

(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2020-529410

(P2020-529410A)

(43) 公表日 令和2年10月8日 (2020.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-505208 (P2020-505208)
 (86) (22) 出願日 平成30年7月31日 (2018.7.31)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月17日 (2020.3.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/044610
 (87) 国際公開番号 W02019/028027
 (87) 国際公開日 平成31年2月7日 (2019.2.7)
 (31) 優先権主張番号 62/539, 421
 (32) 優先日 平成29年7月31日 (2017.7.31)
 (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 O 2
 4 5 1, ウォルサム, ゲートハウス
 ドライブ 3 5
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 グレゴリー ピー. チャン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 5 5 メドフォード サウンダース
 ストリート 1 4 3

最終頁に続く

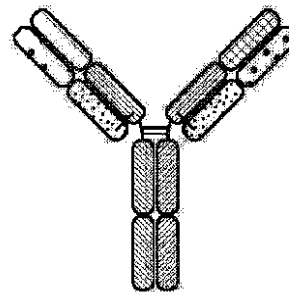
(54) 【発明の名称】 NKG2D、CD16及びFLT3と結合するタンパク質

(57) 【要約】

NKG2D受容体、CD16、及び腫瘍関連抗原FLT3と結合する多重特異性結合タンパク質が記載され、それに加えてがんの処置に有用な医薬組成物及び治療方法が記載される。

【選択図】図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

タンパク質であって、

(a) NKG2D と結合する第 1 抗原結合部位と、

(b) FLT3 と結合する第 2 抗原結合部位と、

(c) 抗体FcドメインもしくはCD16 と結合するのに十分なその一部分、またはCD16 と結合する第 3 抗原結合部位とを含む、前記タンパク質。

【請求項 2】

前記第 1 抗原結合部位が、ヒトの 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 抗原結合部位が、重鎖可変ドメイン及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及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 抗原結合部位が、重鎖可変ドメイン及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。

【請求項 6】

前記第 2 抗原結合部位の前記重鎖可変ドメイン及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。

20

【請求項 7】

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

【請求項 8】

前記第 1 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、及び配列番号：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、先行請求項のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

30

【請求項 9】

前記第 1 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及び配列番号：42 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記第 1 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及び配列番号：50 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記第 1 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及び配列番号：58 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

40

【請求項 12】

前記第 1 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及び配列番号：60 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記第 1 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及び配列番号：62 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1～7 の

50

いずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 4】

前記第 1 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及び配列番号：70 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 5】

前記第 1 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及び配列番号：78 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 6】

前記第 1 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及び配列番号：86 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 7】

前記第 1 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及び配列番号：94 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 8】

前記第 1 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及び配列番号：102 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 9】

前記第 1 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及び配列番号：104 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 0】

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

【請求項 2 1】

前記単一ドメイン抗体が、 V_H H 断片または $V_N A_R$ 断片である、請求項 2 0 に記載のタンパク質。

【請求項 2 2】

前記第 2 抗原結合部位が、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 2 または 2 0 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 3】

前記第 2 抗原結合部位の前記重鎖可変ドメイン及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 2 2 に記載のタンパク質。

【請求項 2 4】

前記第 2 抗原結合部位が F L T 3 と結合し、前記第 2 抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号：109 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号：113 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 5】

前記第 2 抗原結合部位が F L T 3 と結合し、前記第 2 抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号：117 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号：121 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 6】

前記第 2 抗原結合部位が F L T 3 と結合し、前記第 2 抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号：125 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 抗原

10

20

30

40

50

結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号：129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抗原結合部位が、単ドメイン抗体である、請求項1～4または8～21のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項28】

前記第2抗原結合部位が、V_HH断片またはV_{NAR}断片である、請求項27に記載のタンパク質。

【請求項29】

前記タンパク質が、CD16と結合するのに十分な抗体Fcドメインの一部を含み、前記抗体Fcドメインがヒンジ及びCH2ドメインを含む、先行請求項のいずれか1項に記載のタンパク質。

10

【請求項30】

前記抗体Fcドメインが、ヒトIgG1抗体のヒンジ及びCH2ドメインを含む、請求項29に記載のタンパク質。

【請求項31】

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29または30に記載のタンパク質。

【請求項32】

前記Fcドメインが、ヒトIgG1の前記Fcドメインと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、K439からなる群から選択される1つ以上の位置で異なる、請求項31に記載のタンパク質。

20

【請求項33】

先行請求項のいずれか1項に記載のタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、製剤。

【請求項34】

請求項1～32のいずれか1項に記載のタンパク質を発現する1つ以上の核酸を含む、細胞。

30

【請求項35】

腫瘍細胞死の増強方法であって、腫瘍細胞及びナチュラルキラー細胞を、有効量の請求項1～32のいずれか1項に記載の前記タンパク質に曝露することを含み、前記腫瘍細胞がFLT3を発現する、前記方法。

【請求項36】

がんの処置方法であって、前記方法が、有効量の請求項1～32のいずれか1項に記載の前記タンパク質または請求項33に記載の前記製剤を患者に投与することを含み、前記方法。

【請求項37】

前記がんが白血病である、請求項36に記載の方法。

40

【請求項38】

前記白血病が、急性骨髄性白血病、T細胞白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、及び有毛細胞白血病からなる群から選択される、請求項37に記載のがんの処置方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年7月31日出願の米国特許仮出願第62/539,421号明細

50

書の利益及びその優先権を主張し、その内容全体が、あらゆる目的のために参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I形式で電子的に提出された配列表を含有し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。2018年7月30日に作成されたA S C I Iコピーは、D F Y - 0 2 7 W O _ S L . t x tという名称であり、103,731バイトのサイズである。

【0003】

本発明は、N K G 2 D、C D 1 6、及び腫瘍関連抗原F L T 3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】

がんは、かなりの研究努力及び化学的進歩が、この疾患の処置について文献で報告されているにもかかわらず、重大な健康問題であり続けている。血液がん及び骨髄がんは、高い頻度で診断されるがん型であり、多発性骨髄腫、白血病、及びリンパ腫を含む。これらのがんに対する現在の処置選択肢は、全ての患者にとって効果的なものではなく、及び/またはかなり有害な副作用を有し得る。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、それらが高度に特異的であることから望ましく、患者自身の免疫系を使用してがん細胞の破壊を促進し得る。二重特異性T細胞誘導体などの融合タンパク質は、腫瘍細胞及びT細胞に結合し、腫瘍細胞の破壊を促進する、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に、かつある特定の免疫細胞に結合する抗体が、文献に記載されてきた。例えば、W O 2 0 1 6 / 1 3 4 3 7 1及びW O 2 0 1 5 / 0 9 5 4 1 2を参照のこと。

【0006】

ナチュラルキラー(NK)細胞は、自然免疫系の構成要素であり、循環リンパ球のおよそ15%を構成する。NK細胞は実質的に全ての組織に浸潤し、元より、以前の感作を必要とすることなく、効果的に腫瘍細胞を死滅させるそれらの能力を特徴とした。活性化NK細胞は、細胞傷害性T細胞に類似した手段によって、すなわち、パーフォリン及びグランザイムを含有する細胞溶解性顆粒によって、それに加えて細胞死受容体経路によって標的細胞を死滅させる。活性化NK細胞はまた、標的組織に対して他の白血球の動員を促進するI F N - 及びケモカインなどの炎症性サイトカインを分泌する。

【0007】

NK細胞は、それらの表面上の様々な活性化受容体及び阻害性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場合、それらの活性は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(K I R)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場合、それらは、それらの活性化受容体(例えば、N K G 2 D、N C R、D N A M 1)によって活性化される。NK細胞はまた、それらの表面上のC D 1 6受容体を介する一部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細胞の全体的な感度は、刺激シグナル及び阻害シグナルの合計に依存する。

【0008】

F M S様チロシンキナーゼ-3(F L T 3)、すなわち多能性前駆細胞及びリンパ球系共通前駆細胞で発現される受容体チロシンキナーゼは、造血系及び免疫系の発生に重要である。F L T 3を介するシグナル伝達は、細胞の生存、増殖、及び分化において重要な役割を果たす。F L T 3受容体の変異は、白血病、例えば、急性骨髄性白血病、T細胞白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、及び有毛細胞白血病の発症を招き得る。F L T 3の遺伝子内縦列重複(F L T 3 - I T D)は、急性骨髄性白

10

20

30

40

50

血病（AML）と関連する最も一般的な変異である。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体及びCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原FLT3に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。そのようなタンパク質は、NK活性化受容体のうち2種以上と結合し得、天然リガンドとNKG2Dとの結合をブロックする可能性がある。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトのNK細胞を作動させ得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、ヒトのNK細胞ならびにげっ歯類及びカニクイザルなどの、他の種のNK細胞を作動させ得る。本発明の様々な態様及び実施形態が、以下でさらに詳しく記載される。

10

【0010】

したがって、本発明の一態様は、NKG2Dと結合する第1抗原結合部位、腫瘍関連抗原FLT3と結合する第2抗原結合部位、及び抗体Fcドメイン、CD16と結合するのに十分なその一部分、またはCD16と結合する第3抗原結合部位を組み込むタンパク質を提供する。

【0011】

抗原結合部位は各々、抗体重鎖可変ドメイン及び抗体軽鎖可変ドメインを組み込む可能性がある（例えば、抗体におけるように配置される、もしくはscFvを形成するように互いに融合される）か、または抗原結合部位のうち1つ以上が、ラクダ抗体のようなV_H抗体もしくは軟骨魚類に見られるもののようなV_{NAR}抗体などの単ドメイン抗体である可能性がある。

20

【0012】

一態様では、本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体及びCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原FLT3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、及び配列番号：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。

【0013】

NKG2Dに結合する第1抗原結合部位は、いくつかの実施形態では、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%、もしくは100%）同一のアミノ酸配列を有すること、及び/または配列番号：1のCDR1（配列番号：105）、CDR2（配列番号：106）、及びCDR3（配列番号：107）配列と同一のアミノ酸配列を組み込むことなどによって、配列番号：1に関連する重鎖可変ドメインを組み込み得る。配列番号：1に関連する重鎖可変ドメインは、様々な軽鎖可変ドメインと対になってNKG2D結合部位を形成し得る。例えば、配列番号：1に関連する重鎖可変ドメインを組み込む第1抗原結合部位は、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、及び40に関連する配列のうちいずれか1つから選択される軽鎖可変ドメインをさらに組み込み得る。例えば、第1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%）同一の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、及び40から選択される配列のうちいずれか1つと少なくとも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軽鎖可変ドメインを組み込む。

30

40

【0014】

あるいは、第1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及び配列番号：42に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第1抗原結合部位の重

50

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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：４１のＣＤＲ１（配列番号：４３）、ＣＤＲ２（配列番号：４４）、及びＣＤＲ３（配列番号：４５）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第２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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：４２のＣＤＲ１（配列番号：４６）、ＣＤＲ２（配列番号：４７）、及びＣＤＲ３（配列番号：４８）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

【００１５】

他の実施形態では、第１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及び配列番号：５０に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第１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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：４９のＣＤＲ１（配列番号：５１）、ＣＤＲ２（配列番号：５２）、及びＣＤＲ３（配列番号：５３）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第２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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：５０のＣＤＲ１（配列番号：５４）、ＣＤＲ２（配列番号：５５）、及びＣＤＲ３（配列番号：５６）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

【００１６】

あるいは、第１抗原結合部位は、配列番号：５７に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号：５８に関連する軽鎖可変ドメインを、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％）同一のアミノ酸配列及び配列番号：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％）同一のアミノ酸配列を有することなどによって組み込み得る。

【００１７】

別の実施形態では、第１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及び配列番号：６０に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得、例えば、第１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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：５９のＣＤＲ１（配列番号：１３４）、ＣＤＲ２（配列番号：１３５）、及びＣＤＲ３（配列番号：１３６）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第２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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：６０のＣＤＲ１（配列番号：１３７）、ＣＤＲ２（配列番号：１３８）、及びＣＤＲ３（配列番号：１３９）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

【００１８】

NKG2Dに結合する第１抗原結合部位は、いくつかの実施形態では、配列番号：６１に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号：６２に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第１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％、もしくは１００％）同一であり得る、及び／または配列番号：６１のＣＤＲ１（配列番号：６３）、ＣＤＲ２（配列番号：６４）、及びＣＤＲ３（配列番号：６５）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第２抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号：６２と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％

、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。いくつかの実施形態では、第 1 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及び配列番号 : 7 0 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 1 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。同様に、第 2 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。

10

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、第 1 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及び配列番号 : 7 8 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 1 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。同様に、第 2 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。

20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 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及び配列番号 : 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 1 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。同様に、第 2 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。

30

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、第 1 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及び配列番号 : 9 4 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 1 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び 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み得る。同様に、第 2 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 %、 もしくは 1 0 0 %) 同一であり得る、及び / 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)、及び C D R 3 (配列番号 : 1 0 0) 配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

40

50

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 抗原結合部位は、配列番号： 1 0 1 に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号： 1 0 2 に関連する軽鎖可変ドメインを、それぞれ配列番号： 1 0 1 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 %）同一のアミノ酸配列及び配列番号： 1 0 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 %）同一のアミノ酸配列を有することなどによって組み込み得る。いくつかの実施形態では、第 1 抗原結合部位は、配列番号： 1 0 3 に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号： 1 0 4 に関連する軽鎖可変ドメインを、それぞれ配列番号： 1 0 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 %）同一のアミノ酸配列及び配列番号： 1 0 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 %）同一のアミノ酸配列を有することなどによって組み込み得る。

10

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、F L T 3 に結合する第 2 抗原結合部位は、配列番号： 1 0 9 に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号： 1 1 3 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 2 抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号： 1 0 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る、及び / または配列番号： 1 0 9 の C D R 1（配列番号： 1 1 0）、C D R 2（配列番号： 1 1 1）、及び C D R 3（配列番号： 1 1 2）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第 2 抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号： 1 1 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る、及び / または配列番号： 1 1 3 の C D R 1（配列番号： 1 1 4）、C D R 2（配列番号： 1 1 5）、及び C D R 3（配列番号： 1 1 6）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

20

【 0 0 2 4 】

あるいは、F L T 3 に結合する第 2 抗原結合部位は、配列番号： 1 1 7 に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号： 1 2 1 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 2 抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号： 1 1 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る、及び / または配列番号： 1 1 7 の C D R 1（配列番号： 1 1 8）、C D R 2（配列番号： 1 1 9）、及び C D R 3（配列番号： 1 2 0）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第 2 抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号： 1 2 1 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る、及び / または配列番号： 1 2 1 の C D R 1（配列番号： 1 2 2）、C D R 2（配列番号： 1 2 3）、及び C D R 3（配列番号： 1 2 4）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

30

40

【 0 0 2 5 】

あるいは、F L T 3 に結合する第 2 抗原結合部位は、配列番号： 1 2 5 に関連する重鎖可変ドメイン及び配列番号： 1 2 9 に関連する軽鎖可変ドメインを組み込み得る。例えば、第 2 抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号： 1 2 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る、及び / または配列番号： 1 2 5 の C D R 1（配列番号： 1 2 6）、C D R 2（配列番号： 1 2 7）、及び C D R 3（配列番号： 1 2 8）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。同様に、第 2 抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号： 1 2 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 %、もしくは 1 0 0 %）同一であり得る。

50

る、及び／または配列番号：１２９のＣＤＲ１（配列番号：１３０）、ＣＤＲ２（配列番号：１３１）、及びＣＤＲ３（配列番号：１３２）配列と同一のアミノ酸配列を組み込み得る。

【００２６】

いくつかの実施形態では、第２抗原結合部位は、第１抗原結合部位中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む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、ＣＤ１６と結合するのに十分な抗体Ｆｃドメインの一部を組み込み、抗体Ｆｃドメインは、ヒンジ及びＣＨ２ドメイン、及び／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。

10

【００２８】

本明細書に記載されるタンパク質のうちいずれか１つを含有する製剤、タンパク質を発現する１つ以上の核酸を含有する細胞、及び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。

【００２９】

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、治療有効量の本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質を、それを必要とする患者に投与することを含む。多重特異性結合タンパク質を使用して処置される例示的ながんとしては、白血病、例えば、急性骨髄性白血病、Ｔ細胞白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、及び有毛細胞白血病が挙げられる。

20

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１】ヘテロ二量体多重特異性抗体の図である。各アームは、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン、またはＦＬＴ３結合ドメインのいずれかを表し得る。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｄ及びＦＬＴ３結合ドメインは、共通の軽鎖を共有し得る。

【００３１】

【図２】ヘテロ二量体多重特異性抗体の図である。ＮＫＧ２Ｄ結合ドメインまたはＦＬＴ３結合ドメインのいずれかが、ｓｃＦｖ型を取り得る（右アーム）。

【００３２】

【図３】ＥＬＩＳＡアッセイにおける、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）とヒト組換えＮＫＧ２Ｄとの結合親和性を示す線グラフである。

30

【００３３】

【図４】ＥＬＩＳＡアッセイにおける、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）とカニクイザル組換えＮＫＧ２Ｄとの結合親和性を示す線グラフである。

【００３４】

【図５】ＥＬＩＳＡアッセイにおける、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）とマウス組換えＮＫＧ２Ｄとの結合親和性を示す線グラフである。

【００３５】

【図６】平均蛍光強度（ＭＦＩ）のバックグラウンドに対する倍率（ＦＯＢ）を示すフローサイトメトリーによる、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）とヒトＮＫＧ２Ｄを発現するＥＬ４細胞との結合を示す棒グラフである。

40

【００３６】

【図７】平均蛍光強度（ＭＦＩ）のバックグラウンドに対する倍率（ＦＯＢ）を示すフローサイトメトリーによる、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）とマウスＮＫＧ２Ｄを発現するＥＬ４細胞との結合を示す棒グラフである。

【００３７】

【図８】天然リガンドＵＬＢＰ－６と競合することによって、ＮＫＧ２Ｄ結合ドメイン（クローンとして列挙される）と組換えヒトＮＫＧ２Ｄ－Ｆｃとの特異的結合親和性を示す線グラフである。

