(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-500405
(P2024-500405A)
(43)公表日　令和6年1月9日(2024.1.9)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		４Ｂ０６４
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ	*16/46 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		４Ｃ０８５

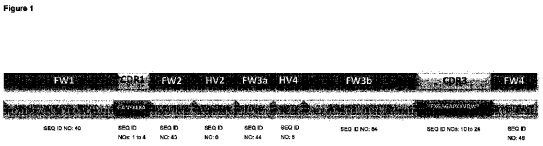
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全152頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-536830(P2023-536830)
(86)(22)出願日　令和3年12月17日(2021.12.17)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月14日(2023.8.14)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/086667
(87)国際公開番号　WO2022/129622
(87)国際公開日　令和4年6月23日(2022.6.23)
(31)優先権主張番号　2020154.7
(32)優先日　令和2年12月18日(2020.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　508362789
アルマック・ディスカバリー・リミテッド
Ａｌｍａｃ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｉｍｉｔｅｄ
英国ビーティ６３・５キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト２０番、アルマック・ハウス
(74)代理人　110000109
弁理士法人特許事務所サイクス
(72)発明者　トランパー ポール リチャード
イギリス国 クレイガボン ビーティ６３ ５キューディ シーゴー インダストリアル エステイト ２０ アルマック ハウス
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＲＯＲ１特異的バリアント抗原結合分子

(57)【要約】
本発明は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的バリアント抗原結合分子及び関連する融合タンパク質、キメラ抗原受容体、核酸配列、ベクター、宿主細胞、医薬組成物、医学的使用及びコンジュゲート並びにそれを調製及び使用する方法に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４（Ｉ）
（式中、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）、ＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹ（配列番号１１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹ（配列番号１２）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹ（配列番号１３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹ（配列番号１４）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹ（配列番号１５）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹ（配列番号１６）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹ（配列番号１７）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹ（配列番号１８）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹ（配列番号１９）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹ（配列番号２１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹ（配列番号２２）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＤＬＳＡ（配列番号２）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり、
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）及びＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）及びＮＫＧＴＭ（配列番号９）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域であり；
ＣＤＲ３がＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）である場合、ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択される）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子。
【請求項２】
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり、及び／又は
ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）及びＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列である、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項３】
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列である、請求項１又は２に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項４】
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び

ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である、請求項１～３のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項５】
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＭ（配列番号９）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である、請求項１～３のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項６】
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＭ（配列番号９）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である、請求項１～３のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項７】
式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４（Ｉ）
（式中、
ＣＤＲ１は、ＧＴＲＹＧＬＹＳ（配列番号２５）、ＧＴＲＹＧＬＹＳＳ（配列番号２６）、ＤＴＲＹＡＬＹＳ（配列番号２７）、ＤＴＲＹＡＬＹＳＳ（配列番号２８）、ＧＴＫＹＧＬＹＡ（配列番号２９）及びＧＴＫＹＧＬＹＡＳ（配列番号３０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；
ＨＶ２は、ＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳ（配列番号３１）、ＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧ（配列番号３２）、ＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧ（配列番号３３）及びＳＴＤＫＥＲＩＩＩＧ（配列番号３４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＫ（配列番号３５）、ＮＫＧＳＫ（配列番号３６）、ＮＮＧＴＫ（配列番号３７）及びＮＮＲＳＫ（配列番号３８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＣＤＲ３は、ＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹ（配列番号３９）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子。
【請求項８】
ＦＷ１は、２０～２８アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、６～１４アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ３ａは、６～１０アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ３ｂは、１７～２４アミノ酸のフレームワーク領域であり；及び／又は
ＦＷ４は、７～１４アミノ酸のフレームワーク領域である、請求項１～７のいずれか一項

に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項９】
ＦＷ１は、ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴ（配列番号４０）、ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴ（配列番号４１）及びＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴ（配列番号４２）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ２は、ＴＹＷＹＲＫＮＰＧ（配列番号４３）によるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ３ａは、ＧＲＹＶＥＳＶ（配列番号４４）及びＧＲＹＳＥＳＶ（配列番号４５）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ３ｂは、ＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡ（配列番号８４）、ＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡ（配列番号４６）及びＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴＹＹＣＫＡ（配列番号４７）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有し；及び／又は
ＦＷ４は、ＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号４８）、ＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号４９）若しくはＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号８５）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有する、請求項８に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項１０】
（化１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）；
（化２）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）；
（化３）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５２）；
（化４）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５３）；
（化５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５４）；
（化６）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５５）；
（化７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５６）；
（化８）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５７）；
（化９）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５８）；
（化１０）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５９）；
（化１１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６０）；
（化１２）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６１）；
（化１３）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６２）；
（化１４）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６３）；
（化１５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６４）；
（化１６）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６５）；
（化１７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６６）；
（化１８）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６７）；
（化１９）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６８）；
（化２０）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ

ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６９）；及び
（化２１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号７０）
からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、且つそのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１１】
（化２２）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）
によるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１２】
（化２３）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）
によるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１３】
（化２４）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）；
（化２５）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７２）；
（化２６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７３）；
（化２７）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７４）；
（化２８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７５）；及び
（化２９）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７６）
からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、且つそのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、Ｆ

ＷＦ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１４】

（化３０）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）

によるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１５】

（化３１）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７７）；

（化３２）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７８）；

（化３３）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＲＹＡＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７９）；

（化３４）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＲＹＡＬＹＳＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８０）；

（化３５）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８１）；

（化３６）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８２）；

（化３７）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＫＥＲＩＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＲＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８３）

からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、且つそのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む、請求項７に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１６】

受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体２（ＲＯＲ２）に結合しない、請求項１～１５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１７】

ヒトＲＯＲ１及びマウスＲＯＲ１（ｍＲＯＲ１）の両方に結合する、請求項１～１６のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。

【請求項１８】

脱グリコシル化ＲＯＲ１に結合する、請求項１～１７のいずれか一項に記載のＲＯＲ１

特異的抗原結合分子。
【請求項１９】
ヒト化されている、請求項１～１８のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２０】
脱免疫化されている、請求項１～１８のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２１】
検出可能な標識、色素、毒素、薬物、プロドラッグ、放射性核種又は生物学的活性分子にコンジュゲートされている、請求項１～２０のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２２】
およそ０．０１～５０ｎＭ、好ましくは０．１～３０ｎＭ、一層より好ましくは０．１～１０ｎＭの親和性定数でＲＯＲ１タンパク質と選択的に相互作用する、請求項１～２１のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２３】
ＲＯＲ１発現腫瘍細胞の殺傷を媒介し得る、請求項１～２２のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２４】
癌細胞増殖を阻害し得る、請求項１～２２のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２５】
ＲＯＲ１への結合時にエンドサイトーシスされ得る、請求項１～２２のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子。
【請求項２６】
請求項１～２５のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質。
【請求項２７】
前記特異的抗原結合分子は、１つ以上の生物学的活性タンパク質に融合されている、請求項２６に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項２８】
前記特異的抗原結合分子は、１つ以上のリンカードメインを介して１つ以上の生物学的活性タンパク質に融合されている、請求項２７に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項２９】
少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、免疫グロビン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロビンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン又は足場タンパク質である、請求項２７又は２８に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３０】
前記少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、免疫グロブリンＦｃ領域である、請求項２９に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３１】
前記少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される免疫グロブリンＦｃ領域の断片である、請求項２９に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３２】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、Ｆｃ重鎖であり、任意選択で、前記Ｆｃ重鎖は、バイオコンジュゲーションに好適な１つ以上のシステイン残基を含むように人工操作さ

れている、請求項３１に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３３】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている、請求項３１又は３２に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３４】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片と二量体化するように人工操作されている、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３５】
前記免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのヘテロ二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３６】
前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される、請求項３５に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３７】
前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される、請求項３５又は３６に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項３８】
式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４　（Ｉ）
（式中、
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ１は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり、
ＨＶ２は、超可変配列であり、
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり、
ＨＶ４は、超可変配列であり、
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ３は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列又はその機能的バリアントを含む抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質であって、前記抗原結合分子は、免疫グロブリンＦｃ領域の断片に融合されており、免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている、組換え融合タンパク質。
【請求項３９】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される、請求項３８に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項４０】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、Ｆｃ重鎖である、請求項３９に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項４１】
免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥ

ＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片と二量体化するように人工操作されている、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４２】

前記免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのノブインホール（ＫＩＨ）二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項３８～４１のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４３】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される、請求項４２に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４４】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される、請求項４２又は４３に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４５】

前記抗原結合分子は、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子である、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４６】

配列番号１４６又は配列番号１４７による配列を含む、請求項２９～４５のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４７】

配列番号１４８による配列を含む、請求項３８に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項４８】

（ａ）第１の組換え融合タンパク質であって、請求項３０～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質である第１の組換え融合タンパク質、及び

（ｂ）第２の組換え融合タンパク質であって、免疫グロブリンＦｃ領域の第１の断片と二量体化するように人工操作されている免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片に融合されている第２の抗原結合分子を含む第２の組換え融合タンパク質

を含む組換え融合タンパク質二量体。

【請求項４９】

免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される、請求項４８に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５０】

免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片は、Ｆｃ重鎖である、請求項４９に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５１】

免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片と二量体化するように人工操作されている、請求項４８～５０のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５２】

前記免疫グロブリンＦｃ領域の前記断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのノブインホール（ＫＩＨ）二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項４８～５１のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５３】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される、請求項５２に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５４】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される、請求項５２又は５３に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５５】

前記第２の抗原結合分子は、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子である、請求項４８～５４のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５６】

前記第２の特異的抗原結合分子は、免疫グロビン、免疫グロビンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はＶＨドメインである、請求項４８～５５のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５７】

（ａ）前記第１の組換え融合タンパク質は、配列番号１４６又は配列番号１４７による配列を含み、及び

（ｂ）前記第２の組換え融合タンパク質は、配列番号１４８による配列を含む、請求項４８又は５６に記載の組換え融合タンパク質二量体。

【請求項５８】

少なくとも１つの膜貫通領域及び少なくとも１つの細胞内ドメインに融合又はコンジュゲートされている、請求項１～２０のいずれか一項に記載の少なくとも１つのＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含むＲＯＲ１特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。

【請求項５９】

請求項５８に記載のキメラ抗原受容体を含む細胞であって、好ましくは人工操作Ｔ細胞である細胞。

【請求項６０】

請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸配列。

【請求項６１】

請求項６０に記載の核酸配列を含み、１つ以上の調節配列を任意選択でさらに含むベクター。

【請求項６２】

請求項６１に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項６３】

特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体を調製する方法であって、請求項６０に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、前記宿主細胞が前記結合分子を産生するような条件下で培養又は維持することを含み、前記結合分子を単離することを任意選択でさらに含む方法。

【請求項６４】

請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体を含む医薬組成物。

【請求項６５】

治療における使用のための、請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体。

【請求項６６】

癌の処置における使用のための、請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体。

【請求項６７】

前記癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である、請求項６６に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体。

【請求項６８】

前記癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される、請求項６６に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体。

【請求項６９】

疾患の処置を、それを必要とする患者において行うための医薬品の製造における、請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体の使用。

【請求項７０】

疾患の処置を、処置を必要とする患者において行う方法であって、前記患者に、治療有効投与量の、請求項１～５８のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質若しくはキメラ抗原受容体又は請求項６４に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項７１】

前記疾患は、癌である、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍からなる群から選択される、請求項７１に記載の方法。

【請求項７４】

サンプル中の標的分析物の存在をアッセイする方法であって、検出可能に標識されている、請求項１～２５のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体を前記サンプルに添加し、且つ前記標的分析物への前記分子の結合を検出することを含む方法。

【請求項７５】

対象における疾患の部位をイメージングする方法であって、検出可能に標識されている、請求項１～２５のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、又は検出可能に標識されている、請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は検出可能に標識されている、請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体を対象に投与することを含む方法。

【請求項７６】

対象における疾患又は医学的病態を診断する方法であって、請求項１～２５のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体を投与することを含む方法。

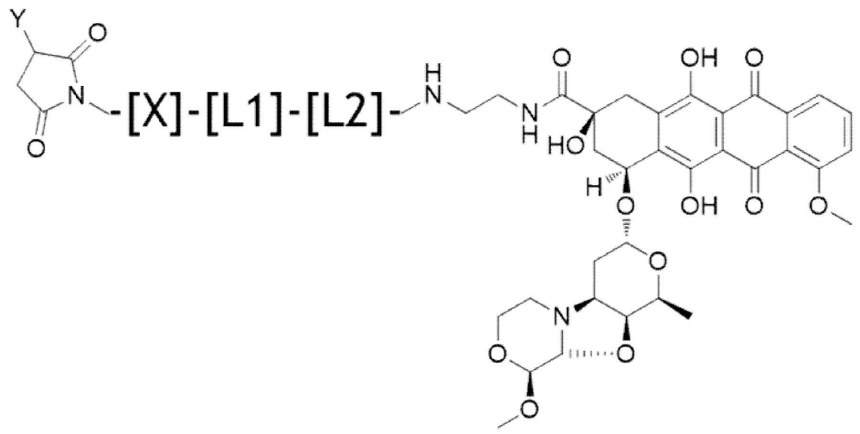
【請求項７７】

請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子とＲＯＲ１への結合について競合する抗体、抗体断片又は抗原結合分子。

【請求項７８】
癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は前記対象の病態の予後診断を提供するためのキットであって、試験対象からのサンプル中に存在する抗原の濃度を検出するための検出手段を含み、前記検出手段は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体、請求項５８に記載のＣＡＲ又は請求項６０に記載の核酸を含み、前記サンプル中の抗原の存在は、前記対象が癌に罹患していることを示唆する、キット。
【請求項７９】
前記抗原は、ＲＯＲ１タンパク質、より好ましくはその細胞外ドメインを含む、請求項７８に記載のキット。
【請求項８０】
前記サンプル中のＲＯＲ１陽性細胞の存在若しくは不存在を同定するか、又は前記サンプル中のその濃度を決定するために使用される、請求項７８に記載のキット。
【請求項８１】
前記アッセイが比較される陽性対照及び／又は陰性対照を含む、請求項７８に記載のキット。
【請求項８２】
検出され得る標識をさらに含む、請求項７８に記載のキット。
【請求項８３】
癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は前記対象の病態の予後診断を提供する方法であって、対象から得られたサンプル中に存在する抗原の濃度を検出することを含み、前記検出は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体、請求項５８に記載のＣＡＲ又は請求項６０に記載の核酸配列を使用して達成され、前記サンプル中の抗原の存在は、前記対象が癌に罹患していることを示唆する、方法。
【請求項８４】
インビトロ又は患者におけるＲＯＲ１を発現する細胞を殺傷するか又はその成長を阻害する方法であって、前記細胞に、医薬有効量又は用量の、（ｉ）請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体、請求項６０に記載の核酸又は請求項５８若しくは５９に記載のＣＡＲ若しくは細胞、或いは（ｉｉ）請求項６４に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。
【請求項８５】
ＲＯＲ１を発現する前記細胞は、癌細胞である、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
前記ＲＯＲ１は、ヒトＲＯＲ１である、請求項８４又は８５に記載の方法。
【請求項８７】
式（ＩＩ）：
Ｘ－ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４－Ｙ　（ＩＩ）
（式中、
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４は、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子であり、
Ｘ及びＹは、任意選択のアミノ酸配列である）
によって表されるアミノ酸配列を含む特異的抗原結合分子であって、第２の部分にコンジュゲートされている特異的抗原結合分子。

【請求項８８】
Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロブリン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン若しくは足場タンパク質を含む群から選択されるかのいずれかである、請求項８７に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項８９】
前記コンジュゲーションは、前記特異的抗原結合分子の前記アミノ酸配列中のシステイン残基を介したものである、請求項８７又は８８に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項９０】
前記第２の部分は、免疫グロブリン若しくは抗体、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン又は足場タンパク質を含む群から選択される、請求項８７～８９のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項９１】
前記第２の部分は、検出可能な標識、色素、毒素、薬物、プロドラッグ、放射性核種又は生物学的活性分子を含む群から選択される、請求項８７～８９のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項９２】
前記第２の部分は、
・メイタンシノイド、
・アウリスタチン、
・アントラサイクリン、好ましくはＰＮＵ由来アントラサイクリン
・アマニチン誘導体、好ましくはα－アマニチン誘導体、
・カリケアマイシン、
・ツブリシン、
・デュオカルマイシン、
・放射性同位体、例えばアルファ線放出放射性核種、例えば２２７Ｔｈ若しくは２２５Ａｃ標識、
・毒性ペイロードを含むリポソーム、
・タンパク質毒素、
・タキサン、
・ピロールベンゾジアゼピン、及び／又は
・インドリノベンゾジアゼピン疑似二量体、及び／又は
・スプライソソーム阻害剤、
・ＣＤＫ１１阻害剤、
・ピリジノベンゾジアゼピン、
・イリノテカン及びその誘導体
を含む群から選択される少なくとも１つの毒素である、請求項８７～８９又は９１のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項９３】
（ａ）請求項１～２５若しくは８７～９０のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体、及び
（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体
を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＩＩ）：

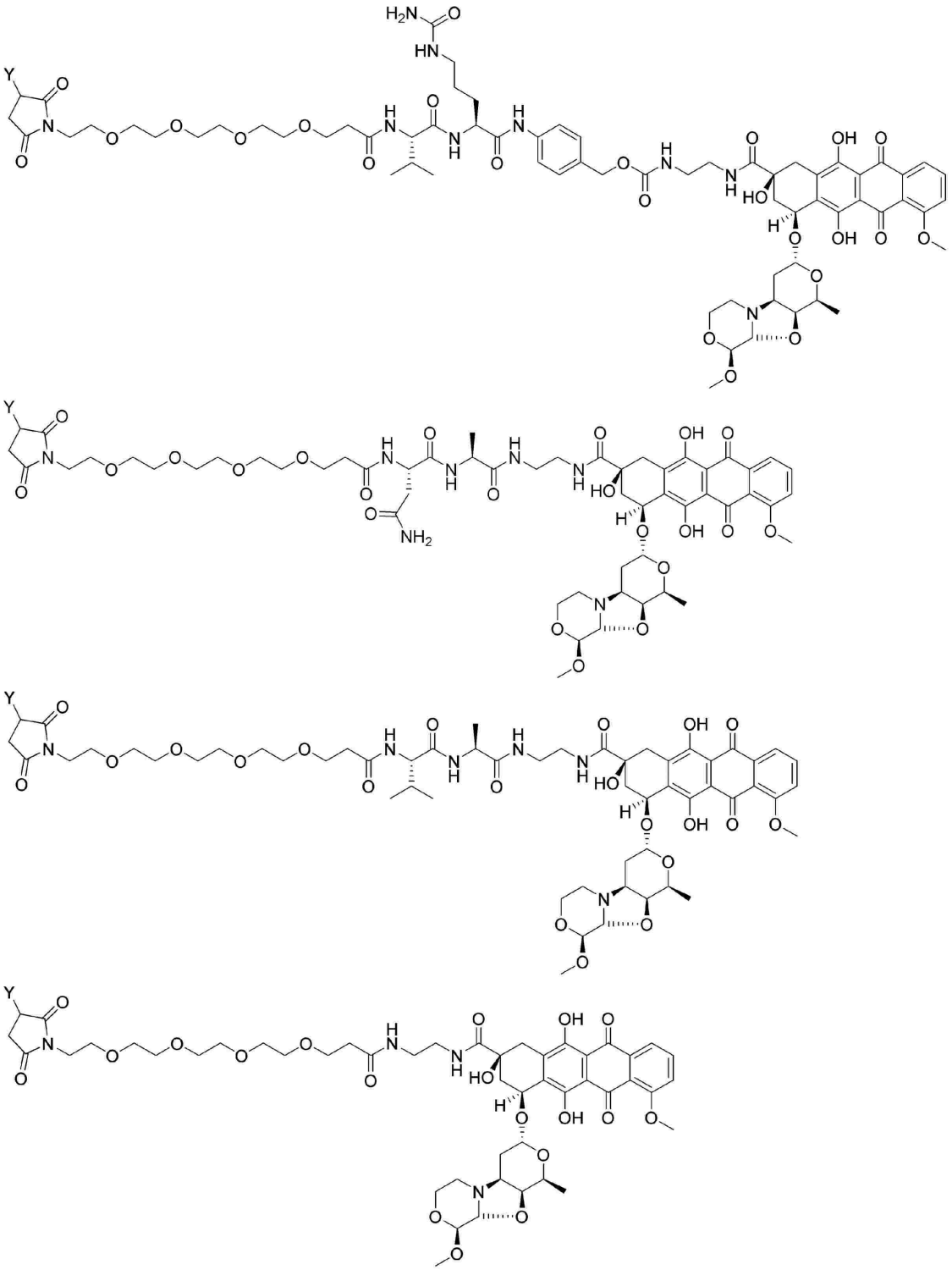
【化３８】



（ＩＩＩ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｌ１］及び［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される任意選択のリンカーであり；及び
Ｙは、請求項１～２５若しくは８７～９０のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体を含む）
の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項９４】
［Ｌ１］、［Ｌ２］又は［Ｌ１］及び［Ｌ２］を含む、請求項９３に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項９５】
［Ｌ２］は、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）又はアラニンである、請求項９３又は９４に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項９６】

【化３９】



から選択される構造を有する、請求項９３に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。

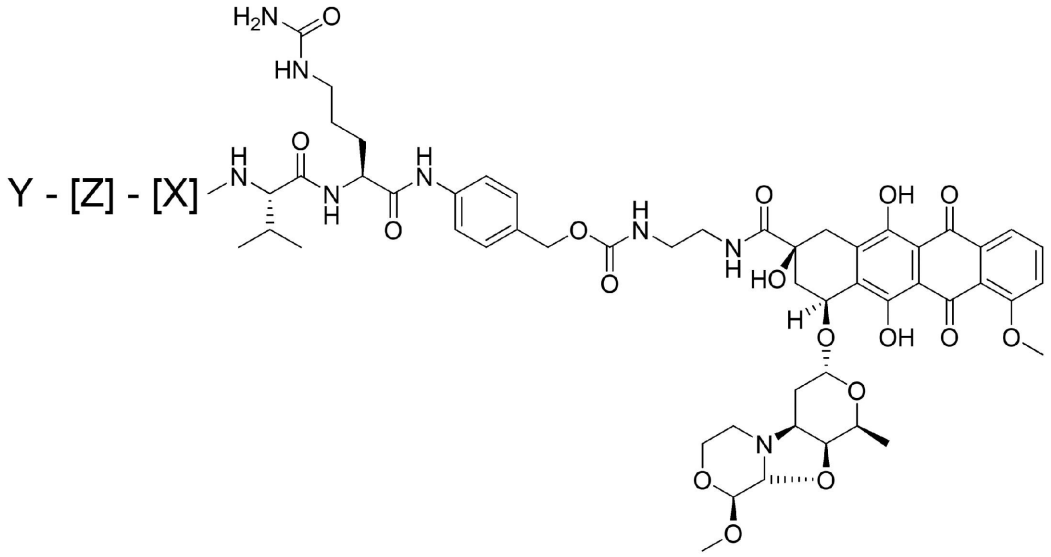
【請求項９７】

（ａ）請求項１～２５若しくは８７～９０のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体、及び

（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体

を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＶ）：

【化４０】



（ＩＶ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｚ］は、前記アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体及び前記標的結合分子をコンジュゲートさせるために使用される反応性基に由来するリンカーであり；及び
Ｙは、請求項１～２５若しくは８７～９０のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は請求項２６～４７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質、又は請求項４８～５７のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体を含む）
の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲート。

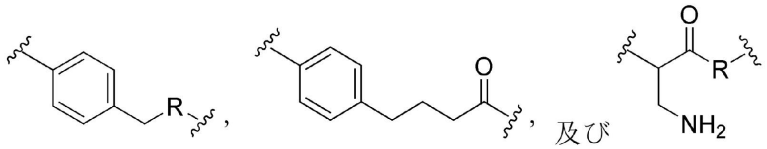
【請求項９８】

［Ｚ］は、ジスルフィド結合、アミド結合、オキシム結合、ヒドラゾン結合、チオエーテル結合、１，２，３トリアゾール及びポリＧｌｙからなる群から選択される、請求項９７に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。

【請求項９９】

［Ｘ］は、ポリエチレングリコール、

【化４１】



を含む群から選択され、

【化４２】



は、前記分子の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである、請求項９３～９５又は９７若しくは９８のいずれか一項に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。

【請求項１００】

［Ｘ］は、ポリエチレングリコールである、請求項９３～９５又は９７若しくは９８の

いずれか一項に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項１０１】
前記標的結合分子は、タンパク質であり、及び前記アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、前記タンパク質のアミノ酸配列中のチオール含有アミノ酸残基にコンジュゲートされているか、又は前記ＰＮＵ誘導体は、前記タンパク質のアミノ酸配列のＮ末端若しくはＣ末端における化学修飾によって取り込まれたチオール部分を介してコンジュゲートされている、請求項９３～１００のいずれか一項に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項１０２】
Ｙは、ヒト免疫グロブリンＦｃ領域又はその断片を介して前記ＰＮＵ誘導体にコンジュゲートされている、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含む、請求項９３～１０１のいずれか一項に記載の標的結合分子－薬物コンジュゲート。
【請求項１０３】
前記組換え融合タンパク質は、配列番号１８６及び／又は配列番号１８７を含む、請求項２６～４７若しくはそれらに従属する任意の請求項のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質又は請求項４８～５７若しくはそれらに従属する任意の請求項のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質二量体。
【請求項１０４】
配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９７、配列番号１９８、配列番号１９９、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号２００、配列番号２０１、配列番号２０２、配列番号１６７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号２０３、配列番号２０４又は配列番号２０５のいずれか１つ以上による配列を含む、請求項２９～４５又はそれらに従属する任意の請求項のいずれか一項に記載の組換え融合タンパク質。
【請求項１０５】
配列番号１７８及び／又は配列番号１７９を含む、請求項８９又はそれに従属する任意の請求項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項１０６】
Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロビン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロビンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン若しくは足場タンパク質を含む群から選択されるかのいずれかである、請求項８７又はそれに従属する任意の請求項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項１０７】
Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロブリンＦｃ領域であるかのいずれかである、請求項８７若しくはそれに従属する任意の請求項又は請求項１０６のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項１０８】
Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又はＦｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される免疫グロブリンＦｃ領域の断片であるかのいずれかである、請求項１０６に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項１０９】
Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、Ｆｃ重鎖であるかのいずれかであり、任意選択で、前記Ｆｃ重鎖は、バイオコンジュゲーションに好適な１つ以上のシステイン残基を含むように人工操作されている、請求項１０８に記載の特異的抗原結合分子。
【請求項１１０】

Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている免疫グロブリンＦｃ領域の断片であるかのいずれかである、請求項１０８又は１０９に記載の特異的抗原結合分子。

【請求項１１１】

Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又はノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の前記第２の断片と二量体化するように人工操作されている免疫グロブリンＦｃ領域の断片であるかのいずれかである、請求項１０８～１１０のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。

【請求項１１２】

Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのヘテロ二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む前記免疫グロブリンＦｃ領域の断片であるかのいずれかである、請求項１０８～１１１のいずれか一項に記載の特異的抗原結合分子。

【請求項１１３】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される、請求項１１２に記載の特異的抗原結合分子。

【請求項１１４】

前記１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される、請求項１１２又は１１３に記載の特異的抗原結合分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子並びに関連する融合タンパク質及びコンジュゲートに関する。さらなる態様において、本発明は、コンジュゲートされた免疫グロブリン様サメ可変新規抗原受容体（ＶＮＡＲ）に関する。

【背景技術】

【０００２】

受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）は、９３７アミノ酸のグリコシル化Ｉ型１回膜貫通型タンパク質である。細胞外領域は、Ｎ末端免疫グロブリンドメイン（Ｉｇ）、それに続くシステインリッチフィズルドドメイン（ｆｚ）、次にそれが結合している膜近傍クリングルドメイン（ｋｒ）を構成する３つの区別されるドメインからなる。タンパク質の細胞内領域は、シュードキナーゼドメイン、それに続くプロリンリッチ領域が散在する２つのＳｅｒ／Ｔｈｒリッチドメインを含有し、この同じドメインアーキテクチャ全体は、密接に関連するファミリーメンバーＲＯＲ２中で保存され、それと高い配列同一性を共有する。

【０００３】

ＲＯＲ１は、胚発生中に発現され、神経堤細胞中において且つ発生後期の壊死及び指間帯で顕著に発現される。しかしながら、この発現は、誕生後に急速にサイレンシングされ、大部分が正常な成体組織中に存在しない。ＲＯＲ１発現は、幅広い範囲の固形腫瘍及び血液悪性腫瘍、例として肺、子宮内膜、膵臓、卵巣、結腸、頭頸部及び前立腺癌、黒色腫及び腎細胞癌、乳癌並びに慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）及び急性リンパ芽球性白血病（ＡＭＬ）にわたり、ｍＲＮＡ及びタンパク質レベルの両方で観察されている。さらに、ＲＯＲ１発現の増加は、多数の癌適応症、例として乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺腺癌及びＣＬＬについて不良な臨床転帰と相関すると報告されている。

【０００４】

ＲＯＲ１の発現パターン及び不良な臨床予後との結びつきと一致して、腫瘍発生及び疾患進行におけるＲＯＲ１の機能的役割は、多数の異なる癌適応症について実証されている。ＲＯＲ１は、乳癌モデルでは上皮間葉転換及び転移を、卵巣癌モデルではスフェロイド形成及び腫瘍生着を促進する。ＲＯＲ１は、肺腺癌におけるＮＫＸ２－１／ＴＴＦ－１系統生存因子癌遺伝子の転写産物標的であり、それは、ＥＧＦＲシグナリングを持続させ、アポトーシス促進性シグナリングを抑制する。ＲＯＲ１は、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤に対する抵抗性を付与するカベオラ構造及びバイパスシグナリング機序を持続させるための足場として作用することも示されている。ＲＯＲ１－ＨＥＲ３複合体を介するシグナリングは、Ｈｉｐｐｏ－ＹＡＰ経路をモジュレートし、乳癌骨転移を促進し、このタンパク質は、Ｍｅｔ駆動腫瘍発生を促進し得る。ＲＯＲ１発現は、Ｈｉｐｐｏ－ＹＡＰ／ＴＡＺ及びＢＭＩ１経路の活性化を介して乳癌における化学療法耐性と関連する。一方、ＣＬＬでは、ＲＯＲ１は、Ｗｎｔ５ａに応答してＲＯＲ２とヘテロオリゴマー化して、シグナリングを伝達し、増殖及び遊走を向上させると報告されている。

【０００５】

癌病理におけるＲＯＲ１の機能的役割及び正常な成体組織での発現の全般的な欠如を考慮すると、この癌胎児性タンパク質は、癌治療のための魅力的な標的である。ＲＯＲ１に対する抗体は、文献国際公開第２０２１０９７３１３号パンフレット（４Ａ５　ｋｉｐｐｓ）、国際公開第２０１４０３１１７４号パンフレット（ＵＣ９６１）、国際公開第２０１６１８７２２０号パンフレット（Ｆｉｖｅ　Ｐｒｉｍｅ）、国際公開第２０１０１２４１８８号パンフレット（２Ａ２）、国際公開第２０１２０７５１５８号パンフレット（Ｒ１１、Ｒ１２）、国際公開第２０１１０５４００７号パンフレット（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｂｉｏ）、国際公開第２０１１０７９９０２号パンフレット（Ｂｉｏｉｎｖｅｎｔ）、国際公開第２０１７１２７６６４号パンフレット、国際公開第２０１７１２７６６４号パンフレット（ＮＢＥ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，ＳＣＲＩＰＰＳ）、国際公開第２０１６０９４８４７号パンフレット（Ｅｍｅｒｇｅｎｔ）、国際公開第２０１７１２７４９９号パンフレット）に記載されており、ヒト化マウス抗ＲＯＲ１抗体ＵＣ９６１は、再発性又は難治性慢性リンパ球性白血病についての臨床試験に入っている。ＲＯＲ１を標的とするキメラ抗原受容体Ｔ細胞も報告されており（Ｈｕｄｅｃｅｋ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２０１３，１９，３１５３－６４）、ＵＣ９６１及びＲＯＲ１を標的化するＣＡＲ－Ｔ細胞を用いる前臨床霊長類研究は、明白な毒性を示さず、これは、成体組織でのこのタンパク質の発現の全般的な欠如と一致する（Ｃｈｏｉ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌｙｍｐｈｏｍａ，ｍｙｅｌｏｍａ＆ｌｅｕｋｅｍｉａ，２０１５，Ｓ１６７；Ｂｅｒｇｅｒ　Ｃ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．，２０１５，３，２０６）。

【０００６】

単一ドメイン結合分子は、区別される種からの一連のタンパク質に由来し得る。免疫グロブリンアイソトープ新規抗原受容体（ＩｇＮＡＲ）は、コモリザメ（Ｇｉｎｇｌｙｍｏｓｔｏｍａ　ｃｉｒｒａｔｕｍ）及び他のサメ並びにエイ種の血清中で最初に見出されたホモ二量体重鎖複合体である。ＩｇＮＡＲは、軽鎖を含有せず、典型的な免疫グロブリン構造と区別される。各分子は、１つの単一可変ドメイン（ＶＮＡＲ）及び５つの定常ドメイン（ＣＮＡＲ）からなる。文献中の命名は、ＩｇＮＡＲを免疫グロブリンアイソトープ新規抗原受容体又は免疫グロブリンアイソトープ新抗原受容体と称し、それらの用語は、同義語である。

【０００７】

Ｉ、ＩＩ及びＩＩＩ型として公知のサメＩｇＮＡＲの３つの主な定義された型が存在する（Ｋｏｖａｌｅｎａ　ｅｔ　ａｌ，Ｅｘｐ　Ｏｐｉｎ　Ｂｉｏｌ　Ｔｈｅｒ　２０１４　１４（１０）１５２７－１５３９）。これらは、強い選択圧力下にあり、したがってほとんど置き換えられない非カノニカルシステイン残基の位置に基づいて分類されている。

【０００８】

３つ全ての型は、標準的な免疫グロブリンフォールドを安定化する３５及び１０７位の

古典的免疫グロブリンカノニカルシステインを３６位のインバリアントのトリプトファンと一緒に有する。定義されるＣＤＲ２自体は、存在しないが、ＴＣＲ　ＨＶ２及びＨＶ４により近く相当する配列バリエーションの領域がそれぞれフレームワーク２及び３において定義されている。Ｉ型は、生殖細胞系によりコードされるシステイン残基をフレームワーク２及びフレームワーク４に、且つ偶数の追加のシステインをＣＤＲ３内に有する。リゾチームから単離され、且つそれと複合体化したＩ型ＩｇＮＡＲの結晶構造研究により、それらのシステイン残基の寄与の決定が可能になった。フレームワーク２及び４のシステインの両方は、ＣＤＲ３中のシステインとのジスルフィド架橋を形成し、ＣＤＲ３ループがＨＶ２領域に向かって下がってタイトに保持される、タイトにパッキングされた構造を形成する。これまで、Ｉ型ＩｇＮＡＲは、コモリザメにおいてのみ同定されており、同じ目のメンバーを含め、全ての他の板鰓類は、ＩＩ型又はこの型のバリエーションのみを有する。

【０００９】

ＩＩ型ＩｇＮＡＲは、ＣＤＲ１及びＣＤＲ３中において、それらの２つの領域を近接して保持する分子内ジスルフィド結合を形成し、結合ポケット又は溝を促す突出ＣＤＲ３をもたらすシステイン残基を有すると定義される。Ｉ型配列は、典型的には、ＩＩ型よりも長いＣＤＲ３を有し、それぞれ平均して２１及び１５残基である。これは、Ｉ型ＣＤＲ３中の２つ以上のシステイン残基がそれらのフレームワーク２及び４カウンターパートと会合する強い選択圧力に起因すると考えられる。体細胞突然変異の蓄積に関する研究により、Ｉ型よりもＩＩ型のＣＤＲ１中に多数の突然変異が存在する一方、Ｉ型のＨＶ２領域は、ＩＩ型よりも大きい配列バリエーションを示すことが示されている。この証拠は、抗原結合部位内で決定されたそれらの領域の位置決めと十分に相関する。ＩＩＩ型として公知の第３のＩｇＮＡＲ型は、新生児において同定されている。ＩｇＮＡＲファミリーのこのメンバーは、（ＣＤＲ３を形成する）Ｄ１及びＤ２領域とＶ遺伝子との生殖細胞系融合に起因して、ＣＤＲ３内の多様性を欠く。ほぼ全ての公知のクローンは、１５残基のＣＤＲ３長を有し、ほとんど又は全く配列多様性がない。

【００１０】

（ＩＩｂ又はＩＶ）型と称されるＶＮＡＲの別の構造型は、２つのみのカノニカルシステイン残基を（フレームワーク１及びフレームワーク３ｂ領域中に）有する。これまで、この型は、ツノザメで主に見出されており、テンジクザメに由来する半合成Ｖ－ＮＡＲライブラリーからも単離された。

【００１１】

ＲＯＲ１特異的抗原結合分子、例としてＶＮＡＲは、参照により全体として本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／１２２４４７号パンフレットに記載されている。とりわけ、国際公開第２０１９／１２２４４７号パンフレットは、以下に特定されるＢ１及びＰ３Ａ１　Ｇ１の配列を記載している。

