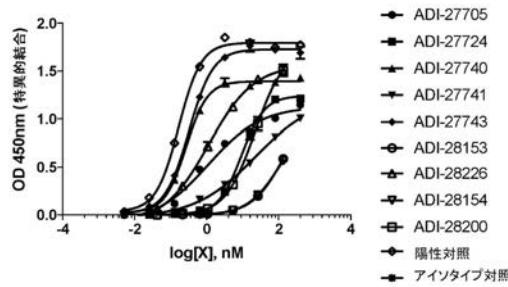
【図3】

FIG. 3



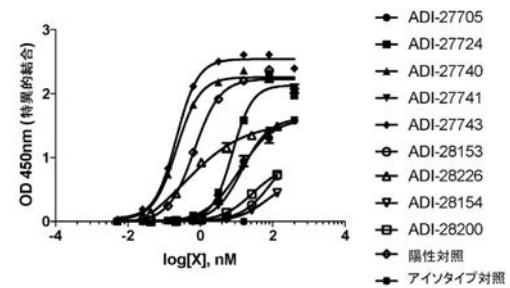
【図4】

FIG. 4



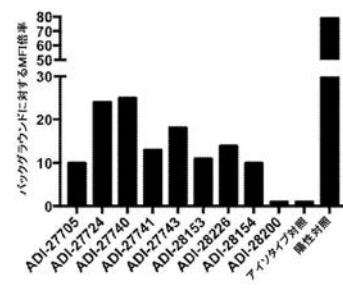
【図5】

FIG. 5



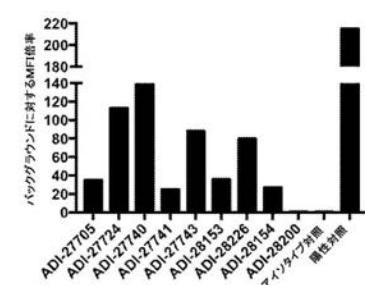
【図6】

FIG. 6



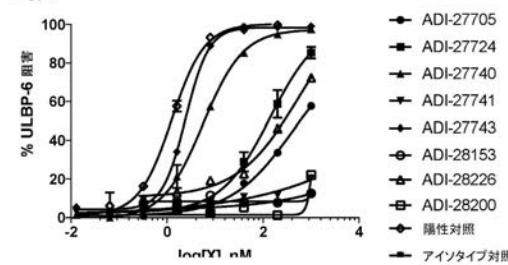
【図7】

FIG. 7



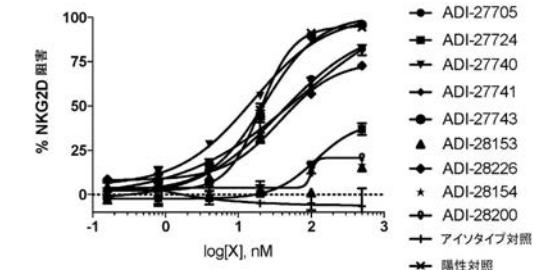
【図8】

FIG. 8



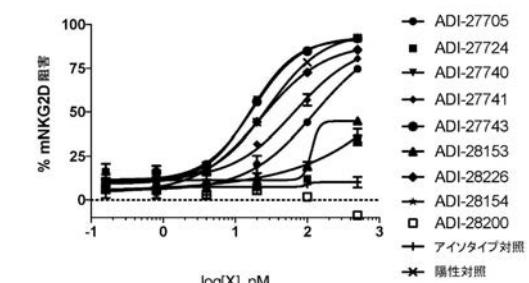
【図9】

FIG. 9



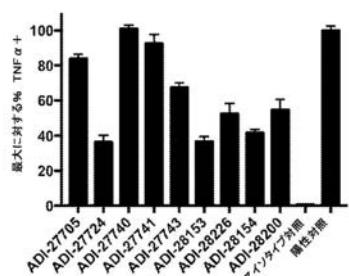
【図10】

FIG. 10



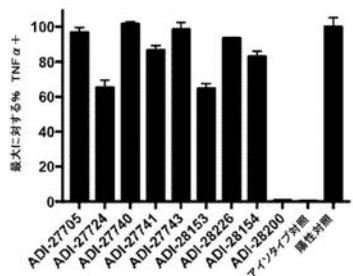
【図 1 1】

FIG. 11



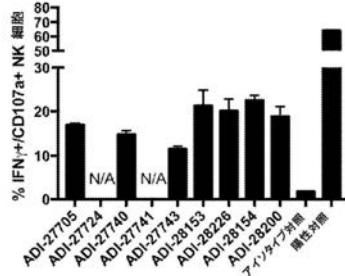
【図 1 2】

FIG. 12



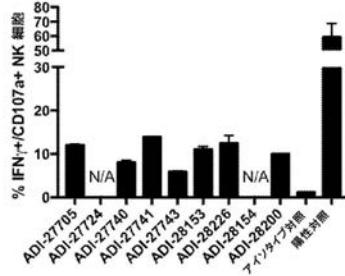
【図 1 3】

FIG. 13



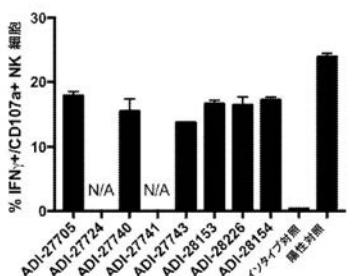
【図 1 4】

FIG. 14



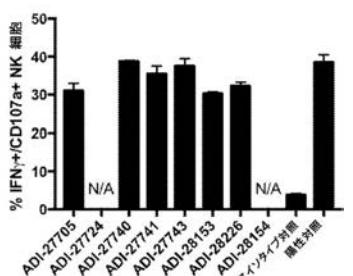
【図 1 5】

FIG. 15



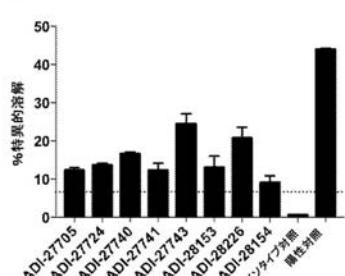
【図 1 6】

FIG. 16



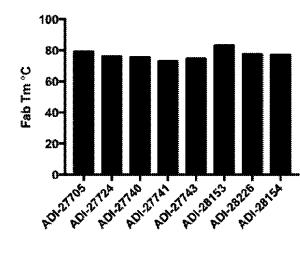
【図 1 7】

FIG. 17



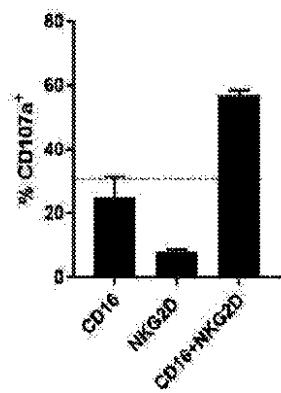
【図 1 8】

FIG. 18



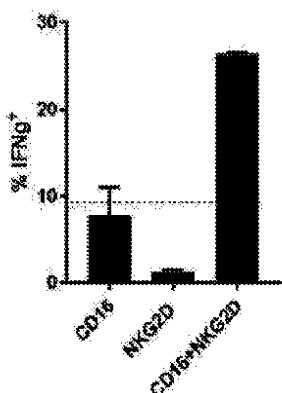
【図 19 A】

FIG. 19A



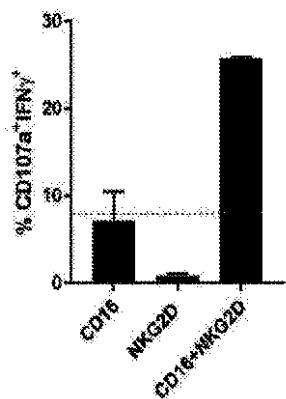
【図 19 B】

FIG. 19B



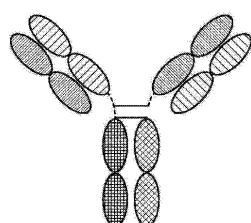
【図 19 C】

FIG. 19C



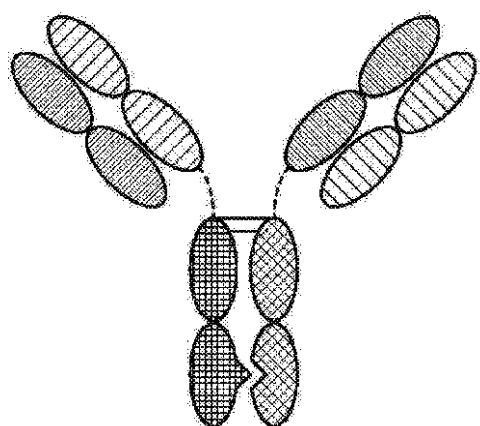
【図 20】

FIG. 20



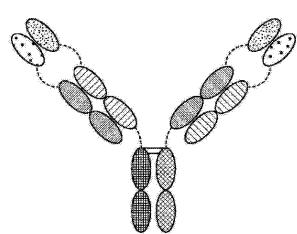
【図 2 1】

FIG. 21



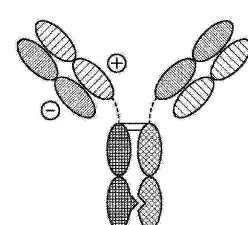
【図 2 2】

FIG. 22



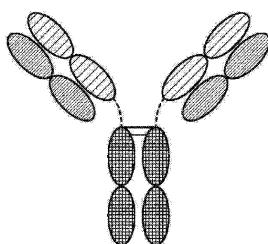
【図 2 3】

FIG. 23



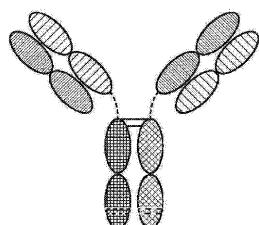
【図 2 4】

FIG. 24



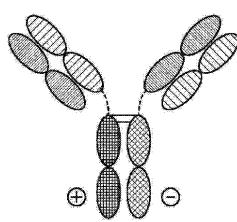
【図 2 6】

FIG. 26



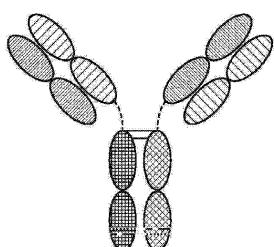
【図 2 5】