50

【 0 0 3 8 】

【 図 9 】天然リガンド M I C A と競合することによって、N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）と組換えヒト N K G 2 D - F c との特異的結合親和性を示す線グラフである。

【 0 0 3 9 】

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

【 0 0 4 0 】

【 図 1 1 】T N F - 陽性細胞のパーセンテージを定量化することによって、N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるヒト N K G 2 D の活性化を示す棒グラフであり、この細胞はヒト N K G 2 D - C D 3 ゼータ融合タンパク質を発現する。

10

【 0 0 4 1 】

【 図 1 2 】T N F - 陽性細胞のパーセンテージを定量化することによって、N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるマウス N K G 2 D の活性化を示す棒グラフであり、この細胞はマウス N K G 2 D - C D 3 ゼータ融合タンパク質を発現する。

【 0 0 4 2 】

【 図 1 3 】N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるヒト N K 細胞の活性化を示す棒グラフである。

【 0 0 4 3 】

20

【 図 1 4 】N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるヒト N K 細胞の活性化を示す棒グラフである。

【 0 0 4 4 】

【 図 1 5 】N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるマウス N K 細胞の活性化を示す棒グラフである。

【 0 0 4 5 】

【 図 1 6 】N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）によるマウス N K 細胞の活性化を示す棒グラフである。

【 0 0 4 6 】

【 図 1 7 】腫瘍細胞上の N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）の細胞傷害効果を示す棒グラフである。

30

【 0 0 4 7 】

【 図 1 8 】示差走査蛍光定量法によって測定される N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列挙される）の融解温度を示す棒グラフである。

【 0 0 4 8 】

【 図 1 9 】C D 1 6 及び N K G 2 D 結合を使用した N K 細胞の相乗的活性化の棒グラフである。図 1 9 A は C D 1 0 7 a のレベルを示し、図 1 9 B は I F N - のレベルを示し、図 1 9 C は C D 1 0 7 a 及び I F N - のレベルを示す。グラフは、平均（ $n = 2$ ） \pm S D を示す。データは、5 人の異なる健康なドナーを使用した 5 つの独立した実験の典型である。

40

【 0 0 4 9 】

【 図 2 0 】T r i o m a b 型の T r i N K E T の図であり、これは I g G 様形状を維持する三機能性の二重特異性抗体である。このキメラは 2 つの半抗体からなり、各々が 1 本の軽鎖及び 1 本の重鎖を有し、2 つの親抗体に由来する。T r i o m a b 型は、1 / 2 のラット抗体及び 1 / 2 のマウス抗体を含有するヘテロ二量体構築物の場合もある。

【 0 0 5 0 】

【 図 2 1 】K i H 共通軽鎖型の T r i N K E T の図であり、これはノブ・イントゥ・ホール（K I H）技術を含む。K i H は、標的 1 及び 2 に結合する 2 つの F a b、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化させた F c を含有するヘテロ二量体である。K i H 型の T r i N K E T は、2 本の異なる重鎖及び両方の重鎖と対になる共通の軽鎖を含有する、

50

標的 1 及び標的 2 に結合する 2 つの F a b を有するヘテロ二量体構築物の場合もある。

【 0 0 5 1 】

【図 2 2】二重可変ドメイン免疫グロブリン (D V D - I g (商 標)) 型の T r i N K E T の図であり、これは天然に存在するフレキシブルリンカーを介して 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 I g G 様分子をもたらす。D V D - I g (商 標) 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 F a b の可変ドメインの N 末端に融合されているホモ二量体構築物である。D V D - I g (商 標) 型は、通常の F c を含有する。

【 0 0 5 2 】

【図 2 3】直交 F a b 界面 (オルソ - F a b) 型の T r i N K E T の図であり、これは F c に融合されている標的 1 及び標的 2 に結合する 2 つの F a b を含有するヘテロ二量体構築物である。軽鎖 (L C) - 重鎖 (H C) 対合は、直交界面によって確実に行われる。ヘテロ二量体化は、F c の変異によって確実に行われる。

10

【 0 0 5 3 】

【図 2 4】2 ・ イン ・ 1 I g 型の T r i N K E T の図である。

【 0 0 5 4 】

【図 2 5】E S 型の T r i N K E T の図であり、これは F c に融合されている標的 1 及び標的 2 に結合する 2 つの異なる F a b を含有するヘテロ二量体構築物である。ヘテロ二量体化は、F c の静電ステアリング変異によって確実に行われる。

20

【 0 0 5 5 】

【図 2 6】F a b アーム交換型の T r i N K E T の図であり、この抗体は、重鎖及び付随する軽鎖 (半分子) と別の分子からの重 - 軽鎖対とを交換することによって F a b アームを交換し、これにより二重特異性抗体をもたらす。F a b アーム交換型 (c F a e) は、標的 1 及び 2 に結合する 2 つの F a b 、 ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化させた F c を含有するヘテロ二量体である。

【 0 0 5 6 】

【図 2 7】S E E D ボディ型の T r i N K E T の図であり、これは標的 1 及び 2 に結合する 2 つの F a b 、 ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化させた F c を含有するヘテロ二量体である。

【 0 0 5 7 】

【図 2 8】L u Z - Y 型の T r i N K E T の図であり、その場合、ロイシンジッパーが 2 つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するために使用される。L u Z - Y 型は、F c に融合されている標的 1 及び 2 に結合する 2 つの異なる s c F a b を含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、F c の C 末端に融合されているロイシンジッパーモチーフによって確実に行われる。

30

【 0 0 5 8 】

【図 2 9】C o v - X - ボディ型の T r i N K E T の図である。

【 0 0 5 9 】

【図 3 0】k - ボディ型の T r i N K E T の図であり、これはヘテロ二量体化変異によって安定化させた F c に融合されている 2 つの異なる F a b を有するヘテロ二量体構築物であり、抗原 1 を標的とする一方の F a b がカップ L C を含有し、抗原 2 を標的とする第 2 F a b がラムダ L C を含有する。図 3 0 A は、k - ボディの 1 つの型の例示的な図であり、図 3 0 B は、別の k - ボディの例示的な図である。

40

【 0 0 6 0 】

【図 3 1】標的 1 に結合する F a b 及び標的 2 に結合する s c F a b を含み、その両方が F c ドメインに融合されている O a s c - F a b ヘテロ二量体構築物である。ヘテロ二量体化は、F c ドメインの変異によって確実に行われる。

【 0 0 6 1 】

【図 3 2】D u e t M a b であり、これは抗原 1 及び 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変異によって安定化させている F c を含有するヘテロ二量体構築

50

物である。F a b 1 及び 2 は、正確な軽鎖及び重鎖対合を確実に行う示差的 S - S 架橋を含有する。

【 0 0 6 2 】

【 図 3 3 】 C r o s s m A b であり、これは標的 1 及び 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変異によって安定化させた F c を有するヘテロ二量体構築物である。C L 及び C H 1 ドメイン、ならびに V H 及び V L ドメインが交換されていて、例えば、C H 1 が V L とインラインで融合される一方で、C L が V H とインラインで融合される。

【 0 0 6 3 】

【 図 3 4 】 F i t - I g であり、これは抗原 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 末端に融合されるホモ二量体構築物である。構築物は、野生型 F c を含有する。

10

【 0 0 6 4 】

【 図 3 5 】 F L T 3 標的化 T r i N K E T と、E L 4 細胞上で発現される N K G 2 D との結合を示す線グラフである。F L T 3 モノクローナル抗体 I M C E B 1 0 を対照として使用した。

【 0 0 6 5 】

【 図 3 6 】 F L T 3 標的化 T r i N K E T と、ヒト A M L 細胞株 M o l m - 1 3 (図 3 6 A) 及び E O L - 1 (図 3 6 B) 上で発現される F L T 3 との結合を示す線グラフである。F L T 3 モノクローナル抗体 I M C E B 1 0 を対照として使用した。

20

【 0 0 6 6 】

【 図 3 7 】 3 7 での 2 時間及び 2 0 時間のインキュベーション後における、E O L - 1 細胞 (図 3 7 A) 及び M o l m - 1 3 細胞 (図 3 7 B) 上での F L T 3 標的化 T r i N K E T の内在化を示す線グラフである。リンツズマブを対照として使用した。

【 0 0 6 7 】

【 図 3 8 】 F L T 3 発現 E O L - 1 細胞に対するヒト N K 細胞の T r i N K E T 媒介性細胞傷害を示す線グラフである。F L T 3 モノクローナル抗体 I M C E B 1 0 及び I M C E B 1 0 に由来する F L T 3 結合ドメインを含有する T r i N K E T が、図 3 8 A に示される。F L T 3 モノクローナル抗体 4 G 8 及び 4 G 8 に由来する F L T 3 結合ドメインを含有する T r i N K E T が、図 3 8 B に示される。

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 6 8 】

本発明は、ナチュラルキラー細胞上の N K G 2 D 受容体及び C D 1 6 受容体、ならびに腫瘍関連抗原 F L T 3 と結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。いくつかの実形態では、多重特異性タンパク質は、F L T 3 または別の腫瘍関連抗原と結合する追加の抗原結合部位をさらに含む。本発明は、そのような多重特異性結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびにがんを処置するなどの目的のために、そのような多重特異性タンパク質及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が以下の節に記載されているが、しかしながら、ある特定の節に記載されている本発明の態様が、いずれの特定の節にも限定されるべきではない。

40

【 0 0 6 9 】

本発明の理解を促進するために、多数の用語及び語句が以下に定義される。

【 0 0 7 0 】

「 a 」及び「 a n 」という用語は、本明細書で使用される場合に「 1 つ以上」を意味し、文脈が不適切でない限り複数形を含む。

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の一部を指す。ヒト抗体では、抗原結合部位は、重 (「 H 」) 鎖及び軽 (「 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。重鎖及び軽鎖の V 領域内における 3 つの大きく異なるストレッチは「超可変領域」と称され、これら

50

は「フレームワーク領域」、または「FR」として知られるより保存された隣接ストレッチ間に挿入される。したがって、「FR」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域間で天然に見られ、かつそれらに隣接しているアミノ酸配列を指す。ヒト抗体分子では、軽鎖の3つの超可変領域及び重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間中で互いに関連して配置され、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面に相補的であり、重鎖及び軽鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」、または「CDR」と称される。ラクダ及び軟骨魚類などのある特定の動物では、抗原結合部位は、「単ドメイン抗体」をもたらす一本の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において、抗原結合表面を保持する抗体の抗原結合断片中において、またはscFvなどの、ペプチドリンカーを使用して単一ポリペプチド中で重鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインに結合させる組換えポリペプチド中において存在し得る。

10

【0072】

「腫瘍関連抗原」という用語は、本明細書で使用される場合、がんに関連するタンパク質、糖タンパク質、ガングリオシド、炭水化物、脂質を含むが、これらに限定されないいずれかの抗原を意味する。そのような抗原は、悪性細胞上で、または腫瘍微小環境中において、例えば、腫瘍関連の血管、細胞外マトリックス、間葉系間質、もしくは免疫浸潤物上などで発現され得る。

【0073】

本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書に記載される方法及び組成物によって処置される生物を指す。そのような生物としては、好ましくは、哺乳動物（例えば、ネズミ、サル、ウマ科、ウシ科、ブタ、イヌ科、ネコ科など）が挙げられるが、これらに限定されず、より好ましくはヒトが挙げられる。

20

【0074】

本明細書で使用される場合、「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つ以上の投与、適用または投与量で投与され得、特定の製剤または投与経路に限定されることを意図するものではない。本明細書で使用される場合、「処置すること」という用語は、状態、疾患、障害などの改善をもたらす、例えば、低下、減少、調節、向上もしくは排除、またはそれらの症状を向上させるいずれかの効果を含む。

【0075】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、活性剤と、その組成物をインビボまたはエクシボでの診断的または治療的使用に特に好適にさせる、不活性または活性な担体との組合せを指す。

30

【0076】

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、標準的な医薬担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン（例えば、油/水または水/油エマルジョンなど）、及び様々な種類の湿潤剤などのいずれかを指す。組成物は、安定剤及び防腐剤も含み得る。担体、安定剤及びアジュバントの例については、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]を参照のこと。

40

【0077】

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、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）を指し、これは対象への投与時に本発明の化合物またはその活性代謝産物もしくは残基を提供することができる。当業者には既知の通り、本発明の化合物の「塩」は、無機または有機酸及び塩基に由来する場合がある。例示的な酸としては、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挙げられるが、こ

50

れらに限定されない。シュウ酸などの他の酸は、それ自体では薬学的に許容されないが、本発明の化合物及びそれらの薬学的に許容される酸付加塩を得る時に中間体として有用な塩の調製に用いられる場合がある。

【0078】

例示的な塩基としては、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、及び式 NW_4^+ （式中、Wは、 C_{1-4} アルキルである）の化合物などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0079】

例示的な塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサノ酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが挙げられるが、これらに限定されない。塩の他の例としては、好適なカチオン、例えば、 Na^+ 、 NH_4^+ 、及び NW_4^+ （式中、Wは、 C_{1-4} アルキル基である）などと化合される本発明の化合物のアニオンが挙げられる。

10

20

【0080】

治療的使用に関して、本発明の化合物の塩は、薬学的に許容されるものとして考慮される。しかしながら、薬学的に許容されない酸及び塩基の塩もまた、例えば、薬学的に許容される化合物の調製または精製において用途を見出す場合もある。

【0081】

記載全体を通して、組成物が特定の構成要素を有する、含む、もしくは備えると記載されている場合か、またはプロセス及び方法が特定のステップを有する、含む、もしくは備えると記載されている場合、さらに、列挙される構成要素から本質的になる、またはそれらからなる本発明の組成物が存在すること、ならびに列挙されるプロセスステップから本質的になる、またはそれらからなる本発明によるプロセス及び方法が存在することが考慮される。

30

【0082】

一般的な事項として、パーセンテージを明示している組成物は、別段の指定がない限り重量によるものである。さらに、変数が定義を伴わない場合には、変数の前の定義を考慮に入れる。

【0083】

I. タンパク質

本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体及びCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原FLT3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、本明細書に記載される医薬組成物及び治療方法に有用である。多重特異性結合タンパク質と、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体及びCD16受容体との結合は、FLT3を発現する腫瘍細胞の破壊に対するナチュラルキラー細胞の活性を増強する。多重特異性結合タンパク質とFLT3発現細胞との結合は、がん細胞をナチュラルキラー細胞に近接させ、これにより、ナチュラルキラー細胞による直接的かつ間接的ながん細胞の破壊が促進される。いくつかの例示的な多重特異性結合タンパク質のさらなる記載が以下に提供される。

40

【0084】

多重特異性結合タンパク質の第1構成要素は、NKG2D受容体発現細胞に結合し、これらの細胞としては、NK細胞、T細胞及びCD8⁺T細胞が挙げられ得るが、これらに限定されない。NKG2D結合時、多重特異性結合タンパク質は、NKG2Dと

50

の結合及びNKGD受容体の活性化から、ULBP6及びMICAなどの天然リガンドをブロックする可能性がある。

【0085】

多重特異性結合タンパク質の第2構成要素は、FLT3と結合する。FLT3発現細胞は、白血病、例えば、急性骨髄性白血病及びT細胞白血病で見られる場合がある。

【0086】

多重特異性結合タンパク質の第3構成要素は、CD16を発現する細胞、白血球、例えば、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、肥満細胞、及び濾胞樹状細胞を含むものの表面上におけるFc受容体に結合する。

【0087】

本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質は、様々な型を取り得る。例えば、1つの型は、第1免疫グロブリン重鎖、第1免疫グロブリン軽鎖、第2免疫グロブリン重鎖及び第2免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体多重特異性抗体である(図1)。第1免疫グロブリン重鎖は、第1Fc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメイン、第1重鎖可変ドメイン及び場合により、第1CH1重鎖ドメインを含む。第1免疫グロブリン軽鎖は、第1軽鎖可変ドメイン及び第1軽鎖定常ドメインを含む。第1免疫グロブリン軽鎖は、第1免疫グロブリン重鎖と一緒に、NKGDと結合する抗原結合部位を形成する。第2免疫グロブリン重鎖は、第2Fc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメイン、第2重鎖可変ドメイン及び場合により、第2CH1重鎖ドメインを含む。第2免疫グロブリン軽鎖は、第2軽鎖可変ドメイン及び第2軽鎖定常ドメインを含む。第2免疫グロブリン軽鎖は、第2免疫グロブリン重鎖と一緒に、FLT3と結合する抗原結合部位を形成する。第1Fcドメイン及び第2Fcドメインは共に、CD16に結合することができる(図1)。いくつかの実施形態では、第1免疫グロブリン軽鎖は、第2免疫グロブリン軽鎖と同一である。

【0088】

別の例示的な型は、第1免疫グロブリン重鎖、第2免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体多重特異性抗体を含む(図2)。第1免疫グロブリン重鎖は、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して、対合してNKGDと結合するか、またはFLT3抗原と結合する重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインで構成される一本鎖可変断片(scfv)に融合される第1Fc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメインを含む。第2免疫グロブリン重鎖は、第2Fc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメイン、第2重鎖可変ドメイン及び場合により、CH1重鎖ドメインを含む。免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常ドメインを含む。第2免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリン軽鎖と対合してNKGDに結合するか、または腫瘍関連抗原FLT3と結合する。第1Fcドメイン及び第2Fcドメインは共に、CD16に結合することができる(図2)。

【0089】

1つ以上の追加の結合モチーフが、場合によりリンカー配列を介して、定常領域CH3ドメインのC末端に融合される場合がある。ある特定の実施形態では、抗原結合モチーフは、四価または三価の分子を形成する一本鎖またはジスルフィド安定化可変領域(scfv)である。

【0090】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質はTriomab型であり、これはIgG様形状を維持する三機能性の二重特異性抗体である。このキメラは2つの半抗体からなり、各々が1本の軽鎖及び1本の重鎖を有し、2つの親抗体に由来する。