【００１２】

Ｂ１

（化１）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号１１３）

【００１３】

Ｐ３Ａ１　Ｇ１

（化２）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１１４）

【００１４】

ＲＯＲ１特異的抗原結合分子、例としてＶＮＡＲのコンジュゲートは、参照により全体

として本明細書に組み込まれる２０２０年６月１９日に出願されたＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０２０／０６７２１０号明細書に記載されている。ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０２０／０６７２１０号明細書は、薬物コンジュゲートにおける使用に好適なアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体を記載している。具体的には、Ｃ１４炭素及び付着ヒドロキシル官能基を欠き、エチレンジアミノ（ＥＤＡ）基がＰＮＵ１５９６８２のＣ１３カルボニルとマレイミド基との間のリンカー領域の一部を形成するＰＮＵ１５９６８２の誘導体が提供される。代わりに、同じ分子は、ＥＤＡ基がリンカー領域の一部とみなされないように「弾頭」としてＥＤＡ－ＰＮＵで記載され得る。リンカーがｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢを含む場合、マレイミド基は、コンジュゲーション反応に好適な任意の反応性基と置き換えられ得る。このようなペイロードは、別の分子上のフリーチオール基と反応し得る。フリーチオールがタンパク質上に存在する場合、タンパク質－薬物コンジュゲート（ＰＤＣ）が形成され得る。

【００１５】

アントラサイクリン誘導体ＰＮＵ－１５９６８２は、ネモルビシンの代謝産物として記載されており（Ｑｕｉｎｔｉｅｒｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１１，１６０８－１６１７）、１つの卵巣（Ａ２７８０）及び１つの乳癌（ＭＣＦ７）細胞系を用いてピコ～フェムトモル範囲においてインビトロ細胞殺傷について極端に高い効力を示すことが報告されている（国際公開第２０１２／０７３２１７Ａ１号パンフレット）。ＰＮＵ－１５９６８２の誘導体は、国際公開第２０１６／１０２６７９号パンフレットにも記載されている。

【００１６】

ＰＮＵ－１５９６８２誘導体の抗体へのコンジュゲーションは、国際公開第２００９／０９９７４１号パンフレット、国際公開第２０１６／１２７０８１号パンフレット及び国際公開第２０１６／１０２６７９号パンフレット、Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２０１５，２１，３２９８及びＳｔｅｆａｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ．Ｔｈｅｒ．，２０１７，１６，８７９に記載されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１７】

改善された特性を有するＲＯＲ１特異的バリアント抗原結合分子及びそのＰＮＵ－１５９６８２の誘導体へのコンジュゲートが本明細書に記載される。

【００１８】

本発明は、一般に、特異的抗原結合分子に関する。

【００１９】

第１の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：

ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４　（Ｉ）

（式中、

ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）、ＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹ（配列番号１１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹ（配列番号１２）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹ（配列番号１３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹ（配列番号１４）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹ（配列番号１５）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹ（配列番号１６）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹ（配列番号１７）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹ（配列番号１８）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹ（配列番号１９）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹ（配列番号２１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹ（配列番号２２）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；

ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＤＬＳＡ（配列番号２）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（

配列番号４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり、
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）及びＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）及びＮＫＧＴＭ（配列番号９）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域であり；
ＣＤＲ３がＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）である場合、ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択される）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子を提供する。

【００２０】

第２の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４
（Ｉ）
（式中、
ＣＤＲ１は、ＧＴＲＹＧＬＹＳ（配列番号２５）、ＧＴＲＹＧＬＹＳＳ（配列番号２６）、ＤＴＲＹＡＬＹＳ（配列番号２７）、ＤＴＲＹＡＬＹＳＳ（配列番号２８）、ＧＴＫＹＧＬＹＡ（配列番号２９）及びＧＴＫＹＧＬＹＡＳ（配列番号３０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；
ＨＶ２は、ＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳ（配列番号３１）、ＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧ（配列番号３２）、ＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧ（配列番号３３）及びＳＴＤＫＥＲＩＩＩＧ（配列番号３４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＫ（配列番号３５）、ＮＫＧＳＫ（配列番号３６）、ＮＮＧＴＫ（配列番号３７）及びＮＮＲＳＫ（配列番号３８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＣＤＲ３は、ＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹ（配列番号３９）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子を提供する。

【００２１】

第３の態様によれば、本発明は、本発明の第１又は第２の態様による特異的抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質を提供する。

【００２２】

第４の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４
（Ｉ）
（式中、
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ１は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり、

ＨＶ２は、超可変配列であり、
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり、
ＨＶ４は、超可変配列であり、
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ３は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列又はその機能的バリアントを含む抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質であって、抗原結合分子は、免疫グロブリンＦｃ領域の断片に融合されており、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている、組換え融合タンパク質を提供する。

【００２３】

第５の態様によれば、本発明は、
（ａ）第１の組換え融合タンパク質であって、第３又は第４の態様による組換え融合タンパク質である第１の組換え融合タンパク質、及び
（ｂ）第２の組換え融合タンパク質であって、免疫グロブリンＦｃ領域の第１の断片と二量体化するように人工操作されている免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片に融合されている第２の抗原結合分子を含む第２の組換え融合タンパク質
を含む組換え融合タンパク質二量体を提供する。

【００２４】

第６の態様によれば、本発明は、少なくとも１つの膜貫通領域及び少なくとも１つの細胞内ドメインに融合又はコンジュゲートされている、本発明の第１又は第２の態様によって定義される少なくとも１つのＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含むＲＯＲ１特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を提供する。

【００２５】

本発明は、第６の態様によるキメラ抗原受容体を含む細胞であって、好ましくは人工操作Ｔ細胞である細胞も提供する。

【００２６】

本発明の第７の態様において、本発明の第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様による特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸配列が提供される。

【００２７】

第７の態様による核酸配列を含むベクター及びそのような核酸を含む宿主細胞も提供される。

【００２８】

第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体を調製する方法であって、上記ポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を、前記宿主細胞が特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体を産生するような条件下で培養又は維持することを含み、任意選択で、特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体を単離することをさらに含む方法が提供される。

【００２９】

本発明の第８の態様において、第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体を含む医薬組成物が提供される。医薬組成物は、種々の薬学的に許容可能な担体を含有し得る。本発明の医薬組成物は、当技術分野において公知の任意の好適な方法、例として、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、経口、腹腔内又は局所投与による投与のためのものであり得る。好ましい実施形態において、医薬組成物は、液剤、ゲル剤、散剤、錠剤、カプセル剤又はフォーム剤の形態で調製され得る。

【００３０】

第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タン

パク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体は、治療法における使用のためのものであり得る。より具体的には、第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体は、癌の処置における使用のためのものであり得る。好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【００３１】

本明細書において、疾患の処置を、それを必要とする患者において行うための医薬品の製造における第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体の使用も提供される。

【００３２】

第１、第２、第３、第４、第５、第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体若しくはキメラ抗原受容体又は第８の態様の医薬組成物は、単回用量で投与され得る。本明細書において使用される場合、「単回用量」は、１回の用量からなる投与量レジメンを指す。代わりに、複数回用量レジメンが使用され得る。理論により拘束されるものではないが、第１、第２、第３、第４、第５、第６の態様の特異的結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体若しくはキメラ抗原受容体又は第８の態様の医薬組成物の利点は、単回用量で投与される場合に特に明らかであり得る。

【００３３】

さらに、本発明によれば、疾患の処置を、処置を必要とする患者において行う方法であって、前記患者に、治療有効投与量の第１、第２、第３、第４、第５若しくは第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体若しくはキメラ抗原受容体又は第８の態様の医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【００３４】

好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【００３５】

本明細書において、サンプル中の標的分析物の存在をアッセイする方法であって、検出可能に標識されている、第１の態様若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体をサンプルに添加し、且つ標的分析物への分子の結合を検出することを含む方法も提供される。

【００３６】

さらに、本明細書において、対象における疾患の部位をイメージングする方法であって、検出可能に標識されている、第１の態様若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は検出可能に標識されている、第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を対象に投与することを含む方法が提供される。

【００３７】

本明細書において、対象における疾患又は医学的病態を診断する方法であって、第１の態様若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融

合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を投与することを含む方法も提供される。

【００３８】

本明細書において、第１又は第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子とＲＯＲ１への結合について競合する抗体、抗体断片又は抗原結合分子も企図される。抗原結合タンパク質（例えば、中和抗原結合タンパク質又は中和抗体）に関連して使用される場合の「競合する」という用語は、試験下の抗原結合タンパク質（例えば、抗体又はその機能的断片）が、共通の抗原（例えば、第１又は第２の態様の特異的抗原結合分子の場合にはＲＯＲ１）への、本明細書に定義される抗原結合分子（例えば、第１の態様の特異的抗原結合分子）の特異的結合を妨害又は阻害するアッセイにより決定される抗原結合タンパク質間の競合を意味する。

【００３９】

本明細書において、癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は対象の病態の予後診断を提供するためのキットであって、試験対象からのサンプル中に存在する抗原の濃度を検出するための検出手段を含み、検出手段は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体、第６の態様のキメラ抗原受容体、又は第７の態様の核酸配列を含み、サンプル中の抗原の存在は、対象が癌に罹患していることを示唆する、キットも記載される。好ましくは、抗原は、ＲＯＲ１タンパク質、より好ましくはその細胞外ドメインを含む。より好ましくは、キットは、サンプル中のＲＯＲ１陽性細胞の存在若しくは不存在を同定するか、又はサンプル中のその濃度を決定するために使用される。キットは、アッセイが比較される陽性対照及び／若しくは陰性対照並びに／又は検出され得る標識も含み得る。

【００４０】

本発明は、癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は対象の病態の予後診断を提供する方法であって、対象から得られたサンプル中に存在する抗原の濃度を検出することを含み、検出は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体、第６の態様のキメラ抗原受容体、又は第７の態様の核酸配列を使用して達成され、サンプル中の抗原の存在は、対象が癌に罹患していることを示唆する、方法も提供する。

【００４１】

本明細書において、インビトロ又は患者におけるＲＯＲ１を発現する細胞を殺傷するか又はその成長を阻害する方法であって、細胞に、医薬有効量又は用量の、（ｉ）第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体、第７の態様の核酸配列、又は第６の態様によるＣＡＲ若しくは細胞、或いは（ｉｉ）第８の態様の医薬組成物を投与することを含む方法も企図される。好ましくは、ＲＯＲ１を発現する細胞は、癌細胞である。より好ましくは、ＲＯＲ１は、ヒトＲＯＲ１である。

【００４２】

第９の態様によれば、本発明は、式（ＩＩ）：

Ｘ－ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４－Ｙ　（ＩＩ）

（式中、

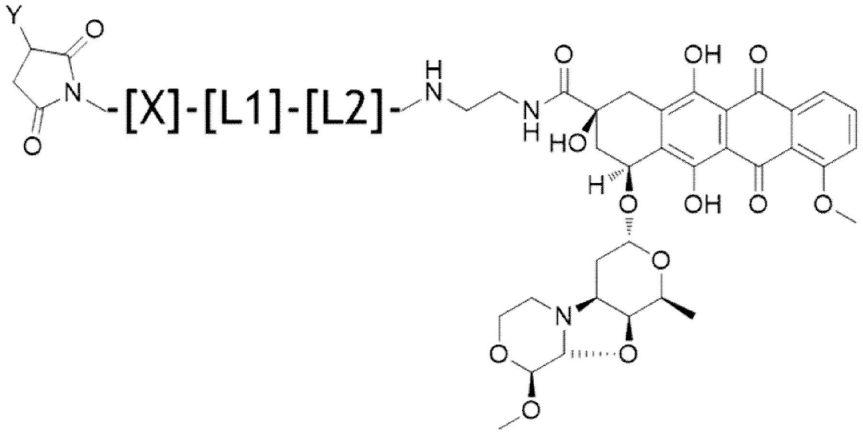
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４は、第１又は第２の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子であり、

Ｘ及びＹは、任意選択のアミノ酸配列である）

によって表されるアミノ酸配列を含む特異的抗原結合分子であって、第２の部分にコンジュゲートされている特異的抗原結合分子を提供する。

【００４３】

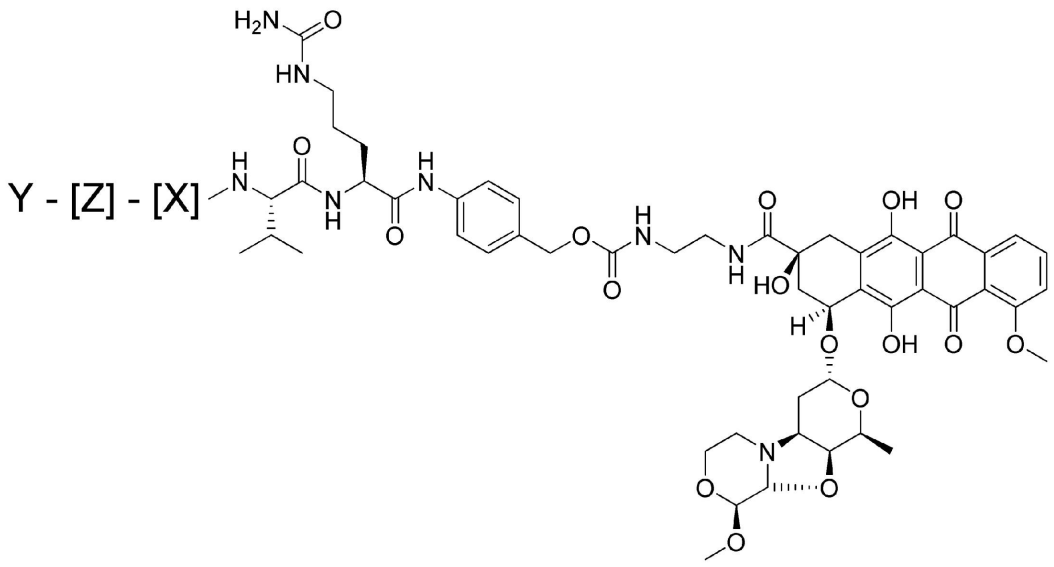
第１０の態様によれば、本発明は、
（ａ）第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体、及び
（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体
を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＩＩ）：
【化３】



（ＩＩＩ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｌ１］及び［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される任意選択のリンカーであり；及び
Ｙは、第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を含む）
の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲートを提供する。
【００４４】
第１１の態様によれば、本発明は、
（ａ）第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体組換え融合タンパク質、及び
（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体
を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＶ）：

【化４】



（ＩＶ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｚ］は、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体及び標的結合分子をコンジュゲートさせるために使用される反応性基に由来するリンカーであり；及び
Ｙは、第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を含む）
の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲートを提供する。

【図面の簡単な説明】

【００４５】

【図１】Ｂ１ループライブラリーの設計：Ｂ１の配列は、ランダム化されたＣＤＲ１及びＣＤＲ３内のアミノ酸を示す「Ｘ」を用いて示される。

【図２】フローサイトメトリーによるＡ５４９（ＲＯＲ１ｈｉ）肺癌細胞へのＢ１　ＶＮＡＲループバリアント（Ｈｉｓ６Ｍｙｃタグ）の細胞表面結合。

【図３】フローサイトメトリーによるＡ４２７（ＲＯＲ１ｌｏｗ）肺癌細胞へのＢ１　ＶＮＡＲループバリアント（Ｈｉｓ６Ｍｙｃタグ）の細胞表面結合。

【図４】Ｐ３Ａ１　Ｇ１の配列及びループライブラリー設計。ＣＤＲ１多様性は、４４８個の組み合わせをもたらし、ＨＶ２多様性は、７６８個の組み合わせをもたらし、ＨＶ４多様性は、２４個の組み合わせをもたらす。

【図５】ＥＬＩＳＡによるヒトＲＯＲ１へのＰ３Ａ１Ｇ１ループバリアントの結合。データは、固定濃度（５ｕｇ／ｍＬ）のループバリアントの各々について４５０ｎｍで得られたＯＤシグナルとしてプロットされる。

【図６】ＥＬＩＳＡによるヒトＲＯＲ１へのＰ３Ａ１Ｇ１ループバリアント及び親Ｐ３Ａ１Ｇ１タンパク質の結合。

【図７】ＶＮＡＲ　ＩｇＧ　Ｆｃ融合タンパク質中で使用されるリンカーマウスＩｇＧ及びリンカーヒトＩｇＧ配列。人工操作ｈＩｇＧ１　Ｆｃ融合タンパク質は、部位特異的標識を可能にするための、ｈＩｇＧ１　Ｆｃ配列中、例えばＳ２３９Ｃ又はＳ４４２Ｃ（ＥＵナンバリング）位の人工操作システイン置換を取り込む。

【図８】フローサイトメトリーによるＡ５４９（ＲＯＲ１ｈｉ）肺癌細胞へのＢ１ループバリアント－ｈＦｃ融合タンパク質の細胞表面結合。

【図９】ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（４－１２％　Ｂｉｓ　Ｔｒｉｓゲル、ＭＯＰＳ緩衝液、±５

０ｍＭのＤＴＴ）によるＲＯＲ１バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体の分析。レーン１　Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）及びレーン２　Ｇ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）。

【図１０】フローサイトメトリーによるＡ５４９（ＲＯＲ１ｈｉ）及びＡ４２７（ＲＯＲ１ｌｏｗ）肺癌細胞へのＲＯＲ１バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体の細胞表面結合。

【図１１】ＰＮＵ－リンカーペイロードＭＡ－ＰＥＧ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ１５９６８２及びＭＡ－ＰＥＧ－ｖｃ－ＥＤＡ－ＰＮＵ１５９６８２の構造。

【図１２】ＥＬＩＳＡによるヒトＲＯＲ１へのＧ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲート並びに対応する親タンパク質の結合を示す用量応答。

【図１３】ＲＯＲ１陽性ＰＡ－１細胞系及びＲＯＲ１ノックアウトされたＰＡ－１細胞系の殺傷におけるＧ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートの効力。

【図１４】ＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－２８患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおけるＧ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートのインビボ有効性。ビヒクル群の最初の動物が人道的腫瘍負荷に達した時点までプロットされたデータ。

【図１５】Ｂ１、Ｂ１　Ｇ４、Ｂ１Ｖ１５、Ｇ３ＣＰ及びＧ３ＣＰＧ４についての配列のアラインメント。ＣＤＲ及びＨＶ領域内のバリエーションの点は、下線で強調される。Ｂ１Ｖ１５（配列番号１１５）は、Ｂ１のループライブラリーバリアントでなく；それらは、同一のＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ３配列を有することに留意されたい。

【図１６】ＰＢＳ　ｐＨ７．４緩衝液中３７℃、９６時間のインキュベーション後のＢ１－ｈＦｃ、Ｂ１Ｇ４－ｈＦｃ、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃのＵＶ分析。

【図１７】ＰＢＳ　ｐＨ７．４緩衝液中３７℃、９６時間のインキュベーション後のＢ１－ｈＦｃ、Ｂ１Ｇ４－ｈＦｃ、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃのサイズ排除分析（ＳＥＣ）。

【図１８】ＲＯＲ１ｌｏｗＨＥＫ２９３細胞及びヒトＲＯＲ１が安定的に形質移入されたＨＥＫ２９３細胞の殺傷におけるＧ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートの効力。

【図１９】ＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－１０患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおけるＧ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートのインビボ有効性。ビヒクル群の最初の動物が人道的腫瘍負荷に達した時点までプロットされたデータ。

【図２０】フローサイトメトリーによるＡ５４９（ＲＯＲ１ｈｉ）及びＡ４２７（ＲＯＲ１ｌｏｗ）肺癌細胞へのＲＯＲ１バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃ薬物コンジュゲートの細胞表面結合。

【図２１】ＲＯＲ１陽性ＰＡ－１細胞系及びＲＯＲ１ノックアウトされたＰＡ－１細胞系の殺傷におけるバイパラトピックＧ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートの効力。

【図２２】ＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－２８患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおけるバイパラトピックＧ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートのインビボ有効性。

【発明を実施するための形態】

【００４６】

本発明は、一般に、特異的抗原結合分子に関する。具体的には、本発明は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）に特異的な免疫グロブリン様サメ可変新規抗原受容体（ＶＮＡＲ）並びに関連する融合タンパク質、キメラ抗原受容体、コンジュゲート及び核酸並びにそれらに伴う方法を提供する。ＲＯＲ１特異的ＶＮＡＲドメインは、本明細書においてＲＯＲ１特異的抗原結合分子と記載される。

【００４７】

新規又は新抗原受容体（ＩｇＮＡＲ）は、軟骨魚類の血清中で見出されるおよそ１６０ｋＤａのホモ二量体タンパク質である（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ　Ａ．Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，

Ｎａｔｕｒｅ，１９９５．３７４（６５１８）：ｐ．１６８－１７３、Ｄｏｏｌｅｙ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，２００３．４０（１）：ｐ．２５－３３；Ｍｕｅｌｌｅｒ，Ｍ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，ｍＡｂｓ，２０１２．４（６）：ｐ．６７３－６８５））。各分子は、単一のＮ末端可変ドメイン（ＶＮＡＲ）及び５つの定常ドメイン（ＣＮＡＲ）からなる。ＩｇＮＡＲドメインは、免疫グロブリン－スーパーファミリーのメンバーである。ＶＮＡＲは、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体可変ドメイン並びに細胞接着分子と構造的類似性及びいくらかの配列類似性を有するタイトに折り畳まれたドメインであり、古典的免疫グロブリン及びＴ細胞受容体のＮ可変末端ドメインとの類似性によりＶＮＡＲと称される。ＶＮＡＲは、免疫グロブリンとの限定的な配列相同性、例えばＶＮＡＲとヒト軽鎖配列との間で２５～３０％の類似性を共有する。

【００４８】

Ｋｏｖａｌｅｖａ Ｍ．ｅｔ ａｌ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１４．１４（１０）：ｐ．１５２７－１５３９及びＺｉｅｌｏｎｋａ Ｓ．ｅｔ ａｌ ｍＡｂｓ ２０１５．７（１）：ｐ．１５－２５は、ＶＮＡＲの構造的特徴付け及び生成の概要を提供しており、参照により本明細書に組み込まれる。

【００４９】

ＶＮＡＲは、古典的免疫グロブリン抗体の祖先から進化したと考えられない。ＶＮＡＲの区別される構造的特徴は、慣用の免疫グロブリン可変ドメイン中に存在するＣＤＲ２ループと同等の配列のトランケーション及びＩｇＮＡＲ構造中に存在しない、通常、軽鎖ドメインとの会合を可能にする疎水性ＶＨ／ＶＬ界面残基の欠如である。さらに、古典的免疫グロブリンと異なり、一部のＶＮＡＲサブタイプは、特別なシステイン残基をＣＤＲ領域中に含み、それらは、ＣＤＲ１及び３にＮ末端で隣接するフレームワーク１及び３領域中のシステイン間のカノニカル免疫グロブリンスーパーファミリー架橋に加えてジスルフィド架橋を形成することが観察される。

【００５０】

これまで、Ｉ、ＩＩ及びＩＩＩ型として公知のサメＩｇＮＡＲの３つの定義された型が存在する。これらは、強い選択圧力下にあり、したがってほとんど置き換えられない非カノニカルシステイン残基の位置に基づいて分類されている。

【００５１】

３つ全ての型は、標準的な免疫グロブリンフォールドを安定化する３５及び１０７位（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．５ｔｈ ｅｄ．１９９１，Ｂｅｔｈｅｓｄａ：ＵＳ Ｄｅｐｔ．ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＰＨＳ，ＮＩＨにおけるようなナンバリング）の古典的免疫グロブリンカノニカルシステインを、３６位のインバリアントのトリプトファンと一緒に有する。定義されるＣＤＲ２自体は、存在しないが、ＴＣＲ ＨＶ２及びＨＶ４により近く相当する配列バリエーションの領域がそれぞれフレームワーク２及び３において定義されている。Ｉ型は、生殖細胞系によりコードされるシステイン残基をフレームワーク２及びフレームワーク４中に、且つ偶数の追加のシステインをＣＤＲ３内に有する。リゾチームから単離され、且つそれと複合体化したＩ型ＩｇＮＡＲの結晶構造研究により、それらのシステイン残基の寄与の決定が可能になった。フレームワーク２及び４のシステインの両方は、ＣＤＲ３中のシステインとのジスルフィド架橋を形成し、ＣＤＲ３ループがＨＶ２領域に向かって下がってタイトに保持される、タイトにパッキングされた構造を形成する。これまで、Ｉ型ＩｇＮＡＲは、コモリザメにおいてのみ同定されており、同じ目のメンバーを含め、全ての他の板鰓類は、ＩＩ型又はこの型のバリエーションのみを有する。

【００５２】

ＩＩ型ＩｇＮＡＲは、ＣＤＲ１及びＣＤＲ３中において、それらの２つの領域を近接して保持する分子内ジスルフィド結合を形成し、結合ポケット又は溝を促す突出ＣＤＲ３をもたらすシステイン残基を有すると定義される。Ｉ型配列は、典型的には、ＩＩ型よりも長いＣＤＲ３を有し、それぞれ平均して２１及び１５残基である。これは、Ｉ型ＣＤＲ３

中の２つ以上のシステイン残基がそれらのフレームワーク２及び４カウンターパートと会合する強い選択圧力に起因すると考えられる。体細胞突然変異の蓄積に関する研究により、Ｉ型よりもＩＩ型のＣＤＲ１中に多数の突然変異が存在する一方、Ｉ型のＨＶ２領域は、ＩＩ型よりも大きい配列バリエーションを示すことが示されている。この証拠は、抗原結合部位内で決定されたそれらの領域の位置決めと十分に相関する。

【００５３】

ＩＩＩ型として公知の第３のＩｇＮＡＲ型は、新生児において同定されている。ＩｇＮＡＲファミリーのこのメンバーは、（ＣＤＲ３を形成する）Ｄ１及びＤ２領域とＶ遺伝子との生殖細胞系融合に起因してＣＤＲ３内の多様性を欠く。ほぼ全ての公知のクローンは、１５残基のＣＤＲ３長を有し、ほとんど又は全く配列多様性がない。

【００５４】

（ＩＩｂ又はＩＶ）型と称されるＶＮＡＲの別の構造型は、２つのみのカノニカルシステイン残基を（フレームワーク１及びフレームワーク３ｂ領域中に）有する。これまで、この型は、ツノザメで主に見出されており、テンジクザメに由来する半合成Ｖ－ＮＡＲライブラリーからも単離された。

【００５５】

ＶＮＡＲ結合表面は、他の天然免疫グロブリン中の可変ドメインと異なり、４つの多様性領域：ＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ３に由来し、それらは、ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４の順序で介在フレームワーク配列により連結している。天然軽鎖パートナーの欠如及びＣＤＲ２の欠如の組み合わせにより、ＶＮＡＲは、脊椎動物界における天然に存在する最小結合ドメインとなる。

【００５６】

ＩｇＮＡＲは、ラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダ及びラマ）に見出される重鎖免疫グロブリン（ＨＣＡｂ）といくらかの付随的な特徴を共有する。ＩｇＮＡＲと異なり、ＨＣＡｂは、明らかに免疫グロブリンファミリーに由来し、標準免疫グロブリンと顕著な配列相同性を共有する。重要なことに、ＶＮＡＲの１つの重要な区別は、分子が、古典的免疫グロブリンともＨＣＡｂとも異なり、その進化のいずれの時点においてもパートナー軽鎖を有さなかったことである。Ｆｌａｊｎｉｋ Ｍ．Ｆ．ｅｔ ａｌ ＰＬｏＳ Ｂｉｏｌ ２０１１．９（８）：ｅ１００１１２０及びＺｉｅｌｏｎｋａ Ｓ．ｅｔ ａｌ ｍＡｂｓ ２０１５．７（１）：ｐ．１５－２５は、ＶＮＡＲと、ラクダ科からの免疫グロブリン由来ＶＨＨ単一結合ドメインとの間の類似性及び相違並びにそれらの考えられる区別される進化起源に対して見解を示している。

【００５７】

ＲＯＲ１に対する抗体が文献で報告されているが、ヒト、マウス及びラットＲＯＲ１の細胞外ドメイン間並びにヒトＲＯＲ１及びＲＯＲ２ファミリーメンバー間の高い配列同一性は、高親和性ｈＲＯＲ１特異的結合薬剤の生成が容易でないことを意味する。さらに、抗体の大きいサイズは、固形腫瘍に侵入するそれらの能力を損ない、立体的要因に起因して標的タンパク質の領域をアクセス不可能にし、それは、オリゴマー化又は受容体クラスター化が観察される細胞表面タンパク質では特に深刻であり得る。

【００５８】

結果として、当技術分野において、抗体と異なる機能的又は物理的特徴又は特性を有する改善された抗ＲＯＲ１結合タンパク質薬剤並びにＲＯＲ１発現と関連する悪性腫瘍のための治療薬及び診断剤の開発が必要とされている。本発明は、そのような薬剤を本明細書に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子の形態で提供する。

【００５９】

理論により拘束されるものではないが、目下記載されるＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ヒト及びマウスＲＯＲ１の両方に結合すると考えられる。多数のバリアント、例としてＧ３ＣＰ、１Ｅ５、１Ｂ１１、Ｃ３ＣＰ、１Ｇ９、１Ｈ８、Ｇ１１ＣＰ、Ｄ９ＣＰ、１Ｂ６、１Ｆ１０、Ｆ２ＣＰ、Ｂ６ＣＰ、１Ｅ１及びＰ３Ａ１Ｇ１ ＮＡＣ６．Ｓ、Ｐ３Ａ１

Ｇ１　ＡＥ３．Ｓ、Ｐ３Ａ１Ｇ１　ＮＡＣ６、Ｐ３Ａ１Ｇ１　ＡＥ３及びＰ３Ａ１Ｇ１ＮＡＧ８が、ｈＲＯＲ１及びｍＲＯＲ１の両方に結合することが実験的に確認された。さらに、本発明のＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ＲＯＲ１の脱グリコシル化形態に結合し得る。さらに、これらは、従来技術に記載の抗ＲＯＲ１抗体と関連する多数の直鎖ペプチドに結合し得ない。したがって、目下記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、それらの従来技術の抗ＲＯＲ１抗体と比較してＲＯＲ１配列中の区別されるエピトープに結合すると考えられる。

【００６０】

癌細胞系への本発明のＲＯＲ１特異的抗原結合分子の結合及び内在化が実証された。これは、癌、具体的には、ＲＯＲ１を発現する癌の処置におけるそのような分子の使用についての潜在性を裏付ける。

【００６１】

いくつかのタイプの融合タンパク質を含め、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の種々の形態が記載される。免疫グロブリンＦｃ領域を含む融合タンパク質並びにホモ及びヘテロ二量体の両方も記載される。Ｆｃドメインへのタンパク質の融合は、タンパク質溶解性及び安定性を改善し、血漿半減期を顕著に増加させ、全体的な治療有効性を改善し得る。

【００６２】

本発明者らは、種々の部分及びペイロードにコンジュゲートしているＶＮＡＲ分子も作出した。したがって、本発明は、化学的コンジュゲートＶＮＡＲも提供する。より具体的には、いくつかのコンジュゲートフォーマットのＲＯＲ１特異的抗原結合分子が提供される。

【００６３】

第１の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：

ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４　（Ｉ）

（式中、

ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）、ＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹ（配列番号１１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹ（配列番号１２）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹ（配列番号１３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹ（配列番号１４）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹ（配列番号１５）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹ（配列番号１６）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹ（配列番号１７）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹ（配列番号１８）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹ（配列番号１９）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹ（配列番号２１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹ（配列番号２２）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；

ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＤＬＳＡ（配列番号２）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり、

ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；

ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；

ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）及びＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；

ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；

ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）及びＮＫＧＴＭ（配列番号９）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；

ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；

ＦＷ４は、フレームワーク領域であり；

ＣＤＲ３がＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）である場合、ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ

（配列番号４）からなる群から選択される）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子を提供する。
【００６４】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）、ＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹ（配列番号１１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹ（配列番号１２）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹ（配列番号１３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹ（配列番号１４）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹ（配列番号１５）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹ（配列番号１６）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹ（配列番号１７）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹ（配列番号１９）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹ（配列番号２１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹ（配列番号２２）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列である。
【００６５】
ＣＤＲ３がＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）でない場合、ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＤＬＳＡ（配列番号２）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり得る。したがって、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、式（Ｉ）：
ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４　（Ｉ）
（式中、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）、ＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹ（配列番号１１）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹ（配列番号１２）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹ（配列番号１３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹ（配列番号１４）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹ（配列番号１５）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹ（配列番号１６）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹ（配列番号１７）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹ（配列番号１８）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹ（配列番号１９）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹ（配列番号２１）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹ（配列番号２２）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）、ＧＡＮＹＤＬＳＡ（配列番号２）、ＧＡＮＹＧＬＳＡ（配列番号３）及びＧＡＮＹＤＬＡＡ（配列番号４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）及びＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）及びＮＫＧＴＭ（配列番号９）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列を含むと定義され得る。
【００６６】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）及びＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり、及び／又は

ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）及びＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列である。
【００６７】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列である。
【００６８】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＧＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号１）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳ（配列番号６）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び
ＨＶ４は、ＮＫＲＴＭ（配列番号８）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である。
【００６９】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＭ（配列番号９）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である。
【００７０】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＣＤＲ３は、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹ（配列番号１０）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＣＤＲ１は、ＤＡＮＹＧＬＡＡ（配列番号５）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＨＶ２は、ＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳ（配列番号７）によるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；及び
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＭ（配列番号９）によるアミノ酸配列を有する超可変配列である。
【００７１】
好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
本明細書においてＧ３ＣＰと称される
（化５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）；
本明細書においてＢ１Ｇ４と称される
（化６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）；
本明細書において１Ｅ２と称される
（化７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＳＧＡＧＡＰＲＰＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５２）；
本明細書において１Ｅ５と称される

（化８）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＣＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５３）；
本明細書において１Ｂ１１と称される
（化９）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５４）；
本明細書においてＣ３ＣＰと称される
（化１０）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５５）；
本明細書において２Ｇ５と称される
（化１１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５６）；
本明細書において１Ｇ１２と称される
（化１２）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５７）；
本明細書においてＧ５ＣＰと称される
（化１３）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５８）；
本明細書において２Ｆ４と称される
（化１４）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ　（配列番号５９）；
本明細書において１Ｇ９と称される
（化１５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６０）；
本明細書において１Ｈ８と称される
（化１６）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６１）；
本明細書においてＧ１１ＣＰと称される
（化１７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６２）；
本明細書においてＤ９ＣＰと称される

（化１８）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６３）；
本明細書において１Ｂ６と称される
（化１９）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６４）；
本明細書において１Ｆ１０と称される
（化２０）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６５）；
本明細書においてＥ６ＣＰと称される
（化２１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６６）；
本明細書においてＦ２ＣＰと称される
（化２２）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６７）；
本明細書においてＢ６ＣＰと称される
（化２３）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＤＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６８）；
本明細書において１Ｇ１と称される
（化２４）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６９）；及び
本明細書においてＡ１０ＣＰと称される
（化２５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＳＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号７０）
からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれらのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、それらのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む。

【００７２】

特に好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化２６）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）
によるアミノ酸配列を含み得る。

【００７３】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化２７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）
によるアミノ酸配列又は配列番号５０によるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、配列番号５０の組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有するその機能的バリアントを含み得る。
【００７４】
配列番号５０（「Ｇ３ＣＰ」）及びその機能的バリアントと関連する特定の利点としては、それらのタンパク質のための非最適化水性緩衝液系における発現収率及び親水性の増加並びに分析、精製の容易性及び単量体性の増加が挙げられる。理論により拘束されるものではないが、これらの利点は、Ｇ３ＣＰ配列又はその機能的バリアントを含むＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合タンパク質において特に明白であり得る。したがって、Ｇ３ＣＰ配列及びその機能的バリアントは、改善された製造及び／又は取扱特性を提供し得る。さらに、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃは、細胞毒性アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体にコンジュゲートされている場合、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）の患者由来ゼノグラフトモデルにおいて優れたインビボ有効性を示す。驚くべきことに、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃの効果は、それ自体が優れたインビボ有効性を示すＢ１－ｈＦｃに対しても改善される。
【００７５】
特に好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化２８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）
によるアミノ酸配列を含み得る。
【００７６】
配列番号５１（「Ｂ１Ｇ４」）及びその機能的バリアントと関連する特定の利点としては、Ｂ１Ｇ４配列又はその機能的バリアントを含む融合タンパク質、例えばＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合タンパク質のための水性緩衝液系における発現収率及び単量体性の増加が挙げられる。したがって、Ｂ１Ｇ４配列及びその機能的バリアントは、改善された製造及び／又は取扱特性を有する融合タンパク質を提供し得る。
【００７７】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化２９）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）
によるアミノ酸配列又は配列番号５１によるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、配列番号５１の組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有するその機能的バリアントを含み得る。
【００７８】
好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
本明細書においてＧ３ＣＰ　Ｇ４と称される
（化３０）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ

ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）；
本明細書においてＧ３ＣＰ　Ｖ１５と称される
（化３１）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７２）；
本明細書において１Ｈ８　Ｇ４と称される
（化３２）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７３）；
本明細書において１Ｈ８　Ｖ１５と称される
（化３３）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７４）；
本明細書においてＣ３ＣＰ　Ｇ４と称される
（化３４）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７５）；及び
本明細書においてＣ３ＣＰＶ１５と称される
（化３５）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７６）
からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれらのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、それらのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む。

【００７９】
特に好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化３６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）
によるアミノ酸配列を含み得る。