FIG. 25



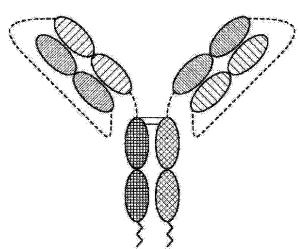
【図 2 7】

FIG. 27



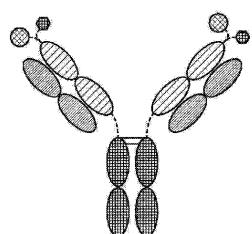
【図 2 8】

FIG. 28



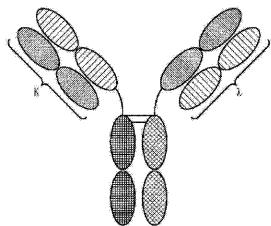
【図 2 9】

FIG. 29



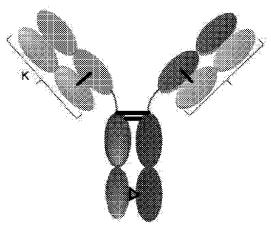
【図 3 0 A】

FIG. 30A



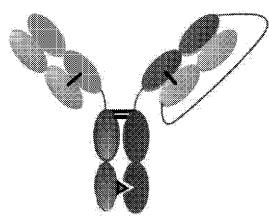
【図 3 0 B】

FIG. 30B



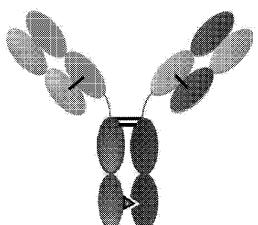
【図 3 1】

FIG. 31



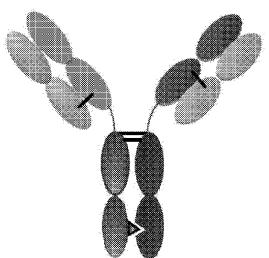
【図 3 3】

FIG. 33



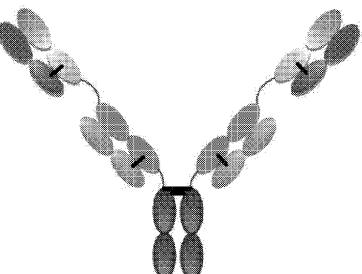
【図 3 2】

FIG. 32



【図 3 4】

FIG. 34



【配列表】

2020521448000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/033952
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 16/24; C07K 16/28; C07K 16/30; C12N 15/09 (2018.01) CPC - A61K 2039/505; C07K 16/28; C07K 16/2815; C07K 16/283; C07K 16/289; C07K 2317/31; C07K 2317/56; C07K 2317/92 (2018.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/134.1; 424/135.1; 424/136.1; 424/178.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/184207 A1 (MACROGENICS, INC.) 03 December 2015 (03.12.2015) entire document	1-4
-		20, 21
Y	WO 2017/081190 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) et al) 18 May 2017 (18.05.2017) entire document	20, 21
A	GLEASON et al. "Bispecific and Trispecific Killer Cell Engagers Directly Activate Human NK Cells through CD16 Signaling and Induce Cytotoxicity and Cytokine Production," Molecular Cancer Therapeutics, 17 October 2012 (17.10.2012), Vol. 11, Iss. 12, Pgs. 2674-2684. entire document	1-4, 20, 21
A	US 2009/0175867 A1 (THOMPSON et al) 09 July 2009 (09.07.2009) entire document	1-4, 20, 21
A	US 2015/0210765 A1 (ZYNGENIA, INC.) 30 July 2015 (30.07.2015) entire document	1-4, 20, 21
A	WO 2016/115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC et al) 21 July 2016 (21.07.2016) entire document	1-4, 20, 21
A	WO 2015/184203 A1 (MACROGENICS, INC.) 03 December 2015 (03.12.2015) entire document	1-4, 20, 21
P, A	US 2017/0233472 A1 (MACROGENICS, INC.) 17 August 2017 (17.08.2017) entire document	1-4, 20, 21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 07 July 2018		Date of mailing of the international search report 09 AUG 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/033952

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 5-19, 22-44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 11/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/04	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEE N

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チャン, グレゴリー ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02155, メドフォード, サンダース ストリート
143

(72)発明者 チュン, アン エフ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01773, リンカーン, モーニングサイド レーン
25

(72)発明者 ヘイニー, ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01778, ウェイランド, リンカーン ロード 61

(72)発明者 ランディ, ブラッドリー エム.

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03766, レバノン, ルーセント ドライブ 7

(72)発明者 プリンツ, ビアンカ

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03766, レバノン, ルーセント ドライブ 7

F ターム(参考) 4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS36 QX01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74