【0091】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質はKiH共通軽鎖(LC)型であり、これはノブ・イントゥ・ホール(KIH)技術を含む。KIHは、CH3ドメインを操作して各重鎖に「ノブ」または「ホール」のいずれかを作製し、ヘテロ二量体化を促進することを含む。「ノブ・イントゥ・ホール(KiH)」Fc技術の背後にある構想とは、小さい残基から高い残基への置換によって1つのCH3ドメイン(CH3A)に「ノ

10

20

30

40

50

ブ」を導入すること（例えば、EU番号付けのT366W_{CH3A}）であった。「ノブ」を収容するために、相補的な「ホール」表面が、最も近接した隣接残基を、より小さな残基を有するノブに置き換えることによって他方のCH3ドメイン（CH3B）上に作製された（例えば、T366S/L368A/Y407V_{CH3B}）。「ホール」変異は、構造に基づくファージライブラリースクリーニングによって最適化された（Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library, J. Mol. Biol. (1997) 270(1): 26-35)。KiH FcバリエーションのX線結晶構造（Elliot JM, Ultshch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, et al., Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. J. Mol. Biol. (2014) 426(9): 1947-57、Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcRs. Mol. Immunol. (2014) 58(1): 132-8）は、ヘテロ二量体化が、CH3ドメイン間のコア界面における立体相補性によって促進される疎水性相互作用により熱力学的に有利となるのに対して、ノブ-ノブ及びホール-ホール界面は、それぞれ立体障害及び有利な相互作用の破壊ゆえに、ホモ二量体化に有利ではないことを実証した。

【0092】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））型であり、これは天然に存在するフレキシブルリンカーを介して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。

【0093】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、直交Fab界面（オルソ-Fab）型である。オルソ-Fab IgGアプローチ（Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, et al., Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat. Biotechnol. (2014) 32(2): 191-8）では、構造に基づく領域設計によって、他方のFabを一切変化させることなく、一方のFabのみにおいてLC及びHC_{VH-CH1}界面に相補的変異が導入される。

【0094】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2・イン・1Ig型である。いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質はES型であり、これはFcに融合されている標的1及び標的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。ヘテロ二量体化は、Fcの静電ステアリング変異によって確実に行われる。

【0095】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質はk-ボディ型であり、これはヘテロ二量体化変異：抗原1を標的とするFab1がカップLCを含有する一方で、抗原2を標的とする第2FabがラムダLCを含有する変異によって安定化させたFcに融合されている2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である。図30Aは、k-ボディの1つの型の例示的な図であり、図30Bは、別のk-ボディの例示的な図であ

る。

【0096】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F a b アーム交換型（重鎖及び付随する軽鎖（半分子）と別の分子からの重 - 軽鎖対とを交換することによって F a b アームを交換する抗体であって、これにより二重特異性抗体をもたらす）である。

【0097】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、S E E D ボディ型である。鎖交換操作ドメイン（S E E D）プラットフォームは、天然抗体の治療用途を拡大させる能力を持つ、非対称かつ二重特異性抗体様分子を生成するように設計された。このタンパク質操作プラットフォームは、保存された C H 3 ドメイン内で免疫グロブリンの構造的に関連した配列を交換することに基づく。S E E D 設計は、A G / G A ヘテロ二量体の効率的な生成を可能にする一方で、A G 及び G A S E E D C H 3 ドメインのホモ二量体化を不利にする。（M u d a M . e t a l . , P r o t e i n E n g . D e s . S e l . (2 0 1 1 , 2 4 (5) : 4 4 7 - 5 4) ）。 10

【0098】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は L u Z - Y 型であり、その場合、ロイシンジッパーが2つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するために使用される。（W r a n i k , B J . e t a l . , J . B i o l . C h e m . (2 0 1 2) , 2 8 7 : 4 3 3 3 1 - 9) ）。 20

【0099】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、C o v - X - ボディ型である。二重特異性 C o v - X - ボディでは、2つの異なるペプチドが、分岐アゼチジノンリンカーを使用して互いに結合され、緩やかな条件下において部位特異的手法で足場抗体に融合される。ファーマコフォアが機能活性に関与するのに対して、抗体足場は長期の半減期及び I g 様分布を付与する。ファーマコフォアは、最適化された、または特有の二重特異性抗体を生成するために、化学的に最適化され得るか、または他のファーマコフォアで置き換えられ得る。（D o p p a l a p u d i V R e t a l . , P N A S (2 0 1 0) , 1 0 7 (5 2) , 2 2 6 1 1 - 2 2 6 1 6) ）。 30

【0100】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F c に融合されている、標的 1 に結合する F a b、及び標的 2 に結合する s c F a b を含む O a s c - F a b ヘテロ二量体型である。ヘテロ二量体化は、F c の変異によって確実に行われる。 30

【0101】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は D u e t M a b 型であり、これは抗原 1 及び 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変異によって安定化させた F c を含有するヘテロ二量体構築物である。F a b 1 及び 2 は、正確な L C 及び H C 対合を確実に示差 S - S 架橋を含有する。 40

【0102】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は C r o s s m A b 型であり、これはヘテロ二量体化によって安定化させた F c に融合されている、標的 1 及び 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 L 及び C H 1 ドメインならびに V H 及び V L ドメインが交換されていて、例えば、C H 1 が V L とインラインで融合される一方で、C L が V H とインラインで融合される。 40

【0103】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合タンパク質は F i t - I g 型であり、これは抗原 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 末端に融合されるホモ二量体構築物である。構築物は、野生型 F c を含有する。

【0104】

表 1 は、組み合わせると N K G 2 D に結合し得る重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのペプチド配列を一覧にしている。N K G 2 D 結合ドメインは、N K G 2 D に対するそ 50

これらの結合親和性が異なる可能性があるが、それにもかかわらず、それらは全てヒトNK G2D及びNK細胞を活性化させる。

【表1】

表1		
クローン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LTVSS (配列番号：1) CDR1 (配列番号：105) - G S F S G Y Y W S CDR2 (配列番号：106) - EIDHSGSTNYP PSLK CDR3 (配列番号：107) - ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYPITFGGGTKV EIK (配列番号：2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LTVSS (配列番号：3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGTK VEIK (配列番号：4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LTVSS (配列番号：5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYHSFYTFGGGKVE IK (配列番号：6)
ADI-	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS

10

20

30

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
27741	GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：7)	QSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQSNSYYTFGGGTKVE IK (配列番号：8)
ADI- 27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYPTFGGGTKVE IK (配列番号：10)
ADI- 28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWGFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTS QSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWAS TRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDSATYYCQQSYDIPYTFGGGTKL EIK (配列番号：12)
ADI- 28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYGSFPITFGGGTKV EIK (配列番号：14)
ADI- 28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPDDFATYYCQQSKEVPWTFGGGTKV EIK (配列番号：16)
ADI- 29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS (配列番号：17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSFPTFGGGTKVE IK (配列番号：18)
ADI- 29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYDIYPTFGGGTKVE

10

20

30

40

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
	(配列番号：19)	IK (配列番号：20)
ADI- 29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYDSYPTFGGGTKVE IK (配列番号：22)
ADI- 29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYGSFPTFGGGTKVE IK (配列番号：24)
ADI- 29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYQSFPTFGGGTKVE IK (配列番号：26)
ADI- 29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYSSFTFGGGTKVE IK (配列番号：28)
ADI- 29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYESYSTFGGGTKVE IK (配列番号：30)
ADI- 29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPDDFATYYCQYDSFITFGGGTKVE IK (配列番号：32)
ADI-	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS

10

20

30

40

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
29425	GYYSWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号：33)	QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYQSYPTFGGGTKVE IK (配列番号：34)
ADI- 29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF GYYSWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号：35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYHSFPTFGGGTKVE IK (配列番号：36)
ADI- 29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF GYYSWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号：37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYELYSYTFGGGTV EIK (配列番号：38)
ADI- 29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF GYYSWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号：39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYDTFITFGGGTKVE IK (配列番号：40)
ADI- 27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGDSSIRHAYYYYGMDVWGQGT TVTVSS (配列番号：41) CDR1 (配列番号：43) — GTFSSY AIS CDR2 (配列番号：44) — GIIPIFGTANYAQKFQ CDR3 (配列番号：45) — ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGPDRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPITF GGGTVKVEIK (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)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA DTAVYYCARGSDRFHPYFDYWGQGTLLTVS	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQFDTPPTFGGGTVK

10

20

30

40

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
	S (配列番号：49) CDR1 (配列番号：51) – GSISSSSYWG CDR2 (配列番号：52) – SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (配列番号：53) – ARGSDRFHPYFDY	EIK (配列番号：50) CDR1 (配列番号：54) – RASQSVSRILA CDR2 (配列番号：55) – DASNRAT CDR3 (配列番号：56) – QQFDTWPPT
ADI- 29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSF GYYWSWIRQPPGKLEWIGEIDHSGSTNYN PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARARGPWSFDPWGQGTLLTVSS (配列番号：57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCEQYDSYPTFGGGTKVE IK (配列番号：58)
ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS SYAISWVRQAPGGGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRGRKASGSFYFYYGMDVWGQT TVTVSS (配列番号：59) CDR1 (配列番号：134) – G T F S S Y A I S CDR2 (配列番号：135) – G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G CDR3 (配列番号：136) – A R R G R K A S G S F Y Y Y Y G M D V	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESS QSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKP LIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFT LTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTF GQGTKLEIK (配列番号：60) CDR1 (配列番号：137) – E S S Q S L L N S G N Q K N Y L T CDR2 (配列番号：138) – W A S T R E S CDR3 (配列番号：139) – Q N D Y S Y P Y T
ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SYMHVVRQAPGGGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGAPNYGDTTHDYYYMDVWGKT TVTVSS (配列番号：61) CDR1 (配列番号：63) – Y T F T S Y Y M H CDR2 (配列番号：64) – I I N P S G G S T S Y A Q K F Q G CDR3 (配列番号：65) – A R G A P N Y G D T T H D Y Y Y M D	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYCQYDDWPFTFGGGTKV EIK (配列番号：62) CDR1 (配列番号：66) – R A S Q S V S S N L A CDR2 (配列番号：67) – G A S T R A T CDR3 (配列番号：68) – Q Q Y D D W P F T

10

20

30

40

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
	V	
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYMHWRQAPGGGLEWMGWINPNSGGTNY AQKFQGRVTMRDTSISTAYMELSRLRSD TAVYYCARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGT TVSS (配列番号：69) CDR1 (配列番号：71) - Y T F T G Y Y M H CDR2 (配列番号：72) - W I N P N S G G T N Y A Q K F Q G CDR3 (配列番号：73) - A R D T G E Y Y D T D D H G M D V	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYCQQDDYWPPTFGGGTKV EIK (配列番号：70) CDR1 (配列番号：74) - R A S Q S V S S N L A CDR2 (配列番号：75) - G A S T R A T CDR3 (配列番号：76) - Q Q D D Y W P P T
ADI- 27744 (A44)	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDGGYYDSGAGDYWGQGT LVTS (配列番号：77) CDR1 (配列番号：79) - F T F S S Y A M S CDR2 (配列番号：80) - A I S G S G G S T Y Y A D S V K G CDR3 (配列番号：81) - A K D G G Y Y D S G A G D Y	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQGVSYPRFTFGGGTKV EIK (配列番号：78) CDR1 (配列番号：82) - R A S Q G I D S W L A CDR2 (配列番号：83) - A A S S L Q S CDR3 (配列番号：84) - Q Q G V S Y P R T
ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGAPMGAAGWFDPWGQGT LVTVSS (配列番号：85) CDR1 (配列番号：87) - F T F S S Y S M N CDR2 (配列番号：88) - S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G CDR3 (配列番号：89) - A R G A P M G A A A G W F D P	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQGVSFPRFTFGGGTKV EIK (配列番号：86) CDR1 (配列番号：90) - R A S Q G I S S W L A CDR2 (配列番号：91) - A A S S L Q S CDR3 (配列番号：92) - Q Q G V S F P R T
ADI- 29378	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYMHWRQAPGGGLEWMGIINPNSGGSTSY	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS

10

20

30

40

表 1		
クロー ン	重鎖可変領域アミノ酸配	軽鎖可変領域アミノ酸配列
(E78)	AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT VTVSS (配列番号：93) CDR1 (配列番号：95) - Y T F T S Y Y M H CDR2 (配列番号：96) - I I N P S G G S T S Y A Q K F Q G CDR3 (配列番号：97) - A R E G A G F A Y G M D Y Y Y M D V	NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQSDNWPFTFGGGTKV EIK (配列番号：94) CDR1 (配列番号：98) - R A S Q S V S S Y L A CDR2 (配列番号：99) - D A S N R A T CDR3 (配列番号：100) - Q Q S D N W P F T

10

【0105】

あるいは、配列番号：101で表される重鎖可変ドメインは、配列番号：102で表される軽鎖可変ドメインと対合し、US9, 273, 136で例証されるように、NKGDに結合し得る抗原結合部位を形成し得る。

20

【化1】

配列番号：101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGTITVTVSS

配列番号：102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPKGAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSKSGTSAF
LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

【0106】

あるいは、配列番号：103で表される重鎖可変ドメインは、配列番号：104で表される軽鎖可変ドメインと対合し、US7, 879, 985で例証されるように、NKGDに結合し得る抗原結合部位を形成し得る。

30

【化2】

配列番号：103

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPSLKSRTISVDT
SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTVSS

配列番号：104

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

40

【0107】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のNKGD受容体及びCD16受容体、ならびに抗原FLT3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、組み合わせるとFLT3に結合し得る重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのいくつかの例示的な配列を一覧にしている。

【表 2】

表 2		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
抗 F L T 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASI

表 2		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
(IMCEB10) (米国特許 第 8 , 0 7 1 , 0 9 9 号明細書)	SYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGTTTVTVSSA (配列番号 : 1 0 9) C D R 1 (配列番号 : 1 1 0) - G Y T F T S Y C D R 2 (配列番号 : 1 1 1) - N P S G G S C D R 3 (配列番号 : 1 1 2) - G V G A H D A F D I	SCRSSQSLLHSNGNNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGV PDRFSGSGSDTDFTLQISRVE AEDVGVYYCMQGTHPAISFGQ GTRLEIKR (配列番号 : 1 1 3) C D R 1 (配列番号 : 1 1 4) - Q S L L H S N G N N Y L D C D R 2 (配列番号 : 1 1 5) - L G S N R A S C D R 3 (配列番号 : 1 1 6) - M Q G T H P A I S
抗 F L T 3 (4G8) (米国特許 第 9 , 0 2 3 , 9 9 6 号明細書)	QVQLQQPGAELVKPGASLKLCKSSGYTFT SYWMHVVRQRPBGHLEWIGEIDPSDSYKDY NQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDD SAVYYCARAITTPFDWFGQTTLTVSS (配列番号 : 1 1 7) C D R 1 (配列番号 : 1 1 8) - S Y W M H C D R 2 (配列番号 : 1 1 9) - E I D P S D S Y K D Y N Q K F K D C D R 3 (配列番号 : 1 2 0) - A I T T T P F D F	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSL SCRASQSSISNNLHWYQQKSHE SPRLLIKYSQSSISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVETEDFG VYFCQQSNTWPYTFGGGTKLE IKR (配列番号 : 1 2 1) C D R 1 (配列番号 : 1 2 2) - R A S Q S I S N N L H C D R 2 (配列番号 : 1 2 3) - Y A S Q S I S C D R 3 (配列番号 : 1 2 4) - Q Q S N T W P Y T
抗 F L T 3 (BV10) (米国特許 第 9 , 0 2 3 , 9 9 6 号明細書)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYN AAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADD AIYYCARKGGIYYANHYAMDYWGQGSVT VSS (配列番号 : 1 2 5) C D R 1 (配列番号 : 1 2 6) - N Y G L H C D R 2 (配列番号 : 1 2 7) - V I W S G G S T D Y N A A F I S	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTM SCKSSQSLLNSGNQKNYMA QKPGQPPKLLIYGASTRESGV PDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCQNDHSYPLTFGA GTKLELKR (配列番号 : 1 2 9) C D R 1 (配列番号 : 1 3 0) - K S S Q S L L N S G N Q K N Y M A

10

20

30

40

表 2		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
	C D R 3 (配列番号: 1 2 8) - K G G I Y Y A N H Y Y A M D Y	C D R 2 (配列番号: 1 3 1) - G A S T R E S C D R 3 (配列番号: 1 3 2) - Q N D H S Y P L T

10

【 0 1 0 8 】

あるいは、F L T 3 に結合し得る新規の抗原結合部位は、配列番号: 1 3 3 で定義されるアミノ酸配列への結合についてのスクリーニングによって同定され得る。

【 化 3 】

配列番号: 1 3 3

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSVVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRPQSSG
TVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQ
SEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEK
VLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKAL
EEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYITCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSDYEDQYE
EFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRK
PQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKFVGGQWSSSTLNMSEAIKGF
VKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGS
SDNEYFYVDFREYEDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIVAVKMLKEKADSSEREA
LMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFFEYCCYGDLLNYLRSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQ
SHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFFEDLLCFAYQVAKGMEFLE
FKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPELSLFEGIYTIKSDVWSYGI
LLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLAD
AEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRPFPSREMDLGLLSPQAQVEDS

20

30

【 0 1 0 9 】

F c ドメイン内では、C D 1 6 結合は、ヒンジ領域及びC H 2 ドメインによって媒介される。例えば、ヒト I g G 1 内では、C D 1 6 との相互作用は、C H 2 ドメインにおけるアミノ酸残基 A s p 2 6 5 - G l u 2 6 9、A s n 2 9 7 - T h r 2 9 9、A l a 3 2 7 - I l e 3 3 2、L e u 2 3 4 - S e r 2 3 9、及び炭水化物残基 N - アセチル - D - グルコサミンに主に集中している (S o n d e r m a n n e t a l., Nature, 406 (6793): 267 - 273 を参照のこと)。既知のドメインに基づいて、変異は、ファージディスプレイライブラリーもしくは酵母表面ディスプレイ c D N A ライブラリーなどを使用することによって、C D 1 6 に対する結合親和性を増強もしくは減少させるために選択され得るか、または相互作用の既知の三次元構造に基づいて設計され得る。