【００８０】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
（化３７）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）
によるアミノ酸配列又は配列番号７１によるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、配列番号７１の組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有するその機能的バリアントを含み得る。

【００８１】
配列番号７１（「Ｇ３ＣＰ　Ｇ４」）及びその機能的バリアントと関連する特定の利点としては、それらのタンパク質のための非最適化水性緩衝液系における発現収率及び親水

性の増加並びに分析、精製の容易性及び単量体性の増加が挙げられる。理論により拘束されるものではないが、これらの利点は、Ｇ３ＣＰ　Ｇ４配列又はその機能的バリアントを含むＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合タンパク質において特に明白であり得る。したがって、Ｇ３ＣＰ　Ｇ４配列及びその機能的バリアントは、改善された製造及び／又は取扱特性を提供し得る。さらに、Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃは、細胞毒性アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体にコンジュゲートされている場合、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）の患者由来ゼノグラフトモデルにおいて優れたインビボ有効性を示す。驚くべきことに、Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃの効果は、それ自体が優れたインビボ有効性を示すＢ１－ｈＦｃに対しても改善される。

【００８２】

Ｇ３ＣＰ及びＧ３ＣＰＧ４の配列は、Ｂ１の配列に対する２つの単一アミノ酸変化を共通して有する。これらは、両方ともＣＤＲ３内に存在し、

１．Ｗ残基のＹ残基における、及び

２．Ｌ残基のＮ残基における

置換である。

【００８３】

Ｇ３ＣＰと比較して、Ｇ３ＣＰＧ４は、Ｂ１に対するＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４の各々の中のさらなる単一アミノ酸変化（Ｂ１　Ｇ４中でも出現する）並びにフレームワーク領域をヒト化する変化（その一部は、図１５に示されるとおりＢ１Ｖ１５、配列番号１１５中でも出現し、Ｂ１Ｖ１５は、Ｂ１と同じＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ３配列を有し、すなわち、これは、ルーブライブラリーバリアントでなく；Ｂ１に対するＢ１Ｖ１５の変化は、フレームワーク領域中のみに存在する）を有する。

【００８４】

理論により拘束されるものではないが、Ｂ１　Ｇ４によってもＢ１　Ｖ１５によっても示されない、Ｇ３ＣＰ及びＧ３ＣＰＧ４の両方により示されるＢ１に対する任意の改善は、それらがＣＤＲ３中で共有する２つの突然変異の一方又は両方から生じると考えられる。したがって、Ｇ３ＣＰ及びＧ３ＣＰＧ４の利点は、配列ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）を含むＣＤＲ３に由来すると考えられる。

【００８５】

理論により拘束されるものではないが、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹ（配列番号２３）と関連する驚くべき利点は、ＷからＹへの及びＬからＮへの置換の両方の相乗効果を表し得る。代わりに、驚くべき利点は、主にＷからＹへの置換に由来し得、したがって、ＹＰＷＧＡＧＡＰＹＬＶＱＷＹ（配列番号２０）により共有される。１Ｂ６はＬからＮへの突然変異を有し、ＹＰＷＧＡＧＡＰＷＮＶＱＷＹ（配列番号２４）のＣＤＲ３配列はＢ１よりも低い溶出容量を有し、したがって、ＣＤＲ３中のＬからＮへの突然変異は改善された製造及び／又は取扱特性をもたらす。

【００８６】

第２の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：

ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４　（Ｉ）

（式中、

ＣＤＲ１は、ＧＴＲＹＧＬＹＳ（配列番号２５）、ＧＴＲＹＧＬＹＳＳ（配列番号２６）、ＤＴＲＹＡＬＹＳ（配列番号２７）、ＤＴＲＹＡＬＹＳＳ（配列番号２８）、ＧＴＫＹＧＬＹＡ（配列番号２９）及びＧＴＫＹＧＬＹＡＳ（配列番号３０）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；

ＦＷ１は、フレームワーク領域であり；

ＦＷ２は、フレームワーク領域であり；

ＨＶ２は、ＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳ（配列番号３１）、ＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧ（配列番号３２）、ＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧ（配列番号３３）及びＳＴＤＫＥＲＩＩＩＧ（配列番号３４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；

ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり；
ＨＶ４は、ＮＫＧＴＫ（配列番号３５）、ＮＫＧＳＫ（配列番号３６）、ＮＮＧＴＫ（配列番号３７）及びＮＮＲＳＫ（配列番号３８）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する超可変配列であり；
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり；
ＣＤＲ３は、ＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹ（配列番号３９）によるアミノ酸配列を有するＣＤＲ配列であり；
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）
によって表されるアミノ酸配列を含む受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子を提供する。

【００８７】
好ましい実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３と称される
（化３８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７７）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３．Ｓと称される
（化３９）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７８）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＣ６と称される
（化４０）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＲＹＡＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７９）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＣ６．Ｓと称される
（化４１）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＲＹＡＬＹＳＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＥＥＲＩＳＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８０）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＧ８と称される
（化４２）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８１）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＧ８．Ｓと称される
（化４３）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＰＮＫＤＲＭＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８２）；
本明細書においてＰ３Ａ１　Ｇ１　ＡＦ７．Ｓと称される
（化４４）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＫＹＧＬＹＡＳＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＴＤＫＥＲＩＩＩＧＧＲＹＳＥＳＶＮＮＲＳＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号８３）
からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれらのいずれかによるＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ２配列を有し、それらのいずれかの組み合わせＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列と少なくとも４５％の組み合わせ配列同一性を有するＦＷ１

、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４配列を有する機能的バリアントを含む。

【００８８】

Ｐ３Ａ１Ｇ１の親和性成熟バリアント及びその機能的バリアントと関連する特定の利点としては、実施例により説明されるとおり、親Ｐ３Ａ１Ｇ１と比較したｈＲＯＲ１－Ｆｃへの結合の改善が挙げられる。

【００８９】

ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、以下の表１に示されるクローンのＣＤＲ及びＨＶ配列を含み得る。本発明の第１及び／又は第２の好ましい態様において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、以下の表１に示されるクローンのいずれかの組み合わせ配列を有する。

【００９０】

【表１】

表１ - B1 ループバリアント

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
B1	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYG LAA（配列番号 1)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPWGAG APWLVQ WY（配列番号 10)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
B1G4	TRVDQSPSS LSASVGDRV TITCVLT（配列番号 41)	DANYG LAA（配列番号 5)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNKER ISIS（配列番号 7)	GRYSES V（配列番号 45)	NKGT M（配列番号 9)	SFTLTISSL QPEDSATY YCRA（配列番号 46)	YPWGAG APWLVQ WY（配列番号 10)	DGAGTKV EIK（配列番号 49)
1E2	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYD LSA（配列番号 2)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPSGAGA PRPVQW Y（配列番号 11)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
1E5	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYG LAA（配列番号 1)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPWGAG APCLVQ WY（配列番号 12)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
1B11	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYG LAA（配列番号 1)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPWGAG APRLVQ WY（配列番号 13)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
C3CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYG LAA（配列番号 1)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPWGAG APRQVQ WY（配列番号 14)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
2G5	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号 40)	GANYG LSA（配列番号 3)	TYWYRK NPG（配列番号 43)	SSNQER ISIS（配列番号 6)	GRYVES V（配列番号 44)	NKRT M（配列番号 8)	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号 84)	YPWGAG APRSVQ WY（配列番号 15)	DGAGTVLT VN（配列番号 48)
1G12	ASVNQTPRT	GANYG	TYWYRK	SSNQER	GRYVES	NKRT	SFSLRIKDL	YPWGAG	DGAGTVLT

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
	ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	LAA（配列番号1）	NPG（配列番号43）	ISIS（配列番号6）	V（配列番号44）	M（配列番号8）	TVADSATY YCKA（配列番号84）	APRSVQ WY（配列番号15）	VN（配列番号48）
G5CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APSLVQW Y（配列番号16）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
2F4	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LSA（配列番号3）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APSNVQ WY（配列番号17）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
1G9	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APSQVQ WY（配列番号18）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
1H8	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APSSVQ WY（配列番号19）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
G11CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LSA（配列番号3）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWLVQ WY（配列番号10）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
D9CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYD LAA（配列番号4）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWLVQ WY（配列番号10）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
1B6	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V(配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWNVQ WY（配列番号24）	DGAGTVLT VN（配列番号48）

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
1F10	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWQVQ WY（配列番号21）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
E6CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LSA（配列番号3）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWQVQ WY（配列番号21）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
F2CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYD LAA（配列番号4）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWQVQ WY（配列番号21）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
B6CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYD LAA（配列番号4）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWSVQ WY（配列番号22）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
1G1	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWSVQ WY（配列番号22）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
A10CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LSA（配列番号3）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APWSVQ WY（配列番号22）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
G3CP	ASVNQTPRT ATKETGESL TINCVVT（配列番号40）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYVES V（配列番号44）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRIKDL TVADSATY YCKA（配列番号84）	YPWGAG APYNVQ WY（配列番号23）	DGAGTVLT VN（配列番号48）
G3CP G4	TRVDQSPSS LSASVGDRV TITCVLT（配列番号41）	DANYG LAA (SEQ IS NO: 5)	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNKER ISIS（配列番号7）	GRYSES V（配列番号45）	NKGT M（配列番号9）	SFTLTISSL QPEDSATY YCRA（配列番号46）	YPWGAG APYNVQ WY（配列番号23）	DGAGTKV EIK（配列番号49）

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
G3CP V15	ASVTQSPRS ASKETGESL TITCRVT（配列番号42）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYSES V（配列番号45）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRISSL TVEDSATY YCKA（配列番号47）	YPWGAG APYNVQ WY（配列番号23）	DGQGTKL EVK（配列番号85）
1H8 G4	TRVDQSPSS LSASVGDRV TITCVLT（配列番号41）	DANYG LAA（配列番号5）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNKER ISIS（配列番号7）	GRYSES V（配列番号45）	NKGT M（配列番号9）	SFTLTISSL QPEDSATY YCRA（配列番号46）	YPWGAG APSSVQ WY（配列番号19）	DGAGTKV EIK（配列番号49）
1H8 V15	ASVTQSPRS ASKETGESL TITCRVT（配列番号42）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYSES V（配列番号45）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRISSL TVEDSATY YCKA（配列番号47）	YPWGAG APSSVQ WY（配列番号19）	DGQGTKL EVK（配列番号85）
C3CP G4	TRVDQSPSS LSASVGDRV TITCVLT（配列番号41）	DANYG LAA（配列番号5）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNKER ISIS（配列番号7）	GRYSES V（配列番号45）	NKGT M（配列番号9）	SFTLTISSL QPEDSATY YCRA（配列番号46）	YPWGAG APRQVQ WY（配列番号14）	DGAGTKV EIK（配列番号49）
C3CP V15	ASVTQSPRS ASKETGESL TITCRVT（配列番号42）	GANYG LAA（配列番号1）	TYWYRK NPG（配列番号43）	SSNQER ISIS（配列番号6）	GRYSES V（配列番号45）	NKRT M（配列番号8）	SFSLRISSL TVEDSATY YCKA（配列番号47）	YPWGAG APRQVQ WY（配列番号14）	DGQGTKL EVK（配列番号85）

【００９１】

ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、以下の表２に示されるクローンのＣＤＲ及びＨＶ配列を含み得る。本発明の第１及び／又は第２の好ましい態様において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、以下の表２に示されるクローンのいずれかの組み合わせ配列を有する。

【００９２】

【表２】

表２-P3A1G1バリアント配列

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
P3A1 G1 AE3	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	GTRY GLYS（配列番号25）	TYWYR KNPG（配列番号43）	SSDEE RISIS（配列番号31）	GRYSES V（配列番号45）	NKGTK（配列番号35）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）
P3A1 G1 AE3.S	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	GTRY GLYSS（配列番号26）	TYWYR KNPG（配列番号43）	SSDEE RISIS（配列番号31）	GRYSES V（配列番号45）	NKGTK（配列番号35）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）
P3A1 G1 NAC6	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	DTRYA LYS（配列番号27）	TYWYR KNPG（配列番号43）	STDEE RISIG（配列番号32）	GRYSES V（配列番号45）	NKGSK（配列番号36）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）
P3A1 G1 NAC6.S	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	DTRYA LYSS（配列番号28）	TYWYR KNPG（配列番号43）	STDEE RISIG（配列番号32）	GRYSES V（配列番号45）	NKGSK（配列番号36）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）
P3A1 G1 NAG8	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	GTKY GLYA（配列番号29）	TYWYR KNPG（配列番号43）	SPNK DRMII G（配列番号33）	GRYSES V（配列番号45）	NNGTK（配列番号37）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）

クローン名	FW1	CDR1	FW2	HV2	FW3a	HV4	FW3b	CDR3	FW4
P3A1 G1 NAG8.S	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	GTKY GLYAS（配列番号30）	TYWYR KNPG（配列番号43）	SPNK DRMII G（配列番号33）	GRYSES V（配列番号45）	NNGTK（配列番号37）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）
P3A1 G1 AF7.S	TRVDQS PSSLSA SVGDR VTITCV LT（配列番号41）	GTKY GLYAS（配列番号30）	TYWYR KNPG（配列番号43）	STDK ERIIIG（配列番号34）	GRYSES V（配列番号45）	NNRSK（配列番号38）	SFTLTIS SLQPED SATYYC RA（配列番号46）	REARH PWLRQ WY（配列番号39）	DGAGT KVEIK（配列番号49）

【００９３】
本明細書に列記されるフレームワーク領域、相補性決定領域及び超可変領域の全ての考えられる組み合わせ及び並べ替えは、本明細書において明示的に企図される。
【００９４】
本発明の分子に関連して言及される配列同一性は、個々のＣＤＲ、ＨＶ若しくはＦＷ、組み合わせＣＤＲ、ＨＶ若しくはＦＷのレベルで判断され得るか、又はそれは、分子全体の長さにわたり判断され得る。記載されるＣＤＲ、ＨＶ及びＦＷ配列は、より長くても又は短くてもよく、配列のＮ又はＣ末端におけるアミノ酸の付加又は欠失によるものか、配列でのアミノ酸の挿入又は欠失かを問わない。
【００９５】
フレームワーク領域ＦＷ１は、好ましくは、２０～２８アミノ酸長、より好ましくは２２～２６アミノ酸長、一層より好ましくは２３～２５アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ１は、２６アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ１は、２５アミノ酸長である。他の一層好ましい実施形態において、ＦＷ１は、２４アミノ酸長である。
【００９６】
代替的な定義において、ＣＤＲ領域ＣＤＲ１は、好ましくは、７～１１アミノ酸長、より好ましくは８～１０アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＣＤＲ１は、９アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＣＤＲ１は、８アミノ酸長である。
【００９７】
フレームワーク領域ＦＷ２は、好ましくは、６～１４アミノ酸長、より好ましくは８～１２アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ２は、１２アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ２は、１０アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ２は、９アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ２は、８アミノ酸長である。
【００９８】
代替的な定義において、超可変配列ＨＶ２は、好ましくは、４～１１アミノ酸長、より好ましくは５～１０アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＨＶ２は、１０アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＨＶ２は、９アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＨＶ２は、６アミノ酸長である。

【００９９】
フレームワーク領域ＦＷ３ａは、好ましくは、６～１０アミノ酸長、より好ましくは７～９アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ３ａは、８アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ３ａは、７アミノ酸長である。
【０１００】
代替的な定義において、超可変配列ＨＶ４は、好ましくは、３～７アミノ酸長、より好ましくは４～６アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＨＶ４は、５アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＨＶ４は、４アミノ酸長である。
【０１０１】
フレームワーク領域ＦＷ３ｂは、好ましくは、１７～２４アミノ酸長、より好ましくは１８～２３アミノ酸長、一層より好ましくは１９～２２アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ３ｂは、２１アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ３ｂは、２０アミノ酸長である。
【０１０２】
代替的な定義において、ＣＤＲ領域ＣＤＲ３は、好ましくは、８～２１アミノ酸長、より好ましくは９～２０アミノ酸長、一層より好ましくは１０～１９アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＣＤＲ３は、１７アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＣＤＲ３は、１４アミノ酸長である。さらなる他の好ましい実施形態において、ＣＤＲ３は、１２アミノ酸長である。他の一層好ましい実施形態において、ＣＤＲ３は、１０アミノ酸長である。
【０１０３】
フレームワーク領域ＦＷ４は、好ましくは、７～１４アミノ酸長、より好ましくは８～１３アミノ酸長、一層より好ましくは９～１２アミノ酸長である。ある好ましい実施形態において、ＦＷ４は、１２アミノ酸長である。他の好ましい実施形態において、ＦＷ４は、１１アミノ酸長である。他の一層好ましい実施形態において、ＦＷ４は、１０アミノ酸長である。さらに他の好ましい実施形態において、ＦＷ４は、９アミノ酸長である。
【０１０４】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＦＷ１は、２０～２８アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ２は、６～１４アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ３ａは、６～１０アミノ酸のフレームワーク領域であり；
ＦＷ３ｂは、１７～２４アミノ酸のフレームワーク領域であり；及び／又は
ＦＷ４は、７～１４アミノ酸のフレームワーク領域である。
【０１０５】
ＲＯＲ１特異的抗原結合分子の一実施形態において、
ＦＷ１は、ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴ（配列番号４０）、ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴ（配列番号４１）及びＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴ（配列番号４２）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそれらのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ２は、ＴＹＷＹＲＫＮＰＧ（配列番号４３）によるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ３ａは、ＧＲＹＶＥＳＶ（配列番号４４）及びＧＲＹＳＥＳＶ（配列番号４５）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそれらのいずれかの機能的バリアントを有し；
ＦＷ３ｂは、ＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡ（配列番号８４）、ＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡ（配列番号４６）及びＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴＹＹＣＫＡ（配列番号４７）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそれらのいずれかの機能的バリアントを有し；及び／又は
ＦＷ４は、ＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号４８）、ＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号４

９）若しくはＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号８５）からなる群から選択されるアミノ酸配列又は少なくとも４５％の配列同一性を有するそれらのいずれかの機能的バリアントを有する。

【０１０６】

本発明のＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ヒト化され得る。本発明のＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、脱免疫化され得る。本明細書に記載のヒト化骨格Ｇ４及びＶ１５上のＢ１ループバリアントは、ヒト化されている。Ｐ３Ａ１Ｇ１が既にヒト化されている場合、Ｐ３Ａ１Ｇ１の全てのループバリアントはヒト化されている。本発明のヒト化配列の例としては、限定されるものではないが、

Ｂ１Ｇ４
Ｇ３ＣＰ　Ｇ４
Ｇ３ＣＰ　Ｖ１５
１Ｈ８　Ｇ４
１Ｈ８　Ｖ１５
Ｃ３ＣＰ　Ｇ４
Ｃ３ＣＰＶ１５
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３．Ｓ
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＣ６
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＣ６．Ｓ
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＧ８
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＮＡＧ８．Ｓ
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＡＦ７．Ｓ

が挙げられる。

【０１０７】

本明細書に記載のヒト化ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、例えば、さらなるＦＷ領域アミノ酸をＤＰＫ－９のアミノ酸で置換することによりさらにヒト化され得ることが当業者により認識される。

【０１０８】

本発明のＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、検出可能な標識、色素、毒素、薬物、プロドラッグ、放射性核種又は生物学的活性分子にコンジュゲートされ得る。

【０１０９】

好ましくは、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体２（ＲＯＲ２）に結合しない。より好ましくは、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ヒトＲＯＲ１及びマウスＲＯＲ１（ｍＲＯＲ１）の両方に結合する。さらにより好ましくは、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、脱グリコシル化ＲＯＲ１に結合する。

【０１１０】

本発明のあるＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、

ＹＭＥＳＬＨＭＱＧＥＩＥＮＱＩ（配列番号９１）
ＣＱＰＷＮＳＱＹＰＨＴＨＴＦＴＡＬＲＦＰ（配列番号９２）
ＲＳＴＩＹＧＳＲＬＲＩＲＮＬＤＴＴＤＴＧＹＦＱ（配列番号９３）
ＱＣＶＡＴＮＧＫＥＶＶＳＳＴＧＶＬＦＶＫＦＧＰＰＰＴＡＳＰＧＹＳＤＥＹＥ（配列番号９４）

から選択される直鎖ペプチド配列に結合し得ない。

【０１１１】

好ましくは、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、およそ０．０１～５０ｎＭ、好ましくは０．１～３０ｎＭ、一層より好ましくは０．１～１０ｎＭの親和性定数でＲＯＲ１タンパク質と選択的に相互作用する。親和性定数は、バイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）により測定され得る。単量体について、相互作用は１：１である。ＶＮＡＲ－ｈＦｃフォーマットについて、本発明者らは２つのアプローチを使用した。一方は、ＲＯＲ１を固定化し、した

がって、アビディティ効果が働くため二価ＶＮＡＲ－ｈＦｃが見かけのＫＤで結合するものである。他方のアプローチは、１：１フォーマットであり、ＶＮＡＲ－ｈＦｃを固定化し、ＲＯＲ１をその表面上に流動させ、したがって、「真の」１：１結合についてのＫＤを与えるものである。典型的には、本明細書において使用される場合、親和性定数は、１：１結合フォーマットを使用してバイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）により測定されるものを指す。この方法により、例えば、Ｇ３ＣＰ及びＧ３ＣＰ　Ｇ４は、０．１～１０ｎＭの範囲内である。Ｐ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントのうち、例は、５．０ｎＭ（ＡＥ３）、１３．８ｎＭ（ＮＡＣ６）及び１２．２ｎＭ（ＮＡＧ８）のＫＤ値を有する。

【０１１２】

さらに、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、好ましくは、ＲＯＲ１発現腫瘍細胞の殺傷を媒介し得るか又は癌細胞増殖を阻害し得る。

【０１１３】

ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ＲＯＲ１への結合時にもエンドサイトーシスされ得る。他の実施形態において、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、ＲＯＲ１に結合時にエンドサイトーシスされ得ない。

【０１１４】

本発明の第３の態様において、第１又は第２の態様の特異的抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質が提供される。好ましくは、第３の態様の組換え融合タンパク質において、特異的抗原結合分子は、１つ以上の生物学的活性タンパク質に融合されている。特異的抗原結合分子は、１つ以上のリンカードメインを介して１つ以上の生物学的活性タンパク質に融合され得る。好ましいリンカーとしては、限定されるものではないが、［Ｇ４Ｓ］ｘ（式中、ｘは、１、２、３、４、５又は６である）が挙げられる。特定の好ましいリンカーは、［Ｇ４Ｓ］３（配列番号８６）及び［Ｇ４Ｓ］５（配列番号８７）である。他の好ましいリンカーとしては、配列ＰＧＶＱＰＳＰ（配列番号８８）、ＰＧＶＱＰＳＰＧＧＧＳ（配列番号８９）及びＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳ（配列番号９０）が挙げられる。これらのリンカーは、組換え融合タンパク質が、グリコシル化パターンが異なる発現系、例えばＣＨＯ及び昆虫並びに発現タンパク質をグリコシル化しない発現系（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））中で発現される場合、特に有用であり得る。［Ｇ４Ｓ］３リンカーを含む本明細書に開示される任意の組換え融合タンパク質配列は、任意の他の本明細書に開示されるリンカー配列を代替的に有し得る。

【０１１５】

本発明の融合タンパク質は、任意の順序で構築され得、すなわち、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子は、Ｎ末端、Ｃ末端に存在するか又はいずれの末端にも存在しない（例えば、より長いアミノ酸配列の内部に存在する）ことも認識される。

【０１１６】

好ましい生物学的活性タンパク質としては、限定されるものではないが、免疫グロブリン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン又は足場タンパク質（ａｆｆｉｂｏｄｙ、ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ｄａｒｐｉｎなど）が挙げられる。他の好ましい生物学的活性タンパク質は、免疫グロブリンＦｃ領域である。他の好ましい融合タンパク質としては、ＶＮＡＲ－ＶＮＡＲ及びＶＮＡＲ－ＶＮＡＲ－ＶＮＡＲが挙げられる。

【０１１７】

一実施形態において、少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、免疫グロブリンＦｃ領域である。

【０１１８】

したがって、組換え融合タンパク質は、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８３、配列番号１８４又は配列番号１８５による配列を含み得る。

Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ
（化４５）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１８６）
Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ
（化４６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１８７）
１Ｈ８－ｈＦｃ
（化４７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１８３）
１Ｈ８　Ｇ４－ｈＦｃ
（化４８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１８４）
１Ｈ８　Ｖ１５－ｈＦｃ
（化４９）

ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１８５）

【０１１９】

さらなる実施形態において、少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、ＳからＣへの突然変異を含むようにさらに改変された免疫グロブリンＦｃ領域である。

【０１２０】

したがって、組換え融合タンパク質は、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８１又は配列番号１８２による配列を含み得る。

Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ）
（化５０）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１７８）
Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ）
（化５１）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番
号１７９）
１Ｈ８－ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ）
（化５２）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ

ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１８０）
１Ｈ８　Ｇ４－ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ）
（化５３）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１８１）
１Ｈ８　Ｖ１５－ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ）
（化５４）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１８２）
【０１２１】
一実施形態において、少なくとも１つの生物学的活性タンパク質は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される免疫グロブリンＦｃ領域の断片である。
【０１２２】
一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、Ｆｃ重鎖である。
【０１２３】
一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている。
【０１２４】
本明細書において使用される場合、「二量体化するように人工操作されている」免疫グロブリンＦｃ領域は、少なくとも１つのアミノ酸置換を含み得る。典型的には、少なくとも１つのアミノ酸置換は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片との相互作用及び／又は会合を促進し、且つ／又はよりエネルギー的に好ましくし、したがって、それが二量体化を促進し、且つ／又は二量体化をよりエネルギー的に好ましくする。このような組換え融合タンパク質は、二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーの調製において特定の有用性を有し得る。
【０１２５】
二量体化するように人工操作されている２つの区別されるＦｃ重鎖の対形成を介してＦｃベース二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーを生成する方法は、当技術分野において公知である。これらの方法は、各々が標的結合ドメイン又は異なる結合特徴を有する配列に融合している２つの異なる重鎖からのＦｃ領域のアセンブルを可能にする。標的結合ドメイン又は配列は、多重特異的バインダーを生成するために異なる標的に指向され、且つ／又はバイパラトピック結合タンパク質を生成するために同じ標的上の異なる領域若しくはエピトープに指向され得る。複数の結合ドメイン又は配列が、多重特異的若

しくはマルチパラトピックバインダー又は両方の多重特異的マルチパラトピックバインダーを同じタンパク質内に作出するためにＦｃ領域に融合され得る。２つの異なるＦｃ重鎖又はその断片のヘテロ二量体化を介してこれらの非対称二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーを生成する方法としては、限定されるものではないが、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂが挙げられる。例えば、Ｂｒｉｎｋｍａｎ＆Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ，（２０１７）ｍＡｂｓ，９：２，１８２－２１２；Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ（２０１２）ｍＡｂｓ ４：６，６５３－６６３；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ（２０１９）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，８，４３；及びＤｉｅｔｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ（２０２０）ＢＢＡ－Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ １８６８ １４０２５０を参照されたく；それらの各々は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【０１２６】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている。これらの方法の各々の特徴は、本発明の第４の態様に関して詳述され、同様に本発明の第３の態様に関連すると企図される。

【０１２７】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのヘテロ二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む。

【０１２８】

一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される。

【０１２９】

一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される。

【０１３０】

本発明の融合タンパク質の任意の部分は、コンジュゲーションを可能にするために人工操作され得る。免疫グロブリンＦｃ領域が使用される好ましい一例において、これは、コンジュゲーション部位としてシステイン残基を含むように人工操作され得る。好ましい導入システイン残基としては、限定されるものではないが、Ｓ２５２Ｃ及びＳ４７３Ｃ（Ｋａｂａｔナンバリング）が挙げられ、それらはそれぞれＥＵナンバリングにおけるＳ２３９Ｃ及びＳ４４２Ｃに対応する。一部の実施形態において、本明細書に開示される融合タンパク質のいずれも、Ｓ２３９Ｃ点突然変異を含み得る。一部の実施形態において、本明細書に開示される融合タンパク質のいずれも、Ｓ４４２Ｃ点突然変異を含み得る。一部の実施形態において、本明細書に開示される融合タンパク質のいずれも、Ｓ２３９Ｃ及びＳ４４２Ｃ点突然変異の両方を含み得る。本明細書に開示される融合タンパク質のいずれの配列も、Ｓ２３９Ｃ及び／又はＳ４４２Ｃ点突然変異を含むように改変され得ることが本明細書において明示的に企図される。

【０１３１】

第３の態様によれば、複数のＶＮＡＲドメインを含む組換え融合体が提供される。したがって、本発明の組換え融合体は、ＶＮＡＲの二量体、三量体又はより高次の多量体であり得る。このような組換え融合体において、各ＶＮＡＲの特異性は、同じ又は異なり得る。本発明の組換え融合体としては、限定されるものではないが、各ＶＮＡＲドメインが異

なる抗原に結合するか、又は単一抗原上の異なるエピトープに結合する（バイパラトピックバインダー）二重特異的又は三重特異的分子が挙げられる。本明細書において使用される「バイパラトピック」という用語は、所与の抗原上の複数のエピトープに結合する分子を包含することが意図される。所与の抗原上の３つ以上のエピトープに結合する分子も本明細書において企図され、「バイパラトピック」という用語が使用される場合、トリパラトピック又はマルチパラトピック分子の可能性も企図されることが理解されるべきである。

【０１３２】

第３の態様によれば、第１の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子及びヒト化ＶＮＡＲドメインを含む組換え融合体も提供される。ヒト化ＶＮＡＲドメインは、ｓｏｌｏＭＥＲと称され得、それとしては、限定されるものではないが、高い親和性でヒト血清アルブミンに結合するヒト化ＶＮＡＲであるＶＮＡＲ　ＢＡ１１が挙げられる。

【０１３３】

バイパラトピック及び多価融合タンパク質の例としては、限定されるものではないが、

・Ｂ１－Ｇ３ＣＰ
・Ｇ３ＣＰ－ＢＡ１１
・ＢＡ１１－Ｇ３ＣＰ
・１Ｈ８－ＢＡ１１
・ＢＡ１１－１Ｈ８
・Ｇ３ＣＰ　Ｖ１５－ＢＡ１１
・Ｇ３ＣＰ　Ｇ４－ＢＡ１１
・Ｂ１－Ｇ３ＣＰ　Ｃｙｓ
・Ｇ３ＣＰ－ＢＡ１１　Ｃｙｓ
・ＢＡ１１－Ｇ３ＣＰ　Ｃｙｓ
・１Ｈ８－ＢＡ１１　Ｃｙｓ
・ＢＡ１１－１Ｈ８　Ｃｙｓ
・Ｇ３ＣＰ　Ｖ１５－ＢＡ１１　Ｃｙｓ
・Ｇ３ＣＰ　Ｇ４－ＢＡ１１　Ｃｙｓ
・Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰＧ４
・Ｇ３ＣＰＧ４（Ｌ２）－－Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３
・Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰＧ４　Ｃｙｓ
・Ｇ３ＣＰＧ４－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３　Ｃｙｓ
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ－（Ｌ２）－ＢＡ１１
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－ＢＡ１１－（Ｌ２）－１Ｈ８
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－１Ｈ８
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ　Ｃｙｓ
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ－（Ｌ２）－ＢＡ１１　Ｃｙｓ
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１　Ｃｙｓ
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－Ｇ３ＣＰ　Ｃｙｓ
・Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－ＢＡ１１－（Ｌ２）－１Ｈ８　Ｃｙｓ
・ＢＡ１１－（Ｌ２）－１Ｐ３Ａ１－（Ｌ２）－１Ｈ８　Ｃｙｓ

が挙げられ、

Ｇ３ＣＰは、

（化５５）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）

であり、
１Ｈ８は、
（化５６）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号６１）
であり、
Ｇ３ＣＰ　Ｇ４は、
（化５７）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）
であり、
Ｇ３ＣＰ　Ｖ１５は、
（化５８）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７２）
であり、
ＢＡ１１は、
（化５９）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号９５）
であり、
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３は、
（化６０）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ
（配列番号７７）
であり、
リンカーが定義されない場合、（－）は、リンカーＷｏｂｂｅ－Ｇ５Ｓに対応し、それは順にＰＧＶＱＰＳＰＧＧＧＧＧＳ（配列番号９６）であり、
－（Ｌ２）－は、リンカーＷｏｂｂｅ－Ｇ４Ｓ－ＧＭに対応し、それは順にＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳ（配列番号９０）であり、
Ｃｙｓ－は、Ｃｙｓ含有Ｃ末端タグ、例えばＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９７）に対応する。
【０１３４】
組換えバイパラトピック融合タンパク質二量体も、本明細書に開示される任意の組換え融合タンパク質、特に本明細書に開示されるループライブラリーバリアントを、Ｆｃ融合体の一方のアーム上に融合させることにより、且つ異なるＲＯＲ１エピトープに対するバインダーを他方上に融合させることにより作製され得る。
【０１３５】
ある実施形態において、本発明の特異的結合分子又は組換え融合体は、精製を支援するためのＮ又はＣ末端タグとともに発現され得る。例としては、限定されるものではないが、Ｈｉｓ６及び／又はＭｙｃが挙げられる。さらに、Ｎ又はＣ末端タグは、コンジュゲーション点として機能するための追加のシステイン残基を含むようにさらに人工操作され得る。したがって、本発明の全ての態様における特異的結合分子又は組換え融合体への言及は、種々のＮ又はＣ末端タグを有するそのような分子を包含し、それらのタグもコンジュ

ゲーションのための追加のシステインを含み得ることも意図されることが認識される。

【０１３６】

追加の組換え融合体が下記に列記される。リンカー及びＶＮＡＲ又は融合パートナーの全ての組み合わせが下記に列挙されているわけではないことが認識される。しかしながら、全てのそのような組み合わせは、本発明により明示的に包含される。

【０１３７】

【表３】

一価-BA11 融合体	二量体バイパラトピック BA11 融合体
BA11-G3CP	G3CP-P3A1G1 AE3-BA11
G3CP-BA11	P3A1G1 AE3-G3CP-BA11
BA11-G3CPG4	G3CP-BA11-P3A1G1 AE3
G3CPG4-BA1	P3A1G1 AE3-BA11-G3CP
P3A1G1 AE3-BA11	G3CPG4-P3A1G1 AE3-BA11
BA11-P3A1G1 AE3	P3A1G1 AE3-G3CPG4-BA11
	G3CPG4-BA11-P3A1G1 AE3
二価-BA11 融合体	P3A1G1 AE3-BA11-G3CPG4
P3A1G1 AE3-P3A1G1 AE3-BA11	B1G4-P3A1G1 AE3-BA11
BA11-P3A1G1 AE3-P3A1G1 AE3	P3A1G1 AE3-B1G4-BA11
P3A1G1 AE3-BA11-P3A1G1 AE3	B1G4-BA11-P3A1G1 AE3
G3CP-G3CP-BA11	P3A1G1 AE3-BA11-B1G4
G3CP-BA11-G3CP	
BA11-G3CP-G3CP	
G3CPG4-G3CPG4-BA11	
G3CPG4-BA11-G3CPG4	
BA11-G3CPG4-G3CPG4	
B1G4-B1G4-BA11	
B1G4-BA11-B1G4	
BA11-B1G4-B1G4	
バイパラトピック二量体	
G3CP-P3A1G1 AE3	
P3A1G1 AE3-G3CP	
G3CPG4-P3A1G1 AE3	
P3A1G1 AE3-G3CPG4	

【０１３８】

ＶＮＡＲドメイン間のリンカーは、優先的に、限定されるものではないが、（Ｇ４Ｓ）５（配列番号８７）、（Ｇ４Ｓ）３（配列番号８６）、（Ｇ４Ｓ）７（配列番号１１６）、ＰＧＶＱＰＳＰＧＧＧＧＳ（配列番号８９）（Ｗｏｂｂｅ－Ｇ４Ｓ）、ＰＧＶＱＰＡＰ

ＧＧＧＧＳ（配列番号９０）（Ｗｏｂｂｅ－Ｇ４Ｓ　ＧＭ）、ＰＧＶＱＰＣＰＧＧＧＧＧＳ（配列番号１７７）（ＷｏｂｂｅＣｙｓ－Ｇ４Ｓ）であり、異なるリンカーの異なる組み合わせが同じ構築物内で組み合わせられ得る。ＷｏｂｂｅＣｙｓ－Ｇ４Ｓ配列は、チオール媒介化学カップリング方針を使用するこのリンカー中でのタンパク質へのペイロードの部位選択的バイオコンジュゲーションを容易にするための単一システイン残基も含有する。バイオコンジュゲーションのためのこのリンカー配列の使用は有利である。それというのも、還元システインの再酸化及びキャッピングは最小であり、バイオコンジュゲーション反応において対応するコンジュゲートへのタンパク質の高い収率変換をもたらすためである。

【０１３９】

これにより、追加のＣ末端（又はＮ末端）タグ配列は、存在しても又はしなくてもよい。

【０１４０】

Ｃ末端タグとしては、限定されるものではないが、精製を容易にするためのポリ－ヒスチジン配列（例えば、Ｈｉｓ６）を含有するタグ、検出を可能にするためのｃ－Ｍｙｃ配列（例えば、ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号１１２））を含有するタグ及び／又はチオール反応性ペイロード及びプローブを使用する標識及びバイオコンジュゲーションを可能にするシステイン残基を含有するタグ並びにそれらの組み合わせが含まれる。優先的なＣ末端タグとしては、限定されるものではないが、

ＱＡＳＧＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９８）
ＱＡＣＧＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９９）
ＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９７）
ＡＡＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号１００）
ＡＣＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号１０１）
ＱＡＳＧＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０２）
ＱＡＣＧＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０３）
ＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０４）
ＡＡＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０５）
ＡＣＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０６）
ＱＡＳＧＡ（配列番号１０７）
ＱＡＣＧＡ（配列番号１０８）
ＱＡＣＫＡ（配列番号１０９）
ＡＣＡ（配列番号１１０）
ＳＡＰＳＡ（配列番号１１１）

が挙げられ、

ＧＳＣＰは、

（化６１）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮ（配列番号５０）

であり、

ＧＳＣＰ　Ｇ４は、

（化６２）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）

であり、

ＢＡ１１は、

（化６３）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ

ＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号９５）
であり、
Ｐ３Ａ１　Ｇ１　ＡＥ３は、
（化６４）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ
（配列番号７７）
であり、
Ｂ１Ｇ４は、
（化６５）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）
である。

【０１４１】

上記のとおり、ＶＮＡＲ及びリンカーの全ての組み合わせが、本明細書に明示的に包含される。ＶＮＡＲのヒト化誘導体も、本明細書に包含される。

【０１４２】

第３の態様によれば、第１の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子及び組換え毒素を含む組換え融合体も提供される。組換え毒素の例としては、限定されるものではないが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）外毒素ＰＥ３８及びジフテリア毒素が挙げられる。

【０１４３】

第３の態様によれば、第１の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子及び組換えＣＤ３結合タンパク質を含む組換え融合体も提供される。組換えＲＯＲ１及びＣＤ３結合薬剤の例としては、限定されるものではないが、
Ｂ１Ｇ４－［ＷＧＭ］－ＣＤ３
（化６６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱ
ＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡ
ＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡ
ＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧ
ＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬ
ＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番号１１７）
Ｇ３ＣＰ－［ＷＧＭ］－ＣＤ３
（化６７）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱ
ＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡ
ＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡ
ＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧ

ＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬ
ＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番号１１８）
Ｇ３ＣＰＧ４－［ＷＧＭ］－ＣＤ３
（化６８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱ
ＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡ
ＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳ
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡ
ＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧ
ＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬ
ＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番号１１９）
Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－［ＷＧＭ］－ＣＤ３
（化６９）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＤ
ＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰ
ＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭ
ＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧ
ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳ
ＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳ
ＨＨＨＨＨＨ（配列番号１２０）
Ｂ１Ｇ４－［ＷＧＭ］－ＢＡ１１－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７０）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫ
ＮＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡ
ＴＹＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬ
ＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩ
ＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳ
ＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧ
ＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱ
ＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭ
ＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番
号１２１）
Ｇ３ＣＰ－［ＷＧＭ］－ＢＡ１１－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫ
ＮＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡ
ＴＹＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬ
ＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩ

ＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳ
ＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧ
ＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱ
ＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭ
ＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番
号１２２）
Ｇ３ＣＰＧ４－［ＷＧＭ］－ＢＡ１１－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７２）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧ
ＳＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫ
ＮＰＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡ
ＴＹＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬ
ＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩ
ＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳ
ＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧ
ＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱ
ＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭ
ＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番
号１２３）
Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－［ＷＧＭ］－ＢＡ１１－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７３）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＴ
ＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＴＳＹＰＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮＰ
ＧＳＳＮＫＥＱＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹ
ＹＣＲＡＭＳＴＮＩＷＴＧＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲ
ＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰ
ＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶ
ＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ
ＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳ
ＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡ
ＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ（配列番号１
２４）
Ｐ３Ａ１－［ＷＧＭ］－Ｇ３ＣＰ－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７４）
ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮ
ＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＡ
ＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰ
ＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹ
ＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳ
ＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷ
ＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴ
ＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮ
ＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴ
ＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ

（配列番号１２５）
Ｐ３Ａ１－［ＷＧＭ］－Ｇ３ＣＰＧ４－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７５）
ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮ
ＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＴ
ＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰ
ＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹ
ＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳ
ＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷ
ＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴ
ＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮ
ＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴ
ＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ
（配列番号１２６）
Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－［ＷＧＭ］－Ｇ３ＣＰ－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＡ
ＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰ
ＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹ
ＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳ
ＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷ
ＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴ
ＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮ
ＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴ
ＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ
（配列番号１２７）
Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－［ＷＧＭ］－Ｇ３ＣＰＧ４－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７７）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＴ
ＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰ
ＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹ
ＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＤＩＫＬＱＱＳ
ＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷ
ＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴ
ＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮ
ＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴ
ＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨＨＨＨ
（配列番号１２８）
Ｐ３Ａ１Ｇ１ＡＥ３－［ＷＧＭ］－Ｄ３－［Ｇ４Ｓ］－ＣＤ３
（化７８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＧＴＲＹＧＬＹＳＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＤＥＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＫＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ

ＹＹＣＲＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳＡ
ＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮＰ
ＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹ
ＹＣＫＡＱＳＧＭＡＩＳＴＧＳＧＨＧＹＮＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＤＩＫＬ
ＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧ
ＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳ
ＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳ
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳ
ＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹ
ＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳＨＨＨ
ＨＨＨ（配列番号１２９）

が挙げられる。

【０１４４】

当技術分野において公知の任意のＣＤ３結合配列及びそのバリアントが上記で置換され得る。例えば、

ＵＣＬ　ＯＫＴ３配列（国際公開第２０１９００８３７９号パンフレット）

（化７９）

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＲＱＡ
ＰＧＱＧＬＥＷＭＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹ
ＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳＶ
ＥＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＶＤＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣ
ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＲＬＩＹＤＴＳＫＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧ
ＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＦＴＦＧＱＧＴＫＶ
ＥＩＫ（配列番号１３０）

Ｈａｒｐｏｏｎ　ＩＤ２０（国際公開第２０１６１８７５９４号パンフレット）

（化８０）

ＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲ
ＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹ
ＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＶ
ＥＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＶＤＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣ
ＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧ
ＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬ
ＥＬＫ（配列番号１３１）

である。

【０１４５】

第４の態様によれば、本発明は、式（Ｉ）：

ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４
（Ｉ）

（式中、
ＦＷ１は、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ１は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ２は、フレームワーク領域であり、
ＨＶ２は、超可変配列であり、
ＦＷ３ａは、フレームワーク領域であり、
ＨＶ４は、超可変配列であり、
ＦＷ３ｂは、フレームワーク領域であり、
ＣＤＲ３は、ＣＤＲ配列であり、
ＦＷ４は、フレームワーク領域である）

によって表されるアミノ酸配列又はその機能的バリアントを含む抗原結合分子を含む組換え融合タンパク質であって、抗原結合分子は、免疫グロブリンＦｃ領域の断片に融合され

ており、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている、組換え融合タンパク質を提供する。

【０１４６】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択される。

【０１４７】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、Ｆｃ重鎖である。

【０１４８】

Ｆｃ領域は、ＦｃγＲ結合を低減させるように人工操作され得る。したがって、本明細書に開示されるＦｃ領域は、ＦｃγＲ結合を低減させるように人工操作され得る。

【０１４９】

本明細書において使用される場合、「二量体化するように人工操作されている」免疫グロブリンＦｃ領域は、少なくとも１つのアミノ酸置換を含み得る。典型的には、少なくとも１つのアミノ酸置換は、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片との相互作用及び／又は会合を促進し、且つ／又はよりエネルギー的に好ましくし、したがって、それが二量体化を促進し、且つ／又は二量体化をよりエネルギー的に好ましくする。このような組換え融合タンパク質は、二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーの調製において特定の有用性を有し得る。

【０１５０】

二量体化するように人工操作されている２つの区別されるＦｃ重鎖の対形成を介してＦｃベース二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーを生成する方法は、当技術分野において公知である。これらの方法は、各々が標的結合ドメイン又は異なる結合特徴を有する配列に融合している２つの異なる重鎖からのＦｃ領域のアセンブルを可能にする。標的結合ドメイン又は配列は、多重特異的バインダーを生成するために異なる標的に指向され、且つ／又はバイパラトピック結合タンパク質を生成するために同じ標的上の異なる領域若しくはエピトープに指向され得る。複数の結合ドメイン又は配列が、多重特異的若しくはマルチパラトピックバインダー又は両方の多重特異的マルチパラトピックバインダーを同じタンパク質内に作出するためにＦｃ領域に融合され得る。２つの異なるＦｃ重鎖又はその断片のヘテロ二量体化を介してこれらの非対称二重特異的及び／又はバイパラトピックバインダーを生成する方法としては、限定されるものではないが、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂが挙げられる。例えば、Ｂｒｉｎｋｍａｎ＆Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ，（２０１７）ｍＡｂｓ，９：２，１８２－２１２；Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ（２０１２）ｍＡｂｓ ４：６，６５３－６６３；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ（２０１９）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，８，４３；及びＤｉｅｔｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ（２０２０）ＢＢＡ－Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ １８６８ １４０２５０を参照されたく；それらの各々は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【０１５１】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている。

【０１５２】

ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）は、第１のＣＨ３ドメイン中のＴ３６６Ｙ置換及び第２のＣＨ３ドメイン中のＹ４０７Ｔ置換を含み得る。

【０１５３】

ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）は、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｓ

３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）は、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）は、ＣＨ３中のジスルフィド結合を含み得る。

【０１５４】

ＣＨ３電荷対形成は、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｋ３９２Ｄ、Ｋ４０９Ｄの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ＣＨ３電荷対形成は、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｅ３５６Ｋ、Ｄ３９９Ｋの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。

【０１５５】

Ｆａｂアーム交換は、第１のＣＨ３ドメイン中のＫ４０９Ｒ置換及び第２のＣＨ３ドメイン中のＦ４０５Ｌ置換を含み得る。Ｆａｂアーム交換及びＤｕｏＢｏｄｙは、同じＦｃ変化を捕捉する。したがって、ＤｕｏＢｏｄｙ技術は、第１のＣＨ３ドメイン中のＫ４０９Ｒ置換及び第２のＣＨ３ドメイン中のＦ４０５Ｌ置換を含み得る。

【０１５６】

ＳＥＥＤ技術は、公知の置換を取り込み、且つ／又はＩｇＧ／Ａキメラをもたらし得る。Ｆｃ鎖のヘテロ二量体アセンブリを可能にするＣＨ３界面中の相補性が、鎖交換人工操作ドメイン（ＳＥＥＤ）ヘテロ二量体を設計することにより開発された。これらのＳＥＥＤ　ＣＨ３ドメインは、ヒトＩｇＡ及びＩｇＧ　ＣＨ３配列に由来する交互セグメント（ＡＧ　ＳＥＥＤ　ＣＨ３及びＧＡ　ＳＥＥＤ　ＣＨ３）から構成され、いわゆるＳＥＥＤボディを生成するために使用された、参照により全体として本明細書に組み込まれるＤａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ（２０１０）ＰＥＤＳ　２３，４，１９５－２０２。分子モデルはＦｃＲｎとの相互作用がＡＧ　ＳＥＥＤ　ＣＨ３において損なわれることを示唆したため、ＣＨ２－ＣＨ３ジャンクションの残基がＩｇＧ配列に戻された。薬物動態研究は、ＳＥＥＤボディの半減期が他のＦｃ融合タンパク質及びＩｇＧ１と同等であることを裏付けた。

【０１５７】

ＢＥＡＴ技術は、ヒトＴ細胞受容体の定常α及びβドメインを、ＩｇＧ１　ＣＨ３二量体界面に人工操作してヘテロ二量体化を駆動させる（Ｓｋｅｇｒｏ　ｅｔ　ａｌ（２０１７）ＪＢＣ　２９２（２３）９７４５－９７５９）。追加のＤ４１０Ｑ突然変異は、この系におけるヘテロ二量体形成をさらに増加させ得る（Ｓｔｕｔｚ＆Ｂｌｅｉｎ　２０２０ＪＢＣ　２９５（２８）９３９２－９４０８）。

【０１５８】

ＨＡ－ＴＦは、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｓ３６４Ｈ、Ｆ４０５Ａの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ＨＡ－ＴＦは、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｙ３４９Ｔ、Ｔ３９４Ｆの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。

【０１５９】

ＺＷ１アプローチは、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、Ｙ４０７Ｖの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ＺＷ１アプローチは、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｔ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ、Ｔ３９４Ｗの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。

【０１６０】

Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチは、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：３６６Ｋ（＋３５１Ｋ）の１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチは、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：３５１Ｄ又は３４９、３６８、３４９若しくは３４９＋３５５におけるＥ若しくはＤの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。

【０１６１】

ＥＷ－ＲＶＴは、第１のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｋ３６０Ｅ、Ｋ４０９Ｗの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ＥＷ－ＲＶＴは、第２のＣＨ３ドメイン中の以下の置換：Ｑ３４７Ｒ、Ｄ３９９Ｖ、Ｆ４０５Ｔの１つ以上（好ましくは全て）を含み得る。ＥＷ－ＲＶＴは、ＣＨ３中のジスルフィド結合を含み得る。ジスルフィド架橋は、第１のＣＨ３ドメインへのＹ３４９Ｃ及び第２のＣＨ３ドメインへのＳ３５４Ｃのさらなる取

り込みにより支持され得る。
【０１６２】
　Ｔｒｉｏｍａｂは、マウスハイブリドーマをラットハイブリドーマと融合させ、二重特異的非対称ハイブリッドＩｇＧ分子の産生をもたらすことにより形成され得る。次いで、軽鎖とその対応する重鎖との優先的な対形成が生じ得る。
【０１６３】
　一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのノブインホール（ＫＩＨ）二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む。
【０１６４】
　一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される。
【０１６５】
　一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される。
【０１６６】
　一実施形態において、抗原結合分子は、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子である。
【０１６７】
　組換え融合タンパク質は、配列番号１４６又は配列番号１４７による配列を含み得る。
Ｇ３ＣＰ　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）配列番号１４６
（化８１）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ
Ｇ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）配列番号１４７
（化８２）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ
【０１６８】
　組換え融合タンパク質は、配列番号１９４、配列番号１９５又は配列番号１９６による配列を含み得る。
１Ｈ８　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）配列番号１９４
（化８３）
ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ

GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
1H8 G4 hFc（S239C＋Y407T）配列番号195
（化84）
TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDANYGLAATYWYRKN
PGSSNKERISISGRYSESVNKGTMSFTLTISSLQPEDSAT
YYCRAYPWGAGAPSSVQWYDGAGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
1H8 v15 hFc（S239C＋Y407T）配列番号196
（化85）
ASVTQSPRSASKETGESLTITCRVTGANYGLAATYWYRKN
PGSSNQERISISGRYSESVNKRTMSFSLRISSLTVEDSAT
YYCKAYPWGAGAPSSVQWYDGQGTKLEVKGGGGSGGGGSG
GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
【0169】
組換え融合タンパク質は、配列番号148による配列を含み得る。
P3A1 hFc（S239C＋T366Y）配列番号148
（化86）
TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTSYGLYSTSWFRKN
PGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFSLRIKDLTVADSAT
YYCKAREARHPWLRQWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGGSGGG
GSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLYCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
【0170】
組換え融合タンパク質は、配列番号191又は配列番号192による配列を含む。
G3CP hFc（S239C＋T366Y）配列番号191
（化87）
ASVNQTPRTATKETGESLTINCVVTGANYGLAATYWYRKN
PGSSNQERISISGRYVESVNKRTMSFSLRIKDLTVADSAT
YYCKAYPWGAGAPYNVQWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGGSG
GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

ＧＳＣＰＧ４　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）配列番号１９２

（化８８）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７１】

組換え融合タンパク質は、配列番号１９７、配列番号１９８又は配列番号１９９による配列を含み得る。

１Ｈ８　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）配列番号１９７

（化８９）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　Ｇ４　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）配列番号１９８

（化９０）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　ｖ１５　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）配列番号１９９

（化９１）

ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ

ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７２】

組換え融合タンパク質は、配列番号１９３による配列を含み得る。

Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）配列番号１９３：

（化９２）

ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮ
ＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩ
ＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥ
ＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥ
ＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹ
ＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴＶＤ
ＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７３】

組換え融合タンパク質は、配列番号１４６、１４７、１９４、１９５、１９６、１４８、１９１、１９１、１９２、１９３、１９７、１９８及び１９９のいずれか１つ又はいずれか２つを含むバイパラトピック二量体であり得る。バイパラトピック二量体は、Ｙ４０７Ｔ点突然変異を含む配列番号１４６、１４７、１９４、１９５、１９６及び１９３の１つを含み得る。バイパラトピック二量体は、Ｔ３６６Ｙ点突然変異を含む配列番号１４８、１９１、１９２、１９７、１９８及び１９９の１つを含み得る。バイパラトピック二量体は、配列番号１４６及び配列番号１４８又は配列番号１４７及び配列番号１４８を含み得る。本明細書に開示される組換え融合タンパク質のいずれも、本明細書に開示されるリンカー及びペイロードのいずれかと会合し得、本明細書に開示されるバイパラトピック二量体のいずれも、本明細書に開示されるリンカー及びペイロードのいずれかと会合し得、コンジュゲーションは、バイパラトピック二量体中のいずれか１つ以上のＳ２３９Ｃ残基によるものであり得る。好ましくは、バイパラトピック二量体は、リンカー及びペイロードｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵと会合し得る。好ましくは、バイパラトピック二量体は、ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵにコンジュゲートしているＧ３ＣＰ　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）（配列番号１４６）及びＰ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）（配列番号１４８）又はインビボでより高度に有効であることが示されているｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵにコンジュゲートしているＧ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）（配列番号１４７）及びＰ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）（配列番号１４８）を含む。

【０１７４】

配列番号１４６、１４７、１９４、１９５、１９６、１４８、１９１、１９１、１９２、１９３、１９７、１９８及び１９９は、コンジュゲーション反応における使用のためのＳ２３９Ｃ突然変異を含む。組換え融合タンパク質が（例えば、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体に）コンジュゲートしていない場合、Ｓ２３９Ｃ突然変異は必要とされず、２３９位はＣではなくＳであり得る。したがって、代替的実施形態において、組換え融合タンパク質又はバイパラトピック二量体は、各配列がＳ２３９Ｃ突然変異を含まないことを除き、配列番号１４６、１４７、１９４、１９５、１９６、１４８、１９１、１９１、１９２、１９３、１９７、１９８及び１９９のいずれか１つによる配列を含み得る。

【０１７５】

したがって、組換え融合タンパク質は、配列番号１６５又は配列番号１６６による配列を含み得る。

Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号１６５：

（化９３）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ

ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

ＧＳＣＰ　Ｇ４－ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号１６６：

（化９４）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７６】

組換え融合タンパク質は、配列番号２００、配列番号２０１又は配列番号２０２による配列を含み得る。

１Ｈ８　ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号２００

（化９５）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　Ｇ４　ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号２０１

（化９６）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　ｖ１５　ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号２０２

（化９７）

ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ

ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７７】

組換え融合タンパク質は、配列番号１６７による配列を含み得る。

Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号１６７：

（化９８）

ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮ
ＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩ
ＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥ
ＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥ
ＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧＦＹ
ＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤ
ＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７８】

組換え融合タンパク質は、配列番号１８８又は配列番号１８９による配列を含み得る。

Ｇ３ＣＰ　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号１８８

（化９９）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

Ｇ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号１８９

（化１００）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１７９】

組換え融合タンパク質は、配列番号２０３、配列番号２０４又は配列番号２０５による配列を含み得る。

１Ｈ８　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号２０３

（化１０１）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ

ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　Ｇ４　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号２０４

（化１０２）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

１Ｈ８　ｖ１５　ｈＦｃ（Ｔ３６６Ｙ）配列番号２０５

（化１０３）

ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１８０】

組換え融合タンパク質は、配列番号１９０による配列を含み得る。

Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｙ４０７Ｔ）配列番号１９０

（化１０４）

ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮ
ＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ
ＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩ
ＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥ
ＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥ
ＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹ
ＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴＶＤ
ＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１８１】

第５の態様によれば、本発明は、

（ａ）第１の組換え融合タンパク質であって、第３又は第４の態様による組換え融合タンパク質である第１の組換え融合タンパク質、及び

（ｂ）第２の組換え融合タンパク質であって、免疫グロブリンＦｃ領域の第１の断片と二量体化するように人工操作されている免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片に融合されている第２の抗原結合分子を含む第２の組換え融合タンパク質

を含む組換え融合タンパク質二量体を提供する。

【０１８２】

一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域

及びＣＨ３領域からなる群から選択される。
【０１８３】
一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片は、Ｆｃ重鎖である。
【０１８４】
一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片は、ノブイントゥホール（Ｙ－Ｔ）、ノブイントゥホール（ＣＷ－ＣＳＡＶ）、ＣＨ３電荷対形成、Ｆａｂアーム交換、ＳＥＥＤ技術、ＢＥＡＴ技術、ＨＡ－ＴＦ、ＺＷ１アプローチ、Ｂｉｃｌｏｎｉｃアプローチ、ＥＷ－ＲＶＴ及びＴｒｉｏｍａｂからなる群から選択される方法により、免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片と二量体化するように人工操作されている。
【０１８５】
一実施形態において、免疫グロブリンＦｃ領域の断片の１つ以上の残基は、１つ以上の対応するアミノ酸突然変異を含む免疫グロブリンＦｃ領域の第２の断片とのノブインホール（ＫＩＨ）二量体化に好適な１つ以上のアミノ酸置換を含む。
【０１８６】
一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される。
【０１８７】
一実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換は、Ｔ３６６Ｙ及びＹ４０７Ｔからなる群から選択される。
【０１８８】
本明細書に開示される組換え融合タンパク質の任意の配列は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択されるいずれか１つ以上のアミノ酸置換を含み得る。したがって、配列番号１４５（ヒトＦｃ領域）は、Ｔ３６６Ｙ、Ｙ４０７Ｔ、Ｓ３５４Ｃ、Ｔ３６６Ｗ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖからなる群から選択されるいずれか１つ以上のアミノ酸置換の取り込みにより改変され得、ヒトＦｃ領域配列に代えて本明細書に記載の組換え融合タンパク質中に取り込まれ得る。
【０１８９】
一実施形態において、第２の抗原結合分子は、ＲＯＲ１特異的抗原結合分子である。
【０１９０】
一実施形態において、第２の特異的抗原結合分子は、免疫グロビン、免疫グロビンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はＶＨドメインである。
【０１９１】
一実施形態において、
（ａ）第１の組換え融合タンパク質は、配列番号１４６又は配列番号１４７による配列を含み、及び
（ｂ）第２の組換え融合タンパク質は、配列番号１４８による配列を含む。
【０１９２】
第６の態様によれば、本発明は、少なくとも１つの膜貫通領域及び少なくとも１つの細胞内ドメインに融合又はコンジュゲートされている、本発明の第１又は第２の態様によって定義される少なくとも１つのＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含むＲＯＲ１特異的キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を提供する。
【０１９３】
本発明は、第６の態様によるキメラ抗原受容体を含む細胞であって、好ましくは人工操作Ｔ細胞である細胞も提供する。
【０１９４】

本発明の第７の態様において、本発明の第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様による特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸配列が提供される。

【０１９５】

第７の態様による核酸配列を含むベクター及びそのような核酸を含む宿主細胞も提供される。

【０１９６】

第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体を調製する方法であって、上記ポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を、前記宿主細胞が特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体を産生するような条件下で培養又は維持することを含み、任意選択で、特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体を単離することをさらに含む方法が提供される。

【０１９７】

本発明の第８の態様において、第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体を含む医薬組成物が提供される。医薬組成物は、種々の薬学的に許容可能な担体を含有し得る。本発明の医薬組成物は、当技術分野において公知の任意の好適な方法、例として、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、経口、腹腔内又は局所投与による投与のためのものであり得る。好ましい実施形態において、医薬組成物は、液剤、ゲル剤、散剤、錠剤、カプセル剤又はフォーム剤の形態で調製され得る。

【０１９８】

第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質又はキメラ抗原受容体は、治療法における使用のためのものであり得る。より具体的には、第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体は、癌の処置における使用のためのものであり得る。好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【０１９９】

本明細書において、疾患の処置を、それを必要とする患者において行うための医薬品の製造における第１、第２、第３、第４、第５又は第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体又はキメラ抗原受容体の使用も提供される。

【０２００】

さらに、本発明によれば、疾患の処置を、処置を必要とする患者において行う方法であって、前記患者に、治療有効投与量の第１、第２、第３、第４、第５若しくは第６の態様の特異的抗原結合分子、組換え融合タンパク質、組換え融合タンパク質二量体若しくはキメラ抗原受容体又は第６の態様の医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【０２０１】

好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【０２０２】
本明細書において、サンプル中の標的分析物の存在をアッセイする方法であって、検出可能に標識されている、第１若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体をサンプルに添加し、且つ標的分析物への分子の結合を検出することを含む方法も提供される。
【０２０３】
さらに、本明細書において、対象における疾患の部位をイメージングする方法であって、検出可能に標識されている、第１若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は検出可能に標識されている、第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を対象に投与することを含む方法が提供される。
【０２０４】
本明細書において、対象における疾患又は医学的病態を診断する方法であって、第１の態様若しくは第２の態様の特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を投与することを含む方法も提供される。
【０２０５】
本明細書において、第１又は第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子とＲＯＲ１への結合について競合する抗体、抗体断片又は抗原結合分子も企図される。抗原結合タンパク質（例えば、中和抗原結合タンパク質又は中和抗体）に関連して使用される場合の「競合する」という用語は、試験下の抗原結合タンパク質（例えば、抗体又はその機能的断片）が、共通の抗原（例えば、第１又は第２の態様の特異的抗原結合分子の場合にはＲＯＲ１）への、本明細書に定義される抗原結合分子（例えば、第１の態様の特異的抗原結合分子）の特異的結合を妨害又は阻害するアッセイにより決定される抗原結合タンパク質間の競合を意味する。
【０２０６】
本明細書において、癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は対象の病態の予後診断を提供するためのキットであって、試験対象からのサンプル中に存在する抗原の濃度を検出するための検出手段を含み、検出手段は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３、第４若しくは第５の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体、第６の態様のキメラ抗原受容体又は第７の態様の核酸配列を含み、サンプル中の抗原の存在は、対象が癌に罹患していることを示唆する、キットも記載される。好ましくは、抗原は、ＲＯＲ１タンパク質、より好ましくはその細胞外ドメインを含む。より好ましくは、キットは、サンプル中のＲＯＲ１陽性細胞の存在若しくは不存在を同定するか、又はサンプル中のその濃度を決定するために使用される。キットは、アッセイが比較される陽性対照及び／若しくは陰性対照並びに／又は検出され得る標識も含み得る。
【０２０７】
本発明は、癌に罹患している対象若しくはその易罹患性を診断するか、又は対象の病態の予後診断を提供する方法であって、対象から得られたサンプル中に存在する抗原の濃度を検出することを含み、検出は、それぞれ任意選択で誘導体化されている、第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３、第４若しくは第５の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体、第６の態様のキメラ抗原受容体又は第７の態様の核酸配列を使用して達成され、サンプル中の抗原の存在は、対象が癌に罹患していることを示唆する、方法も提供する。
【０２０８】
本明細書において、インビトロ又は患者におけるＲＯＲ１を発現する細胞を殺傷するか又はその成長を阻害する方法であって、細胞に、医薬有効量又は用量の、（ｉ）第１若しくは第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子、第３、第４若しくは第５の態様の組換え

融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体、又は第６の態様の核酸配列、又は第７の態様によるＣＡＲ若しくは細胞、或いは（ｉｉ）第８の態様の医薬組成物を投与することを含む方法も企図される。好ましくは、ＲＯＲ１を発現する細胞は、癌細胞である。より好ましくは、ＲＯＲ１は、ヒトＲＯＲ１である。

【０２０９】

第９の態様によれば、本発明は、式（ＩＩ）：

Ｘ－ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４－Ｙ　（ＩＩ）

（式中、

ＦＷ１－ＣＤＲ１－ＦＷ２－ＨＶ２－ＦＷ３ａ－ＨＶ４－ＦＷ３ｂ－ＣＤＲ３－ＦＷ４は、第１又は第２の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子であり、

Ｘ及びＹは、任意選択のアミノ酸配列である）

によって表されるアミノ酸配列を含む特異的抗原結合分子であって、第２の部分にコンジュゲートされている特異的抗原結合分子を提供する。

【０２１０】

ある好ましい実施形態において、本発明のこの態様による特異的抗原結合分子は、第３、第４又は第５の部分にさらにコンジュゲートし得る。さらなる部分のコンジュゲーションも企図される。一部の場合、第３、第４又は第５の部分は、第２の部分にコンジュゲートされ得る。したがって、本発明のこの態様による部分のいずれも、それにコンジュゲートしている追加の部分を有し得ることが理解される。下記の第２の部分の好ましい特徴部の説明は、必要な変更を加えれば第３、第４、第５又はより高次の部分にも当てはまる。

【０２１１】

好ましくは、Ｘ又はＹは、個々に不存在であるか、又は免疫グロブリン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン、足場タンパク質（ａｆｆｉｂｏｄｙ、ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ｄａｒｐｉｎなど）若しくは毒素、例として、限定されるものではないが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）外毒素ＰＥ３８、ジフテリア毒素を含む群から選択されるかのいずれかである。

【０２１２】

好ましくは、コンジュゲーションは、特異的抗原結合分子のアミノ酸配列中のシステイン残基を介したものである。システイン残基は、任意選択の配列Ｘ又はＹ（存在する場合）を含め、配列中の任意の場所に存在し得る。

【０２１３】

コンジュゲーションは、特異的抗原結合分子のアミノ酸配列のＮ末端又はＣ末端に取り込まれたチオール、アミノキシ又はヒドラジニル部分を介し得る。

【０２１４】

好ましくは、第２の部分は、検出可能な標識、色素、毒素、薬物、プロドラッグ、放射性核種又は生物学的活性分子を含む群から選択される。

【０２１５】

より好ましくは、第２の部分は、

・メイタンシノイド、
・アウリスタチン、
・アントラサイクリン、好ましくはＰＮＵ由来アントラサイクリン、
・カリケアマイシン、
・アマニチン誘導体、好ましくはα－アマニチン誘導体、
・ツブリシン、
・デュオカルマイシン、

・放射性同位体、例えばアルファ線放出放射性核種、例えば２２７Ｔｈ若しくは２２５Ａｃ、
・毒性ペイロードを含むリポソーム、
・タンパク質毒素、
・タキサン、
・ピロールベンゾジアゼピン、
・インドリノベンゾジアゼピン疑似二量体、及び／又は
・スプライソソーム阻害剤、
・ＣＤＫ１１阻害剤、
・ピリジノベンゾジアゼピン、
・イリノテカン及びその誘導体
を含む群から選択される少なくとも１つの毒素である。

【０２１６】

この態様による他の好ましい実施形態において、第２の部分は、免疫グロブリン、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン、足場タンパク質（ａｆｆｉｂｏｄｙ、ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ｄａｒｐｉｎなど）又は毒素、例として、限定されるものではないが、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）外毒素ＰＥ３８、ジフテリア毒素を含む群からのものであり得る。

【０２１７】

特に好ましい実施形態において、第２の部分は、この態様による特異的抗原結合分子と同じ又は異なり得るＶＮＡＲドメインである。したがって、化学的コンジュゲーションにより結合しているＶＮＡＲドメインの二量体、三量体又はより高次の多量体が、本明細書において明示的に企図される。このような実施形態において、個々の各ＶＮＡＲドメインは、他のＶＮＡＲドメインと同じ抗原特異性を有し得るか又はそれらは異なり得る。

【０２１８】

この態様によれば、特異的抗原結合分子は、例えば、さらなる生物学的活性分子（例として、限定されるものではないが、半減期延長のための分子、例えばＢＡ１１）に融合しており、次いで第２の部分、例として、限定されるものではないが、細胞毒性ペイロードにさらにコンジュゲートしている第１～第５の態様に関連して記載されるバイパラトピック特異的抗原結合分子を含み得る。

【０２１９】

この態様によれば、特異的抗原結合分子は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）特異的抗原結合分子であり得る。これは、本発明の第１又は第２の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子であり得る。したがって、第１、第２及び第３の態様に関連して記載される好ましい特徴部のいずれも、必要な変更を加えれば第６の態様に当てはまる。

【０２２０】

第９の態様の特異的抗原結合分子は、治療法における使用のためのものであり得る。より具体的には、第９の態様の特異的抗原結合分子は、癌の処置における使用のためのものであり得る。好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【０２２１】

本明細書において、疾患の処置を、それを必要とする患者において行うための医薬品の

製造における、第９の態様の特異的抗原結合分子の使用も提供される。

【０２２２】

第９の特異的抗原結合分子を含む医薬組成物も提供される。医薬組成物は、種々の薬学的に許容可能な担体を含有し得る。

【０２２３】

さらに、本発明によれば、疾患の処置を、処置を必要とする患者において行う方法であって、前記患者に、治療有効投与量の第９の態様の特異的抗原結合分子又は第９の態様の特異的抗原結合分子を含む医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【０２２４】

好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。

【０２２５】

本明細書において、サンプル中の標的分析物の存在をアッセイする方法であって、検出可能に標識されている、第９の態様の特異的抗原結合分子をサンプルに添加し、且つ標的分析物への分子の結合を検出することを含む方法も提供される。

【０２２６】

さらに、本明細書において、対象における疾患の部位をイメージングする方法であって、検出可能に標識されている、第９の態様の特異的抗原結合分子を対象に投与することを含む方法が提供される。

【０２２７】

本明細書において、対象における疾患又は医学的病態を診断する方法であって、第９の態様の特異的抗原結合分子を投与することを含む方法も提供される。

【０２２８】

さらに、本発明の上述の態様のいずれかに関して記載される特徴部はいずれも、必要な変更を加えれば本発明の他の態様と組み合わせられ得る。

【０２２９】

挙げられる配列に加え、以下の配列が明示的に開示される。これらの配列のあるものは、本明細書に記載の本発明の分子の例に関する。

【０２３０】

【表４】

表３－追加の配列

配列番号	配列名	配列
115	B1V15	ASVTQSPRSASKETGESLTITCRVTGANYGLAATYWYRKN PGSSNQERISISGRYSESVNKRTMSFSLRISSLTVEDSATYY CKAYPWGAGAPWLVQWYDGQGTKLEVK
151	ヒトROR1-His (CHO)	QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTS LGQTAELHCKVSGNPPPTI RWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYF QCVATNGKEVVSSTGVLFVK FGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMI GTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCR DECEILENVLCQTEYIFARS NPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINK NHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGN QKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEHHHHHH
152	ヒトROR1 (Igドメイン)	SELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTI RWFKNDAPVVQEPRRLSFRS TIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVK AAAHHHHH
153	マウスROR1-His (CHO)	QETELSVSAELVPTSSWNTSSEIDKGSYLTLDEPMNNITTS LGQTAELHCKVSGNPPPSI RWFKNDAPVVQEPRRISFRATNYGSRLRIRNLDTTDTGYF

配列番号	配列名	配列
		QCVATNGKKVVSTTGVLFVK FGPPPTASPGSSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMI GTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCR DECEVLENVLCQTEYIFARS NPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINK NHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHSFTALRFPELNGGHSYCRNPGN QKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEHHHHHH
154	ヒトROR1-Fc (CHO)	QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTS LGQTAELHCKVSGNPPPTI RWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYF QCVATNGKEVVSSTGVLFVK FGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMI GTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCR DECEILENVLCQTEYIFARS NPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINK NHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGN QKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL

配列番号	配列名	配列
		MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
155	ヒトROR2-Fc (CHO)	EVEVLDPNDPLGPLDGQDGPIPTLKGYFLNFLEPVNNITI VQGQTAILHCKVAGNPPPNV RWLKNDAPVVQEPRRIIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYY QCVATNGMKTITATGVLFVR LGPTHSPNHNFQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYV DSLQMQGEIENRITAAFTMI GTSTHLSDQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSRTPKPRELCR DECEVLESDLCRQEYTIARS NPLILMRLQLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRY HQCYNGSGMDYRGTASTTKS GHQCQPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGGQ MEGPWCFTQNKNVRMELCDVPS CSPRDSSKMGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE

配列番号	配列名	配列
		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
156	マウスROR1-Fc(CHO)	QETELSVSAELVPTSSWNTSSEIDKGSYLTLDEPMNNITTS LGQTAELHCKVSGNPPPSI RWFKNDAPVVQEPRRISFRATNYGSRLRIRNLDTTDTGYF QCVATNGKKVVSTTGVLFVK FGPPPTASPGSSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMI GTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCR DECEVLENVLCQTEYIFARS NPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINK NHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHSFTALRFPELNGGHSYCRNPGN QKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

配列番号	配列名	配列
		LHNHYTQKSLSLSPGK
157	ラット ROR1-Fc (CHO)	QETELSVSAELVPTSSWNTSSEIDKDSYLTLDEPMNNITTS LGQTAELHCKVSGNPPPNI RWFKNDAPVVQEPRRISFRATNYGSRLRIRNLDTTDTGYF QCVATSGKKVVSTTGVLFVK FGPPPTASPGSSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMI GTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCR DECEVLENVLCHTEYIFARS NPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINK NHKCYNSTGVDYRGTVSVTK SGRQCQPWNSQYPHTHSFTALRFPELNGGHSYCRNPGN QKEAPWCFTLDENFKSDLCDIP ACDSKDSKEKNKMEGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

【０２３１】

薬物コンジュゲートのためのペイロードとしての使用のための高度に興味深いクラスのＤＮＡインターカレート毒素はアントラサイクリンであり、それは癌治療における化学療法薬としてのその臨床的検証が証明されているためである。