40

【 0 1 1 0 】

ヘテロ二量体抗体重鎖の集合は、同じ細胞中で 2 つの異なる抗体重鎖配列を発現することによって達成され得、これにより各抗体重鎖のホモ二量体の集合に加えて、ヘテロ二量体の集合がもたらされる可能性がある。ヘテロ二量体の優先的集合を促進することは、U S 1 3 / 4 9 4 8 7 0、U S 1 6 / 0 2 8 8 5 0、U S 1 1 / 5 3 3 7 0 9、U S 1 2 / 8 7 5 0 1 5、U S 1 3 / 2 8 9 9 3 4、U S 1 4 / 7 7 3 4 1 8、U S 1 2 / 8 1 1 2 0 7、U S 1 3 / 8 6 6 7 5 6、U S 1 4 / 6 4 7 4 8 0、及び U S 1 4 / 8 3 0 3 3 6 に示されるように、各抗体重鎖定常領域の C H 3 ドメインに異なる変異を組み込むことによって達成され得る。例えば、変異は、ヒト I g G 1 に基づき、第 1 ポリペプチド及び第

50

2 ポリペプチドが互いに選択的にヘテロ二量体化するのを可能にする、これら2本の鎖内におけるアミノ酸置換の異なる対を組み込むことでCH3ドメイン中に作製され得る。以下に例証されるアミノ酸置換の位置は全て、K a b a tにおけるようなE Uインデックスに従って番号付けされる。

【0111】

1つの設定では、第1ポリペプチドのアミノ酸置換は、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と置き換え、第2ポリペプチドの少なくとも1つのアミノ酸置換は、元のアミノ酸(複数可)を、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(複数可)と置き換えて、その結果、より大きなアミノ酸置換(突起)がより小さなアミノ酸置換(空洞)の表面に収まる。例えば、一方のポリペプチドがT366W置換を組み込み得、他方がT366S、L368A、及びY407Vを含む3つの置換を組み込み得る。

10

【0112】

本発明の抗体重鎖可変ドメインは、抗体定常領域、例えば、ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含み、CH1ドメインを含む、または含まないIgG定常領域などと少なくとも90%同一のアミノ酸配列に場合により結合され得る。いくつかの実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ヒト抗体定常領域、例えば、ヒトIgG1定常領域、IgG2定常領域、IgG3定常領域、またはIgG4定常領域などと少なくとも90%同一である。いくつかの他の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、別の哺乳動物、例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、またはウマなどの抗体定常領域と少なくとも90%同一である。1つ以上の変異が、ヒトIgG1定常領域と比較した場合、定常領域中に、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及び/またはK439に組み込まれ得る。例示的な置換としては、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、及びK439Eが挙げられる。

20

30

【0113】

ある特定の実施形態では、ヒトIgG1定常領域のCH1中に組み込まれ得る変異は、アミノ酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171、及び/またはV173における場合がある。ある特定の実施形態では、ヒトIgG1定常領域のCk中に組み込まれ得る変異は、アミノ酸E123、F116、S176、V163、S174、及び/またはT164における場合がある。

40

【0114】

あるいは、アミノ酸置換は、表3に示される置換の以下のセットから選択され得る。

【表 3】

表 3		
	第 1 ポリペプチド	第 2 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

【0115】

あるいは、アミノ酸置換は、表 4 に示される置換の以下のセットから選択され得る。

【表 4】

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

30

【0116】

あるいは、アミノ酸置換は、表 5 に示される置換の以下のセットから選択され得る。

【表 5】

表 5		
	第 1 ポリペプチド	第 2 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

10

【 0 1 1 7 】

あるいは、各ポリペプチド鎖の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、表 6 から選択され得る。

【表 6】

表 6	
第 1 ポリペプチド	第 2 ポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T 3 6 6 V、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、N 3 9 0 D、N 3 9 0 E、K 3 9 2 L、K 3 9 2 M、K 3 9 2 V、K 3 9 2 F、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、K 4 0 9 F、K 4 0 9 W、T 4 1 1 D 及び T 4 1 1 E

20

【 0 1 1 8 】

あるいは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、表 7 における置換の以下のセットから選択され得て、第 1 ポリペプチド列に示される位置（複数可）は、任意の既知の負荷電アミノ酸によって置き換えられ、第 2 ポリペプチド列に示される位置（複数可）は、任意の既知の正荷電アミノ酸によって置き換えられる。

30

【表 7】

表 7	
第 1 ポリペプチド	第 2 ポリペプチド
K 3 9 2、K 3 7 0、K 4 0 9、または K 4 3 9	D 3 9 9、E 3 5 6、または E 3 5 7

40

【 0 1 1 9 】

あるいは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、表 8 の以下のセットから選択され得て、第 1 ポリペプチド列に示される位置（複数可）は、任意の既知の正荷電アミノ酸によって置き換えられ、第 2 ポリペプチド列に示される位置（複数可）は、任意の既知の負荷電アミノ酸によって置き換えられる。

【表 8】

表 8	
第 1 ポリペプチド	第 2 ポリペプチド
D 3 9 9、E 3 5 6、または E 3 5 7	K 4 0 9、K 4 3 9、K 3 7 0、 または K 3 9 2

【 0 1 2 0 】

あるいは、アミノ酸置換は、表 9 の以下のセットから選択され得る。

【表 9】

表 9	
第 1 ポリペプチド	第 2 ポリペプチド
T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0	T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9
5 A、及び Y 4 0 7 V	2 L、及び T 3 9 4 W

【 0 1 2 1 】

あるいは、またはさらに、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 ポリペプチド鎖のいずれか上の S 3 5 4 C、及び相対するポリペプチド鎖上の Y 3 4 9 C を導入することによって増加する場合があり、これは 2 つのポリペプチドの界面内で人工ジスルフィド架橋を形成する。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T 3 6 6 位で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6、L 3 6 8 及び Y 4 0 7 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T 3 6 6、L 3 6 8 及び Y 4 0 7 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 位で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5、及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、E 3 5 7、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5 及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、Y 3 4 9、E 3 5 7、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5 及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5、及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

が、L 3 5 1、D 3 9 9、S 4 0 0 及び Y 4 0 7 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T 3 6 6、N 3 9 0、K 3 9 2、K 4 0 9 及び T 4 1 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び Y 4 0 7 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

10

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、Q 3 4 7、Y 3 4 9、K 3 6 0、及び K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び F 4 0 5 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9 及び F 4 0 5 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

20

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9 及び K 4 3 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、D 3 5 6、E 3 5 7 及び D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び K 4 3 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

30

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 及び D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

40

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 及び K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における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 及び D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、S 3 5 4 C 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9 C 置換によって I g G 1 定常

50

領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0135】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、Y349C置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、S354C置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0136】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、K360E及びK409W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、O347R、D399V及びF405T置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、O347R、D399V及びF405T置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K360E及びK409W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0138】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T366W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366S、T368A、及びY407V置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T366S、T368A、及びY407V置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0140】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T350V、L351Y、F405A、及びY407V置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T350V、T366L、K392L、及びT394W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

30

【0141】

いくつかの実施形態では、抗体定常領域における一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、T350V、T366L、K392L、及びT394W置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なり、抗体定常領域における他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T350V、L351Y、F405A、及びY407V置換によってIgG1定常領域のアミノ酸配列とは異なる。

【0142】

上に記載される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得る。例えば、第1免疫グロブリン重鎖をコードする第1核酸配列は、第1発現ベクターにクローニングされ得、第2免疫グロブリン重鎖をコードする第2核酸配列は、第2発現ベクターにクローニングされ得、免疫グロブリン軽鎖をコードする第3核酸配列は、第3発現ベクターにクローニングされ得、第1、第2、及び第3発現ベクターは一緒に宿主細胞へと安定にトランスフェクトされ、多量体タンパク質を産生し得る。

40

【0143】

多重特異性タンパク質の最高収量を達成するために、異なる比の第1、第2、及び第3発現ベクターが、宿主細胞へのトランスフェクションについて最適な比を決定するために調査され得る。トランスフェクション後、単一クローンは、当該技術分野において既知の方法、例えば、限界希釈法、ELISA、FACS、顕微鏡法、またはClonepix

50

などを使用して、細胞バンク生成のために単離され得る。

【0144】

クローンは、バイオリアクターのスケールアップに好適な条件下で培養され、多重特異性タンパク質の発現を維持し得る。多重特異性タンパク質は、当該技術分野において既知の方法、例えば、遠心分離、深層濾過、細胞溶解、均質化、凍結融解、アフィニティー精製、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、及びミックスモードクロマトグラフィーを含む方法を使用して、単離かつ精製され得る。

【0145】

II. 多重特異性タンパク質の特性

本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、NK G2 D 結合部位、CD 16 結合部位、及びFLT 3 結合部位を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、NK細胞などの、NK G2 D 及び/またはCD 16 を発現する細胞、ならびにFLT 3 を発現する腫瘍細胞に同時に結合する。多重特異性結合タンパク質とNK細胞との結合は、腫瘍細胞の破壊に対するNK細胞の活性を増強し得る。

10

【0146】

いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するFLT 3 モノクローナル抗体（すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれているものと同じFLT 3 結合部位を含有するモノクローナル抗体）と同様の親和性でFLT 3 に結合する。いくつかの実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するFLT 3 モノクローナル抗体よりも、FLT 3 を発現する腫瘍細胞を死滅させるのにより効果的である。

20

【0147】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、NK G2 D 結合部位及びFLT 3 に対する結合部位を含み、FLT 3 を発現する細胞と共培養する場合に初代ヒトNK細胞を活性化させる。NK細胞活性化は、CD 107 a 脱顆粒及びIFN - サイトカイン産生の増加を特徴とする。さらに、対応するFLT 3 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、FLT 3 を発現する細胞の存在下でヒトNK細胞の優れた活性化を示す場合がある。

【0148】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、NK G2 D 結合部位及びFLT 3 に対する結合部位を含み、FLT 3 を発現する細胞と共培養すると、静止及びIL - 2 活性化ヒトNK細胞の活性を増強する。

30

【0149】

ある特定の実施形態では、FLT 3 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、中レベル及び低レベルのFLT 3 を発現する腫瘍細胞を標的とすることに利点がある。

【0150】

III. 治療用途

本発明は、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質及び/または本明細書に記載される医薬組成物を使用して、がんを処置する方法を提供する。本方法は、FLT 3 を発現する様々ながんを処置するために使用されてよい。いくつかの実施形態では、がんは白血病、例えば、急性骨髄性白血病、T細胞白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、または有毛細胞白血病である。

40

【0151】

いくつかの他の実施形態では、がんは、乳癌、卵巣癌、食道癌、膀胱癌もしくは胃癌、唾液腺導管癌、唾液腺導管癌（複数可）、肺の腺癌または子宮漿液性子宮内膜癌などの子宮癌の侵攻型である。いくつかの他の実施形態では、がんは、脳癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝臓癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、直腸癌、腎臓癌、胃癌、精巣癌、または子宮癌である。さらに他の実施形態では、がんは、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、黒色腫、神経芽細胞腫、肉腫（例えば、血管肉腫も

50

しくは軟骨肉腫)、喉頭癌、耳下腺癌、胆道癌、甲状腺癌、末端黒子型黒色腫、日光角化症、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、肛門管癌、肛門癌、肛門直腸癌、星状細胞腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、胆道癌、骨癌、骨髄癌、気管支癌、気管支腺癌、カルチノイド、胆管癌、軟骨肉腫、脈絡叢乳頭腫/癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、明細胞癌、結合組織癌、嚢胞腺腫、消化器系癌、十二指腸癌、内分泌系癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、内皮細胞癌、上衣癌、上皮細胞癌、ユーイング肉腫、眼及び眼窩の癌、女性生殖器癌、限局性結節性過形成、胆嚢癌、胃洞癌、胃底部癌、ガストリノーマ、膠芽腫、グルカゴノーマ、心臓癌、血管芽細胞腫、血管内皮腫、血管腫、肝細胞腺腫、肝細胞腺腫症、肝胆道癌、肝細胞癌、ホジキン病、回腸癌、インスリノーマ、上皮内腫瘍、上皮内扁平上皮腫瘍、肝内胆管癌、浸潤性扁平上皮癌、空腸癌、関節癌、カボジ肉腫、骨盤癌、大細胞癌、大腸癌、平滑筋肉腫、悪性黒子型黒色腫、リンパ腫、男性生殖器癌、悪性黒色腫、悪性中皮腫瘍、髓芽腫、髓様上皮腫、髓膜癌、中皮癌、転移性癌、口腔癌、粘表皮癌、多発性骨髄腫、筋肉癌、鼻道癌、神経系癌、神経上皮腺癌、結節性黒色腫、非上皮性皮膚癌、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起膠細胞癌、口腔癌、骨肉腫、乳頭状漿液性腺癌、陰茎癌、咽頭癌、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、直腸癌、腎細胞癌、呼吸器系癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性癌、洞癌、皮膚癌、小細胞癌、小腸癌、平滑筋癌、軟組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、脊椎癌、扁平上皮癌、横紋筋癌、中皮下癌、表在拡大黒色腫、T細胞白血病、舌癌、未分化癌、尿管癌、尿道癌、膀胱癌、泌尿器系癌、子宮頸癌、子宮体癌、ブドウ膜黒色腫、膣癌、疣状癌、VIPoma、外陰癌、高分化癌、またはウィルムス腫瘍である。

10

20

【0152】

いくつかの他の実施形態では、処置されるがんは、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、B細胞リンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、原発性縦隔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、脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病、または中枢神経系原発(CNS)リンパ腫などである。ある特定の他の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、T細胞リンパ腫、例えば、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、末梢性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、腸管症型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、または末梢性T細胞リンパ腫などである。

30

【0153】

IV. 併用療法

本発明の別の態様は、併用療法をもたらす。本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質は、がんを処置するために追加の治療剤と組み合わせて使用され得る。

【0154】

がんの処置において併用療法の一部として使用される場合のある例示的な治療剤としては、例えば、放射線、マイトマイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ビンクリスチン、エトポシド、クラドリビン、ミトブロニトール、メトトレキサート、ドキソルビシン、カルボコン、ペントスタチン、ニトラクリン、ジノスタチン、セトロレリクス、レトロゾール、ラルチトレキセド、ダウノルビシン、ファドロゾール、フォテムスチン、チマルファシン、ソブゾキサ、ネダブラチン、シタラビン、ピカルタミド、ピノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリブチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトレチナート、イソトレチノイン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、プトシン、カルモフル、ラゾキサ、シゾフィラン、カルボプラチン、ミトラクトール、テガフル、イホスファミド、プレドニムスチン、ピシバニール、レバミソール、テニボシド、インブロスルファン、エノシタビン、リスリド、オキシメトロン、タモキシフェン、プロゲステロン

40

50

、メピチオスタン、エピチオスタノール、フォルメスタン、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 (I F N -)、コロニー刺激因子 - 1、コロニー刺激因子 - 2、デニロイキンジフクトクス、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剤の同種受容体に対する示差的結合、及び血清半減期の増加または低減を示す可能性がある上述した剤の変化形態が挙げられる。

【 0 1 5 5 】

がんの処置において併用療法の一部として使用される場合のある追加の剤の種類は、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としては、(i) 細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (C T L A 4)、(i i) プログラム細胞死タンパク質 1 (P D 1)、(i i i) P D L 1、(i v) L A G 3、(v) B 7 - H 3、(v i) B 7 - H 4、及び(v i i) T I M 3 のうち 1 つ以上を阻害する剤が挙げられる。C T L A 4 阻害剤のイピリムマブは、黒色腫を処置するために米国食品医薬品局によって承認されている。

【 0 1 5 6 】

さらに、がんの処置において併用療法の一部として使用される場合のある他の剤は、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剤 (例えば、ハーセプチン) 及び非細胞傷害剤 (例えば、チロシンキナーゼ阻害剤) である。

【 0 1 5 7 】

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

【 0 1 5 8 】

本発明のタンパク質は、原発巣の外科的除去のために補助剤としても使用され得る。

【 0 1 5 9 】

多重特異性結合タンパク質及び追加の治療剤の量ならびに投与の相対的タイミングは、所望の組み合わせられた治療効果を達成するために選択される場合がある。例えば、併用療法を、そのような投与を必要とする患者に投与する場合、組み合わせた治療剤、または治療剤を含む医薬組成物 (複数可) は、例えば、順次、並行して、共に、同時になどの任意の順序で投与されてよい。さらに、例えば、多重特異性結合タンパク質は、追加の治療剤 (複数可) が、その予防効果もしくは治療効果を発揮しているか、または逆の場合の間中、投与されてよい。

【 0 1 6 0 】

V . 医薬組成物

本開示はまた、治療有効量の本明細書に記載される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、様々な薬物送達システムで使用するために製剤化され得る。1 つ以上の生理学的に許容される賦形剤または担体も、適切な製剤化のために組成物に含まれ得る。本開示での使用に好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見出される。薬剤送達の

方法の簡単な概説については、例えば、L a n g e r (S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 , 1 9 9 0) を参照のこと。

【 0 1 6 1 】

本開示の静脈内薬物送達製剤は、バッグ、ペン、またはシリンジ中に含有されてよい。ある特定の実施形態では、バッグは、管及び／または針を含む導管に連結されてよい。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よい。ある特定の実施形態では、製剤は、凍結して乾燥（凍結乾燥）されて、約 1 2 ～ 6 0 本のバイアル中に含有されてよい。ある特定の実施形態では、製剤は凍結乾燥されてよく、4 5 m g の凍結乾燥製剤が、1 本のバイアル中に含有されてよい。ある特定の実施形態では、約 4 0 m g ～ 約 1 0 0 m g の凍結乾燥製剤が、1 本のバイアル中に含有されてよい。ある特定の実施形態では、1 2、2 7、または 4 5 本のバイアルからの凍結乾燥製剤が、静脈内薬物製剤中に治療用量のタンパク質を得るために組み合わせられる。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であって、約 2 5 0 m g / バイアル ～ 約 1 0 0 0 m g / バイアルとして保存されてよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であって、約 6 0 0 m g / バイアルとして保存されてよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であって、約 2 5 0 m g / バイアルとして保存されてよい。

10

【 0 1 6 2 】

タンパク質は、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、液状の水溶性医薬製剤中に存在し得る。

【 0 1 6 3 】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌されてよい、または滅菌濾過されてよい。得られた水溶液は、そのまま使用するために梱包されてよい、または凍結乾燥されてよく、凍結乾燥調製物は投与前に滅菌水性担体と組み合わせられる。調製物の p H は通常、3 ～ 1 1、より好ましくは 5 ～ 9 または 6 ～ 8、最も好ましくは 7 ～ 7 . 5 などの 7 ～ 8 であることになる。固体形態の得られた組成物は、固定量の上述した剤（複数可）を各々含有する、複数の単回用量単位で梱包されてよい。固体形態の組成物はまた、変動する量のために容器中に梱包され得る。

20

【 0 1 6 4 】

ある特定の実施形態では、本開示は、本開示のタンパク質を、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 8 0、水、及び水酸化ナトリウムと組み合わせて含む、有効期限が延長された製剤を提供する。

30

【 0 1 6 5 】

ある特定の実施形態では、水性製剤は、p H 緩衝溶液中に本開示のタンパク質を含んで調製される。本発明の緩衝液は、約 4 ～ 約 8、例えば、約 4 . 5 ～ 約 6 . 0、もしくは約 4 . 8 ～ 約 5 . 5 の範囲の p H を有してよい、または約 5 . 0 ～ 約 5 . 2 の p H を有してよい。上に列挙した p H の中間の範囲も、本開示の一部であることを意図する。例えば、上限及び／または下限として上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、含まれることを意図する。この範囲内で p H を制御することになる緩衝液の例としては、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、クエン酸塩及び他の有機酸緩衝液が挙げられる。

40

【 0 1 6 6 】

ある特定の実施形態では、製剤は、約 4 ～ 約 8 の範囲で p H を維持するためにクエン酸塩及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、p H 範囲は、約 4 . 5 ～ 約 6 . 0、または約 p H 4 . 8 ～ 約 5 . 5、または約 5 . 0 ～ 約 5 . 2 の p H 範囲内であってよい。ある特定の実施形態では、緩衝系としては、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、及び／またはリン酸二水素ナトリウム二水和物が挙げられる。ある特定の実施形態では、緩衝系としては、約 1 . 3 m g / m L のクエン酸（例えば、1 . 3 0 5 m g / m L）、約 0 . 3 m g / m L のクエン酸ナトリウム（例えば、0 . 3 0 5 m g / m L）、約 1 . 5 m g / m L のリン酸二ナトリウム二水和物（例

50

例えば、 1.53 mg/mL ）、約 0.9 mg/mL のリン酸二水素ナトリウム二水和物（例えば、 0.86 ）、及び約 6.2 mg/mL の塩化ナトリウム（例えば、 6.165 mg/mL ）が挙げられる。ある特定の実施形態では、緩衝系としては、 $1 \sim 1.5 \text{ mg/mL}$ のクエン酸、 $0.25 \sim 0.5 \text{ mg/mL}$ のクエン酸ナトリウム、 $1.25 \sim 1.75 \text{ mg/mL}$ のリン酸二ナトリウム二水和物、 $0.7 \sim 1.1 \text{ mg/mL}$ のリン酸二水素ナトリウム二水和物、及び $6.0 \sim 6.4 \text{ mg/mL}$ の塩化ナトリウムが挙げられる。ある特定の実施形態では、製剤のpHは、水酸化ナトリウムで調整される。

【0167】

ポリオールは等張化剤として作用し、抗体を安定化させる場合があり、これも製剤中に含まれてよい。ポリオールは、製剤の所望の等張性に関して変動する場合がある量で製剤に添加される。ある特定の実施形態では、水性製剤は等張であってよい。添加されるポリオールの量はまた、ポリオールの分子量に対して変化する場合もある。例えば、より少量の単糖（例えば、マンニトール）が、二糖（トレハロースなど）と比較して添加されてよい。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る場合もあるポリオールは、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 $5 \sim 20 \text{ mg/mL}$ であってよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約 $7.5 \sim 15 \text{ mg/mL}$ であってよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約 $10 \sim 14 \text{ mg/mL}$ であってよい。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は、約 12 mg/mL であってよい。ある特定の実施形態では、ポリオールのソルビトールが、製剤に含まれてよい。

【0168】

洗剤または界面活性剤もまた、製剤に添加されてよい。例示的な洗剤としては、非イオン性洗剤、例えば、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、80など）またはポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）などが挙げられる。添加される洗剤の量は、それが製剤化抗体の凝集を減少させる、及び/または製剤中の微粒子の形成を最小限に抑える、及び/または吸着を減少させるような量である。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んでよい。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を含有してよい。Tween 80は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレートを記載するために使用される用語である(Fiedler, Lexikon der Hefsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996を参照のこと)。ある特定の実施形態では、製剤は、約 $0.1 \text{ mg/mL} \sim 10 \text{ mg/mL}$ のポリソルベート80、または約 $0.5 \text{ mg/mL} \sim 5 \text{ mg/mL}$ を含有してよい。ある特定の実施形態では、約0.1%のポリソルベート80が、製剤に添加されてよい。

【0169】

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 10 mg/mL 濃度で、ゴム栓で閉められ、アルミニウムクリンプシールクロージャーで密封されたUSP/Ph EurタイプI 50Rバイアルのいずれか中に提示されてよい。栓は、USP及びPh Eurに適合するエラストマーで作製されてよい。ある特定の実施形態では、バイアルは、 60 mL の抽出可能な体積を可能にするために、 61.2 mL のタンパク質産物溶液で満たされてよい。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てよい。

【0170】

ある特定の実施形態では、本開示の液体製剤は、安定したレベルの糖と組み合わせて 10 mg/mL 濃度の溶液として調製されてよい。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てよい。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、または不適当な粘度をもたらす可能性のある量以下の量で添加されてよい。ある特定の実施形態では、糖は二糖、例えば、スクロースであってよい。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、及び防腐剤のうち1つ以上を含んでよい。

【0171】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、液体製剤のpHは、薬学的に許容される酸及び/または塩基の添加によって設定されてよい。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される酸は、塩酸であってよい。ある特定の実施形態では、塩基は水酸化ナトリウムであってよい。

【0172】

凝集に加えて、脱アミドは、発酵、採取/細胞清澄化、精製、原薬/医薬品の保存中及び試料分析中に生じる可能性のあるペプチド及びタンパク質の一般的な産物バリエーションである。脱アミドは、加水分解され得るスクシンイミド中間体を形成するタンパク質からのNH₃の消失である。スクシンイミド中間体は、親ペプチドの17ダルトンの質量低減をもたらす。後続の加水分解によって、18ダルトンの質量増加がもたらされる。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下では不安定性ゆえに困難である。そのため、脱アミドは通常、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もたらす。脱アミドの割合に影響を及ぼすパラメータとしては、pH、温度、溶媒誘電率、イオン強度、一次配列、局所的なポリペプチド立体構造及び三次構造が挙げられる。ペプチド鎖中でAsnに隣接するアミノ酸残基は、脱アミドの割合に影響を及ぼす。タンパク質配列中においてAsnの後のGly及びSerは、脱アミドに対してより高い感受性をもたらす。

10

【0173】

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反応を防止するためのpH及び湿度の条件下で保存されてよい。

【0174】

本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与について安全かつ非毒性）、液体製剤の調製に有用なものである。例示的な担体としては、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンゲル液またはデキストロス溶液が挙げられる。

20

【0175】

防腐剤は、細菌作用を減少させるために、本明細書における製剤に場合により添加されてよい。防腐剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回用量）製剤の作製を容易にする場合がある。

【0176】

静脈内（IV）製剤は、特定の場合で、例えば、患者が移植後に入院してIV経路によって全ての薬物を受け入れる場合などでは、好ましい投与経路である場合がある。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で希釈される。ある特定の実施形態では、注射のために希釈した医薬品は等張であり、静脈内注入による投与に好適である。

30

【0177】

ある特定の実施形態では、塩または緩衝液成分は、10mM~200mMの量で添加されてよい。塩及び/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有する様々な既知の酸（無機及び有機）から得られる。ある特定の実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝液であってよい。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシン酸、炭酸、クエン酸緩衝液であってよく、その場合、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

【0178】

防腐剤は、細菌作用を減少させるために、本明細書における製剤に場合により添加されてよい。防腐剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回用量）製剤の作製を容易にする場合がある。

【0179】

本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与について安全かつ非毒性）、液体製剤の調製に有用なものである。例示的な担体としては、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンゲル液またはデキストロス溶液が挙げられる。

50

【0180】

本開示のタンパク質は、タンパク質及びリオプロテクタントを含む凍結乾燥製剤中に存在し得る。リオプロテクタントは糖、例えば、二糖であってよい。ある特定の実施形態では、リオプロテクタントは、スクロースまたはマルトースであってよい。凍結乾燥製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、増量剤、及び／または防腐剤のうち1つ以上を含んでよい。

【0181】

凍結乾燥医薬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ってよい。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であってよい。

10

【0182】

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及び／または塩基の添加によって設定されてよい。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される酸は、塩酸であってよい。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ってよい。

【0183】

凍結乾燥前、本開示のタンパク質を含有する溶液のpHは、6～8に調整されてよい。ある特定の実施形態では、凍結乾燥医薬品のpH範囲は、7～8であってよい。

【0184】

ある特定の実施形態では、塩または緩衝液成分は、10mM～200mMの量で添加されてよい。塩及び／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有する様々な既知の酸（無機及び有機）から得られる。ある特定の実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝液であってよい。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシン酸、炭酸、クエン酸緩衝液であってよく、その場合、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。

20

【0185】

ある特定の実施形態では、「増量剤」が添加されてよい。「増量剤」は、凍結乾燥混合物に質量を添加し、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する（例えば、開孔構造を維持する本質的に均一の凍結乾燥ケーキの作製を容易にする）化合物である。例示的な増量剤としては、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコール及びソルビトールが挙げられる。本発明の凍結乾燥製剤は、そのような増量剤を含有してよい。

30

【0186】

防腐剤は、細菌作用を減少させるために、本明細書における製剤に場合により添加されてよい。防腐剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回用量）製剤の作製を容易にする場合がある。

【0187】

ある特定の実施形態では、凍結乾燥医薬品は、水性担体で構成されてよい。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、ヒトへの投与について安全かつ非毒性）、凍結乾燥後の液体製剤の調製に有用なものである。例示的な希釈剤としては、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンゲル液またはデキストロース溶液が挙げられる。

40

【0188】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥医薬品は、注射用滅菌水、USP（SWFI）または0.9%の塩化ナトリウム注射液、USPのいずれかで再構成される。再構成中、凍結乾燥粉末が溶液中に溶解する。

【0189】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥タンパク質産物は、約4.5mLの注射用水中に構成され、0.9%の生理食塩水（塩化ナトリウム溶液）で希釈される。

【0190】

本発明の医薬組成物中における活性成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性が

50

なく、特定の患者、組成物、及び投与方法に関して所望の治療応答を達成するのに効果的な活性成分の量を得るように変化させてよい。

【0191】

特定の用量は、各患者に対して均一な用量、例えば、50～5000mgのタンパク質であり得る。あるいは、患者の用量は、患者の概算の体重または表面積に合わせることができる。適切な投与量を決定する時の他の要因としては、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、性別及び健康状態が挙げられ得る。処置に適切な投与量を決定するのに必要な計算のさらなる精度向上は、当業者によって、特に本明細書に開示される投与量情報及びアッセイに鑑みて日常的に行われる。投与量はまた、適切な用量反応データと組み合わせて使用される投与量を決定することを目的とした既知のアッセイの使用によって決定され得る。個々の患者の投与量は、疾患の進行をモニターしながら調整され得る。患者における標的化可能な構築物または複合体の血中レベルは、投与量が効果濃度に達する、またはそれを維持するために調整が必要であるかを確認するために測定され得る。ファーマコゲノミクスは、どの標的化可能な構築物及び/または複合体、ならびにその投与量が、所与の個体にとって効果的な可能性が最も高いのかを決定するために使用されてよい(Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308:43-53, 2001、Steimer et al., *Clinica Chimica Acta* 308:33-41, 2001)。

10

20

【0192】

概して、体重に基づく投与量は、約0.01μg～約100mg/kg体重、例えば、約0.01μg～約100mg/kg体重、約0.01μg～約50mg/kg体重、約0.01μg～約10mg/kg体重、約0.01μg～約1mg/kg体重、約0.01μg～約100μg/kg体重、約0.01μg～約50μg/kg体重、約0.01μg～約10μg/kg体重、約0.01μg～約1μg/kg体重、約0.01μg～約0.1μg/kg体重、約0.1μg～約100mg/kg体重、約0.1μg～約50mg/kg体重、約0.1μg～約10mg/kg体重、約0.1μg～約1mg/kg体重、約0.1μg～約100μg/kg体重、約0.1μg～約10μg/kg体重、約0.1μg～約1μg/kg体重、約1μg～約100mg/kg体重、約1μg～約50mg/kg体重、約1μg～約10mg/kg体重、約1μg～約1mg/kg体重、約1μg～約100μg/kg体重、約1μg～約50μg/kg体重、約1μg～約10μg/kg体重、約10μg～約100mg/kg体重、約10μg～約50mg/kg体重、約10μg～約10mg/kg体重、約10μg～約1mg/kg体重、約10μg～約100μg/kg体重、約10μg～約50μg/kg体重、約50μg～約100mg/kg体重、約50μg～約50mg/kg体重、約50μg～約10mg/kg体重、約50μg～約1mg/kg体重、約100μg～約100mg/kg体重、約100μg～約50mg/kg体重、約100μg～約10mg/kg体重、約100μg～約1mg/kg体重、約1mg～約100mg/kg体重、約1mg～約50mg/kg体重、約1mg～約10mg/kg体重、約10mg～約100mg/kg体重、約10mg～約50mg/kg体重、約50mg～約100mg/kg体重などである。

30

40

【0193】

用量は、毎日、毎週、毎月または毎年1回以上、あるいは2～20年ごとに1回の投与であってよい。当業者は、体液または組織中において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及び濃度に基づいて、投薬の反復率を容易に推定し得る。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、カテテルによる灌流によって、または直接の病巣内注射によって行われ得る。これは、毎日1回以上、毎週1回以上、毎月1回以上、及び毎年1回以上投与されてよい。

【0194】

上の記載は、本発明の複数の態様及び実施形態について記載している。本特許出願は、

50

態様及び実施形態の全ての組合せ及び順列を具体的に考慮する。

【実施例】

【0195】

ここに概して記載される本発明は、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ることとなり、それらは、単に本発明のある特定の態様及び実施形態の例示を目的として含まれ、本発明を限定することを意図するものではない。

【0196】

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

ヒト、マウスまたはカニクイザルNKG2Dエクトドメインの核酸配列を、ヒトIgG 1Fcドメインをコードする核酸配列と融合し、発現される哺乳動物細胞内に導入した。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。非特異的結合を防止するためにウシ血清アルブミンでウェルをブロックした後、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。一次抗体の結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化させた、Fc交差反応を回避するためにヒトカップ軽鎖を特異的に認識する二次抗体を使用して検出した。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)、すなわち、西洋ワサビペルオキシダーゼの基質をウェルに添加して結合シグナルを可視化し、その吸光度を450nmで測定して540nmで補正した。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から選択される重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む、もしくはeBioscienceで入手可能な抗マウスNKG2DクローンのMI-6及びCX-5)を各ウェルに添加した。

10

20

【0197】

アイソタイプ対照が、組換えNKG2D-Fcタンパク質に対して最小限の結合を示した一方で、陽性対照は、組換え抗原に最も強く結合した。全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、及びカニクイザル組換えNKG2D-Fcタンパク質に対して結合を実証したが、クローンごとに親和性が異なっていた。概して、各抗NKG2Dクローンは、ヒト(図3)及びカニクイザル(図4)組換えNKG2D-Fcに同様の親和性で結合したが、マウス(図5)組換えNKG2D-Fcに対する親和性は低かった。

30

【0198】

NKG2D結合ドメインは、NKG2Dを発現する細胞に結合する

EL4マウスリンパ腫細胞株を操作して、ヒトまたはマウス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させた。NKG2D結合クローン、アイソタイプ対照または陽性対照を100nMの濃度で使用して、EL4細胞上に発現した細胞外NKG2Dを染色した。抗体結合を、フルオロフォア複合化抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、バックグラウンドに対する倍率(FOB)を、親EL4細胞と比較したNKG2D発現細胞の平均蛍光強度(MFI)を使用して算出した。

40

【0199】

全てのクローンによって産生されたNKG2D結合ドメインが、ヒト及びマウス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から選択される重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む、またはeBioscienceで入手可能な抗マウスNKG2DクローンのMI-6及びCX-5)が、最も良好なFOB結合シグナルをもたらした。各クローンに対するNKG2D結合親和性は、ヒトNKG2D(図6)及びマウス(図7)NKG2Dを発現する細胞間で類似していた。