【０２３２】

化学的コンジュゲートタンパク質薬物コンジュゲートの安定性は、重要な検討事項である。それというのも、腫瘍細胞の標的化前の患者の循環中の高度に強力なアントラサイクリン毒素、例えばＰＮＵ－１５９６８２の意図されない放出がオフターゲット効果及び不所望な副作用をもたらすためである。ＰＮＵコンジュゲートから放出される一部の例の分

子としては、異なるＶａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ含有薬物リンカーからのＰＮＵ１５９６８２誘導体の放出が挙げられる。

【０２３３】

したがって、不所望な副作用を回避するか又は少なくとも低減させるために高い安定性で標的化タンパク質に結合され得る強力な毒素が要求される。代わりに、リンカーペイロードは、細胞外開裂がペイロードの誘導体を減衰された効力で放出するように設計される。しかしながら、十分な効力が、有効性を達成するためにより高用量を投与する必要性に起因して打ち消されるいかなる副作用の低減も回避するために保持されることを必要とする。

【０２３４】

コンジュゲーションの容易性は、容易に製造可能な産物の産生において重要な因子である。本開示のペイロードは、簡単で標準的な条件を使用してコンジュゲーションパートナー上の任意の利用可能なチオール基と反応し得るマレイミド基を使用し得る。さらに、コンジュゲーションのためのマレイミド／チオール化学反応の使用は、例えば、タンパク質配列中の人工操作システイン残基の側鎖上の導入チオール基への部位特異的コンジュゲーションを可能にする。本明細書に記載の一部の場合、システインは、人工操作システインを含有するｈｉｓ－ｍｙｃタグ（例の配列としては、限定されるものではないが、ＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９７）又はＱＡＣＧＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９９）が挙げられる）のタンパク質のＣ又はＮ末端での導入を介して導入され得る。

【０２３５】

非選択的標識方法を使用して、例えばタンパク質内のアミノ官能基との反応を介して生成される抗体／タンパク質薬物コンジュゲートは、薬物抗体比が異なる複数の異なる種を含有する産物を送達する。これは、インビボ有効性及び毒性に影響するコンジュゲートの特性、例として効力及びＰＫ特性に影響する。したがって、チオール反応性ペイロードは大いに重要である。それというのも、それらは単一プロセスにおいて高い収率で、タンパク質中の天然に存在するシステイン残基と又は分子生物学／組換えタンパク質発現若しくは化学合成を使用して若しくは発現、合成若しくは天然タンパク質の化学修飾を介してタンパク質の配列内の任意の点の特異的部位中に人工操作されているシステイン残基と反応され得るためである。本明細書に記載の一部の場合、システインは、Ｆｃ融合タンパク質のＦｃ領域中に人工操作されている。

【０２３６】

本開示は、薬物コンジュゲートにおける使用に好適なアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体を提供する。具体的には、Ｃ１４炭素及び付着カルボキシル官能基を欠き、ＰＮＵ１５９６８２のＣ１３カルボニルでエチレンジアミノ（ＥＤＡ）基で官能化されているＰＮＵ１５９６８２の誘導体が提供される。このＥＤＡ－ＰＮＵ１５９６８２は、次にＥＤＡ部分のアミノ基を介してマレイミド含有リンカーで官能化され得る。マレイミド基は、式（Ｖ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体中に存在し、式（ＶＩ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体中にも存在し得る。このようなペイロードは、別の分子上のフリーチオール基と反応し得る。フリーチオールがタンパク質上に存在する場合、タンパク質－薬物コンジュゲート（ＰＤＣ）が形成され得る。

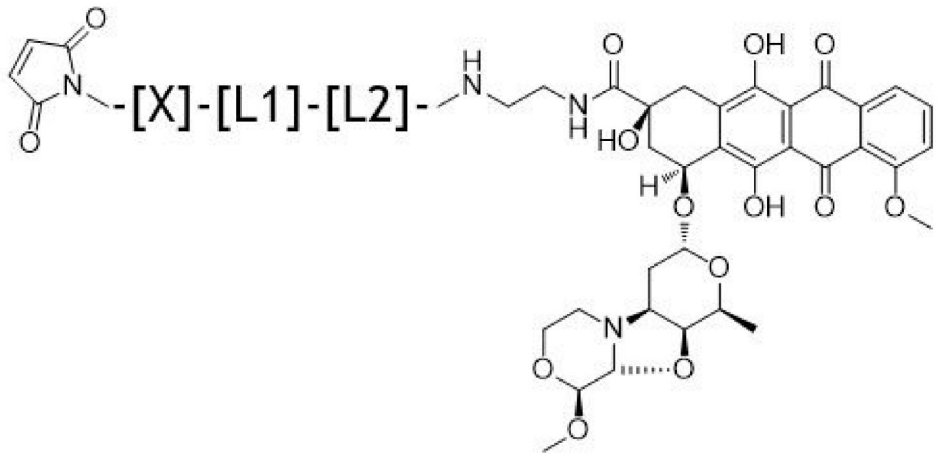
【０２３７】

驚くべきことに、エチレンジアミノ（ＥＤＡ）基で官能化されており、マレイミド基を介してチオール基に結合しているＰＮＵ１５９６８２の誘導体は、非ＥＤＡペイロード又は遊離ペイロード誘導体と比較して高い安定性をわずかに低い効力で示す。より安定的なペイロードは、低減されたオフターゲット効果のため有利であり得、それは次に副作用の低減及び患者コンプライアンスの増加をもたらし得る。

【０２３８】

ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０２０／０６７２１０号明細書は、式（Ｖ）：

【化１０５】



（Ｖ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｌ１］及び［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される任意選択のリンカーである）
のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体を記載している。

【０２３９】

式（Ｖ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、［Ｌ１］、［Ｌ２］又は［Ｌ１］及び［Ｌ２］を含み得る。

【０２４０】

好ましくは、［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］がペプチドである場合、前記ペプチドは、グリシンを含有しない。

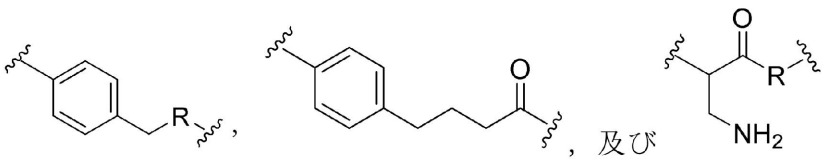
【０２４１】

任意選択のスペーサー及び／又は任意選択のリンカーが不存在である場合、その場所に結合が残留することが当業者には明確である。

【０２４２】

好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコール、

【化１０６】



を含む群から選択され、

【化１０７】

～

は、分子の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテ

ロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである。

【０２４３】

最も好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、ＰＥＧ４であり得る。

【０２４４】

好ましくは、［Ｌ２］は、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）又はアラニンである。

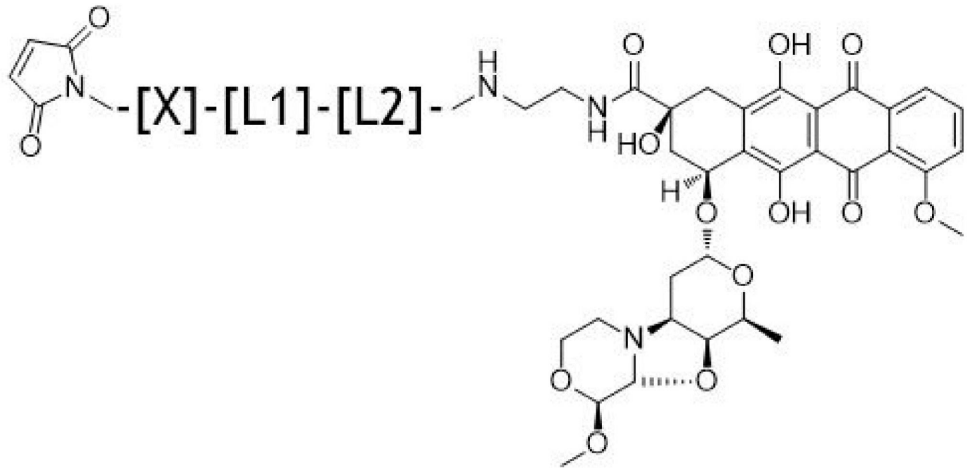
【０２４５】

好ましくは、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］を含み、［Ｘ］は、任意選択である。したがって、［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるリンカーであり得る。式（Ｖ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、［Ｌ１］、［Ｌ２］又は［Ｌ１］及び［Ｌ２］を含み得る。式（Ｖ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］を含み得る。

【０２４６】

ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０２０／０６７２１０号明細書は、式（Ｖ）：

【化１０８】



（Ｖ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；

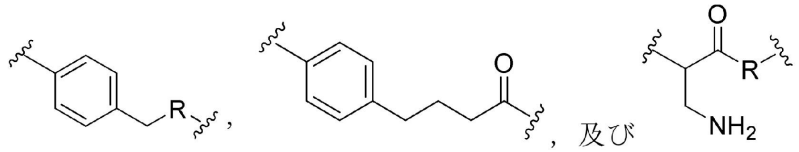
［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるリンカーである）

のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体であって、［Ｌ１］、［Ｌ２］又は［Ｌ１］及び［Ｌ２］を含む式（Ｖ）のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体を記載している。

【０２４７】

好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコール、

【化１０９】



を含む群から選択され、

【化１１０】



は、分子の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである。

【０２４８】

最も好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、ＰＥＧ４であり得る。

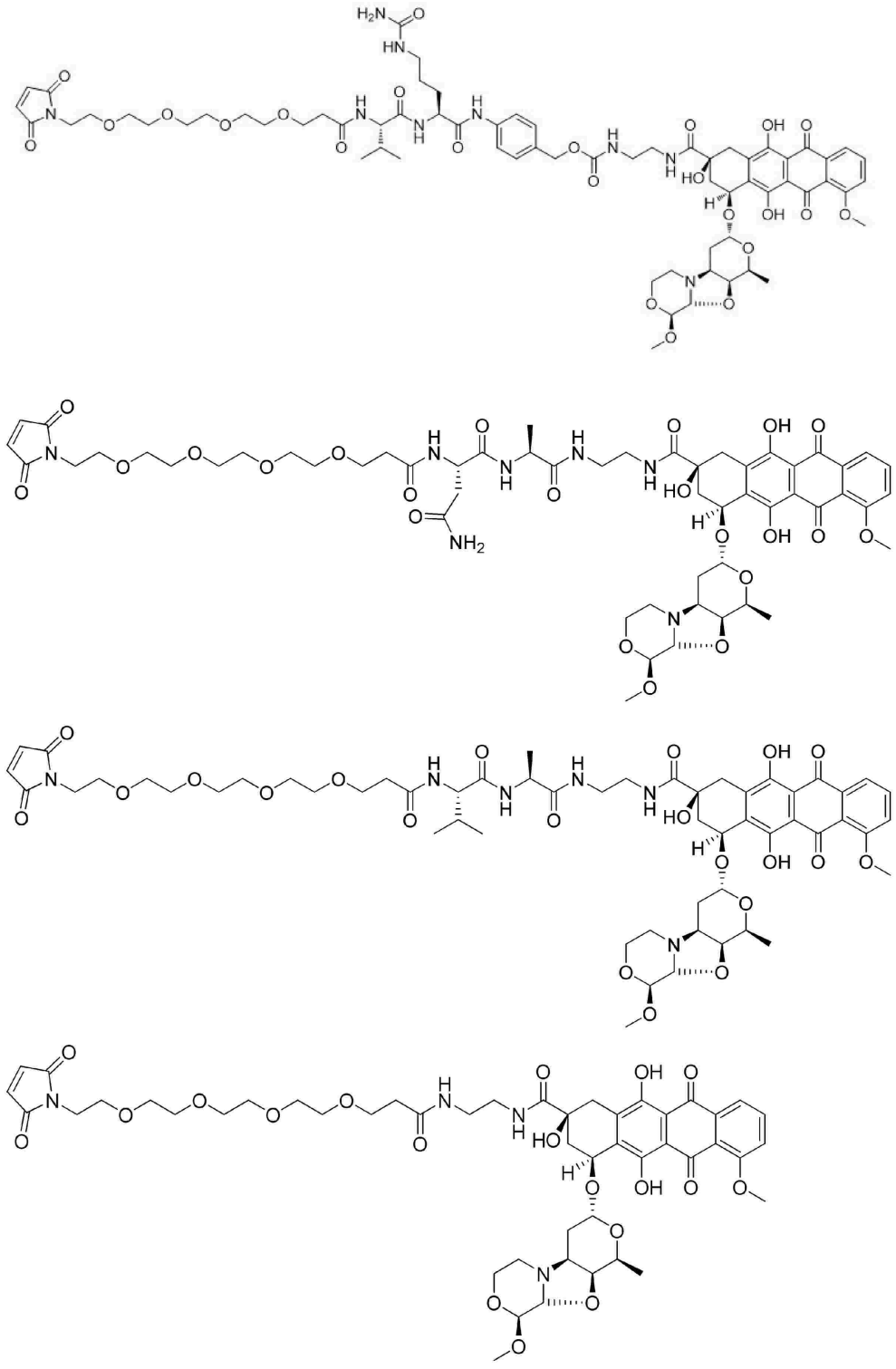
【０２４９】

好ましくは、［Ｌ２］は、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）又はアラニンである。

【０２５０】

好ましくは、ＰＮＵ誘導体は、

【化１１１】

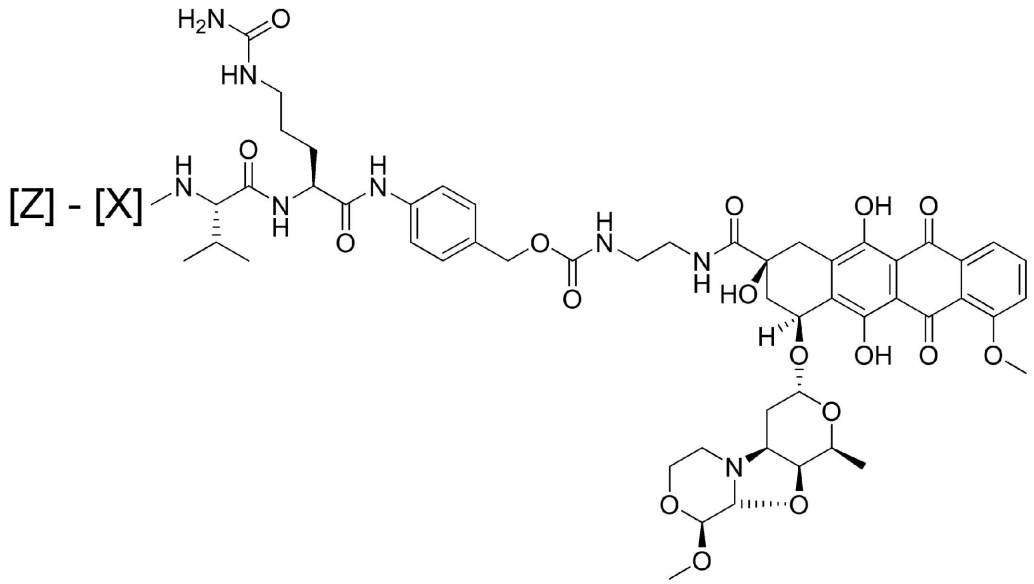


から選択される構造を有する。

【０２５１】

ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０２０／０６７２１０号明細書は、式（ＶＩ）：

【化１１２】



（ＶＩ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｚ］は、反応性基である）
のアントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体も記載している。反応性基は、コンジュゲーション反応、特に標的結合分子に対するコンジュゲーション反応における使用に好適な任意の反応性基であり得る。

【０２５２】

したがって、［Ｚ］は、バイオコンジュゲーション反応における使用のための官能基を含む部分であり得る。バイオコンジュゲーション反応における使用のための官能基としては、限定されるものではないが、
・チオエーテル及びセロノエーテル反応を介するタンパク質上のチオール基又はセレノール基との反応のためのマレイミド又はハロゲン化アルキル；
・マレイミド、ハロゲン化アルキル又はタンパク質システイン残基のチオール基を含むチオール官能化分子との反応のためのスルフィドリル基；
・チオールジスルフィド交換を介してジスルフィド結合を形成するためのチオール基との反応のための活性化ジスルフィド、例えばピリジルジチオール（Ｎｐｙｓチオール）又はＴＮＢチオール（５－チオール－２－ニトロ安息香酸）；
・アミド結合形成反応を介するタンパク質及び生体分子上のカルボキシル基への付着のためのアミノ基；
・歪み促進型アルキン－アジド環化付加銅不含化学反応を介するアジド官能化生体分子との反応のためのアルキン基、特に環拘束性アルキン、例えばジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）又はビシクロ［６．１．０］ノニン（ＢＣＮ）。アジド官能基は、例えば、非天然アミノ酸パラ－アジドメチ－Ｌ－フェニアラニンの取り込みを介してタンパク質中に、又はアジド含有糖類似体を付着させる酵素媒介糖人工操作を使用してタンパク質グリカン中に導入され得る；
・歪み促進型アルキン－アジド環化付加銅不含化学反応を介するアルキン官能化標的結合分子との反応のためのアジド基；
・オキシム形成ライゲーションを介する生体分子上のアルデヒド及びケトン基との反応のためのアミノキシ基。ケトンは、アンバー終止コドン技術の使用、例えば非天然アミノ酸パラ－アセチルフェニルアラニンの取り込みを介してタンパク質中に導入され得る。アルデヒドは、還元糖の存在を介して生体分子上に見出され得、Ｎ末端セリン残基の過ヨウ素

酸酸化又は炭水化物のシス－グリコール基の過ヨウ素酸酸化を介してタンパク質中に導入され得る。アルデヒド基は、ホルミルグリシン生成酵素によるホルミルグリシンへの規定の配列内のタンパク質システインの変換を介してタンパク質中にも取り込まれ得る。さらに、ホルミルグリシン含有タンパク質は、ヒドラジノ－ピクテ－スペングラー（ＨＩＰＳ）ライゲーションを介するペイロードへのコンジュゲーションであった；
・オキシム又はヒドラジン結合形成ライゲーション反応を介するアミノキシ又はヒドラジド又はヒドラジニル官能化生体分子との反応のためのアルデヒド又はケトン基。タンパク質アミノキシ及びヒドラジド官能化タンパク質は、インテイン融合タンパク質の開裂を介して生成され得る。

【０２５３】

したがって、［Ｚ］は、マレイミド、ハロゲン化アルキル、スルフィドリル基、活性化ジスルフィド（例えば、ピリジルジチオール（Ｎｐｙｓチオール）又はＴＮＢチオール（５－チオール－２－ニトロ安息香酸））、アミノ基、アルキン基（例えば、環拘束性アルキン、例えばジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）又はビシクロ［６．１．０］ノニン（ＢＣＮ））、アジド基、アミノキシ基、アルデヒド基及びケトン基からなる群から選択され得る。

【０２５４】

［Ｚ］は、酵素媒介バイオコンジュゲーション反応のための部分であり得る。酵素媒介バイオコンジュゲーション反応における使用のための部分としては、限定されるものではないが、ソルターゼ酵素媒介抗体コンジュゲーションにおける使用のためのポリＧｌｙ［（Ｇｌｙ）ｎ］又はＬｙｓ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙ及びＬｙｓ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙなどの配列と含有されるグルタミンγ－カルボキシアミド基への細菌トランスグルタミナーゼ媒介コンジュゲーションのための適切な第１級アミンが挙げられる。

【０２５５】

したがって、［Ｚ］は、ポリＧｌｙ及び第１級アミンからなる群から選択され得る。

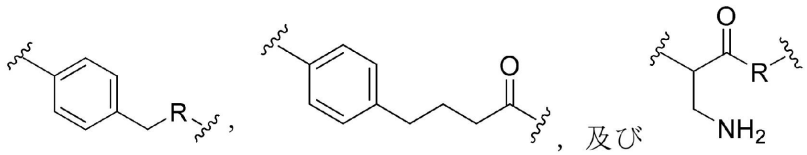
【０２５６】

したがって、式（ＩＶ）によるＰＮＵ誘導体は、Ｌ１は、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢであり、Ｌ２は、不存在であり、マレイミド基は、上記定義の別の反応性基で置き換えられ得る式（Ｖ）のＰＮＵ誘導体に対応し得る。

【０２５７】

好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコール、

【化１１３】



を含む群から選択され、

【化１１４】



は、分子の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである。

【０２５８】

最も好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、ＰＥＧ４であり得る。

【０２５９】

式（Ｖ）又は式（ＶＩ）によるＰＮＵ誘導体は、本発明によるＲＯＲ１特異的抗原結合

分子又は本発明の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体にコンジュゲートされ得る。

【０２６０】

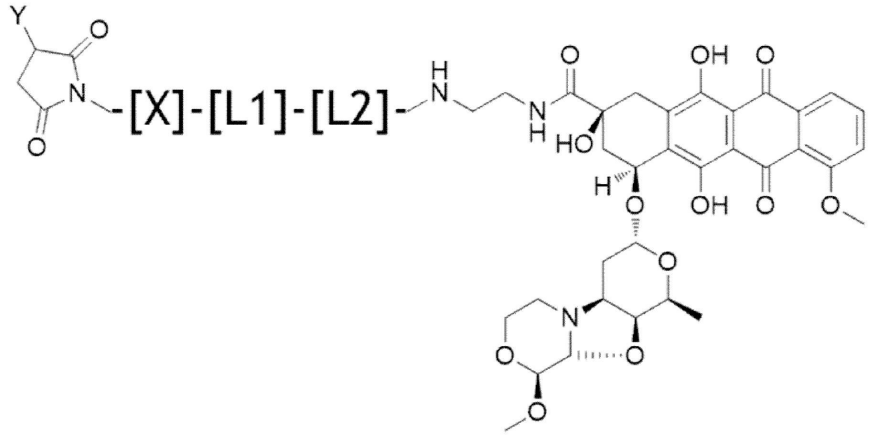
第１０の態様によれば、本発明は、

（ａ）第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体、及び

（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体

を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＩＩ）：

【化１１５】



（ＩＩＩ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；

［Ｌ１］及び［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される任意選択のリンカーであり；及び

Ｙは、第１、第２若しくは第９の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子、又は第３若しくは第４の態様の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質、又は第５の態様の組換え融合タンパク質二量体を含む）

の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲートを提供する。

【０２６１】

式（ＩＩＩ）の標的結合分子－薬物コンジュゲートは、［Ｌ１］、［Ｌ２］又は［Ｌ１］及び［Ｌ２］を含み得る。

【０２６２】

好ましくは、［Ｌ１］及び／又は［Ｌ２］がペプチドである標的結合分子－薬物コンジュゲートにおいて、前記ペプチドは、グリシンを含有しない。

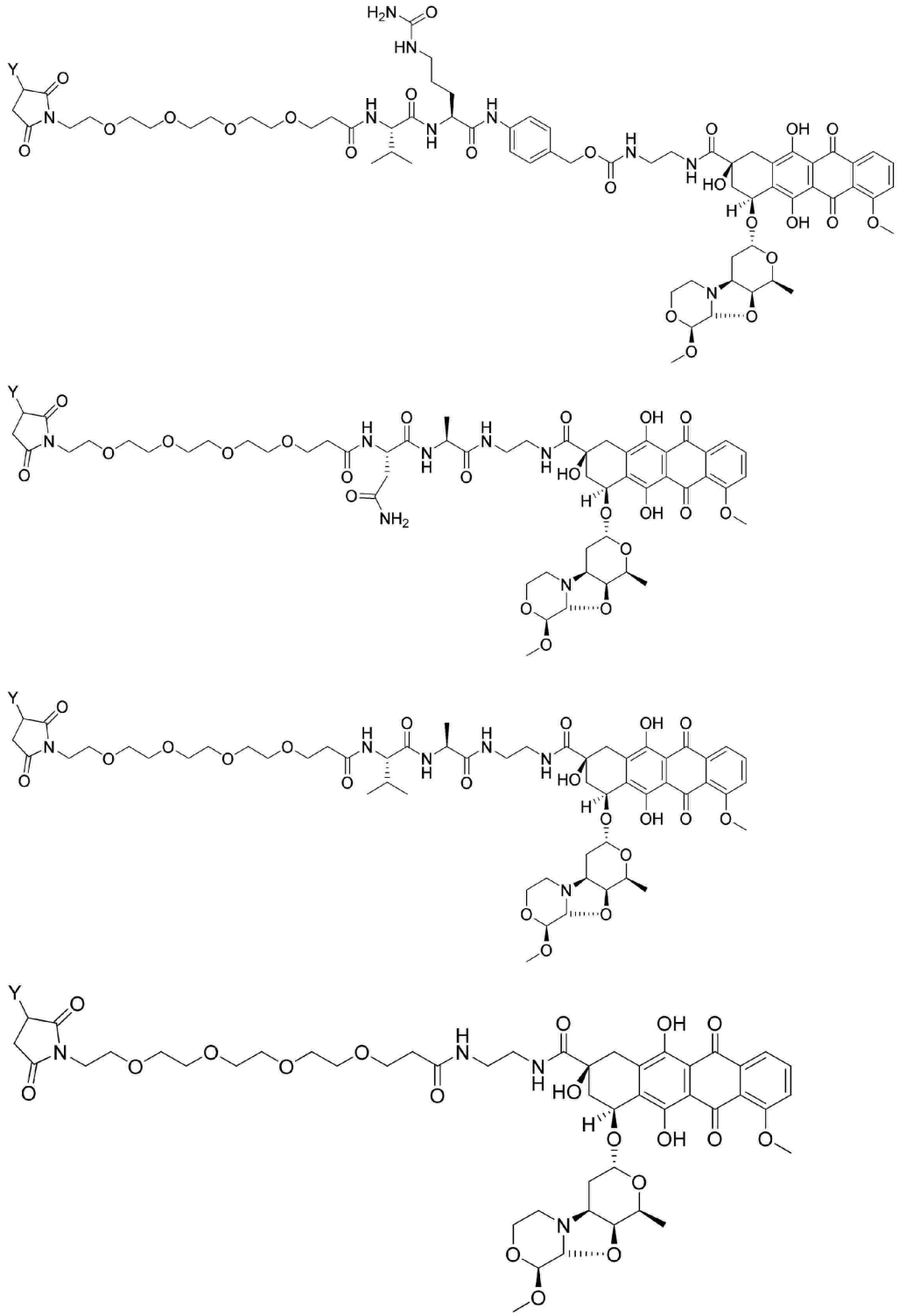
【０２６３】

任意選択のスペーサー及び／又は任意選択のリンカーが不存在である場合、その場所に結合が残留することが当業者に明確である。

【０２６４】

好ましくは、標的結合分子－薬物コンジュゲートは、

【化１１６】



から選択される構造を有する。

【０２６５】

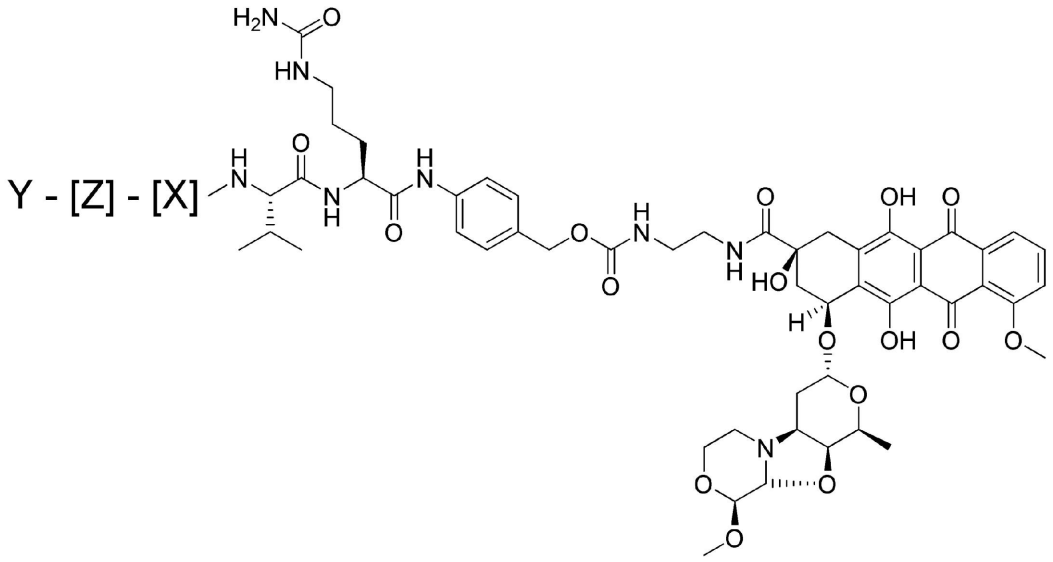
第１１の態様によれば、本発明は、

（ａ）第１、第２若しくは第９の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子又は第３、第４若しくは第５の組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体、及び

（ｂ）アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体

を含む標的結合分子－薬物コンジュゲートであって、式（ＩＶ）：

【化１１７】



（ＩＶ）

（式中、［Ｘ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若しくは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｚ］は、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体及び標的結合分子をコンジュゲートさせるために使用される反応性基に由来するリンカーであり；及び
Ｙは、第１、第２若しくは第９の態様のＲＯＲ１特異的抗原結合分子又は第３、第４若しくは第５の態様による組換え融合タンパク質若しくは組換え融合タンパク質二量体を含む）
の構造を有する標的結合分子－薬物コンジュゲートを提供する。

【０２６６】

［Ｚ］は、典型的には、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体及び標的結合分子をコンジュゲートさせるために使用される反応性基に由来する部分である。［Ｚ］は、マレイミド、ハロゲン化アルキル、スルフィドリル基、活性化ジスルフィド、アミノ基、アルキン基、アジド基、アミノキシ基、アルデヒド基及びケトン基からなる群から選択される反応性基に由来する部分であり得る。

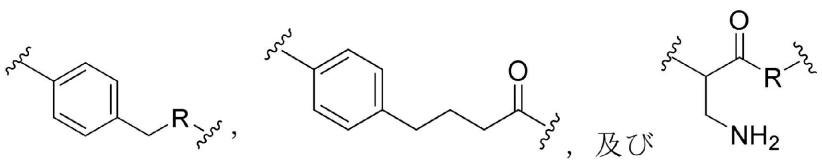
【０２６７】

したがって、［Ｚ］は、ジスルフィド結合、アミド結合、オキシム結合、ヒドラゾン結合、チオエーテル結合、１，２，３トリアゾール及びポリＧｌｙからなる群から選択され得る。

【０２６８】

好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコール、

【化１１８】



を含む群から選択され、

【化１１９】



は、部分の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、置換若しくは非置換アルキル基、置換若し

くは非置換ヘテロアルキル基、置換若しくは非置換アリール基、置換若しくは非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである。

【０２６９】

最も好ましくは、［Ｘ］は、ポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、ＰＥＧ４であり得る。

【０２７０】

好ましくは、標的結合分子は、タンパク質又は核酸である。（特異的抗原結合タンパク質とも称され得る）標的結合タンパク質の例としては、限定されるものではないが、免疫グロブリン又は抗体、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦｃ領域の断片、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域、ＣＨ３領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異的ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン、足場タンパク質（ａｆｆｉｂｏｄｙ、ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ｄａｒｐｉｎなど）が挙げられる。標的結合核酸の例としては、限定されるものではないが、アプタマーが挙げられる。

【０２７１】

好ましくは、標的結合分子－薬物コンジュゲートは、タンパク質であり、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、タンパク質のアミノ酸配列中のチオール含有アミノ酸残基又はタンパク質の化学修飾により導入された、例えば特異的抗原結合タンパク質のアミノ酸配列のＮ末端若しくはＣ末端で取り込まれたチオール基にコンジュゲートされている。チオール基は、他の標的結合分子、例えば核酸中にも取り込まれ得る。

【０２７２】

第１０又は第１１の態様の標的結合分子－薬物コンジュゲートの一実施形態において、Ｙは、ヒト免疫グロブリンＦｃ領域又はその断片を介してＰＮＵ誘導体にコンジュゲートされている、本発明の第１又は第２の態様によるＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含む。

【０２７３】

一実施形態において、ヒト免疫グロブリンＦｃ領域の断片は、Ｆｃ重鎖、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域からなる群から選択され得る。

【０２７４】

本明細書において、治療法における使用のための、上記態様による標的結合分子－薬物コンジュゲートも提供される。

【０２７５】

本明細書において、癌の処置における使用のための、上記態様による標的結合分子－薬物コンジュゲートも提供される。

【０２７６】

本明細書において、疾患の処置を、それを必要とする患者において行うための医薬品の製造における、上記態様による標的結合分子－薬物コンジュゲートの使用も提供される。

【０２７７】

本明細書において、疾患の処置を、処置を必要とする患者において行う方法であって、前記患者に、治療有効投与量の上記態様による標的結合分子－薬物コンジュゲートを投与することを含む方法も提供される。疾患は、癌であり得る。

【０２７８】

好ましくは、癌は、ＲＯＲ１陽性癌種である。より好ましくは、癌は、血液癌、例えばリンパ腫及び白血病、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）並びに神経芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌、皮膚癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、胃癌又は肝臓癌を含む固形腫瘍を含む群から選択される。癌は、中皮腫又はトリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）であり得る。中皮腫は、胸膜中皮腫であり得る

。

【０２７９】

本明細書において、上記態様のいずれかによる標的結合分子－薬物コンジュゲート及び少なくとも１つの他の薬学的に許容可能な成分を含む医薬組成物も提供される。

【０２８０】

定義

本発明の抗原特異的結合分子は、ＶＮＡＲ分子の合成ライブラリー又は軟骨魚類の免疫化に由来するライブラリーに由来するアミノ酸配列を含む。ＶＮＡＲ、ＩｇＮＡＲ及びＮＡＲという用語は、互換的にも使用され得る。

【０２８１】

アミノ酸は、本明細書において１文字コード若しくは３文字コード又はその両方として表される。

【０２８２】

「親和性精製」という用語は、分子を化学的又は結合パートナーに特異的に誘引又は結合させてその分子をパートナー部分に結合又は誘引させつつ不純物から分離することを可能にする組み合わせ又は複合体を形成することに基づく分子の精製を意味する。

【０２８３】

「相補性決定領域」又はＣＤＲ（すなわちＣＤＲ１及びＣＤＲ３）という用語は、存在が典型的に抗原結合に関与するＶＮＡＲドメインのアミノ酸残基を指す。各ＶＮＡＲは、典型的には、ＣＤＲ１及びＣＤＲ３と識別される２つのＣＤＲ領域を有する。さらに、各ＶＮＡＲドメインは同様に抗原結合に関与し得る「超可変ループ」（ＨＶ）からのアミノ酸を含む。一部の例において、相補性決定領域は、ＣＤＲ領域及び超可変ループの両方からのアミノ酸を含み得る。他の例において、抗原結合は、単一のＣＤＲ又はＨＶからの残基のみを含み得る。ＶＮＡＲ分子について一般に許容されている命名法によれば、ＣＤＲ２領域は存在しない。

【０２８４】

「フレームワーク領域」（ＦＷ）は、ＣＤＲ残基以外のＶＮＡＲ残基である。各ＶＮＡＲは、典型的には、ＦＷ１、ＦＷ２、ＦＷ３ａ、ＦＷ３ｂ及びＦＷ４と識別される５つのフレームワーク領域を有する。

【０２８５】

ＶＮＡＲ中のＦＷ、ＣＤＲ及びＨＶ領域の間の境界は固定が意図されず、したがって、それらの領域の長さ及び組成のいくらかの変動が予期されるべきである。これは、特にそれらの領域の分析において実施されてきた研究を参照して当業者により理解される。（Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ ＯＮＥ（２０１６）１１（８）；Ｌｕｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎ（２０１４）５９，１９４－１９９；Ｚｉｅｌｏｎｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２０１５）．１７，（４）３８６－３９２；Ｆｅｎｎｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ（２０１０）４００．１５５－１７０；Ｋｏｖａｌｅｎｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（２０１３）２８８．１７４０８－１７４１９；Ｄｏｏｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，（２００６）ＰＮＡＳ １０３（６）．１８４６－１８５１）。本発明の分子は、本明細書においてＦＷ、ＣＤＲ及びＨＶ領域への言及によって定義されるが、それらの厳密な定義により限定されない。したがって、ＶＮＡＲドメインの構造としての当技術分野における理解に即した変動が本明細書において明示的に企図される。

【０２８６】

「コドンセット」は、所望のバリアントアミノ酸をコードするために使用される異なるヌクレオチドトリプレット配列のセットを指す。オリゴヌクレオチドのセットは、コドンセットにより提供されるヌクレオチドトリプレットの全ての考えられる組み合わせを表し、所望のアミノ酸グループをコードする配列を含み、例えば固相合成により合成され得る。コドン指定の標準形式は、当技術分野において公知であり、本明細書に記載されるＩＵＢコードのものである。