【0200】

実施例2 - NKG2D結合ドメインは、NKG2Dに結合する天然リガンドをブロックする

ULBP-6との競合

50

組換えヒトNK G 2 D - F cタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を減少させるためにウシ血清アルブミンでウェルをブロックした。飽和濃度のULBP - 6 - His - ビオチンをウェルに添加し、続いてNK G 2 D結合ドメインクローンを添加した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、NK G 2 D - F cでコーティングしたウェルに結合したままであったULBP - 6 - His - ビオチンを、西洋ワサビペルオキシダーゼと複合化したストレプトアビジン及びTMB基質によって検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NK G 2 D - F cタンパク質に対するNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を、ウェル中でNK G 2 D - F cタンパク質に対する結合からブロックされたULBP - 6 - His - ビオチンのパーセンテージから算出した。陽性対照抗体（配列番号：101～104から選択される重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む）ならびに様々なNK G 2 D結合ドメインが、NK G 2 Dに結合するULBP - 6をブロックした一方で、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）。 10

【0201】

ULBP - 6配列は、配列番号：108で表される。

【化4】

MAAAAI PALLLCLPLLLFLFLFGWSRARRDDPHSLCYDIT
VIPKFRPGPRWCAVQQGVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPL
GKKLNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPK
EPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLFDSEK
RMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWL
EDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTLLILCC
LLIILPCFILPGI（配列番号：108） 20

【0202】

MICAとの競合

組換えヒトMICA - F cタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を減少させるためにウシ血清アルブミンでウェルをブロックした。NK G 2 D - F c - ビオチンをウェルに添加し、続いてNK G 2 D結合ドメインを添加した。インキュベーション及び洗浄後、MICA - F cでコーティングしたウェルに結合したままであったNK G 2 D - F c - ビオチンを、ストレプトアビジン - HRP及びTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NK G 2 D - F cタンパク質に対するNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を、MICA - F cでコーティングしたウェルに対する結合からブロックされたNK G 2 D - F c - ビオチンのパーセンテージから算出した。陽性対照抗体（配列番号：101～104から選択される重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む）ならびに様々なNK G 2 D結合ドメインが、NK G 2 Dに結合するMICAをブロックした一方で、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）。 30

【0203】

Rae - 1デルタとの競合 40

組換えマウスRae - 1デルタ - F c（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、非特異的結合を減少させるためにウシ血清アルブミンでウェルをブロックした。マウスNK G 2 D - F c - ビオチンをウェルに添加し、続いてNK G 2 D結合ドメインを添加した。インキュベーション及び洗浄後、Rae - 1デルタ - F cでコーティングしたウェルに結合したままであったNK G 2 D - F c - ビオチンを、ストレプトアビジン - HRP及びTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NK G 2 D - F cタンパク質に対するNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を、Rae - 1デルタ - F cでコーティングしたウェルに対する結合からブロックされたNK G 2 D - F c - ビオチンのパーセンテージから算出した。陽性対照（配列番号：101～104から選択される重鎖 50

及び軽鎖可変ドメインを含む、または *e B i o s c i e n c e* で入手可能な抗マウス N K G 2 D クローンの M I - 6 及び C X - 5) ならびに様々な N K G 2 D 結合ドメインクローンが、マウス N K G 2 D に結合する R a e - 1 デルタをブロックした一方で、アイソタイプ対照抗体は、R a e - 1 デルタとの競合をほとんど示さなかった (図 1 0) 。

【 0 2 0 4 】

実施例 3 - N K G 2 D 結合ドメインクローンは、N K G 2 D を活性化させる

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

10

【 0 2 0 5 】

N K G 2 D 結合ドメインが N K G 2 D を活性化させるかを決定するために、それらをマイクロプレートのウェルに吸着させ、N K G 2 D - C A R E L 4 細胞を、抗体断片でコーティングしたウェル上で 4 時間、プレフェルジン - A 及びモネンシンの存在下において培養した。細胞内 T N F - α 産生、すなわち、N K G 2 D 活性化の指標をフローサイトメトリーによってアッセイした。T N F - α 陽性細胞のパーセンテージを、陽性対照で処理した細胞を基準として正規化した。全ての N K G 2 D 結合ドメインが、ヒト N K G 2 D (図 1 1) 及びマウス N K G 2 D (図 1 2) の両方を活性化させた。

20

【 0 2 0 6 】

実施例 4 - N K G 2 D 結合ドメインは N K 細胞を活性化させる

初代ヒト N K 細胞

末梢血単核細胞 (P B M C) を、密度勾配遠心分離法を使用して、ヒト末梢血バフィーコートから単離した。N K 細胞 (C D 3 $^{+}$ C D 5 6 $^{+}$) を、磁気ビーズを用いたネガティブセクションを使用して P B M C から単離し、単離した N K 細胞の純度は通常、> 9 5 % であった。次いで、単離した 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 時間培養してから、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、フルオロフォア複合化抗 C D 1 0 7 a 抗体、プレフェルジン - A、及びモネンシンを含有する培地中で培養した。培養後、N K 細胞を、フローサイトメトリーによって C D 3、C D 5 6 及び I F N - γ に対するフルオロフォア複合化抗体を使用してアッセイした。C D 1 0 7 a 及び I F N - γ 染色を、C D 3 $^{+}$ C D 5 6 $^{+}$ 細胞中で分析し、N K 細胞活性化を評価した。C D 1 0 7 a / I F N - γ 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結合による良好な N K 細胞活性化を示している。N K G 2 D 結合ドメインならびに陽性対照 (例えば、配列番号 : 1 0 1 または配列番号 : 1 0 3 で表される重鎖可変ドメイン、及び配列番号 : 1 0 2 または配列番号 : 1 0 4 で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、C D 1 0 7 a $^{+}$ 及び I F N - γ $^{+}$ となる N K 細胞を示した (図 1 3 及び図 1 4 は、2 つの独立した実験からのデータを表し、各々で N K 細胞調製のために異なるドナーの P B M C を使用した) 。

30

40

【 0 2 0 7 】

初代マウス N K 細胞

脾臓を C 5 7 B 1 / 6 マウスから入手し、7 0 μ m のセルストレーナーによって破碎して単一の細胞懸濁液を得た。細胞をペレットにし、A C K 溶解緩衝液 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c から購入した # A 1 0 4 9 2 0 1、1 5 5 m M の塩化アンモニウム、1 0 m M の重炭酸カリウム、0 . 0 1 m M の E D T A) 中に再懸濁して赤血球を除去した。残存する細胞を 1 0 0 n g / m L の h I L - 2 と共に 7 2 時間培養してから、採取して N K 細胞単離のために調製した。次いで、N K 細胞 (C D 3 $^{+}$ N K 1 . 1

50

⁺) を、磁気ビーズを用いたネガティブ除去技術を使用して脾臓細胞から単離し、通常は > 90 % の純度であった。精製した NK 細胞を、100 ng / mL の m I L - 15 を含有する培地中で 48 時間培養してから、それらを、NK 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、フルオロフォア複合化抗 C D 1 0 7 a 抗体、プレフェルジン - A、及びモネンシンを含有する培地中で培養した。NK G 2 D 結合ドメインでコーティングしたウェル中での培養後、NK 細胞を、フローサイトメトリーによって C D 3、NK 1 . 1 及び I F N - に対するフルオロフォア複合化抗体を使用してアッセイした。C D 1 0 7 a 及び I F N - 染色を、C D 3 - NK 1 . 1 ⁺ 細胞中で分析し、NK 細胞活性化を評価した。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結合による良好な NK 細胞活性化を示している。NK G 2 D 結合ドメインならびに陽性対照 (e B i o s c i e n c e で入手可能な抗マウス NK G 2 D クローンの M I - 6 及び 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、C D 1 0 7 a ⁺ 及び I F N - ⁺ となる NK 細胞を示した (図 1 5 及び図 1 6 は、2 つの独立した実験からのデータを表し、各々で NK 細胞調製のために異なるマウスを使用した) 。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

実施例 5 - NK G 2 D 結合ドメインは、標的腫瘍細胞の細胞傷害を可能にする

ヒト及びマウス初代 NK 細胞活性化アッセイは、NK G 2 D 結合ドメインとのインキュベーション後における、NK 細胞上での細胞傷害性マーカーの増加を実証した。このことが腫瘍細胞溶解の増加につながるかを確認するために、細胞に基づくアッセイを利用し、各 NK G 2 D 結合ドメインを単一特異性抗体とした。F c 領域を 1 つの標的化アームとして使用した一方で、F a b 領域 (NK G 2 D 結合ドメイン) は、NK 細胞を活性化させるための別の標的化アームとして機能した。T H P - 1 細胞はヒト起源であり、高レベルの F c 受容体を発現し、これらを腫瘍標的として使用して、P e r k i n E l m e r D E L F I A 細胞傷害性キットを使用した。T H P - 1 細胞を B A T D A 試薬で標識し、10⁵ / mL で培養培地中に再懸濁させた。次いで、標識した T H P - 1 細胞を NK G 2 D 抗体と組み合わせ、マウス NK 細胞をマイクロタイタープレートのウェル中において 37 で 3 時間単離した。インキュベーション後、20 µ L の培養上清を除去し、200 µ L のユウロピウム溶液と混合して 15 分間暗所で振盪しながらインキュベートした。蛍光を、時間分解蛍光モジュールを備えた P h e r a S t a r プレートリーダーによって経時的に測定し (励起 337 nm、発光 620 nm)、特異的溶解をキットの説明書に従って算出した。

【 0 2 0 9 】

NK G 2 D に対する天然リガンドである陽性対照の U L B P - 6 は、マウス NK 細胞による T H P - 1 標的細胞の特異的溶解の増加を示した。NK G 2 D 抗体はまた、T H P - 1 標的細胞の特異的溶解も増加させた一方で、アイソタイプ対照抗体は特異的溶解の減少を示した。点線は、抗体を添加しなかった場合の、マウス NK 細胞による T H P - 1 細胞の特異的溶解を示す (図 1 7) 。

【 0 2 1 0 】

実施例 6 - NK G 2 D 抗体は高い熱安定性を示す

NK G 2 D 結合ドメインの融解温度を、示差走査蛍光定量法を使用してアッセイした。外挿した見かけの融解温度は、典型的な I g G 1 抗体と比較して高い (図 1 8) 。

【 0 2 1 1 】

実施例 7 - NK G 2 D 及び C D 1 6 を架橋することによるヒト NK 細胞の相乗的活性化
初代ヒト NK 細胞活性化アッセイ

末梢血単核細胞 (P B M C) を、密度勾配遠心分離法を使用して、ヒト末梢血パフーコートから単離した。NK 細胞を、ネガティブ磁気ビーズ (S t e m C e l l # 17955) を使用して P B M C から精製した。NK 細胞は、フローサイトメトリーによって決定した場合、> 90 % の C D 3 - C D 5 6 ⁺ であった。次いで、細胞を、活性化アッセイでの使用前に 100 ng / mL の h I L - 2 (P e p r o t e c h # 200 - 02) を含有

する培地中で48時間増殖させた。抗体を96ウェル平底プレート上に、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗CD16、Biolegend #302013) 及び $5\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗NKGD2D、R&D #MAB139) の濃度で、 $100\mu\text{L}$ の滅菌PBS中において一晩4でコーティングし、続いてウェルを完全に洗浄して過剰な抗体を除去した。脱顆粒の評価のために、IL-2活性化NK細胞を 5×10^5 細胞/mLで、 $100\text{ng}/\text{mL}$ のヒトIL-2 (hIL2) 及び $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のAPC複合化抗CD107a mAb (Biolegend #328619) を補充した培養培地中に再懸濁させた。次いで、 1×10^5 細胞/ウェルを抗体でコーティングしたプレート上に添加した。タンパク質輸送阻害剤のプレフェルジンA (BFA、Biolegend #420601) 及びモネンシン (Biolegend #420701) を、それぞれ1:1000及び1:270の最終希釈で添加した。播種した細胞を、4時間37で5%CO₂ 中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 (Biolegend #300452) 及び抗CD56 mAb (Biolegend #318328) で標識し、その後、固定して透過処理し、抗IFN- γ mAb (Biolegend #506507) で標識した。生CD56⁺CD3⁻細胞上でゲーティングした後、NK細胞を、CD107a及びIFN- γ の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。

10

20

30

40

50

【0212】

受容体の組合せの相対的効力を調査するために、プレート結合刺激によるNKGD2DまたはCD16の架橋、及び両方の受容体の共架橋を実施した。図19 (図19A~19C) に示す通り、CD16及びNKGD2Dの複合刺激は、CD107a (脱顆粒) (図19A) 及び/またはIFN- γ 産生 (図19B) の大幅なレベル上昇をもたらした。点線は、各受容体の個々の刺激に関する相加効果を表す。

【0213】

IL-2活性化NK細胞のCD107aレベル及び細胞内IFN- γ 産生を、抗CD16、抗NKGD2Dまたは両方のモノクローナル抗体の組合せによるプレート結合刺激の4時間後に分析した。グラフは、平均 ($n=2$) \pm SDを示す。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及びIFN- γ のレベルを示す。図19A~19Cに示したデータは、5人の異なる健康なドナーを使用した5つの独立した実験の典型である。

【0214】

実施例8 - 細胞に発現したヒトNKGD2Dに結合するTriNKETの評価

EL4マウスリンパ腫細胞株を操作して、ヒトNKGD2Dを発現させた。多重特異性結合タンパク質、例えば、三重特異性結合タンパク質 (TriNKET) は、その各々がNKGD2D結合ドメイン、FLT3結合ドメイン、及びCD16に結合するFcドメインを含有し、EL4細胞上に発現した細胞外NKGD2Dに結合するそれらの親和性について試験した。TriNKETを $20\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、次いで段階的に希釈した。TriNKETとNKGD2Dとの結合を、フルオロフォア複合化抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出した。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、平均蛍光強度 (MFI) を、二次抗体対照を基準として正規化してバックグラウンドに対する倍率 (FOB) 値を得た。

【0215】

試験したTriNKETは、A44-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (クローンADI-27744からのNKGD2D結合ドメイン、ならびにFLT3モノクローナル抗体IMCEB10から、例えば、配列番号: 109の重鎖可変領域及び配列番号: 113の軽鎖可変領域を組み込むことによって得られるFLT3結合ドメイン)、A44-TriNKET-FLT3-4G8 (クローンADI-27744からのNKGD2D結合ドメイン、ならびにモノクローナル抗体4G8から、例えば、配列番号: 117の重鎖可変領域及び配列番号: 121の軽鎖可変領域を組み込むことによって得られるFLT3結合ドメイン)、A49-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (クローンADI-27749からのNKGD2D結合ドメインならびにFLT3モノクローナル抗体IMC

EB10から、例えば、配列番号：109の重鎖可変領域及び配列番号：113の軽鎖可変領域を組み込むことによって得られるFLT3結合ドメイン)、A49-TRINET-FLT3-4G8(クローンADI-27749からのNKG2D結合ドメインならびにモノクローナル抗体4G8から、例えば、配列番号：117の重鎖可変領域及び配列番号：121の軽鎖可変領域を組み込むことによって得られるFLT3結合ドメイン)、C26-TRINET-FLT3-4G8(クローンADI-28226からのNKG2D結合ドメイン、ならびにモノクローナル抗体4G8から、例えば、配列番号：117の重鎖可変領域及び配列番号：121の軽鎖可変領域を組み込むことによって得られるFLT3結合ドメイン)であった。FLT3モノクローナル抗体IMCEB10を対照として使用した。NKG2D結合ドメインを含有するTRINET(A44、A49、またはC26)は、細胞表面上に発現したNKG2Dに結合することを示した。同じNKG2D結合ドメインを含有するが、異なるFLT3結合ドメインを含有するTRINETは、細胞表面上のNKG2Dに対して同様の結合親和性を示した(図35)。

10

20

30

40

50

【0216】

実施例9 - がん細胞上に発現したFLT3に結合するTRINETの評価

FLT3を発現するヒトAML細胞株(Molm-13及びEOL-1)を使用して、FLT3標的化TRINETと腫瘍関連抗原との結合をアッセイした。TRINETを細胞と共にインキュベートし、結合を、フルオロフォア複合化抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、平均蛍光強度(MFI)を、二次抗体対照を基準として正規化してバックグラウンドに対する倍率(FOB)値を得た。

【0217】

IMCEB10または4G8のFLT3結合ドメインを含有するFLT3標的化TRINETは、Molm-13及びEOL-1細胞(図36A及び図36B)に対する結合が陽性を示した。IMCEB10または4G8のいずれかのFLT-3結合ドメインを含有するTRINETとヒトAML細胞株との結合は、NKG2D結合ドメインに依存しなかった。4G8のFLT3結合ドメインを含有するTRINETは、より高い最大結合及びEC₅₀値を示した。

【0218】

実施例10 - FLT3発現細胞上でのFLT3標的化TRINETの内在化

ヒトAML細胞株のMolm-13及びEOL-1を使用して、細胞表面上に発現したFLT3に結合した後のFLT3標的化TRINETの内在化を評価した。TRINETまたはモノクローナル抗体のリンズマブを20μg/mLに希釈し、これを使用して細胞を染色した。染色後、試料の3分の2を37℃で一晩置いて内在化を促進させ、試料の残り3分の1を、フルオロフォア複合化抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出し、ベースラインMFIを得た。37℃での2時間及び20時間のインキュベーション後、試料をインキュベーターから取り出し、細胞の表面上にある結合した抗体を、フルオロフォア複合化抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出し、試料MFIを得た。内在化を算出した：
%内在化 = (1 - (試料MFI / ベースラインMFI)) * 100%。

【0219】

図37A及び37Bは、それぞれEOL-1及びMolm-13細胞とのインキュベーション後におけるFLT3標的化TRINETの内在化を示した。CD33はMolm-13及びEOL-1細胞株の両方に発現されるため、抗CD33モノクローナル抗体のリンズマブを内在化の陽性対照として使用した。リンズマブは、両方の細胞株上で高レベルの内在化を示し、内在化は経時的に増加した。IMCEB10のFLT3結合ドメインを含有するTRINETは、4G8のFLT3結合ドメインを含有するTRINETと比較して、2時間のインキュベーション後により高いレベルの内在化を示した。20時間のインキュベーション後、4G8のFLT3結合ドメインを含有するTRINET及びIMCEB10のFLT3結合ドメインを含有するTRINETは、細胞上で同様のレベルの内在化を示した。

【0220】

実施例11 - *Tr i N K E T*は、がん細胞に対するヒトNK細胞の細胞傷害を増強する *F L T 3* 標的化 *Tr i N K E T* の存在下において *F L T 3* 発現がん細胞を溶解させるヒトNK細胞の能力を試験するために、末梢血単核細胞 (*P B M C*) を単離し、NK細胞単離のために調製した。*P B M C* を、密度勾配遠心分離法を使用して、ヒト末梢血バフィーコートから単離した。単離した *P B M C* を洗浄し、NK細胞単離のために調製した。NK細胞を、磁気ビーズを用いたネガティブセクション技術を使用して単離し、単離したNK細胞の純度は通常、 $> 90\%$ の *C D 3 - C D 5 6 +* であった。単離したNK細胞を、 100 ng / mL の *I L - 2* を含有する培地中で培養したか、またはサイトカインを入れずに一晩置いた。*I L - 2* 活性化または置いたNK細胞を、細胞傷害性アッセイで翌日使用した。

10

【0221】

全ての細胞傷害性アッセイを、以下の通りに調製した：*F L T 3* 陽性腫瘍細胞 *E O L - 1* を培養物から採取し、*P B S* で洗浄して、*B A T D A* 試薬 (*P e r k i n E l m e r C 1 3 6 - 1 0 0*) での標識のために、増殖培地中において $10^6 / \text{mL}$ で再懸濁させた。標的細胞の標識については、製造業者の指示に従った。標識後、細胞を *H B S* で3回洗浄し、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5 / \text{mL}$ で培養培地中において再懸濁させた。バックグラウンドウェルを調製するために、標識した細胞のアリコートを取り、細胞を培地から分離した。 $100 \mu \text{L}$ の培地を3連でウェルに慎重に添加し、細胞ペレット化の妨害を回避した。 $100 \mu \text{L}$ の *B A T D A* 標識細胞を、96ウェルプレートの各ウェルに添加した。ウェルを標的細胞からの自然放出のために保存し、ウェルを、 1% *T r i t o n - X* の添加によって標的細胞の最大溶解のために調製した。*F L T 3* モノクローナル抗体または *F L T 3* 標的化 *Tr i N K E T* を培養培地中で希釈し、 $50 \mu \text{L}$ の希釈したモノクローナル抗体または *Tr i N K E T* を各ウェルに添加した。置いた、及び/または活性化させたNK細胞を培養物から採取して洗浄し、 $10^5 \sim 2.0 \times 10^6 / \text{mL}$ で培養培地中において、所望のエフェクター細胞対標的細胞比に応じて再懸濁させた。 $50 \mu \text{L}$ のNK細胞をプレートの各ウェルに添加し、合計で $200 \mu \text{L}$ の培養体積とした。プレートを 37°C で $5\% \text{ CO}_2$ を用いて2～3時間インキュベートしてから、アッセイを進めた。

20

【0222】

2～3時間の培養後、プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を遠心分離によって 200 g で5分間ペレットにした。 $20 \mu \text{L}$ の培養上清を、製造業者から提供された清浄なマイクロプレートに移し、 $200 \mu \text{L}$ の室温ユウロピウム溶液を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、プレートシェーカー上において 250 rpm で15分間インキュベートした。プレートを、*V i c t o r 3* または *S p e c t r a M a x i 3 X* 機器のいずれかを使用して読み取った。 $\%$ 特異的溶解を、以下の通りに算出した： $\%$ 特異的溶解 = $(\text{実験的放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出}) \times 100\%$ 。

30

【0223】

F L T 3 標的化 *Tr i N K E T* は、*F L T 3* 陽性 *E O L - 1* がん細胞に対するヒトNK細胞の細胞傷害を媒介した。図38Aに示す通り、両方の *Tr i N K E T* (*A 4 9 - Tr i N K E T - I M C E B 1 0* 及び *A 4 4 - Tr i N K E T - I M C E B 1 0*) は、がん細胞に対するNK細胞の細胞傷害活性を用量反応的に増強することができた。両方の *Tr i N K E T* は、対応する *F L T 3* モノクローナル抗体 *I M C E B 1 0* よりも著しく強力であった。図38Bに示す通り、*Tr i N K E T* (*A 4 9 - Tr i N K E T - 4 G 8*、*A 4 4 - Tr i N K E T - 4 G 8*、及び *C 2 6 - Tr i N K E T - 4 G 8*) は、がん細胞に対するNK細胞の細胞傷害活性を用量反応的に増強することができた。*Tr i N K E T* は、対応する *F L T 3* モノクローナル抗体 *4 G 8* よりも著しく強力であった。さらに、*4 G 8* の *F L T 3* 結合ドメインを含有する *Tr i N K E T* は、*I M C E B 1 0* の *F L T 3* 結合ドメインを含有する *Tr i N K E T* よりも、ヒトNK細胞の細胞傷害を媒介する時により強力であった。

40

【0224】

50

参照による援用

本明細書で言及される特許文献及び科学論文の各々の開示全体は、あらゆる目的のために参照によって組み込まれる。

【 0 2 2 5 】

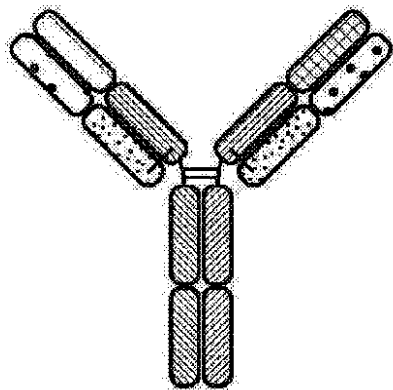
均等論

本発明は、その趣旨または本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化されてよい。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載される本発明を限定するのではなく、あらゆる点において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、特許請求の範囲と等価の意味及び範囲内に入る全ての変更が、本明細書に包含されること意図する。