【０２８７】
コドンセットは、典型的には、イタリック体の３つの大文字、例えばＮＮＫ、ＮＮＳ、ＸＹＺ、ＤＶＫなどによって表される。したがって、「非ランダムコドンセット」は、本明細書に記載のアミノ酸の選択基準を部分的に、好ましくは完全に満たす選択アミノ酸をコードするコドンセットを指す。ある位置で選択されたヌクレオチド「縮退」を伴うオリゴヌクレオチドの合成は当技術分野において周知であり、例えばＴＲＩＭアプローチ（Ｋｎａｐｐｅｋ ｅｔ ａｌ．；Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９９），２９６，５７－８６）；Ｇａｒｒａｒｄ＆Ｈｅｎｎｅｒ，Ｇｅｎｅ（１９９３），１２８，１０３）である。あるコドンセットを有するオリゴヌクレオチドのそのようなセットは、市販の核酸合成剤（例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡから入手可能）を使用して合成され得るか、又は市販品として（例えば、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから）得ることもできる。特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドのセットは、典型的には、異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを含み、その相違は配列全体内のコドンセットにより確立される。本発明により使用されるオリゴヌクレオチドは、ＶＮＡＲ核酸テンプレートへのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、適宜、制限酵素部位も含み得る。

【０２８８】
「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養物」は、（特に文脈が示さない限り）互換的に使用され、そのような名称は、細胞又は細胞系の全ての子孫を含む。したがって、例えば、「形質転換体」及び「形質転換細胞」のような用語は、転換数にかかわらずそれに由来する初代対象細胞及び培養物を含む。意図的又は偶発的な突然変異に起因して全ての子孫はＤＮＡ含量が正確に同一でなくてよいことも理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされるものと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が含まれる。

【０２８９】
発現に言及する際の「制御配列」は、特定の宿主生物において作動可能に結合しているコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を意味する。原核生物に好適な制御配列としては、例えば、プロモーター、任意選択で、オペレーター配列、リボソーム結合部位などが挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーなどの制御配列を使用する。

【０２９０】
「コートタンパク質」という用語は、少なくとも一部がウイルス粒子の表面上に存在するタンパク質を意味する。機能的観点から、コートタンパク質は、宿主細胞におけるウイルスアセンブリプロセスの間にウイルス粒子と会合し、アセンブルされたウイルスと、それが別の宿主細胞に感染するまで会合したままである任意のタンパク質である。

【０２９１】
特定のアッセイにおける化学実体についての「検出限界」は、そのアッセイについてバックグラウンドレベルを超えて検出され得るその実体の最低濃度である。例えば、ファージＥＬＩＳＡにおいて、特定の抗原結合断片をディスプレイする特定のファージについての「検出限界」は、特定のファージが、抗原結合断片をディスプレイしない対照ファージにより産生されるシグナルを上回るＥＬＩＳＡシグナルを産生するファージ濃度である。

【０２９２】
「融合タンパク質」及び「融合ポリペプチド」は、互いに共有結合している２つの部分を有するポリペプチドを指し、その部分の各々は異なる特性を有するポリペプチドである。特性は、生物学的特性、例えばインビトロ又はインビボ活性であり得る。特性は、簡易な化学的特性又は物理的特性、例えば標的抗原への結合、反応の触媒作用などであり得る。２つの部分は、単一ペプチド結合により直接又は１つ以上のアミノ酸残基を含有するペプチドリンカーを介して結合し得る。一般に、２つの部分及びリンカーは、互いにリーディングフレーム内に存在する。好ましくは、ポリペプチドの２つの部分は、異種又は異なるポリペプチドから得られる。

【０２９３】
本文における「融合タンパク質」という用語は、一般に、化学的手段、例として水素結合若しくは塩橋又はタンパク質合成を介するペプチド結合或いはその両方により互いに連結している１つ以上のタンパク質を意味する。典型的には、融合タンパク質はＤＮＡ組換え技術により調製され、本明細書において組換え融合タンパク質と称され得る。
【０２９４】
「異種ＤＮＡ」は、宿主細胞中に導入される任意のＤＮＡである。ＤＮＡは、種々の資源、例としてゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡ及び融合体又はそれらの組み合わせに由来し得る。ＤＮＡは、宿主若しくはレシピエント細胞と同じ細胞若しくは細胞型からのＤＮＡ又は異なる細胞型、例えばアロジェニック若しくはゼノジェニック資源からのＤＮＡを含み得る。ＤＮＡは、任意選択で、マーカー又は選択遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、温度耐性遺伝子などを含み得る。
【０２９５】
「高度に多様な位置」は、公知のアミノ酸配列及び／又は天然に存在する抗体若しくは抗原結合断片が比較される場合、その位置で表される多数の異なるアミノ酸を有する軽鎖及び重鎖の可変領域中に位置するアミノ酸の位置を指す。高度に多様な位置は、典型的にはＣＤＲ又はＨＶ領域中に存在する。
【０２９６】
「同一性」は、配列を比較することにより決定される、２つ以上のポリペプチド配列又は２つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係を説明する。同一性は、場合により、ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列の鎖間のマッチにより決定される、ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度（相同性）も意味する。２つのポリペプチド又は２つのポリヌクレオチド配列間の同一性を測定する多数の方法が存在する一方、同一性を決定するために一般に用いられる方法は、コンピュータプログラムでコード化されている。２つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラムとしては、限定されるものではないが、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１２，３８７（１９８４）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ及びＦＡＳＴＡ（Ａｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．（１９９０）２１５，４０３）が含まれる。
【０２９７】
好ましくは、タンパク質のアミノ酸配列は、ＨＧＭＰ（Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｊｅｃｔ）により提供されるＢＬＡＳＴコンピュータプログラム（Ａｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９０）２１５，４０３－４１０）のデフォルトパラメータを使用してアミノ酸レベルで本明細書に開示されるアミノ酸配列と少なくとも４５％の同一性を有する。
【０２９８】
より好ましくは、タンパク質配列は、核酸又はアミノ酸レベルで、本明細書に示されるアミノ酸配列と少なくとも４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５５％、６０％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、一層より好ましくは９５％（一層より好ましくは少なくとも９６％、９７％、９８％又は９９％）の同一性を有し得る。
【０２９９】
タンパク質は、ＨＧＭＰより提供されるＢＬＡＳＴコンピュータプログラムのデフォルトパラメータを使用して本明細書に開示される配列と少なくとも４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５０％、５５％、６０％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の同一性を有する配列も含み得る。
【０３００】
「ライブラリー」は、複数のＶＮＡＲ又はＶＮＡＲ断片の配列（例えば、本発明のポリペプチド）又はそれらの配列をコードする核酸であって、その配列が本発明の方法により

それらの配列に導入されるバリアントアミノ酸の組み合わせが異なるものを指す。
【０３０１】
「ライゲーション」は、２つの核酸断片間でホスホジエステル結合を形成するプロセスである。２つの断片のライゲーションのため、断片の末端は互いに適合可能でなければならない。一部の場合、末端は、エンドヌクレアーゼ消化後に直接適合可能になる。しかしながら、エンドヌクレアーゼ消化後に一般に産生される突出末端を平滑末端に変換してそれらをライゲーションに適合可能にすることが最初に必要なことがある。末端の平滑化のため、ＤＮＡは、好適な緩衝液中で、４つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下において、約１０単位のＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗ断片又はＴ４ＤＮＡポリメラーゼと１５℃で少なくとも１５分間処理される。次いで、ＤＮＡは、フェノール－クロロホルム抽出及びエタノール沈殿又はシリカ精製により精製される。一緒にライゲートされるべきＤＮＡ断片は、ほぼ等モル量で溶液中に装入される。溶液は、ＡＴＰ、リガーゼ緩衝液及び０．５μｇのＤＮＡに対して約１０単位のリガーゼ、例えばＴ４ＤＮＡリガーゼも含有する。ＤＮＡがベクター中にライゲートされるべき場合、ベクターは、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いる消化により最初に直鎖化される。次いで、ライゲーション段階における自己ライゲーションを防止するため、直鎖化された断片は、細菌アルカリホスファターゼ又は仔ウシ腸ホスファターゼで処理される。
【０３０２】
「突然変異」は、参照ヌクレオチド配列、例えば野生型配列に対するヌクレオチドの欠失、挿入又は置換である。
【０３０３】
「天然の」又は「天然に存在する」ＶＮＡＲは、非合成源、例えばエクスビボで得られる組織源又は板鰓亜綱（Ｅｌａｓｍｏｂｒａｎｃｈｉｉ）の動物の血清から同定されるＶＮＡＲを指す。これらのＶＮＡＲは、天然又はそうでなければ誘導された、免疫応答の任意の型において産生されるＶＮＡＲを含み得る。天然ＶＮＡＲは、それらの抗体を構成又はコードするアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を含む。本明細書において使用される場合、天然ＶＮＡＲは、「合成ＶＮＡＲ」と異なり、合成ＶＮＡＲは、例えば、ある位置の１つのアミノ酸又は２つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸で置換するか、欠失させるか又は付加し、その異なるアミノ酸が資源抗体配列と異なる抗体配列を提供することにより資源又はテンプレート配列から変化させたＶＮＡＲ配列を指す。
【０３０４】
「核酸構築物」という用語は、一般に、クローニングにより得られるか又は化学合成により生成されるＤＮＡ、ｃＤＮＡ又はＲＮＡ、例えばｍＲＮＡであり得る任意の長さの核酸を指す。ＤＮＡは、一本鎖又は二本鎖であり得る。一本鎖ＤＮＡは、コードセンス鎖であり得るか、又はそれは、非コード若しくはアンチセンス鎖であり得る。治療的使用のため、核酸構築物は、好ましくは、処置されるべき対象において発現され得る形態である。
【０３０５】
核酸に言及する場合の「作動可能に連結している」は、その核酸が別の核酸配列との機能的な関係に配置されていることを意味する。例えば、プレ配列若しくは分泌リーダーのためのＤＮＡは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのためのＤＮＡに作動可能に連結しており；プロモーター若しくはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結しており；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように位置している場合、コード配列に作動可能に連結している。一般に、「作動可能に連結している」は、結合しているＤＮＡ配列が連続しており、分泌リーダーの場合には付随し、リーディングフレーム中に存在することを意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続している必要はない。結合は、簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドのアダプター又はリンカーが慣用の実務に従って使用される。
【０３０６】

「タンパク質」という用語は、一般に、ペプチド結合により一緒に連結している複数のアミノ酸残基を意味する。これは、ペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー又はポリペプチドと互換的に使用され、同じものを意味し、それらの糖タンパク質及び誘導体を含む。「タンパク質」という用語は、タンパク質の断片、類似体、バリアント及び誘導体を含むことも意図され、その断片、類似体、バリアント又は誘導体は、参照タンパク質と本質的に同じ生物学的活性又は機能を保持する。タンパク質類似体及び誘導体の例としては、ペプチド核酸及びＤＡＲＰｉｎ（設計されたアンキリン反復タンパク質）が挙げられる。

【０３０７】

タンパク質の断片、類似体、バリアント又は誘導体は、それが由来する元のタンパク質配列の長さに応じて少なくとも２５、好ましくは３０若しくは４０又は最長５０若しくは１００若しくは６０～１２０アミノ酸長であり得る。９０～１２０、１００～１１０アミノ酸の長さが一部の例において簡便であり得る。

【０３０８】

タンパク質の断片、誘導体、バリアント又は類似体は、（ｉ）アミノ酸残基の１つ以上が保存的又は非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されており、そのように置換されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされるアミノ酸残基若しくはそうでなくてもよいもの、又は（ｉｉ）アミノ酸残基の１つ以上が置換基を含むもの、又は（ｉｉｉ）追加のアミノ酸が、成熟ポリペプチド、例えばポリペプチドの精製に用いられるリーダー又は補助配列に融合しているものであり得る。このような断片、誘導体、バリアント及び類似体は、本明細書の教示から当業者の技能の範囲内にあるとみなされる。

【０３０９】

「オリゴヌクレオチド」は、公知の方法（例えば、固相技術を使用するリン酸トリエステル、亜リン酸又はホスホラミダイト化学反応）により化学的に合成される、短い１本鎖又は２本鎖ポリデオキシヌクレオチドである。さらなる方法は、遺伝子の核酸配列全体が公知であるか、又はコード鎖に相補的な核酸の配列が利用可能である場合に使用されるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を含む。代わりに、標的アミノ酸配列が公知である場合、各アミノ酸残基についての公知の好ましいコード残基を使用して潜在的な核酸配列を推定することができる。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲル若しくは分子サイジングカラム上において又は沈殿により精製され得る。ＤＮＡが非核酸不純物（極性、非極性、イオン性などであり得る）から分離される場合、ＤＮＡは「精製される」。

【０３１０】

本明細書において使用される「資源」又は「テンプレート」ＶＮＡＲは、本明細書に記載の基準に従って多様化が実施される際に抗原結合配列がテンプレート配列として機能するＶＮＡＲ又はＶＮＡＲ抗原結合断片を指す。抗原結合配列は、一般に、ＶＮＡＲ内に好ましくは少なくとも１つのＣＤＲを含み、好ましくはフレームワーク領域を含む。

【０３１１】

「転写調節エレメント」は、以下の構成要素：エンハンサーエレメント、プロモーター、オペレーター配列、リプレッサー遺伝子及び転写終結配列の１つ以上を含有する。

【０３１２】

「形質転換」は、細胞がＤＮＡを取り込み、「形質転換体」になるプロセスを意味する。ＤＮＡの取り込みは、永続的又は一過的であり得る。「形質転換体」は、ＤＮＡと関連する表現型の発現（例えば、ＤＮＡによりコードされるタンパク質により付与される抗生物質耐性）により証明される、ＤＮＡを取り込み、保持した細胞である。

【０３１３】

出発又は参照ポリペプチド（例えば、資源ＶＮＡＲ又はそのＣＤＲ）の「バリアント」又は「突然変異体」、例えば融合タンパク質（ポリペプチド）又は異種ポリペプチド（ファージと異種）は、（１）出発又は参照ポリペプチドのものと異なるアミノ酸配列を有し、（２）天然又は人工突然変異誘発のいずれかを介して出発又は参照ポリペプチドに由来したポリペプチドである。このようなバリアントは、例えば、目的のポリペプチドのアミ

ノ酸配列内の残基からの欠失及び／又はそれらの中への挿入及び／又はそれらの置換を含む。例えば、（資源ＶＮＡＲ又は抗原結合断片内で対応する位置で見出されるアミノ酸に関して）バリアントアミノ酸を有する配列をコードする非ランダムコドンセットを含むオリゴヌクレオチドを使用して生成される本発明の融合ポリペプチドは、資源ＶＮＡＲ又は抗原結合断片に関してバリアントポリペプチドである。したがって、バリアントＣＤＲは、出発又は参照ポリペプチド配列（例えば、資源ＶＮＡＲ又は抗原結合断片のもの）に関してバリアント配列を含むＣＤＲを指す。これに関連して、バリアントアミノ酸は、出発又は参照ポリペプチド配列（例えば、資源ＶＮＡＲ又は抗原結合断片のもの）中の対応する位置のアミノ酸と異なるアミノ酸を指す。最終バリアント又は突然変異体構築物に到達するために欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせが行われ得、但し最終構築物が所望の機能的特徴を有することを条件とする。アミノ酸の変化は、ポリペプチドの翻訳後プロセスも変更し得、例えばグリコシル化部位の数又は位置を変える。

【０３１４】

「野生型」若しくは「参照」配列又は「野生型」若しくは「参照」タンパク質／ポリペプチドの配列、例えばコートタンパク質又は資源ＶＮＡＲのＣＤＲは、バリアントポリペプチドが突然変異の導入を介して誘導される参照配列であり得る。一般に、所与のタンパク質についての「野生型」配列は、天然で最も一般的な配列である。同様に、「野生型」遺伝子配列は、天然で最も一般に見出されるその遺伝子についての配列である。突然変異は、天然プロセス又は人為的手段のいずれかを介して「野生型」遺伝子（したがって、それがコードするタンパク質）中に導入され得る。このようなプロセスの産物は、元の「野生型」タンパク質又は遺伝子の「バリアント」又は「突然変異体」形態である。

【０３１５】

「ヒト化」抗原特異的抗原結合分子は、インビボでの免疫原性の潜在性を低減させる一方、特異的抗原上の特異的エピトープについての機能的結合活性を保持するように１つ以上のアミノ酸配列位置で修飾され得る。

【０３１６】

抗体可変ドメインのヒト化は、ヒト対象に投与された場合にヒト化形態が不所望な免疫学的反応を回避し得るように、治療的に有用な標的に対してヒト以外の種において生じた抗体を改変するための当技術分野において周知の技術である。ヒト化に関する方法は、Ａｌｍａｇｒｏ Ｊ．Ｃ ａｎｄ Ｗｉｌｌｉａｍ Ｓｔｒｏｈｌ Ｗ．Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ，Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｂｅｎｃｈ ｔｏ Ｃｌｉｎｉｃ．Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ａｎ Ｊ．２００９ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ及びＳｔｒｏｈｌ Ｗ．Ｒ．ａｎｄ Ｓｔｒｏｈｌ Ｌ．Ｍ．，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ２０１２にまとめられている。

【０３１７】

ＩｇＮＡＲは、免疫グロブリンと比較して区別される起源を有し、免疫グロブリン可変ドメインと比較して配列相同性をほとんど有さないが、免疫グロブリンとＩｇＮＡＲ可変ドメインとの間でいくらかの構造的類似性が存在し、その結果、類似のプロセスがＶＮＡＲドメインに適用され得る。例えば、参照により組み込まれる国際公開第２０１３／１６７８８３号パンフレットは、ＶＮＡＲのヒト化の説明を提供する。Ｋｏｖａｌｅｎｋｏ Ｏ．Ｖ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２０１３．２８８（２４）：ｐ．１７４０８－１９も参照されたい。

【０３１８】

ヒト化抗原特異的結合分子は、１つ以上のフレームワークアミノ酸残基をＤＰＫ－９の対応するフレームワークアミノ酸残基で置換することにより、野生型抗原特異的結合分子と異なり得る。ＤＰＫ－９は、可変カッパサブグループ１（Ｖκ１）のメンバーであるヒト生殖細胞系ＶＬ足場である。ＤＰＫ－９は、

（化１２０）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＹＳＴＰＮＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ
（配列番号１３２）
による配列を有する。

【０３１９】

本明細書において使用される「キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）」という用語は、例えば、人工Ｔ細胞受容体、キメラＴ細胞受容体又はキメラ免疫受容体を指し得、人工特異性を特定の免疫エフェクター細胞上にグラフト化する人工操作受容体を包含する。ＣＡＲは、抗原特異的結合タンパク質、例えばモノクローナル抗体又はＶＮＡＲの特異性をＴ細胞上に付与するために用いられ得、それにより例えば養子細胞療法における使用のための多数の特異的Ｔ細胞の生成が可能になる。ＣＡＲは、例えば、細胞の特異性を腫瘍関連抗原に指向し得る。ＣＡＲは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン及び腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含み得る。特定の態様において、ＣＡＲは、ＣＤ３－ゼータ膜貫通及びエンドドメインに融合しているモノクローナル抗体に由来する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）の融合体を含む。他の特定の態様において、ＣＡＲは、本明細書に記載のＶＮＡＲドメインとＣＤ３－ゼータ膜貫通及びエンドドメインとの融合体を含む。他のＣＡＲ設計の特異性は、受容体のリガンド（例えば、ペプチド）又はパターン認識受容体、例えばデクチンに由来し得る。特定の実施形態において、Ｂ系列分子ＣＤ１９に特異的なＣＡＲを使用することによりＴ細胞の特異性を再指向させることにより、悪性Ｂ細胞を標的化することができる。ある場合において、活性化誘導細胞死を低減させるように抗原認識ドメインのスペーシングが改変され得る。ある場合において、ＣＡＲは、追加の共刺激シグナリングのためのドメイン、例えばＣＤ３－ゼータ、ＦｃＲ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ１３７、ＤＡＰ１０及び／又はＯＸ４０を含む。一部の場合、分子、例として共刺激分子、イメージング（例えば、陽電子放出断層撮影）のためのレポーター遺伝子、プロドラッグの添加時に条件付きでＴ細胞を排除する遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン及びサイトカイン受容体がＣＡＲと共発現され得る。

【０３２０】

本明細書において使用される「コンジュゲーション」という用語は、２つ以上の化学的部分を化学的に結合させる任意の方法を指し得る。典型的には、コンジュゲーションは、共有結合を介する。本発明に関して、化学的部分の少なくとも１つは、ポリペプチドであり、一部の場合、コンジュゲーションは、２つ以上のポリペプチドを含み、その１つ以上は、組換えＤＮＡ技術により生成され得る。ポリペプチドをコンジュゲートさせるための多数の系が当技術分野で公知である。例えば、コンジュゲーションは、Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミドを使用して、ポリペプチド分子中に存在するリジン残基を介して、又はマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステルを使用して、ポリペプチド分子中に存在するシステイン残基を介して達成され得る。一部の実施形態において、コンジュゲーションは、短時間作用性の分解可能な結合、例として、限定されるものではないが、生理学的に開裂可能な結合、例としてエステル、炭酸エステル、カルバメート、スルフェート、ホスフェート、アシルオキシアルキルエーテル、アセタール及びケタール、ヒドラゾン、オキシム及びジスルフィド結合を介して生じる。一部の実施形態において、コンジュゲート部分の、それがコンジュゲートしているポリペプチド又はタンパク質からの放出を可能にするために細胞内又は細胞外酵素、例えばカテプシンファミリーメンバーにより開裂可能であり、還元条件又は酸性ｐＨ下で開裂可能であるリンカーが取り込まれる。

【０３２１】

コンジュゲーションの特に好ましい方法は、インテインベース技術（米国特許出願公開第２００６２４７４１７号明細書）の使用である。簡単に述べると、目的のタンパク質は、人工操作インテインドメインのＮ末端融合体として発現される（Ｍｕｉｒ　２００６　Ｎａｔｕｒｅ　４４２，５１７－５１８）。後続のタンパク質－インテイン結合体におけ

るＮからＳへのアシルシフトはチオエステル結合中間体をもたらし、それはビス－アミノキシ剤又はアミノ－チオールで化学的に開裂されてそれぞれ所望のタンパク質Ｃ末端アミノキシ又はチオール誘導体が得られ得る。これらのＣ末端アミノキシ及びチオール誘導体はそれぞれ化学選択的にアルデヒド／ケトン及びマレイミド官能化部分と反応されて部位特異的Ｃ末端修飾タンパク質が得られ得る。

【０３２２】

コンジュゲーションの別の好ましい方法において、ＶＮＡＲは、ＶＮＡＲのＣ末端領域若しくはその付近の又は短いＣ末端タグ配列内に組み込まれた追加のシステインとともに直接発現され、チオール反応性ペイロード、例えばマレイミド官能化部分とのコンジュゲーションを可能にする。

【０３２３】

本明細書において言及されるコンジュゲーションは、多数の有用な特性を付与し得るリンカー部分の使用を包含することも意図される。リンカー部分としては、限定されるものではないが、ペプチド配列、例えばポリ－グリシン、ｇｌｙ－ｓｅｒ、ｖａｌ－ｃｉｔ又はｖａｌ－ａｌａが挙げられる。ある場合において、リンカー部分は、ある条件下において、例えば酵素、求核性／塩基性試薬、還元剤、光照射、求電子性／酸性試薬、有機金属及び金属試薬若しくは酸化試薬の使用を介して開裂可能であるように選択され得るか、又はリンカーは、そのような条件下で開裂に抵抗するように特別に選択され得る。

【０３２４】

多数の目的を達成するためにポリペプチドが種々の機能的部分にコンジュゲートされ得る。免疫原性及び抗原性を低減させるか、又は溶解性を改善するための機能的部分の例としては、限定されるものではないが、ポリマー、例えばポリエチレングリコールが含まれる。さらなる非限定的な例としては、治療剤又は細胞毒性剤へのポリペプチドのコンジュゲーションが挙げられる。

【０３２５】

「検出可能な標識」という用語は、本明細書において、実体が分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的又は他の手段により可視化され得るか、又はそうでなければ検出され得ることを規定するために使用される。検出可能な標識は、測定され得、強度が結合実体の量に比例するシグナルをそれが生成するように選択され得る。タンパク質及びペプチドを標識及び／又は検出するための広範な種々の系が当技術分野において公知である。標識は、直接的に検出可能であり得るか（すなわち検出可能にするためのいかなるさらなる反応も操作も要求せず、例えば、フルオロフォアは、直接的に検出可能である）、又はそれは、間接的に検出可能であり得る（すなわち検出可能である別の実体との反応又は結合を介して検出可能になり、例えば、ハプテンは、レポーター、例えばフルオロフォアを含む適切な抗体との反応後の免疫染色により検出可能である）。好適な検出可能な薬剤としては、限定されるものではないが、放射性核種、フルオロフォア、化学発光剤、マイクロ粒子、酵素、比色標識、磁気標識、ハプテン、分子ビーコン及びアプタマービーコンが含まれる。

【０３２６】

インビトロ又は患者におけるＲＯＲ１を発現する細胞を殺傷するか又はその成長を阻害する方法が本明細書で企図される。一般に、細胞に関連して本明細書で使用される「殺傷すること」という用語は、細胞死を引き起こすことを意味する。これは、多数の機序、例えば壊死若しくは他の細胞損傷又はアポトーシスの誘導により達成され得る。本明細書において使用される「成長を阻害すること」又は「増殖を阻害すること」という語句は、細胞発生の防止、より具体的には、細胞分裂の防止を包含することが意図される。

【０３２７】

本明細書において使用される場合、アルキル基は、１～４０個の炭素原子を含有する直鎖又は分枝鎖の置換又は非置換基（好ましくは非置換）である。アルキル基は、任意の位置において任意選択で置換され得る。本明細書において使用される「アルケニル」という用語は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有する直鎖又は分枝鎖脂肪族部分からの

単一の水素原子の除去に由来する基を示す。本明細書において使用される「アルキニル」という用語は、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有する直鎖又は分枝鎖脂肪族部分からの単一の水素原子の除去に由来する基を指す。

【０３２８】

「アルキル」、「アリール」、「ヘテロアリール」などの用語は、多価種、例えばアルキレン、アリーレン、「ヘテロアリーレン」なども含む。アルキレン基の例としては、エチレン（－ＣＨ２－ＣＨ２－）及びプロピレン（－ＣＨ２－ＣＨ２－ＣＨ２－）が挙げられる。例示的なアリーレン基は、フェニレン（－Ｃ６Ｈ４－）であり、例示的なヘテロアリーレン基は、ピリジニレン（－Ｃ５Ｈ３Ｎ－）である。

【０３２９】

芳香環は、０、１、２つ又はそれを超える、好ましくは０、１又は２つの環ヘテロ原子を有し得る環式芳香族基である。芳香環は任意選択で置換され得、且つ／又は１つ以上の芳香環又は非芳香環（好ましくは芳香族）に縮合し得、それらは、０、１、２つ又はそれを超える環ヘテロ原子を含有して多環式環系を形成し得る。

【０３３０】

芳香環としては、アリール及びヘテロアリール基の両方が挙げられる。アリール及びヘテロアリール基は、単核であり、すなわち１つのみの芳香環（例えば、フェニル又はフェニレンなど）を有し得るか、又は多核であり、すなわち縮合し得る（例えば、ナフチル又はナフチレンなど）、個々に共有結合している（例えば、ビフェニルなど）２つ以上の芳香環並びに／又は縮合芳香環及び個々に結合している芳香環の両方の組み合わせを有し得る。好ましくは、アリール又はヘテロアリール基は、実質的に基全体にわたり実質的にコンジュゲートしている芳香族基である。アリール基は、５～４０個の環炭素原子、５～２５個の炭素原子、５～２０個の炭素原子又は５～１２個の炭素原子を含有し得る。ヘテロアリール基は、Ｎ、Ｏ、Ｓ及びＰから選択される１つ以上の環ヘテロ原子を含有する５～４０員、５～２５員、５～２０員又は５～１２員環であり得る。アリール又はヘテロアリールは、１つ以上の芳香環又は非芳香環（好ましくは芳香環）に縮合して多環式環系を形成し得る。

【０３３１】

アリール及びヘテロアリールは、好ましくは、縮合環も含み得、任意選択で置換されている最大２５個の環原子を有する単環、二環若しくは三環式芳香族又は複素環式芳香族基を示す。

【０３３２】

好ましいアリール基としては、限定されるものではないが、ベンゼン、ビフェニレン、トリフェニレン、［１，１’：３’，１’’］テルフェニル－２’－イレン、ナフタレン、アントラセン、ビナフチレン、フェナントレン、ピレン、ジヒドロピレン、クリセン、ペリレン、テトラセン、ペンタセン、ベンゾピレン、フルオレン、インデン、インデノフルオレン、スピロビフルオレンなどが挙げられる。

【０３３３】

好ましいヘテロアリール基としては、限定されるものではないが、５員環、例えばピロール、ピラゾール、シロール、イミダゾール、１，２，３－トリアゾール、１，２，４－トリアゾール、テトラゾール、フラン、チオフェン、セレノフェン、オキサゾール、イソオキサゾール、１，２－チアゾール、１，３－チアゾール、１，２，３－オキサジアゾール、１，２，４－オキサジアゾール、１，２，５－オキサジアゾール、１，３，４－オキサジアゾール、１，２，３－チアジアゾール、１，２，４－チアジアゾール、１，２，５－チアジアゾール、１，３，４－チアジアゾール、６員環、例えばピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、１，３，５－トリアジン、１，２，４－トリアジン、１，２，３－トリアジン、１，２，４，５－テトラジン、１，２，３，４－テトラジン、１，２，３，５－テトラジン及び縮合系、例えばカルバゾール、インドール、イソインドール、インドリジン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、ベンゾトリアゾール、プリン、ナフトイミダゾール、フェナントロイミダゾール、ピリドイミダゾール、ピラジンイミダゾール

、キノキサリンイミダゾール、ベンゾオキサゾール、ナフトオキサゾール、アントルオキサゾール、フェナントルオキサゾール、イソオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、ジベンゾフラン、キノリン、イソキノリン、プテリジン、ベンゾ－５，６－キノリン、ベンゾ－６，７－キノリン、ベンゾ－７，８－キノリン、ベンゾイソキノリン、アクリジン、フェノチアジン、フェノキサジン、ベンゾピリダジン、ベンゾピリミジン、キノキサリン、フェナジン、ナフチリジン、アザカルバゾール、ベンゾカルボリン、フェナントリジン、フェナントロリン、チエノ［２，３ｂ］チオフェン、チエノ［３，２ｂ］チオフェン、ジチエノチオフェン、ジチエノピリジン、イソベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェン、ベンゾチアジアゾチオフェン、２，５－ジヒドロピロロ［３，４－ｃ］ピロール－１，４－ジオン（ジケトピロロピロール、ＤＰＰ）、２－オキソ－１Ｈ－インドール－３－イリデン、［３，３’－ビピロロ［２，３－ｂ］ピリジニリデン］－２，２’（１Ｈ，１’Ｈ）－ジオン（ピリジンイソインジゴ）及び（３Ｅ）－３－（２－オキソ－１Ｈ－インドール－３－イリデン）－１Ｈ－インドール－２－オン（イソインジゴ）又はそれらの組み合わせが挙げられる。ヘテロアリール基は、アルキル、アルコキシ、チオアルキル、フルオロ、フルオロアルキル又はさらなるアリール若しくはヘテロアリール置換基で置換され得る。好ましくは、ヘテロアリール基は、チオフェンである。

【０３３４】

特に好ましいヘテロ原子は、Ｏ、Ｓ、Ｎ、Ｐ及びＳｉから選択される。典型的には、水素が本発明の分子中に含まれるヘテロ原子の原子価を完結させ、例えばＮについて１又は２つの他の基が関与する－ＮＨ－又は－ＮＨ２が存在し得る。

【０３３５】

本明細書において使用される場合、「任意選択で置換されている」という用語は、任意選択で置換される部分中の水素原子の１つ以上が好適な置換基により置き換えられていることを意味する。特に示されない限り、「任意選択で置換されている」基は、基の各置換可能位置に好適な置換基を有し得、任意の所与の構造における２つ以上の位置が指定される基から選択される２つ以上の置換基で置換され得る場合、置換基は、全ての位置で同じであるか又は異なり得る。本発明により想定される置換基の組み合わせは、好ましくは、安定的化合物の生成をもたらすものである。本明細書において使用される「安定的」という用語は、化学的に実現可能であり、室温（すなわち１６～２５℃）で十分に長く存在して、それらの検出、単離及び／又は化学合成における使用を可能にし得る化合物を指す。

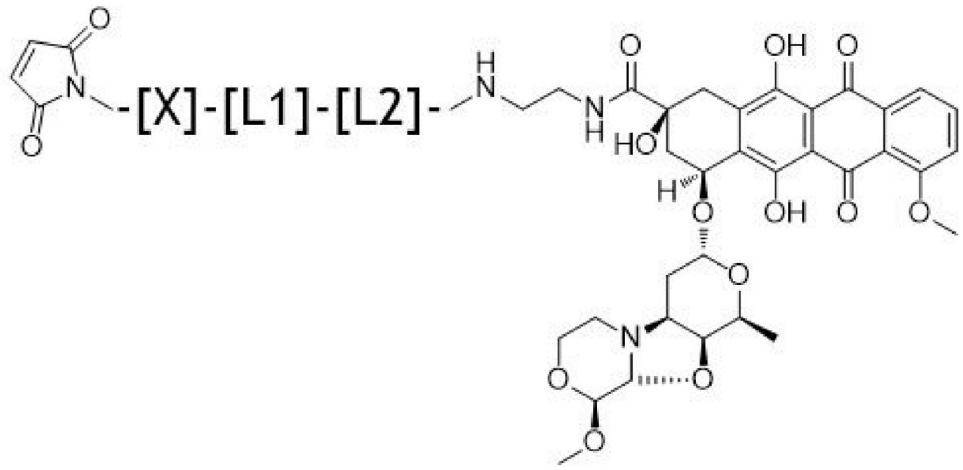
【０３３６】

上記基（例えば、本明細書において「任意に置換されている」と称されるもの、例としてアルキル、アリール及びヘテロアリール基）のいずれも、１つ以上の置換基を任意選択で含み得、それは、好ましくは、シリル、スルホ、スルホニル、ホルミル、アミノ、イミノ、ニトリロ、メルカプト、シアノ、ニトロ、ハロゲン、－ＮＣＯ、－ＮＣＳ、－ＯＣＮ、－ＳＣＮ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ０Ｒ００、－Ｃ（＝Ｏ）Ｘ０、Ｃ（＝Ｏ）Ｒ０、－ＮＲ０Ｒ００、Ｃ１～１２アルキル、Ｃ１～１２アルケニル、Ｃ１～１２アルキニル、Ｃ６～１２アリール、Ｃ３～１２シクロアルキル、４～１２個の環原子を有するヘテロシクロアルキル、５～１２個の環原子を有するヘテロアリール、Ｃ１～１２アルコキシ、ヒドロキシ、Ｃ１～１２アルキルカルボニル、Ｃ１～１２アルコキシ－カルボニル、Ｃ１～１２アルキルカルボニルオキシ又はＣ１～１２アルコキシカルボニルオキシから選択され、１つ以上のＨ原子は、Ｆ又はＣｌ及び／又はその組み合わせで任意選択で置き換えられており；Ｘ０は、ハロゲンであり、Ｒ０及びＲ００は、独立して、Ｈ又は任意選択で置換されているＣ１～１２アルキルである。任意選択の置換基は、同じ基及び／又は複数の上記の基の全ての化学的に考えられる組み合わせを含み得る（例えば、アミノ及びスルホニルは、互いに直接付着している場合、スルファモイル基を表す）。一実施形態において、置換基は、アシルでない。本明細書において使用される場合、アシルは、オキソ酸、例えばカルボン酸からの１つ以上のヒドロキシル基の除去により誘導される部分であるアシル基を指す。これは、二重結合酸素原子及びアルキル基を含有する。

【０３３７】

一部の実施形態において、基は、非置換であり得る。例えば、アントラサイクリン（ＰＮＵ）誘導体は、式（Ｖ）：

【化１２１】



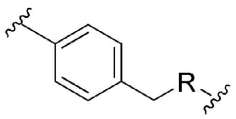
（Ｖ）

（式中、［Ｘ］は、非置換アルキル基、非置換ヘテロアルキル基、非置換アリール基、非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーであり；
［Ｌ１］及び［Ｌ２］は、バリン（Ｖａｌ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、アラニン（Ａｌａ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、ペプチド、－（ＣＨ２）ｎ－、－（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ－、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）、Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ－ＰＡＢ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＰＡＢ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ａｓｎ－Ａｌａ、グリシンを除く任意のアミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される任意選択のリンカーである）
のものであり得る。

【０３３８】

基が非置換である実施形態において、［Ｘ］は、好ましくは、ポリエチレングリコール、及び

【化１２２】



を含む群から選択され、

【化１２３】



は、分子の残部への付着点を表し、［Ｒ］は、非置換アルキル基、非置換ヘテロアルキル基、非置換アリール基、非置換ヘテロアリール基、１つ以上のヘテロ原子、ポリエチレングリコール又はそれらの組み合わせを含む群から選択される任意選択のスペーサーである。

【０３３９】

一般に、ＰＡＢという用語は、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニルを意味することが意図される。場合により文献において、ＰＡＢという用語は、ｐ－アミノベンジルを示すために使用され得る。本明細書において、ＰＡＢは、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニルを示すことを意図される。