10

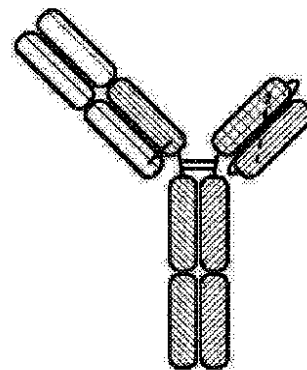
【 図 1 】

FIG. 1

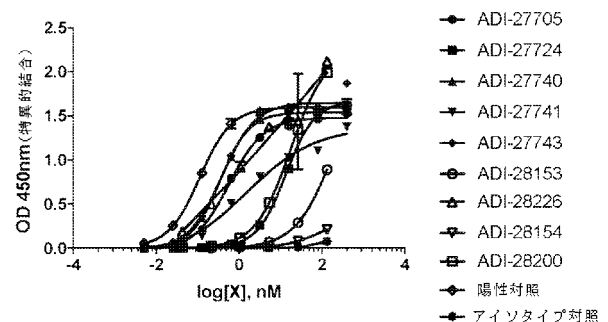


【 図 2 】

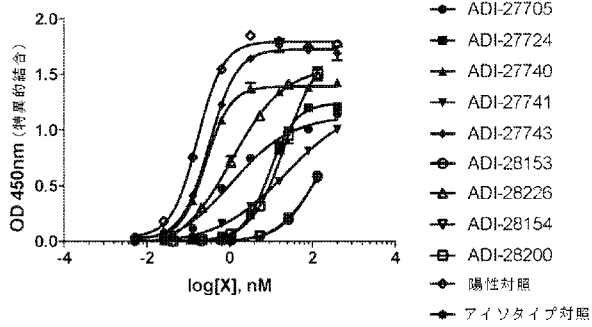
FIG. 2



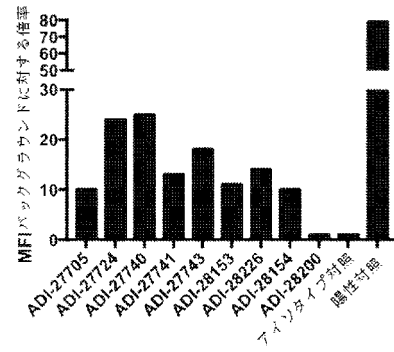
【 図 3 】



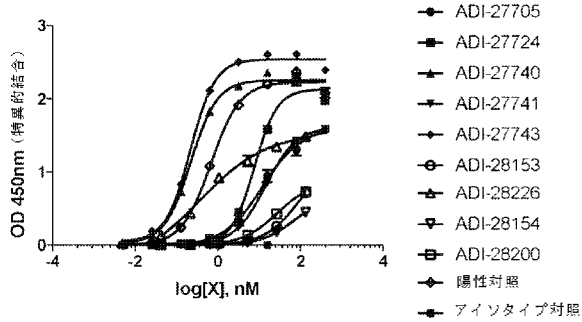
【図 4】



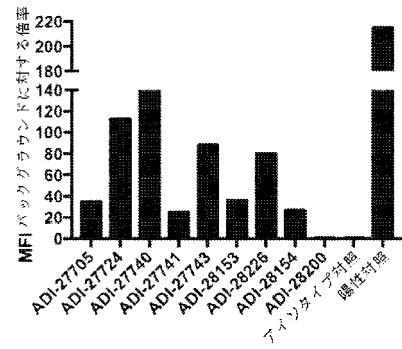
【図 6】



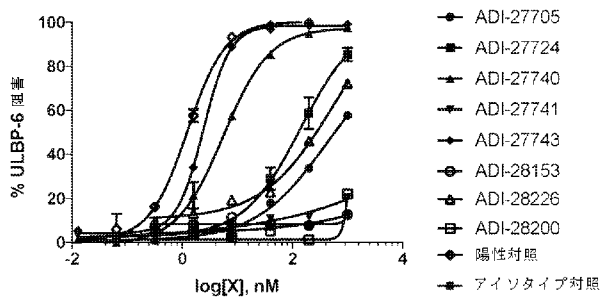
【図 5】



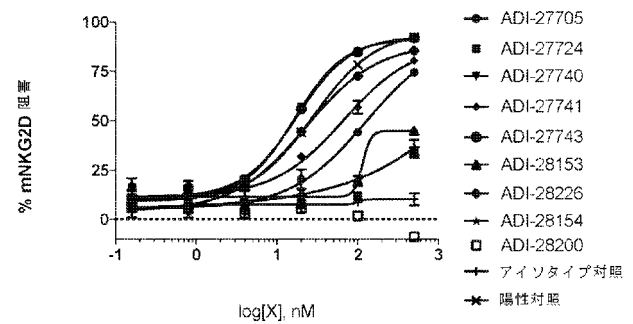
【図 7】



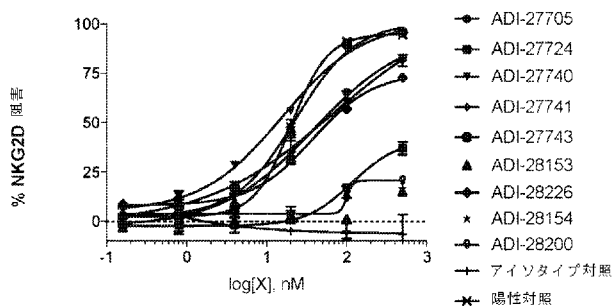
【図 8】



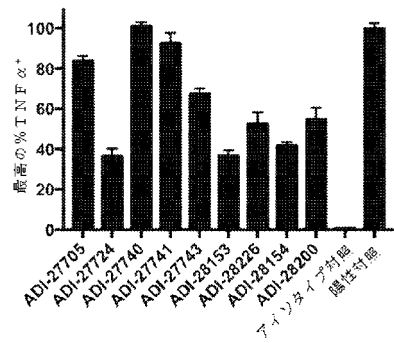
【図 10】



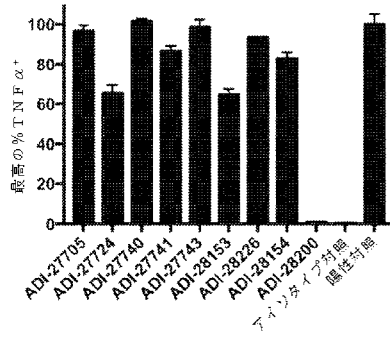
【図 9】



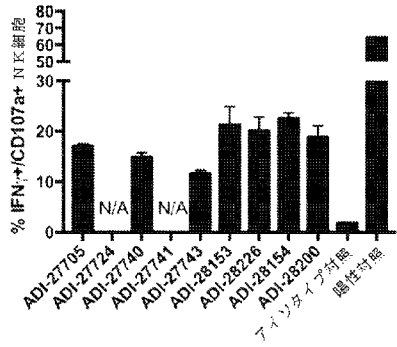
【図 11】



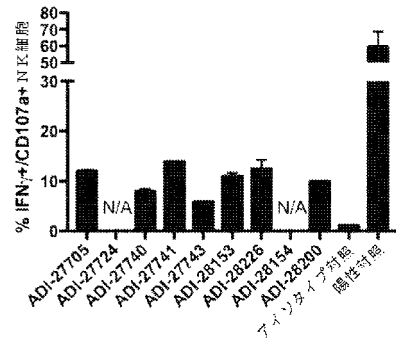
【図 12】



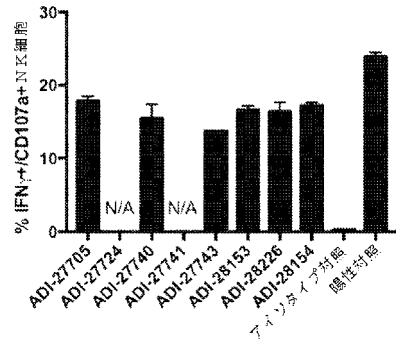
【図 13】



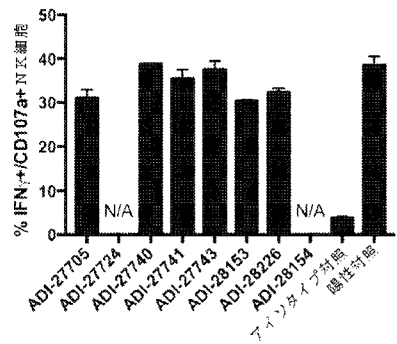
【図 14】



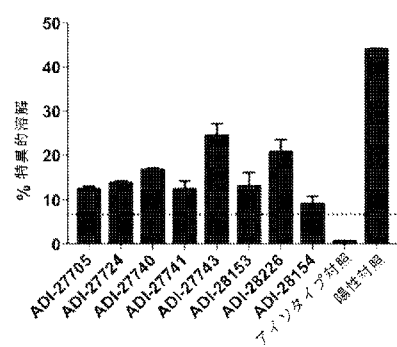
【図 15】



【図 16】

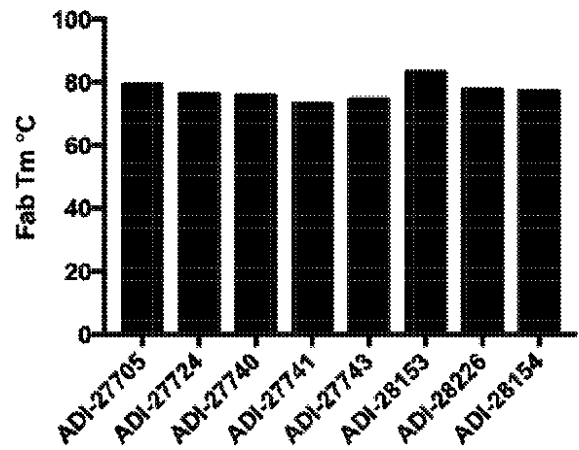


【図 17】



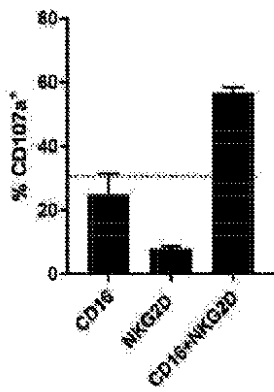
【図 18】

FIG. 18



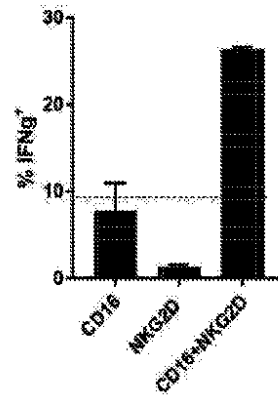
【 図 1 9 A 】

FIG. 19A



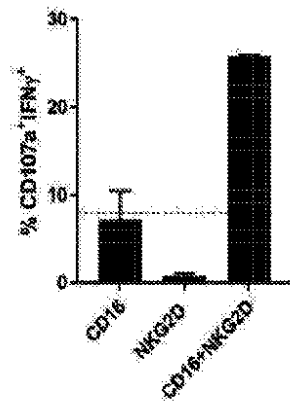
【 図 1 9 B 】

FIG. 19B



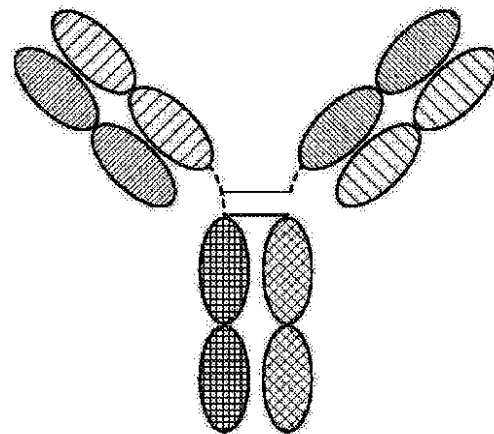
【 図 1 9 C 】

FIG. 19C



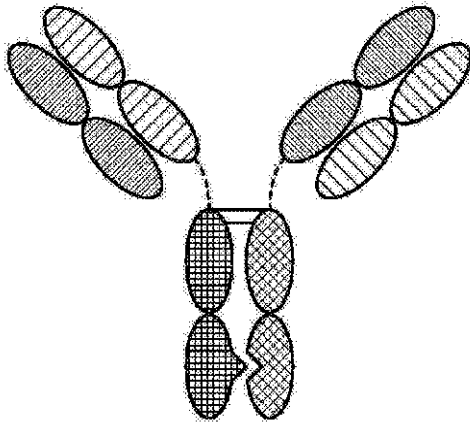
【 図 2 0 】

FIG. 20



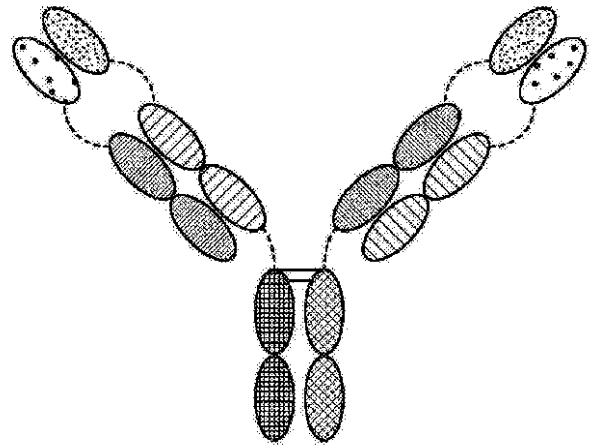
【 図 2 1 】

FIG. 21



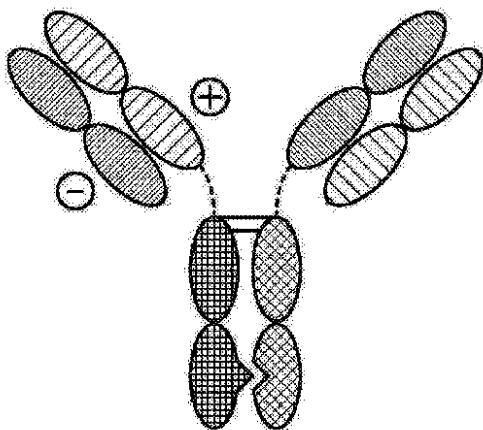
【 図 2 2 】

FIG. 22



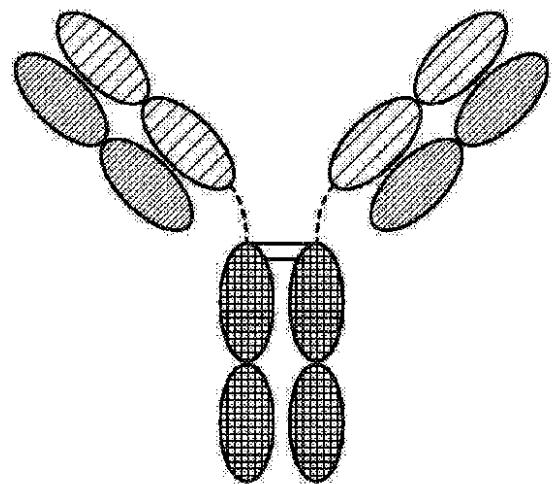
【 図 2 3 】

FIG. 23



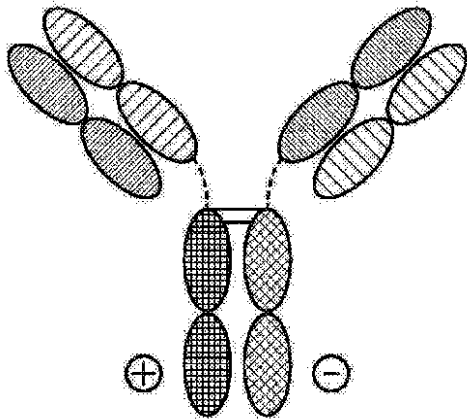
【 図 2 4 】

FIG. 24



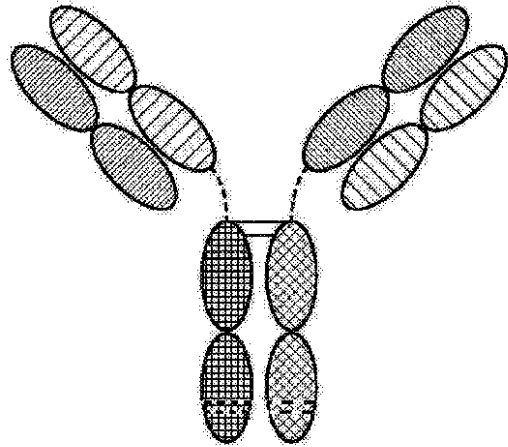
【 図 2 5 】

FIG. 25



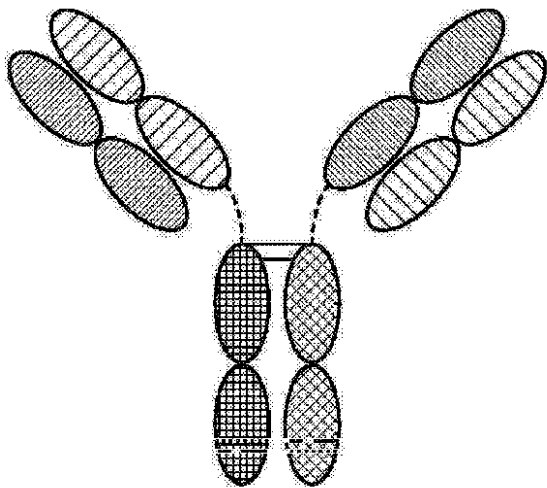
【 図 2 6 】

FIG. 26



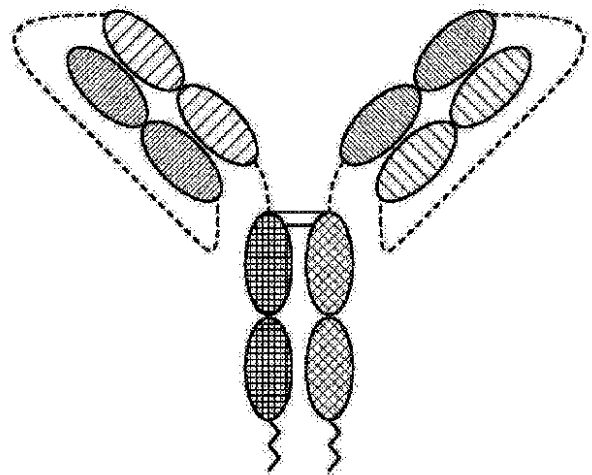
【 図 2 7 】

FIG. 27



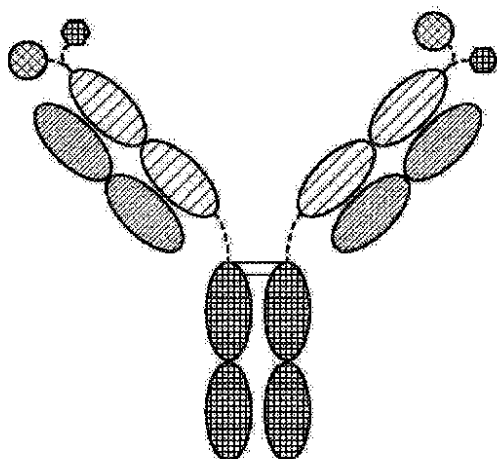
【 図 2 8 】

FIG. 28



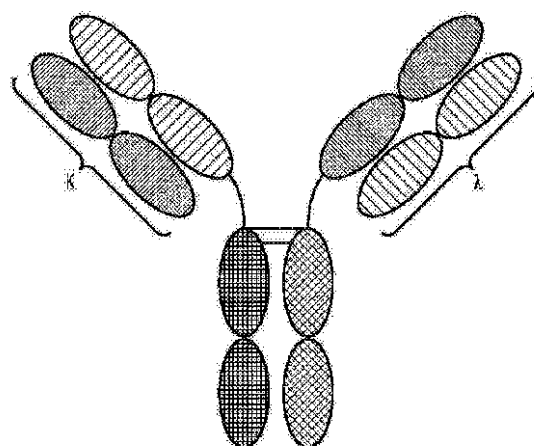
【 図 2 9 】

FIG. 29



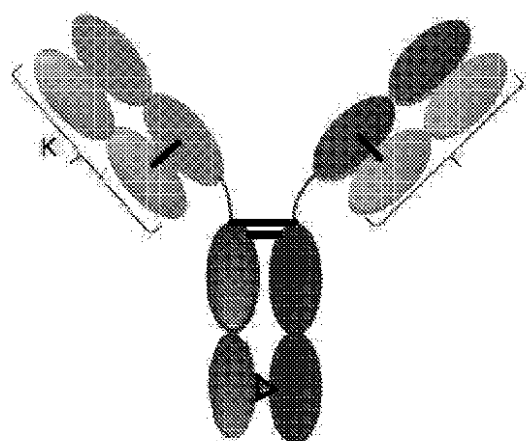
【 図 3 0 A 】

FIG. 30A



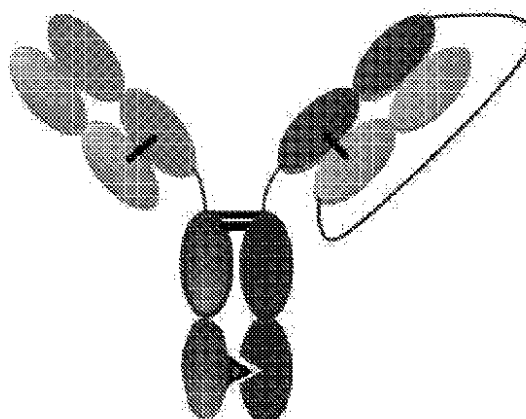
【 図 3 0 B 】

FIG. 30B



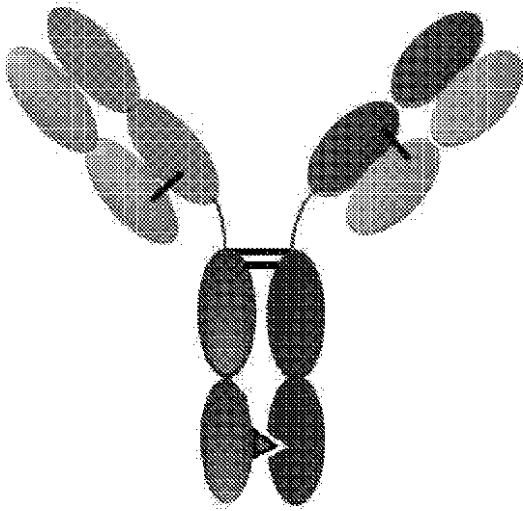
【 図 3 1 】

FIG. 31



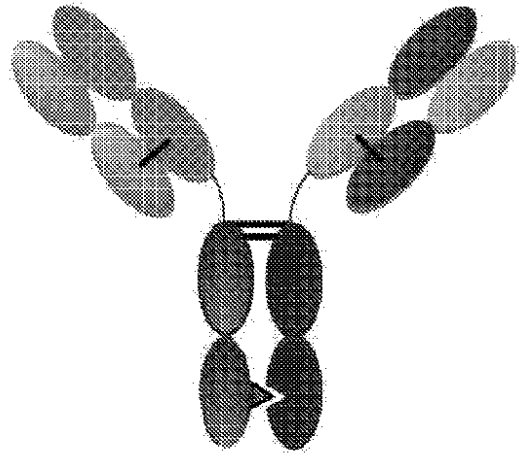
【 図 3 2 】

FIG. 32



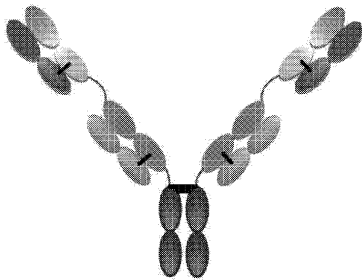
【 図 3 3 】

FIG. 33

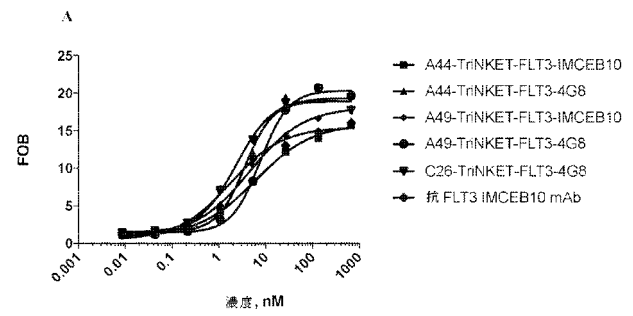


【 図 3 4 】

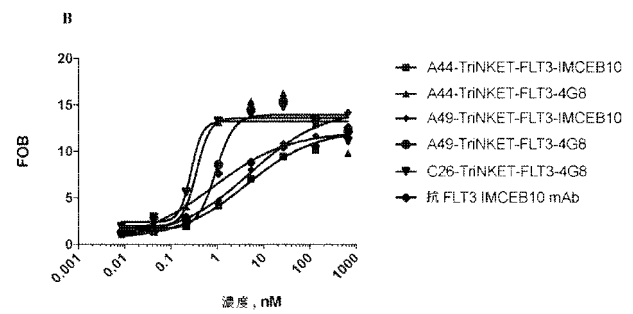
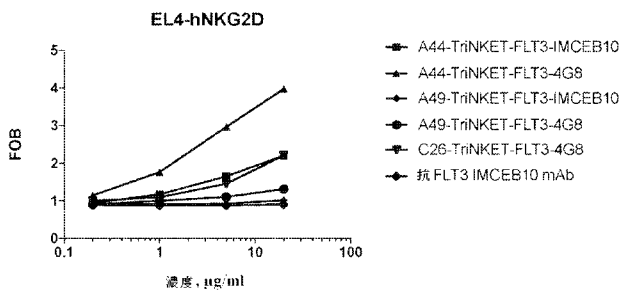
FIG. 34



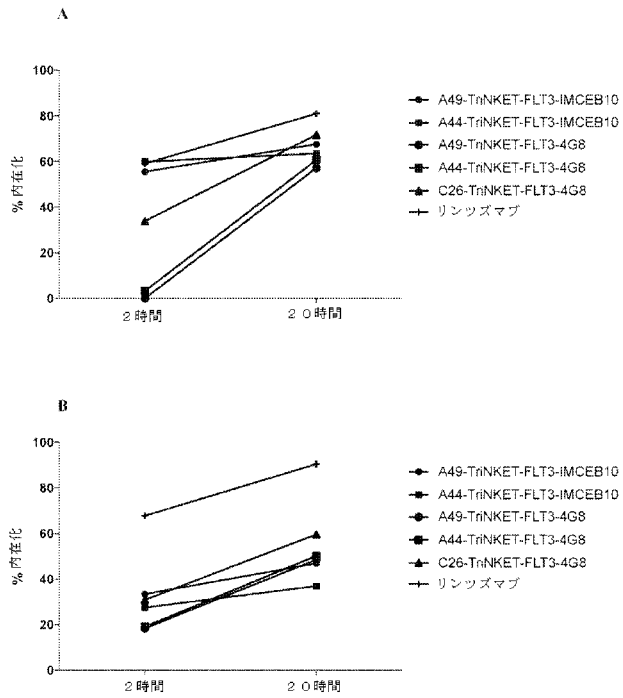
【 図 3 6 】



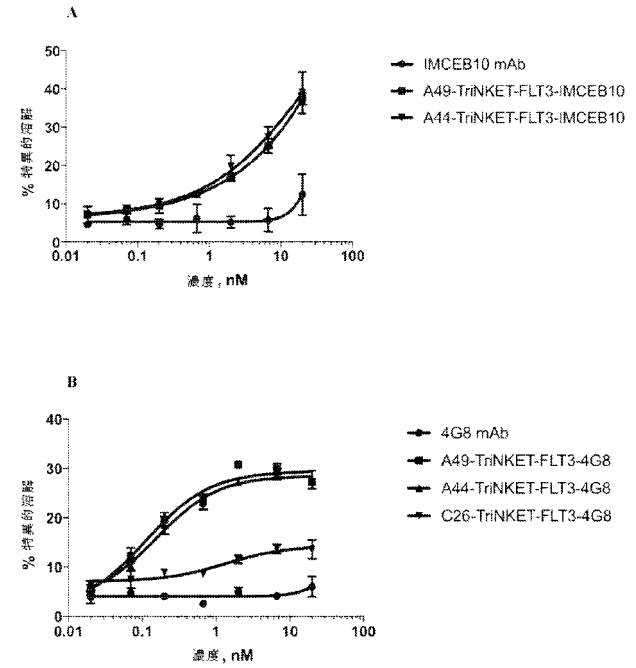
【 図 3 5 】



【図 37】



【図 38】



【手続補正書】

【提出日】令和2年7月1日(2020.7.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2020529410000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/044610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/28; C07K 16/46 (2018.01)

CPC - C07K 16/2866; C07K 16/2896; C07K 16/468; C07K 2317/31 (2018.08)

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 - 424/136.1; 424/143.1; 530/387.3 (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	US 2017/0022291 A1 (ADIMAB, LLC) 26 January 2017 (26.01.2017) entire document	1-4, 20, 21
A	US 2016/0046730 A1 (ABBVIE INC. et al) 18 February 2016 (18.02.2016) entire document	1-4, 20, 21
A	US 2011/0044980 A1 (GHAYUR et al) 24 February 2011 (24.02.2011) entire document	1-4, 20, 21
A	US 2015/0166636 A1 (IGAWA et al) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-4, 20, 21
A	US 2015/0119555 A1 (SYNIMMUNE GMBH) 30 April 2015 (30.04.2015) entire document	1-4, 20, 21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2018

Date of mailing of the international search report

15 OCT 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 Helpline: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/044610

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, 22-38
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 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 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 7	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13		

(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, RO, 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, DO, 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 . T R I T O N

(72) 発明者 アン エフ . チェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 7 3 リンカーン モーニングサイド レーン 2
5

(72) 発明者 ウィリアム ヘイニー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 7 8 ウェイランド リンカーン ロード 6 1

(72) 発明者 ブラッドリー エム . ルンデ
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 0 3 7 6 6 レバノン ルーセント ドライブ 7

(72) 発明者 ピアンカ プリンズ
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 0 3 7 6 6 レバノン ルーセント ドライブ 7

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AA90X AA90Y AB01 AC14 CA25 CA44

4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74