【０３４０】

「標的結合分子」という用語は、所与の標的に結合する任意の分子を指す。これに関連して、「標的」及び「抗原」は、互換的に使用され得る。標的結合分子の例としては、天然又は組換えタンパク質、例として免疫グロブリン又は抗体、免疫グロブリンＦｃ領域、免疫グロブリンＦａｂ領域、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｖ－Ｆｃ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異性ｔ細胞エンゲージャー、インテイン、インテイン融合体、ＶＮＡＲドメイン、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＶＨドメイン、足場タンパク質（ａｆｆｉｂｏｄｙ、ｃｅｎｔｙｒｉｎ、ｄａｒｐｉｎなど）及び核酸、例としてアプタマー又は標的に結合するように開発されるか若しくは標的に天然に結合する小分子若しくは天然産物が挙げられる。

【０３４１】

チオールを導入するためのタンパク質及び生体分子の化学修飾は、十分に確立されている。方法は、アミン基と２－イミノチオラン（トラウト試薬）との反応、ＮＨＳ－エステル含有ヘテロ二官能性薬剤、例えばＮ－スクシンイミジルＳ－アセチルチオレート（ＳＡＴＡ）又はＮ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルジチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）でのアミン基の修飾とそれに続くヒドロキシルアミン及び還元剤でのそれぞれの処理並びにＣ末端チオールタンパク質及びペプチドを生成するためのシステアミンによる人工操作インテイン融合タンパク質の開裂を含む。

【０３４２】

「～を含む群から選択される」という語句は、本明細書において現れる場合には常に「～からなる群から選択される」という語句で置換され得、その逆も同様である。

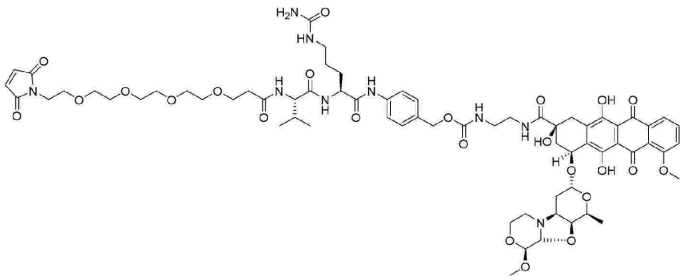
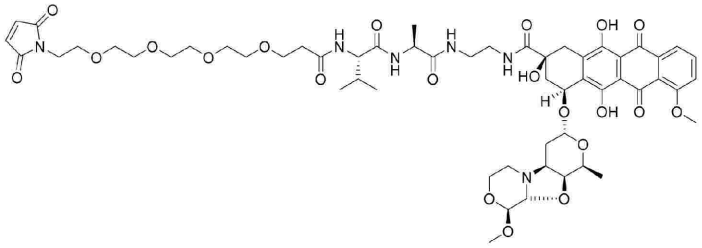
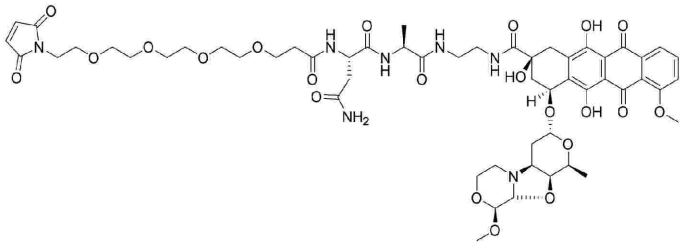
【０３４３】

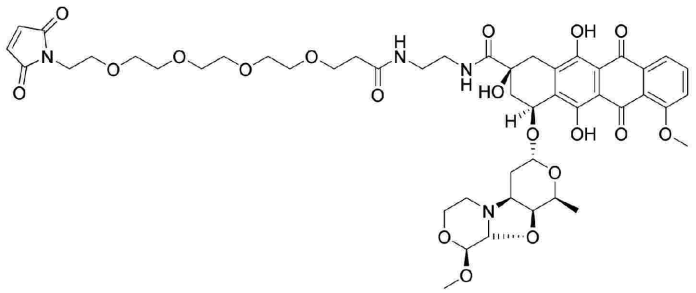
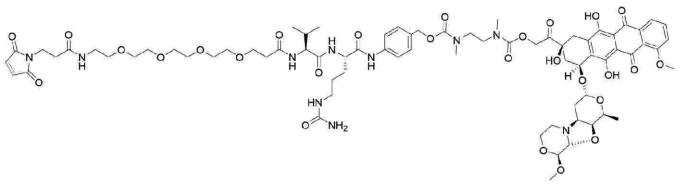
本明細書に記載のＰＮＵ誘導体は、標準的な合成方法に従って調製され得る。正確な分子が産生されたことを確認するために質量分析が使用され得る（表４）。

【０３４４】

【表５】

表 4: 質量分析による PNU 誘導体の特徴付け

名称	構造	予測質量, Da	実測質量, Da
MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682		1402.5	1402.1
MA-PEG4-va-EDA-PNU159682		1167.2	1167.6
MA-PEG4-na-EDA-PNU159682		1182.2	1182.4

MA-PEG4-EDA-PNU 159682		997.01	996.8
MA-PEG4-vc-PAB-D MAE-PNU159682		1559.6	1558.7

【０３４５】
本発明は、以下の実施例の参照によりさらに理解される。
【実施例】
【０３４６】
実施例１　－　抗ＲＯＲ１　ＶＮＡＲ　Ｂ１ループライブラリー配列の生成
Ｂ１タンパク質ライブラリー設計。
Ｂ１とＲＯＲ１との間の相互作用のより良好な理解を得るため、本発明者らは、ＲＯＲ１　Ｉｇドメインとの複合体中のＢ１の結晶構造を解析した（データ示さず）。この結晶構造は、発現及びスクリーニングされたタンパク質ライブラリー中でどの位置が変化するかを提供した。本発明者らは、８８及び９４位のＢ１トリプトファン残基のアラニンへの突然変異（標準的なアラニンスキャニングアプローチ）がタンパク質の機能又は発現の損失を引き起こしたことを事前に留意した。結晶構造から、ＣＤＲ３ループ中のそれらの残基がＲＯＲ１結合に重要であると考えられることが観察された。したがって、ＣＤＲ１及びＣＤＲ３領域内の選択位置の変化を介してタンパク質の生物物理学的特性を改変するようにＢ１ループライブラリーを設計した。特定の各ループ位置で作製された突然変異のセットは、生物物理学的特性を変化させる一方、構造統合性及び高い親和性結合を維持することを目的としてＢ１：ＲＯＲ１複合体の構造分析から提供された。
【０３４７】
ライブラリー構築
Ｂ１の配列及びループライブラリー設計を図１に示す。ライブラリーをＣＤＲ１及びＣＤＲ３の制御突然変異誘発により合成した。ＣＤＲループ内に位置する残基３０、３２、８８、９４及び９５をランダム化した。
【０３４８】
ライブラリー構築。
ｐＥＤＶ１ファージミドベクター中へのクローニングのためのＳｆｉＩ制限部位を導入するための特異的プライマーを使用するＰＣＲによりＢ１ループライブラリーＤＮＡを増幅させた。ｐＥＤＶ１中にライゲートされたライブラリーＤＮＡをエレクトロコンピテントＴＧ１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｌｕｃｉｇｅｎ）中に形質転換させた。ライブラリーサイズは、８×１０４であると算出された。
【０３４９】

ライブラリーの品質制御として８４個の単一クローンをピックし、シーケンシングした。１つの配列は、ＷＴ　Ｂ１クローンであることが見出された。ＣＤＲ１及びＣＤＲ３多様性に基づく合計７０個のユニーククローンが同定された。

【０３５０】

これらの配列は、ＩＭＡＣクロマトグラフィーによる精製並びにＥＬＩＳＡ及びフローサイトメトリーによるＲＯＲ１結合の評価を可能にするためのＣ末端ＨｉｓＭｙｃタグを含有する。

【０３５１】

ＲＯＲ１特異的ＶＮＡＲ配列についてのライブラリーのスクリーニング

Ｂ１はヒト及びマウスＲＯＲ１の両方に結合するため、組換えヒト及びマウスＲＯＲ１－ＦｃタンパクをＣＤＲループライブラリーのスクリーニングに使用した。合計９２８個のクローンが９６ウェルフォーマット中で発現され；ペリプラズム分画を抽出し、ＲＯＲ１への結合をＥＬＩＳＡで分析した。ＲＯＲ１に結合するＢ１　ＷＴ配列の他に２３個のユニーク配列が見出された。

【０３５２】

ＲＯＲ１　ＶＮＡＲバインダーの発現

２３個のクローンをＴＧ１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細菌中で発現させ、Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅを使用してＩＭＡＣ精製した。タンパク質をＰＢＳ　ｐＨ７．４に対して透析し、吸光度Ａｂｓ２８０を測定し、濃度を算出した。得られた収率は、１．５～９ｍｇ／Ｌの範囲であった。タンパク質の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。

【０３５３】

異なるループバリアントについてのＥＬＩＳＡによるヒト及びマウスＲＯＲ１への結合を表５にまとめる。

【０３５４】

方法

ライブラリー合成

ＣＤＲループライブラリーをＧｅｎｅＡｒｔ　Ｇｅｎｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓにより提供される設計に従って合成した。

【０３５５】

ｐＥＤＶ１中へのライブラリーサブクローニング

１１．４ｎｇ（１０μｌ）の合成ライブラリーのＰＣＲ増幅を、総反応容量１ｍｌ中でＰｈｕｓｉｏｎ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ及び以下のプライマーを使用して実施した。

２８０：５’－ＣＴＡＣＣＧＴＧＧＣＣＣＡＧＧＣＧＧＣＣ－３’（配列番号１３３）

２８７：５’－ＧＧＴＧＡＴＧＧＴＧＧＧＣＣＣＣＴＧＡＧＧＣＣＴ－３’（配列番号１３４）

【０３５６】

アンプリコンをＰｒｏｍｅｇａ　ＰＣＲ精製キットで精製し、ＳｆｉＩで消化し、さらにＳｆｉＩ制限酵素で開環されたｐＥＤＶ１ベクター中にライゲートした。ライゲーションを１：３の比で実施した（０．５４μｇのベクターを１．６２μｇのライブラリーＤＮＡでライゲートした）。

【０３５７】

ＣＤＲループライブラリーのスクリーニング：９６ウェルフォーマット中での単一クローンのペリプラズム発現及びＥＬＩＳＡ結合

１．１ｍｌの２×ＴＹ／０．１％のグルコース／１００μｇ／μｌのＡｍｐを含有するＧｒｅｉｎｅｒ９６深ウェルプレートに接種する。インキュベーションチャンバー中において３７℃で５時間、１８０ｒｐｍでわずかに濁るまで成長させる。

２．２×ＴＹ／Ａｍｐ中の１１０μｌ／ウェルの１ｍＭのＩＰＴＧ（ＩＰＴＧ＝１００μＭの最終濃度）で誘導し；同じ振盪速度において２８℃で一晩。

３．培養物を４℃及び３５００ｒｐｍで１５分間スピンする。上清をデカントし、ペーパ

ータオル上でタップ乾燥させる。
４．２５０μｌ／ウェルの氷冷ＴＥＳ緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ／ＨＣｌ、ｐＨ８．０／１ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ８．０／２０％のスクロース）をペレットに添加する。Ｖｏｒｔｅｘ処理する。
５．水中で１：５希釈された２５０μｌのＴＥＳ緩衝液（氷冷）を添加する。氷上で（又は縁で）３０分間保持する。上記のとおりスピンする。上清を氷上で使用直前まで保持する。
【０３５８】
ＥＬＩＳＡ
１．９６ウェルプレートを１μｇ／ｍｌのｈｕＲＯＲ１－Ｆｃ、マウスＲＯＲ１－Ｆｃ、ヒトＲＯＲ２－Ｆｃ又はＨＳＡでコーティングし、４℃で一晩インキュベートする。
２．プレートを３×ＰＢＳＴで洗浄する。
３．コーティングされたプレートを２００μｌ／ウェルの４％のＭＰＢＳでブロッキングする。室温で１時間インキュベートする。
４．３×ＰＢＳＴで洗浄する。
５．プレートを１００μｌ／ウェルのペリプラズム調製物と室温で１時間インキュベートする。
６．１００μｌの抗Ｈｉｓ－ＨＲＰ（ＰＢＳＴ中１：１０００）を添加し、室温で１時間インキュベートする。
７．２×ＰＢＳＴ及び２×ＰＢＳで洗浄する。
８．１００μｌ／ウェルのＴＭＢ基質を添加する。反応を５０μｌ／ウェルの１ＭのＨ２ＳＯ４で停止させる。
【０３５９】
ＲＯＲ１　ＶＮＡＲバインダーのラージスケール発現及び精製
１．グリセロールストックからのクローンを２０ｍｌの２×ＴＹ／０．１％のグルコース／１００μｇ／μｌのＡｍｐ中に接種する。インキュベーションチャンバー中において２５０ｒｐｍで振盪させながら３７℃で一晩成長させる。
２．一晩培養物をＴＢ＋リン酸塩＋１％のグルコース＋１００μｇ／ｍｌのＡｍｐ培地中で１：５０に希釈し（１０ｍｌの一晩培養物を５００ｍｌの培地；４５０ｍｌのＴＢ＋５０ｍｌのリン酸塩中に入れる）、終日又は可能な限り長く激しく振盪させながら（２５０ｒｐｍ）３７℃でインキュベートする。
３．細胞を２０℃での１５分間の４，０００×ｇでの遠心分離によりペレット化する。
４．細胞を同じ容量のＴＢ＋リン酸塩＋１％のグルコース＋１００μｇ／ｍｌのＡｍｐ培地中で再懸濁させ、振盪させながら３０℃で一晩インキュベートする。
５．細胞を２０℃での１５分間の４，０００×ｇでの遠心分離によりペレット化し、細胞を同じ容量のＴＢ＋リン酸塩＋１００μｇ／ｍｌのＡｍｐ培地（グルコースなし）中で再懸濁させる。ＩＰＴＧを１ｍＭのＩＰＴＧの最終濃度まで添加する。振盪させながら３０℃で４～５時間インキュベートする。
６．細胞を２０分間の４５００×ｇでの遠心分離により回収する［ペレットをこの時点で－２０℃において凍結させることができた］
７．ペレットを１０％培養物容量の氷冷ＴＥＳ緩衝液（５００ｍｌの培養物について５０ｍｌ）中で再懸濁させ、氷上で１５分間穏やかに振盪させる。
８．等容量の氷冷５ｍＭのＭｇＳＯ４を添加し（２．５ｍＭの最終濃度のＭｇＳＯ４のため）、氷上でさらに１５分間穏やかに振盪を継続する。
９．懸濁液を４℃での３０分間の８０００×ｇでの遠心分離によりペレット化する。上清は、放出されたペリプラズムタンパク質を含有する。
１０．１０×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）［１×ＰＢＳの最終濃度］をペリプラズム調製物の抽出物に添加してからＩＭＡＣ精製を行う。
【０３６０】
固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）精製

１．２～３ｍｌのニッケル－樹脂（Ｈｉｓ　Ｐｕｒ　Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ＃８８２２２）を１００ｍｌの浸透圧ショック溶液（ペリプラズム抽出物）に添加し、ローラ上において室温で１時間インキュベートする。
２．ペリプラズム抽出物をカラムに通す（Ｐｏｌｙ　ｐｒｅｐクロマトグラフィーカラム１０ｍｌ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ＃７３２１０１０）
３．樹脂を５０～１００ｍｌのＰＢＳで洗浄する。
４．タンパク質を５×１ｍｌの５００ｍＭのイミダゾール（ｐＨ８）で溶出させる。
５．溶出物を３×５リットルのＰＢＳ中で透析カセット（Ｓｌｉｄｅ　Ａ　Ｌｙｚｅｒ透析カセット７．０００ＭＷＣＯ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ＃６６７０７）中で撹拌しながら透析する。
６．タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析する。

【０３６１】

精製されたタンパク質の濃度は、アミノ酸配列から予測される理論吸光係数を使用して２８０ｎｍにおける吸光度から測定した。全てのタンパク質を還元及び非還元ＳＤＣ　ＰＡＧＥ分析並びに質量分析により特徴付けした。所望されるジスルフィド結合の形成を質量分析法により確認した。

【０３６２】

サイズ排除クロマトグラフィー

ループ人工操作バリアントをサイズ排除クロマトグラフィーにより評価した。Ｂ１ループバリアントの単量体性及び生物物理学的特性を、分析ＳＥＣカラム（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５　１０／３００　ＧＬ）を使用するサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により評価した。クロマトグラフィーをＰＢＳ　ｐＨ７．４中で実施した。ＳＥＣ上の溶出容量は、異なるタンパク質の相対的疎水性の尺度であり得る。溶出容量が増加するにつれ、カラムマトリックスとの相互作用の結果として疎水性の増加が示される。

【０３６３】

同一条件下のＳＥＣ溶出容量ランを表５に示す。

【０３６４】

ＢＬＩによるヒト及びマウスＲＯＲ１への結合

バイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）Ｏｃｔｅｔ　Ｋ２システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用して結合キネティクスを決定した。ヒト又はマウスＲＯＲ１－ｈＦｃ融合タンパク質（細胞外ドメイン）を、酢酸ナトリウムｐＨ５緩衝液中でＣＯＯＨ２チップ又はＡＲ２Ｇセンサにアミンカップリングを使用して固定化した。ＶＮＡＲを種々の濃度で試験し、バイオレイヤー干渉のためのＯｃｔｅｔ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔソフトウェア（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用してＫａ（Ｍ－１ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤ（ｎＭ）値を決定した。

【０３６５】

表５は、ヒト及びマウスＲＯＲ１についてのそれらの分子の親和性についてのＢＬＩデータをまとめる。

【０３６６】

【表６】

表 5: B1 ループライブラリーバリアントの特徴付け

	SEC	hROR1			mROR1			ELISA	
名称	RT (ml)	K_D (nM)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	hROR1	mROR1
B1	27.79	2.1	120000	0.000252					
1E2	17.74	8.11	162600	0.001319				**	-
1E5	29.1	1.02	40200	0.0000411				***	***
1B11	18.76	12.3	84500	0.00104	4.74E-09	2.35E+05	1.11E-03	***	*
C3CP	18.65	4.56	165000	0.000753	3.21E-08	1.70E+05	5.44E-03	***	*
2G5	18.16	9.49	452000	0.00429				**	-
1G12	17.72	39.9	225000	0.00897				**	-
G5CP	18.58	8.56	122000	0.00104	1.00E-07	1.00E+04	1.00E-03	**	-
2F4	18	2.58	374000	0.000966				*	-
1G9	18.52	13.4	112000	0.00151	1.78E-08	2.23E+05	3.96E-03	***	**
1H8	18.47	12.6	41300	0.000519	4.58E-09	1.82E+05	8.35E-04	***	***/**
G11CP	25.3	0.592	87900	0.0000521				**	*
D9CP	21.99	13.4	57200	0.000766				***	*
1B6	25.24	0.262	506000	0.000133				***	***
1F10	25.65	0.602	147300	0.0000886				***	***
E6CP	23.45	2.05	66500	0.000136				**	-
F2CP	20.6	9.43	48500	0.000458				***	**
B6CP	20.76	2.1	79900	0.000168	5.13E-09	1.10E+05	5.63E-04	***	**
1G1	26.67	0.662	127400	0.0000844				***	***
A10CP	18.07	11.6	157000	0.00182				*	-
G3CP	20.58	0.796	369000	0.000294	2.80E-09	2.23E+05	6.23E-04	***	***

【０３６７】

フローサイトメトリーによる細胞表面ＲＯＲ１へのループバリアントＶＮＡＲの結合

インテイン技術を使用してループバリアントＶＮＡＲを再発現させた。インテイン融合体としての発現のため、ＶＮＡＲをコードするＤＮＡを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現（ＧｅｎｅＡｒｔ、Ｔｈｅｒｍｏ）に最適化し、インテイン発現ベクター中にインフレームでクローニングした。これは、キチンカラム上での精製を可能にするためのキチン結合ドメイン（ＣＢＤ）に次に融合している人工操作インテインドメインに融合している目的のＶＮＡＲタンパク質をコードする遺伝子をもたらす。

【０３６８】

形質転換大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞を１Ｌシェーカーフラスコ中でＯＤ６００ｎｍ＝約０．６になるまで成長させ、４℃で２時間コールドショックし、次いでタンパク質発現を０．５ｍＭのＩＰＴＧで１８℃において一晩誘導した。細胞を溶解緩衝液（５０ｍＭのリン酸ナトリウムｐＨ７．４、０．５ＭのＮａＣｌ、１５％のグリセロール、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％のＳａｒｋｏｓｙｌ、１ｍＭのＡＥＢＳＦ）中で超音波処理により溶解させ、遠心分離して細胞片を除去した。ＶＮＡＲインテイン融合タンパク質を澄明化

細胞溶解物からキチンビーズ（ＮＥＢ、Ｓ６６５１）上で固定化することにより精製した。ビーズを溶解緩衝液で、次いで開裂緩衝液（５０ｍＭのリン酸ナトリウムｐＨ６．９、２００ｍＭのＮａＣｌ）で入念に洗浄し、ＶＮＡＲをビーズから４００ｍＭのジオキシアミン若しくはＯ，Ｏ’－１，３－プロパンジイルビスヒドロキシルアミン又はＶＮＡＲの対応するＣ末端アミノキシ、Ｃ末端システイン若しくはＣ末端チオール誘導体を生成するための１００ｍＭのシステイン若しくはシステアミン中での一晩の化学開裂により放出させた。

【０３６９】

次いで、開裂されたＶＮＡＲ上清をＳＥＣ（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５　２６／６０　ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）及び／又はＩＭＡＣ（ＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりさらに精製した。アミノ酸配列から予測される理論吸光係数を使用して２８０ｎｍにおける吸光度から濃度を決定した。全てのタンパク質を還元及び非還元ＳＤＣ　ＰＡＧＥ分析並びに質量分析により特徴付けした。ＶＮＡＲドメイン中の所望されるジスルフィド結合の形成を質量分析法により確認した。次いで、これらのＣ末端ＨｉｓＭｙｃタグ付タンパク質をフローサイトメトリーによりＲＯＲ１細胞表面結合について評価した。

【０３７０】

ｈＲＯＲ１への試験薬剤の細胞表面結合を異なる細胞系（Ａ５４９及びＡ４２７）中で特徴付けし、得られたＫＤａｐｐ値を決定した。接着癌細胞を組織培養フラスコから、０．１％のＥＤＴＡ／ＰＢＳ溶液と３７℃で約１０分間又は細胞が容易に脱離するまでインキュベートすることにより剥離させた。細胞を１５ｍｌチューブ中で氷冷ＰＢＳ／２％のＦＣＳ中で再懸濁させ、１５００ｒｐｍにおいて４℃で５分間遠心分離した。上清を除去し、細胞ペレットをＰＢＳ／２％のＦＣＳ中で再懸濁させた。Ｚ１　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）又はＣｈｅｍｏｍｅｔｅｃ　Ｎｕｃｌｅｏｃｏｕｎｔｅｒ　ＮＣ－２０２を使用して細胞カウントを実施し、５×１０＾５個の細胞を試験サンプルごとに９６ウェルプレート中にアリコート化した。細胞を一連の濃度の１００μｌの試験薬剤と対照と氷上で１時間インキュベートした。サンプルプレートを２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上清を除去し、マルチチャンネルピペットを使用して細胞ペレットを０．２５ｍＬの氷冷ＰＢＳ／２％のＦＣＳ中で再懸濁させることにより洗浄を実施した。サンプルを２０００ｒｐｍにおいて４℃で５分間再度遠心分離した。上清を除去し、２回のさらなる洗浄を上記のとおり実施した。最終洗浄及び遠心分離ステップ後、プレートをティッシュペーパー上でブロットすることにより過剰の液体を除去した。細胞ペレットサンプルごとに１００μｌの抗×６ＨｉｓタグＡｂ（Ａｂｃａｍ）を適宜添加し、氷上で３０分間インキュベートすることによりＶＮＡＲの結合を決定した。洗浄ステップを上記のとおり実施した。ＰＥ－抗マウス抗体（ＪＩＲ）を使用して、適切なサンプルと暗所で氷上において３０分間インキュベートすることによりＶＮＡＲ（Ｈｉｓ６タグ付）薬剤及び対応する薬物－コンジュゲートの結合を検出した。洗浄ステップを上記のとおり実施した。全ての細胞ペレットを最終的に０．３ｍｌの氷冷ＰＢＳ／２％のＦＣＳ中で再懸濁させ、暗所で氷上において放置してからＭｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｇｕａｖａ　ＥａｓｙＣｙｔｅ　ＨＴ又はＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で分析した。

【０３７１】

図２及び図３に示されるとおり、ループライブラリーバリアントは、ＲＯＲ１ｈｉヒト癌細胞系Ａ５４９に結合するが、ＲＯＲ１ｌｏｗヒト癌細胞系Ａ４２７には結合しない。２Ｖは、ナイーブＶＮＡＲライブラリーに由来する対照ＶＮＡＲ配列であり、したがって、このタンパク質クラスの代表であるが、公知の標的を有さない。

【０３７２】

実施例２　－　Ｂ１ループライブラリーバリアントのヒト化及びさらなる人工操作

２つの異なる方針を使用して３つのリードＲＯＲ１結合Ｂ１ループライブラリーＶＮＡＲのヒト化配列誘導体を生成した。

【０３７３】
ヒト化配列をヒト生殖細胞系Ｖκ１配列、ＤＰＫ－９に基づいて設計した。例えば、Ｐ３Ａ１　Ｖ１において、ＶＮＡＲのフレームワーク領域１、３及び４を突然変異させてＤＰＫ－９のフレームワーク領域とアラインさせた。
【０３７４】
第２の方針は、ＲＯＲ１結合ＶＮＡＲの結合ループを事前にヒト化されたＶＮＡＲフレームワーク上にグラフト化することを含んだ（Ｋｏｖａｌｅｎｋｏ　ｅｔ　ａｌ　ＪＢＣ　２０１３　２８８（２４）１７４０８－１７４１９；国際公開第２０１３／１６７８８３号パンフレット）。しかし、ＲＯＲ１　Ｉｇドメインとの複合体中のＶＮＡＲ　Ｂ１の構造に基づいてさらなる位置を人工操作した。
【０３７５】
追加の人工操作の部位は、タンパク質のＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４領域中のアミノ酸変化を含む。
【０３７６】
同様に、このアプローチを使用してＢ１のヒト化バリアントを開発し、それは、したがって、そのＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４領域並びにフレームワーク領域中にアミノ酸変化を含有する。Ｂ１Ｇ４は事実上、Ｂ１のループライブラリー誘導体又はＢ１のヒト化バリアントのループライブラリーバリアントであるため、ＣＤＲ１、ＨＶ２、ＨＶ４及びＣＤＲ３配列は、親タンパク質中のものと同じである。
【０３７７】
ヒト化／グラフト化ループライブラリーＶＮＡＲ配列の例は、以下である。
Ｇ３ＣＰ　Ｇ４
（化１２４）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７１）
Ｇ３ＣＰ　Ｖ１５
（化１２５）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７２）
１Ｈ８　Ｇ４
（化１２６）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７３）
１Ｈ８　Ｖ１５
（化１２７）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＳＳＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７４）
Ｃ３ＣＰ　Ｇ４
（化１２８）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ
ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号７５）
Ｃ３ＣＰＶ１５
（化１２９）
ＡＳＶＴＱＳＰＲＳＡＳＫＥＴＧＥＳＬＴＩＴＣＲＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＳＳＬＴＶＥＤＳＡＴ

ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＲＱＶＱＷＹＤＧＱＧＴＫＬＥＶＫ（配列番号７６）
Ｂ１Ｇ４
（化１３０）
ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＷＬＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号５１）。
【０３７８】
ヒト化構築物をコードするＤＮＡを、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中での発現にコドン最適化し、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｔｈｅｒｍｏ）により合成した。全てのヒト化配列を以下のＣ末端Ｈｉｓ６タグとともに生成した。
ＱＡＳＧＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０２）
【０３７９】
Ｇ４配列を追加のＣ末端タグを用いずに作製した。
【０３８０】
これらのタンパク質をコードするＤＮＡをインテイン発現ベクター中にサブクローニングし、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で発現させ、「ＶＮＡＲインテイン融合タンパク質の発現の典型的方法」セクションに既に記載のとおり精製した。
【０３８１】
ヒト化ＲＯＲ１結合ＶＮＡＲバリアントは、ＢＬＩによるヒトＲＯＲ１への高い親和性結合、良好な熱安定性及びＳＥＣによるほとんど凝集がない証拠を実証した。ＢＬＩは、チップ表面に固定化されたヒトＲＯＲ１　ＥＣＤ－Ｆｃを使用して上記のとおり実施した。ＳＥＣは、上記のとおり実施した。熱安定性アッセイは、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）色素キット（Ｔｈｅｒｍｏ）を用いるＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＳｔｅｐＯｎｅ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲシステムを使用した。アッセイミックスは、タンパク質が２０μＬ中で２０μＭの最終濃度になるように設定した。５μＬのＴｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）緩衝液を２．５ｕＬの８×Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）色素と並行して添加した。ＳｔｅｐＯｎｅソフトウェアを使用してアッセイをランし、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析した。全てのデータは、一次導関数分析からのものである。ｈＲＯＲ１結合についてのＢＬＩデータ及びｐｒｏｔｅｉｎ　ｔｈｅｒｍａｌ　ｓｈｉｆｔによる熱安定性を表６に示す。
【０３８２】
【表７】
表 6: ヒト化 VNAR ループバリアントについての熱安定性及び hROR1 結合データ

構築物	Tm (°C)	hROR1 結合 K_D (nM)
G3CP G4	57.4	8.5
G3CP V15	57.2	<0.5
1H8 G4	58.7	33.7
1H8 V15	57.4	<0.5
C3CP G4	58.2	6.8
C3CP V15	57.2	1.4
B1G4	56.0	9.2

【０３８３】
ＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４領域中の追加の突然変異を伴うヒト化ＶＮＡＲフレームワーク上へのＧ３ＣＰ、１Ｈ８及びＣ３ＣＰのＨＶ及びＣＤＲループのグラフト化又はヒトＤＰＫ－９配列からの領域でのＶＮＡＲフレームワーク配列の置換のいずれも、安定的で

、単量体で、ｈＲＯＲ１への高い親和性結合を維持する実質的に人工操作されているタンパク質を生じさせた。

【０３８４】

実施例３　－　抗ＲＯＲ１　ＶＮＡＲ　Ｐ３Ａ１　Ｇ１ループライブラリー配列の生成

ライブラリー設計

Ｐ３Ａ１　Ｇ１は、ＲＯＲ１結合ＶＮＡＲ　Ｐ３Ａ１のヒト化バージョンである。Ｐ３Ａ１　Ｇ１ループライブラリーは、フレームワーク内のいかなる変化もなしでＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４領域のランダム化を介してこのヒト化バリアントのＲＯＲ１結合親和性を改善するように設計した。突然変異の選択を、アブラツノザメ（Ｓｑｕａｌｕｓ　ａｃａｎｔｈｕｓ）からのＶＮＡＲ配列のデータ分析に基づいて行った。Ｐ３Ａ１　Ｇ１の配列及びライブラリー設計を図４に示す。

【０３８５】

ライブラリーは、ＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４の制御突然変異誘発により合成した。ＣＤＲ１、ＨＶ２及びＨＶ４ループ内にそれぞれ位置する残基２６～３３、４４～５２及び６１～６５を、図４に規定される選択アミノ酸に変化させ、８．２×１０６の組み合わせの総ライブラリー多様性をもたらした。

【０３８６】

ライブラリー構築。

ｐＥＤＶ１ファージミドベクター中へのクローニングのためのＳｆｉＩ制限部位を導入するための特異的プライマーを使用するＰＣＲによりＰ３Ａ１　Ｇ１ライブラリーＤＮＡを増幅させた。これは、追加のＳｅｒ残基をＣＤ１中に導入する。ｐＥＤＶ１中にライゲートされたライブラリーＤＮＡをエレクトロコンピテントＴＧ１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｌｕｃｉｇｅｎ）中に形質転換した。ライブラリーサイズは２×１０８と算出された。ライブラリーの品質制御として１９２個の単一クローンをピックし、シーケンシングした。

【０３８７】

抗原特異的ＶＮＡＲ配列についてのＰ３Ａ１　Ｇ１ライブラリーのスクリーニング

組換えヒトＲＯＲ１タンパク質をＰ３Ａ１　Ｇ１ライブラリーの選択及びスクリーニングに使用した。２つの方針：事前に装飾されたストレプトアビジンコートビーズ上で固定化されたビオチン化抗原上での選択及びｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅに直接固定化された抗原を用いる選択を利用してＲＯＲ１特異的バインダーを単離した。ビオチン化抗原ビーズで事前に装飾されたものでの選択は３ラウンドのパニングを含み、第１及び第２のラウンドでは低ストリンジェンシーであるが（両ラウンドについて３×ＰＢＳＴ及び３×ＰＢＳ洗浄、ラウンド１及び２についてそれぞれ１００ｎＭ及び１０ｎＭのビオチン化ｈｕＲＯＲ１）、第３のラウンドについて高ストリンジェンシーであった（１０×ＰＢＳＴ及び１０×ＰＢＳ洗浄、０．５ｎＭのビオチン化ｈｕＲＯＲ１）。ｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅ上での選択は、２ｎｇ／ｍｌの一定の抗原濃度を用いる２ラウンドのパニングからなる。選択プロセス後、アウトプットをヒト又はマウスＲＯＲ１に対するモノクローナルファージ及びペリプラズム抽出物ＥＬＩＳＡによる抗原特異的結合についてスクリーニングした。ｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅに直接固定化された抗原を用いる選択から、ＶＮＡＲをディスプレイするモノクローナルファージの９５％がヒト及びマウスＲＯＲ１に特異的であり、事前に装飾されたストレプトアビジンコートビーズ上に固定化されたビオチン化抗原上での選択について４％であった。

【０３８８】

各選択操作から合計９つのユニーク配列を発現させ、結合及び選択性について分析した（表７及び８）。

【０３８９】

【表８】

表7: immunotubeに直接固定化された抗原を用いる選択から単離されたP3A1 G1ループバリアント。

クローン ID	配列 - C 末端タグを含む: QASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号 98)
P3A1G1	TRVDQTPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYGLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTK SFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLIS EEDL (配列番号 135)
NAG8.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTKYGLYASTYWYRKNPGSPNKDRMIIGGRYSESVNNGT KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 136)
AC5.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYGLYSSTYWYRKNPGSSNKERMSISGRYSESVNKGS KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 137)
AG5.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTNYALYSSTYWYRKNPGSTNKESMSIGGRYSESVNKRS KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 138)
AF1.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDAKYGLYSSTYWYRKNPGSPDKERIINGGRYSESVNNRT KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 139)
AB11.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDARYGLFASTYWYRKNPGSPDKDSISIGGRYSESVNKRS KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 140)
NAE1.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTKYGLFSSTYWYRKNPGSSDKERISIGGRYSESVNKGP KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 141)
AA6.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTRYGLYASTYWYRKNPGSPDEESMINGGRYSESVNKRT KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 142)
AB7.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTKYALFSSTYWYRKNPGSSNEERISIGGRYSESVNNRT KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 143)
AF7.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTKYGLYASTYWYRKNPGSTDKERIIIGGRYSESVNNRS KSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGTKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLI SEEDL (配列番号 144)

【０３９０】

【表９】

表8: 事前に装飾されたストレプトアビジンコートビーズ上で固定化されたビオチン化抗原上での選択から単離されたP3A1 G1ループバリアント。

クローンID	配列 - C末端タグを含む: QASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号98)
P3A1 G1	TRVDQTPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYGLYSTYWYRKNPGSSNKEQISIS GRYSESVNKGTKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAGT KVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号135)
NAC1.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTKYGLYSSTYWYRKNPGSTDEERIII GGRYSESVNKGSKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号168)
NAC6.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTRYALYSSTYWYRKNPGSTDEERISI GGRYSESVNKGSKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号169)
NAE9.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTGYGLYSSTYWYRKNPGSTDEERMII SGRYSESVNKRTKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号170)
NAF3.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTKYGLYASTYWYRKNPGSPDEERIII SGRYSESVNKGSKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号171)
NAF5.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTKYALFSSTYWYRKNPGSTNEDRISI GGRYSESVNKGTKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号172)
AA5.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTGYGLYSSTYWYRKNPGSSDEERIII GGRYSESVNKGSKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号173)
AD10.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTKYGLYSSTYWYRKNPGSSDKESIII GGRYSESVNNGTKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号174)

AE3.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTGTRYGLYSSTYWYRKNPGSSDEERISI SGRYSESVNKGTKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号175)
AF4.S	TRVDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTRYALYASTYWYRKNPGSTDEDRIII GGRYSESVNKGSKSFTLTISSLQPEDSATYYCRAREARHPWLRQWYDGAG TKVEIKQASGAHHHHHHGAEFEQKLISEEDL (配列番号176)

【０３９１】

ＲＯＲ１　Ｐ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントの発現

クローンをＴＧ１大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細菌中で発現させ、得られたＣ末端ＨｉｓＭｙｃタグ付タンパク質を、Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅを使用するＩＭＡＣにより精製した。タンパク質をＰＢＳ　ｐＨ７．４に対して透析し、吸光度Ａｂｓ２８０を測定し、濃度を算出した。得られた収率は、０．５～６．５ｍｇ／Ｌの範囲であった。タンパク質の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。

【０３９２】

全てのタンパク質を還元及び非還元ＳＤＣ　ＰＡＧＥ分析並びに質量分析により特徴付けした。所望されるジスルフィド結合の形成を質量分析法により確認した。

【０３９３】

ＥＬＩＳＡによるｈＲＯＲ１へのＰ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントの結合

ヒトＲＯＲ１へのＰ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントの結合を最初にＥＬＩＳＡにより評価した。簡潔に述べると、ＥＬＩＳＡ法は以下のとおりである。ウェルを１００ｎｇのＲＯＲ１－ｈＦｃ抗原でコーティングし、カバーして室温で２時間インキュベートした。プレートをウェルごとにＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０（ｖ／ｖ））で３×４００ｕｌで洗浄し、次いでＰＢＳＴ中４％のスキムミルク粉末（ｗ／ｖ）で３７℃において１時間ブロッキングした。プレートを前述のとおり洗浄し、ＰＢＳ単独でさらに洗浄した。ＨｉｓＭｙｃタグ付結合タンパク質を４％のミルクＰＢＳＴ中で希釈し、４℃で一晩インキュベートした。プレートをＰＢＳＴで３回、３×ＰＢＳで洗浄し、適切な二次検出抗体を４％のミルクＰＢＳＴ中で室温において１時間使用して結合を検出した。使用される二次抗体としては、抗ｃ－Ｍｙｃ、ＨＲＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　＃Ｒ９５１－２５）マウス抗ポリＨｉｓ、ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ　＃Ａ７０５８）が挙げられる。

【０３９４】

プレートをＰＢＳＴで３回洗浄した。１００μＬのＴＭＢ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　＃３４０２９）を添加し、反応を室温で１０分間進行させた。１００μＬの２ＭのＨ２ＳＯ４を添加して反応をクエンチさせた。プレートを短時間遠心分離してから４５０ｎｍにおける吸光度をＣＬＡＲＩＯｓｔａｒプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）上で読み取った。

【０３９５】

図５は、ヒトＲＯＲ１への異なるバリアントの相対的結合を示し、配列ＮＡＧ８．Ｓ、ＡＦ７．Ｓ、ＮＡＣ６．Ｓ及びＡＥ３．Ｓが結合についての最大のシグナルを示す。

【０３９６】

同じＥＬＩＳＡ法を使用してヒトＲＯＲ１へのバリアントＮＡＧ８．Ｓ、ＡＦ７．Ｓ、ＮＡＣ６．Ｓ及びＡＥ３．Ｓの結合を親Ｐ３Ａ１　Ｇ１配列の結合と比較もした。

【０３９７】

図６に示される用量応答データは、これらのループライブラリー配列がヒトＲＯＲ１に親Ｐ３Ａ１　Ｇ１タンパク質よりも強力に結合することを示す。

【０３９８】

ＥＬＩＳＡによるＰ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントのマウスＲＯＲ１及びＲＯＲ２結合の特徴付け

　Ｐ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントの選択を、ＥＬＩＳＡによりマウスＲＯＲ１及びヒトＲＯＲ２への結合についてさらに特徴付けした。同じＥＬＩＳＡ手順を上記のとおり用いたが、プレートにコーティングされたｍＲＯＲ１－ｈＦｃ又はｈＲＯＲ２－ｈＦｃのいずれかを用いた。試験バリアントはヒトＲＯＲ２に結合しなかった。試験されたバリアントのうち、ＮＡＣ６．Ｓ及びＡＥ３．ＳがマウスＲＯＲ１に結合した。

【０３９９】

インテイン融合タンパク質としてのＰ３Ａ１　Ｇ１ループライブラリーバリアントの発現

　インテイン技術を使用してＰ３Ａ１　Ｇ１ループバリアントＶＮＡＲ　ＮＡＧ８．Ｓ、ＮＡＣ６．Ｓ及びＡＥ３．Ｓを再発現させたが、ＣＤＲ１ループからＳｅｒを欠失させた。インテイン融合体としての発現は上記のとおり、ＶＮＡＲドメインのＣ末端に取り込まれるＨｉｓタグＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧ（配列番号１６３）又はＨｉｓＭｙｃタグＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＧ（配列番号１６４）のいずれかを用いて実施した。

【０４００】

　発現及びキチンビーズ上での捕捉後、インテインＶＮＡＲを４００ｍＭのジオキシアミン若しくはＯ，Ｏ’－１，３－プロパンジイルビスヒドロキシルアミン又はＶＮＡＲの対応するＣ末端アミノキシ、Ｃ末端システイン若しくはＣ末端チオール誘導体を生成するための１００ｍＭのシステイン若しくはシステアミン中での一晩の化学開裂によりビーズから放出させた。

【０４０１】

　次いで、開裂されたＶＮＡＲ上清をＳＥＣ（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５　２６／６０　ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）及び／又はＩＭＡＣ（ＨｉｓＴｒａｐ　ＨＰ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりさらに精製してタンパク質ＮＡＧ８、ＮＡＣ６及びＡＥ３を得た。濃度を２８０ｎｍにおける吸光度からアミノ酸配列から予測される理論吸光係数を使用して決定した。全てのタンパク質を還元及び非還元ＳＤＣ　ＰＡＧＥ分析並びに質量分析により特徴付けした。ＶＮＡＲドメイン中の所望されるジスルフィド結合の形成を質量分析法により確認した。

【０４０２】

　次いで、これらのＣ末端ＨｉｓＭｙｃ又はＨｉｓタグ付タンパク質を、ＢＬＩによりＲＯＲ１結合、熱安定性及びＳＥＣにより生物物理学的特性についてさらに評価した。

【０４０３】

ＢＬＩによるヒト及びマウスＲＯＲ１への結合

　バイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）Ｏｃｔｅｔ　Ｋ２システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用して結合キネティクスを決定した。ヒト又はマウスＲＯＲ１－ｈＦｃ融合タンパク質（細胞外ドメイン）を、酢酸ナトリウムｐＨ５緩衝液中でＣＯＯＨ２チップ又はＡＲ２Ｇセンサにアミンカップリングを使用して固定化した。ＶＮＡＲを種々の濃度で試験し、バイオレイヤー干渉のためのＯｃｔｅｔ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔソフトウェア（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用してＫａ（Ｍ－１ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤ（ｎＭ）値を決定した。結合パラメータを表９に示す。

【０４０４】

熱安定性アッセイ

　熱安定性アッセイは、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）色素キット（Ｔｈｅｒｍｏ）を用いるＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＳｔｅｐＯｎｅ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲシステムを使用した。アッセイミックスは、タンパク質がＰＢＳ　ｐＨ７．４　２０μＬ中で２０μＭの最終濃度になるように設定した。２．５μＬの８×Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）色素を添加した。ＳｔｅｐＯｎｅソフトウェアを使用してアッセイをランし、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｓｈｉｆｔ（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析した。全てのデータは一次導関数分析からのもので

あり、Ｔｍ値を表９に詳述する。
【０４０５】
サイズ排除クロマトグラフィー
　Ｐ３Ａ１ループバリアントの単量体性及び生物物理学的特性を、分析ＳＥＣカラム（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００　ＧＬ）を使用するサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により評価した。クロマトグラフィーをＰＢＳ　ｐＨ７．４中で実施した。
【０４０６】
　同一条件下の％単量体性及びＳＥＣ溶出容量ランを表９に示す。
【０４０７】
【表１０】
表 9: P3A1 G1 バリアント NAG8、NAC6 及び AE3 の ROR1 結合及び物理的特性のまとめ

パラメータ	P3A1 G1	P3A1 G1 AE3 His	P3A1 G1 NAC6 His	P3A1 G1 NAG8 HisMyc
hROR1 親和性 K_D (nM)	弱いバインダー	5	13.8	12.2
hROR1 親和性 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	–	1.32E+06	1.38E+06	1.48E+06
hROR1 親和性 k_{off} (s^{-1})	–	6.60E-03	1.90E-02	1.80E-02
SEC による%単量体	100	100	100	100
SEC 溶出容量 (mL)	15.47	17.3	17.3	14.8
Tm (° C)	58.01	63.2	58.9	53.8
マウス ROR1 K_D (nM)	–	4.4	26.1	13.3

【０４０８】
実施例４　－　多量体としてのＶＮＡＲ再フォーマット化
　異なるＧｌｙＳｅｒベースリンカーを使用する遺伝子融合によりＲＯＲ１結合ループバリアントＶＮＡＲを良好にヘテロ二量体及び三量体に再フォーマット化して二重特異的バインダー、ＲＯＲ１バイパラトピックバインダー及びＲＯＲ１バイパラトピック二重特異的バインダーを生成した。
【０４０９】
二重特異的バインダー
　ＰＧＶＱＰＳＰＧＧＧＧＧＳ（配列番号９６）リンカーを使用してＲＯＲ１ループバリアントＶＮＡＲバインダーを高い親和性で血清アルブミンに結合するヒト化ＶＮＡＲ　ＢＡ１１と組み合わせることにより、いくつかの二重特異的ＶＮＡＲベースバインダーを開発した。
【０４１０】
　タンパク質を、精製及び特徴付けを支援するためのＣ末端タグＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９７）又はＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０４）とともに発現させた。このタグは、チオール媒介化学カップリング方針を使用するタンパク質へのペイロードの部位選択的バイオコンジュゲーションを容易にするための単一システイン残基も含有する。
【０４１１】
　バイオレイヤー干渉（Ｋ２　Ｏｃｔｅｔ装置／Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を上記のとおり使用して結合キネティクスを決定した。ＢＬＩ実験のため、ＲＯＲ１－ｈＦｃ（細胞外ドメイン）及びＨＳＡを酢酸ナトリウムｐＨ５緩衝液中でＡＲ２Ｇセンサにアミンカップリングを使用して固定化した。ＶＮＡＲベース分子を種々の濃度で試験し、Ｏｃｔｅｔデータ分析ＨＴソフトウェア（Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用してＫａ（Ｍ－１

ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤ（ｎＭ）値を決定した。

【０４１２】

ｈＲＯＲ１結合についての結合キネティクスも、ベースライン、会合及び解離条件において飽和レベルのＨＳＡ（２００ｎＭ）を用いて実施した。

【０４１３】

ＲＯＲ１ｈｉ　Ａ５４９癌細胞系への結合をフローサイトメトリーにより決定した。用量応答を実施し、ＶＮＡＲ濃度に応じた平均蛍光強度（バックグラウンド補正）の変化を使用して細胞表面ＲＯＲ１バインダーについてのＫＤａｐｐを決定した。

【０４１４】

これらの二重特異的ＶＮＡＲの特徴付けを表１０に示す。

【０４１５】

【表１１】

表 10: ROR1 VNAR ループライブラリーバリアントを含有する二重特異的タンパク質の特徴付け

	BA11-B1	BA11-G3CP	G3CP-BA11	BA11-1H8	1H8-BA11	G3CP V15-BA11	G3CP G4-BA11
予測質量 (Da)	27121.0	27170.0	27170.0	27066.9	27066.9	27264.1	27160.9
実測質量 (Da)	27116.5	27165.9	27165.7	27062.6	27062.4	27260.1	27156.8
hROR1 親和性 K_D (nM)	0.21	2.61	1.74	6.83	4.74	1.47	10.2
hROR1 親和性 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	9.70E+04	1.04E+05	1.13E+05	7.02E+04	8.26E+04	9.00E+04	1.52E+05
hROR1 親和性 k_{off} (s^{-1})	2.03E-05	2.73E-04	1.96E-04	4.79E-04	3.92E-04	1.33E-04	1.55E-03
HSA 親和性 K_D (nM)	3.15	2.11	5.36	3.17	3.07	1.49	3.28
HSA 親和性 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	8.48E+04	2.91E+05	1.17E+05	2.09E+05	2.57E+05	2.59E+05	2.15E+05
HSA 親和性 k_{off} (s^{-1})	2.67E-04	6.12E-04	6.25E-04	6.63E-04	7.88E-04	3.85E-04	7.06E-04
HSA の存在下での hROR1 親和性 K_D (nM)	3.05	26.7	6.21	50.8	29.4	11.0	23
HSA の存在下での hROR1 親和性 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	1.00E+05	4.87E+04	1.12E+05	4.59E+04	4.17E+04	6.20E+04	4.22E+03
HSA の存在下での hROR1 親和性 k_{off} (s^{-1})	3.06E-04	1.30E-03	6.95E-04	2.33E-03	1.22E-03	6.80E-04	1.15E-02
$ROR1^+$ A549 細胞への結合 [K_D app]	5.42 nM	2.22nM	1.74 nM	2.61nM	6.61 nM	ND	4.30 nM

【０４１６】

二重特異的ＶＮＡＲバインダーを、Ｃ末端タグ中の単一システイン残基へのコンジュゲーションを介してさらに改変した。

【０４１７】

バイパラトピックバインダー

異なるＲＯＲ１ループバリアントＶＮＡＲバインダーを、血清アルブミン結合ヒト化ＶＮＡＲ　ＢＡ１１の追加の挿入を用いて又は用いずに組み合わせていくつかのＲＯＲ１バイパラトピックバインダーを開発した。ＰＧＶＱＰＡＰＧＧＧＧＳ（配列番号９０）リンカーを使用してＶＮＡＲドメインを一緒に連結させ、タンパク質を、精製及び特徴付けを支援するためのＣ末端タグＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨＧＡＥＦＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（配列番号９７）又はＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０４）とともに発現させた。このタグは、チオール媒介化学カップリング方針を使用するタンパク質へのペイロードの部位選択的バイオコンジュゲーションを容易にするための単一システイン残基も含有する。

【０４１８】

バイオレイヤー干渉（Ｋ２　Ｏｃｔｅｔ装置／Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を上記のとおり使用して結合キネティクスを決定した。ＢＬＩ実験のため、ＲＯＲ１－ｈＦｃ（細胞外ドメイン）を酢酸ナトリウムｐＨ５緩衝液中でＡＲ２Ｇセンサにアミンカップリングを使用して固定化した。ＶＮＡＲベース分子を種々の濃度で試験し、Ｏｃｔｅｔデータ分析ＨＴソフトウェア（Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用してＫａ（Ｍ－１ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤ（ｎＭ）値を決定した。

【０４１９】

これらの二重特異的ＶＮＡＲの特徴付けを表１１に示す。

【０４２０】

【表１２】

表 11:　ROR1 VNAR ループライブラリーバリアントを含有するバイパラトピックタンパク質の特徴付け

構築物	リンカー	予測質量(還元); Da	実測質量; Da	hROR1 結合 (BLI)		
				K_D (nM)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd (s^{-1})
P3A1G1AE3-G3CPG4	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	26288.0	26284.4	0.58	4.46E+05	2.58E-04
G3CPG4 -P3A1G1AE3	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	26288.0	26284.5	0.53	4.11E+05	2.17E-04
P3A1-BA11-G3CP	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	40146.51	ND	0.22	5.82E+04	1.28E-05
P3A1-G3CP-BA11	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	40146.51	ND	0.20	5.74E+04	1.14E-05
BA11-G3CP-P3A1	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	40146.51	40142.16	0.30	2.07E+05	6.15E-05
BA11-P3A1-G3CP	PGVQPAPGGGGS (配列番号 90)	40146.51	ND	0.14	2.94E+05	4.09E-05

【０４２１】

バイパラトピックバインダーは、ＲＯＲ１の結合について個々のＲＯＲ１結合単量体と比較して増加した親和性を示す。

【０４２２】

ＢＡ１１を含有する構築物は、バイパラトピック二重特異的タンパク質バインダーの例である。

【０４２３】

さらに、ＲＯＲ１ループバリアントＶＮＡＲバインダーをヒト化ＶＮＡＲ　ＢＡ１１と組み合わせるか、又はＰＧＶＱＰＣＰＧＧＧＧＧＳ（配列番号１７７）リンカーを使用して異なるＲＯＲ１ループバリアントＶＮＡＲバインダーを組み合わせることにより、いくつかの二重特異的及びバイパラトピックＶＮＡＲベースバインダーを開発した。このリンカー配列は、チオール媒介化学カップリング方針を使用するこのリンカー中でのタンパク質へのペイロードの部位選択的バイオコンジュゲーションを容易にするための単一システイン残基も含有する。

【０４２４】

タンパク質を、精製及び特徴付けを支援するためのＣ末端タグＱＡＳＧＡＨＨＨＨＨＨ

（配列番号１０２）又はＱＡＣＫＡＨＨＨＨＨＨ（配列番号１０４）とともに発現させた。

【０４２５】

【表１３】

表 12: システイン含有リンカー配列を有する ROR1 VNAR ループライブラリーバリアントを含有する二重特異的及びバイパラトピックタンパク質の特徴付け

構築物	リンカー	予測質量(還元); Da	実測質量; Da	hROR1 結合 (BLI)		
				K_D (nM)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd (s^{-1})
P3A1G1AE3-G3CPG4	PGVQPCPGGGGGS (配列番号 177)	26232.9	26228.9	0.24	1.10E+06	2.60E-04
G3CPG4-P3A1G1AE3	PGVQPCPGGGGGS (配列番号 177)	26232.9	26228.8	0.28	6.41E+05	1.76E-04

【０４２６】

二重特異的ＶＮＡＲバインダーを、リンカー配列中の単一システイン残基へのコンジュゲーションを介してさらに改変した。

【０４２７】

コンジュゲーション前、２０当量のＴＣＥＰを二重特異的タンパク質に添加してリンカーチオールのシステイン／グルタチオンキャッピングを除去した。室温での１時間のインキュベーション後、ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ陽イオン交換クロマトグラフィーカラム（Ｃｙｔｉｖａ）上での精製によりＴＣＥＰを除去した。カラム上にロードするため、タンパク質を５０ｍＭのリン酸Ｎａ緩衝液ｐＨ６．０中で３倍希釈した。次いで、５０ｎＭのリン酸Ｎａ　ｐＨ６．０、１ＭのＮａＣｌからなる溶出緩衝液の勾配の増加によりタンパク質を溶出させた。コンジュゲートに、４当量のマレイミド含有ペイロードを添加し、室温で１時間インキュベートしておいた。次いで、上記と同じプロトコルを使用する陽イオン交換により遊離ペイロードを除去した。

【０４２８】

【表１４】

表 13: システイン含有リンカー配列を有する ROR1 VNAR ループライブラリーバリアントを含有する二重特異的及びバイパラトピックタンパク質薬物コンジュゲートの特徴付け

タンパク質	ペイロード	脱グリコシル化還元質量, Da		MS による DAR	コンジュゲート収率（全体）	hROR1 結合 (BLI)
		予測	実測		%	K_D (nM)
BA11-G3CP	MA-vc-PAB-MMAE	26825.8	26823.3	1.0	35	0.54
G3CP G4-P3A1G1 AE3	MA-vc-PAB-MMAE	27549.5	27544.9	1.0	28	0.76

【０４２９】

いかなる特定の理論にも拘束されるものではないが、産生のスケールを増加させることにより、且つ最適化された精製プロセスを用いることにより、コンジュゲート収率を改善することができることが予測される。

【０４３０】

実施例５　－　Ｆｃ融合タンパク質としてのＶＮＡＲ再フォーマット化

ＶＮＡＲ　Ｆｃ融合タンパク質

Ｆｃドメインへのタンパク質の融合は、タンパク質溶解性及び安定性を改善し、血漿半減期を顕著に増加させ、全体的な治療有効性を改善し得る。ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ配列を以下に示し、さらなる例を図７に示す。

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（ｈＦｃ）

（化１３１）

ＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１４５）

【０４３１】

ＶＮＡＲループバリアントを、ｈＩｇＧ１　Ｆｃ配列中のシステイン置換Ｓ２３９Ｃ（ＥＵナンバリング）を含有する人工操作ｈＩｇＧ１　Ｆｃドメインに、標準的な［Ｇ４Ｓ］３リンカーを介して遺伝子融合させた。ＶＮＡＲ　Ｆｃ融合タンパク質をＣＨＯ　Ｋ１細胞中で分泌タンパク質として一過的に発現させ、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ（商標）（Ｅｖｉｔｒｉａ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を使用して培地から精製した。精製されたタンパク質をＰＢＳ　ｐＨ７．４又はＰＢＳ＋１００ｍＭのＡｒｇ　ｐＨ７．４中に交換し、ＳＥＣ（ＡｄｖａｎｃｅＢｉｏ、Ａｇｉｌｅｎｔ、ランニング緩衝液ＤＰＢＳ　ｐＨ７．４）、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ及び質量分析により分析して配列及びタンパク質統合性を確認した。

【０４３２】

Ｐｉｏｎｅｅｒ表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）装置（ＳｅｎｓｉＱ／Ｐａｌｌ　Ｆｏｒ

ｔｅＢｉｏ）又はバイオレイヤー干渉（ＢＬＩ）Ｏｃｔｅｔ　Ｋ２システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用して結合キネティクスを決定した。ＲＯＲ１－ｈＦｃ融合タンパク質（細胞外ドメイン）を、酢酸ナトリウムｐＨ５緩衝液中でＣＯＯＨ２チップ又はＡＲ２Ｇセンサにアミンカップリングを使用して固定化した。ＶＮＡＲ－Ｆｃ分子を種々の濃度で試験し、バイオレイヤー干渉のためのＯｃｔｅｔ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔソフトウェア（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用してＫａ（Ｍ－１ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤａｐｐ（ｎＭ）値を決定した。代わりに、ＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体をＡＨＣチップ上に固定化することにより、結合についてのキネティックパラメータを決定した。ヒトＲＯＲ１（ＥＣＤ）を種々の濃度で試験し、バイオレイヤー干渉のためのＯｃｔｅｔ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔソフトウェア（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用して１：１結合についてのＫａ（Ｍ－１ｓ－１）、Ｋｄ（ｓ－１）及びＫＤ（ｎＭ）値を決定した。ＲＯＲ１　２Ａ２　ｍＡｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）をＲＯＲ１への陽性／陰性結合についての対照として含めた。２Ｖは、ナイーブＶＮＡＲライブラリーに由来する対照ＶＮＡＲ配列であり、したがって、このタンパク質クラスの代表であるが公知の標的を有さない。ＳＥＣ分析を上記のとおり実施した。データを表１４にまとめ、それは親Ｂ１－ｈＦｃタンパク質に対するループライブラリーｈＦｃバリアントの有利な特性を実証する。

【０４３３】

癌細胞系の表面上でのＲＯＲ１へのＶＮＡＲ－Ｆｃ融合体の結合は、上記の方法を使用するフローサイトメトリーにより測定し、ＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体分子の結合を１００μＬのＰＥ－抗ヒト抗体（ＪＩＲ）の添加及び３０分間の氷上でのインキュベーションにより決定した。ＶＮＡＲ－ｈＦｃ濃度に応じた蛍光強度の増加からＫＤａｐｐ値を算出した。図８は、ＲＯＲ１ｈｉＡ５４９肺腺癌細胞への異なるＶＮＡＲ－Ｆｃ融合体の結合を示す。

【０４３４】

表１４は、発現収率（最終精製緩衝液交換タンパク質に基づく）、ｈＦｃ融合体のＳＥＣ分析、ＢＬＩによるＲＯＲ１についてのそれらの分子の親和性及びＲＯＲ１ｈｉＡ５４９細胞の結合についてのＫＤａｐｐをまとめる。

【０４３５】

【表１５】

表 14: ROR1 ループバリアント VNAR-Fc 融合体の特徴付け

	B1-hFc	G3CP-hFc	G3CP G4-hFc	1H8-hFc	1H8 G4 - hFc	1H8 V15-hFc
全発現収率（一過的 CHO 発現）	50 mg/L	> 100 mg/L	>100 mg/L	80 mg/L	>100 mg/L	>100 mg/L
SEC による%単量体	81	>98	95.2	90.5	96.1	92.5
hROR1 親和性 $K_D$app (nM)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.3	0.19
hROR1 親和性 K_D (1:1) (nM)	3.78	5.74	17.9	26.9	2506	16.9
ラット ROR1 親和性 $K_D$app (nM)	0.04	0.7	1.9	4.4	NB	2.5
細胞表面 hROR1 結合(フローサイトメトリータイトレーション A549 細胞) $K_D$app (nM)	1.7	0.72	0.75	ND	ND	ND

【０４３６】

ＰＢＳ緩衝液中のＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合タンパク質の相対的安定性を評価した。Ｇ３Ｃ

Ｐ－ｈＦｃ、Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ及びＢ１Ｇ４－ｈＦｃ並びに親Ｂ１－ｈＦｃを、０．０５％のアジ化ナトリウムを含有する無菌ＰＢＳ緩衝液ｐＨ７．４中で２ｍｇ／ｍＬで３７℃において９６時間インキュベートした。ＵＶ吸光度を２８０ｎｍ及び３２０ｎｍでｔ＝０及びｔ＝９６時間で測定した。ｔ＝０及びｔ＝９６時間でのタンパク質の単量体性をサイズ排除クロマトグラフィー（ＰＢＳ　ｐＨ７．４ランニング緩衝液を用いるＳ２００Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００ＧＬ）により評価した。図１６に示されるとおり、２８０ｎｍ及び３２０ｎｍの両方でのＵＶ吸光度は、Ｂ１－ｈＦｃについて９６時間のインキュベーション後に増加したが、ループライブラリーバリアント（すなわちＧ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ）について増加しなかった。特に３２０ｎｍでの吸光度は、凝集物粒子による光の散乱に起因する。２８０ｎｍでの吸光度から算出されたループライブラリーバリアント（すなわちＧ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ）についてのタンパク質濃度は、実験全体にわたり一定のままである。ｔ＝０対ｔ＝９６時間でのＳＥＣ分析（図１７）は、ループライブラリーバリアント（すなわちＧ３ＣＰ－ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ）が良好な安定性を有し、親タンパク質Ｂ１－ｈＦｃよりも安定的であることを示す。

【０４３７】

バイパラトピックＶＮＡＲ　Ｆｃ融合タンパク質

ＶＮＡＲループバリアントを、ヘテロ二量体のために人工操作されているｈＩｇＧ１　Ｆｃに標準的な［Ｇ４Ｓ］３リンカーを介して遺伝子融合させた（Ｒｉｄｇｗａｙ　１９９６　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　９（７）：６１７－２１）。ノブバリアントは、３３６位にトリプトファン置換（Ｔ３６６Ｙ）を有し、ホールバリアントは、４０７位にトレオニン置換（Ｙ４０７Ｔ）（ＥＵナンバリング）を有する。このアプローチを使用して、一方のアームがＶＮＡＲループバリアントを含み、他方のアームが第２のＲＯＲ１結合ＶＮＡＲを含むバイパラトピックＲＯＲ１バインダーを生成した。さらに、システイン置換をノブ及びホールバリアントの両方のｈＩｇＧ１　Ｆｃ配列［Ｓ２３９Ｃ（ＥＵナンバリング）］中で取り込んで異なるペイロードとのバイオコンジュゲーションを容易にした。

【０４３８】

ＶＮＡＲ　Ｆｃ融合タンパク質を、ＣＨＯ　Ｋ１細胞中で分泌タンパク質として一過的に共発現させ、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ（商標）（Ｅｖｉｔｒｉａ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を使用して培地から精製した。精製されたタンパク質をＰＢＳ　ｐＨ７．４中に交換し、ＳＥＣ（ＡｄｖａｎｃｅＢｉｏ、Ａｇｉｌｅｎｔ、ランニング緩衝液ＤＰＢＳ）、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ及び質量分析により分析して配列及びタンパク質統合性を確認した。

Ｇ３ＣＰ　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）

（化１３２）

ＡＳＶＮＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＶＴＧＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＱＥＲＩＳＩＳＧＲＹＶＥＳＶＮＫＲＴＭＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴ
ＹＹＣＫＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧ
ＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬ
ＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰ
ＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ
ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴ
ＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１４６）

Ｇ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｙ４０７Ｔ）

（化１３３）

ＴＲＶＤＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＶＬＴＤＡＮＹＧＬＡＡＴＹＷＹＲＫＮ
ＰＧＳＳＮＫＥＲＩＳＩＳＧＲＹＳＥＳＶＮＫＧＴＭＳＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＳＡＴ

ＹＹＣＲＡＹＰＷＧＡＧＡＰＹＮＶＱＷＹＤＧＡＧＴＫＶＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＴＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１４７）

ＰＳＡ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋Ｔ３６６Ｙ）

（化１３４）

ＴＲＶＤＱＴＰＲＴＡＴＫＥＴＧＥＳＬＴＩＮＣＶＬＴＤＴＳＹＧＬＹＳＴＳＷＦＲＫＮＰＧＴＴＤＷＥＲＭＳＩＧＧＲＹＶＥＳＶＮＫＧＡＫＳＦＳＬＲＩＫＤＬＴＶＡＤＳＡＴＹＹＣＫＡＲＥＡＲＨＰＷＬＲＱＷＹＤＧＡＧＴＶＬＴＶＮＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＣＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＹＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号１４８）

【０４３９】

全てのタンパク質を還元及び非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析（図９）並びに質量分析（表１５）により特徴付けした。

【０４４０】

バイオレイヤー干渉（Ｋ２　Ｏｃｔｅｔ装置／Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を上記のとおり使用してＲＯＲ１への結合を決定した。ＢＬＩ実験のため、ＲＯＲ１－ｈＦｃ、（細胞外ドメイン）をセンサ上に固定化した。データを表１５に示す。

【０４４１】

【表１６】

表 15: バイパラトピック VNAR-Fc 融合体の MS 特徴付け及び BLI によるヒト ROR１への結合

タンパク質	予測 MW ΔC 末端 Lys, Da			実測 MW, Da			ROR1 結合 (BLI)
	単量体１	単量体２	二量体	単量体１	単量体２	二量体	K_D app (nM)
G3CP-P3A1 hFc (S239C+KIH)	38,775.5	39,059.9	77,827.3	38,770.0	39,054.5	77,820.2	<0.05
G3CPG4-P3A1 hFc (S239C+KIH)	38,766.4	39,059.9	77,818.2	38,760.9	39054.5	77,812.1	<0.05

【０４４２】

癌細胞系の表面上でのＲＯＲ１へのバイパラトピックＶＮＡＲ－Ｆｃ融合体の結合を、上記の方法を使用するフローサイトメトリーにより測定した。ＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体分子の結合を１００μＬのＰＥ－抗ヒト抗体（ＪＩＲ）の添加及び３０分間の氷上でのインキュベーションにより決定した。ＶＮＡＲ－ｈＦｃ濃度に応じた蛍光強度の増加からＫＤａｐｐ値を算出した。図１０は、ＲＯＲ１ｈｉＡ５４９肺腺癌細胞及びＲＯＲ１ｌｏｗＡ４２７細胞へのバイパラトピックＶＮＡＲ－Ｆｃ融合体の結合を示す。Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ

１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）はＡ５４９細胞に強力に結合し、ＫＤａｐｐはそれぞれ０．０６ｎＭ及び０．２０ｎＭであるが、Ａ４２７細胞への結合をほとんど示さない。

【０４４３】

実施例６　－　ループバリアントＶＮＡＲ薬物コンジュゲート

ＶＮＡＲ－ｈＦｃ薬物コンジュゲート

ＡＤＣを生成するための別のアプローチは、抗体の軽鎖及び重鎖上の位置でシステイン置換又は付加を人工操作することであり、これらのシステインは、部位特異的標識のための反応性チオール基を提供する（Ｊｕｎｕｔｕｌａ　２００８　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２６，９２５－９３２、Ｊｅｆｆｒｅｙ　２０１３、Ｓｕｔｈｅｒｌａｎｄ　２０１６）。

【０４４４】

上記のとおりＦｃ領域中に人工操作されている追加のシステインを有する抗ＲＯＲ１ループライブラリーＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体を生成し、そのシステインは、蛍光標識（ＡＦ４８８）及び細胞毒性薬（ＭＡ　ＰＥＧ４　ｖｃ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ　１５９６８２及びＭＡ　ＰＥＧ４　ｖａ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ　１５９６８２）のマレイミド誘導体での部位特異的標識を可能にした（図１１）。

【０４４５】

ＶＮＡＲ－ｈＦｃ－薬物コンジュゲートの生成

文献［Ｊｕｎｕｔｕｌａ　ｅｔ　ａｌ，２００８　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｊｅｆｆｒｅｙ　ｅｔ　ａｌ，２０１３　Ｂｉｏｃｏｎｊ　Ｃｈｅｍ］から適合された部分的還元、リフォールディング及び標識方法を使用して、これらのタンパク質をマレイミドＰＮＵ誘導体で部位特異的標識した。簡潔に述べると、１ｍｇ／ｍｌのＶＮＡＲ　ｈＦｃ溶液を、１ｍＭ　ＥＤＴＡを有するＰＢＳ＋１００ｍＭのＬ－アルギニンｐＨ７．４中で調製した。２０モル当量のＴＣＥＰを添加し、４℃で最低４８時間インキュベートした。３０モル当量のＤＨＡＡを添加し、ｐＨを６．５に調整し、室温で１時間インキュベートした。再フォールドされたＶＮＡＲ　Ｆｃ　Ｓ２３９ＣをＰＢＳ＋５０ｍＭのＬ－アルギニン中に入念に透析又は緩衝液交換し、ＵＶにより定量してから４又は５モル当量のマレイミドＰＮＵ溶液と室温で一晩反応させた。コンジュゲートをＳＥＣにより精製し、分析ＨＩＣ、分析ＳＥＣ及びＬＣ－ＭＳにより分析した。表１６は、調製されたコンジュゲートをまとめる。

【０４４６】

【表１７】

表 16：VNAR-PNU コンジュゲートの特徴のまとめ

タンパク質	ペイロード	脱グリコシル化還元質量，Da		MS による DAR	コンジュゲート収率（全体）	HMW 凝集物
		予測	実測		%	%
G3CP hFc	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,239.6	40,239.8	2.1	52	<3
	MA-PEG4-va-EDA-PNU159682	40,003.6	40,005.3	2.0	61	<3
G3CPG4 hFc	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,229.5	40,230.0	2.2	49	<1.5
	MA-PEG4-va-EDA-PNU159682	39,994.5	39,995.4	2.0	61	<1
B1G4 hFc	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,253.0	40,251.8	2.0	37	<1
	MA-PEG4-va-EDA-PNU159682	40,017.0	40,016.2	2.0	43	<1
B1 hFc	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,262.2	40,263.3	2.1	46	<1
	MA-PEG4-va-EDA-PNU159682	40,026.9	40,027.6	2.0	50	<1

【０４４７】

最終コンジュゲートのＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び質量分析による分析は、標識が定量的に進行して薬物抗体比（ＤＡＲ）が２である高度に純粋な均一のタンパク質薬物コンジュゲートを生じさせたことを決定した。

【０４４８】

ＥＬＩＳＡによるｈＲＯＲ１へのＶＮＡＲ－ｈＦｃ－薬物コンジュゲートの結合

ヒトＲＯＲ１へのＧ３ＣＰ　ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ並びにそれらのそれぞれの薬物コンジュゲートの結合を、ＥＬＩＳＡにより評価した。簡潔に述べると、ＥＬＩＳＡ法は以下のとおりである。ウェルを１００ｎｇのＲＯＲ１－ｈｉｓ抗原でコーティングし、カバーして室温で２時間インキュベートした。プレートをウェルごとにＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０（ｖ／ｖ））で３×４００ｕｌで洗浄し、次いでＰＢＳＴ中４％のスキムミルク粉末（ｗ／ｖ）で３７℃において１時間ブロッキングした。プレートを前述のとおり洗浄し、ＰＢＳ単独でさらに洗浄した。Ｂ１ループバリアント（ＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体）結合タンパク質を４％のミルクＰＢＳＴ中で希釈し、４℃で一晩インキュベートした。プレートをＰＢＳＴで３回、３×ＰＢＳで洗浄し、適切な二次検出抗体を４％のミルクＰＢＳＴ中で室温において１時間使用して結合を検出した。検出に使用される二次抗体は、ウサギ抗ヒトＩｇＧ　Ｈ＆Ｌ（ＨＲＰ）、Ａｂｃａｍカタログ番号ａｂ６７５９であった。プレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、次いで１００μＬのＴＭＢ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　＃３４０２９）を添加し、反応を室温で１０分間進行させた。次い

で、１００μＬの２ＭのＨ２ＳＯ４を添加して反応をクエンチさせた。プレートを短時間遠心分離してから４５０ｎｍでの吸光度をＣＬＡＲＩＯｓｔａｒプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）上で読み取った。

【０４４９】

図１２は、Ｇ３ＣＰ　ｈＦｃ及びＧ３ＣＰＧ４　ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートがヒトＲＯＲ１に強力に結合し、親タンパク質への異なるＰＮＵリンカーペイロードのコンジュゲーション後に結合活性の損失がないことを示す。

【０４５０】

抗ＲＯＲ１　ＶＮＡＲ薬物コンジュゲートで処理された癌細胞についてのインビトロ細胞生存アッセイ

細胞を白色透明底９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ）中に播種し、３７℃、５％のＣＯ２で２４時間インキュベートした。翌日、希釈系列を各試験薬剤について×１０作業ストックで設定した。用量応答×１０ストックは、１００００、５０００、１０００、５００、１００、５０、１０、５、１、０．５ｎＭなどであった。１０μＬの×１０ストック溶液を細胞プレートにマルチチャンネルピペットを使用して添加した（ウェル当たり９０μｌ）。これは、ウェル中への１：１０希釈及び１０００ｎＭ（カラム１）～０．０５ｎＭ（カラム１０）の範囲又は最も感受性の細胞系について適宜０．５ｆＭまで続く用量応答をもたらした。１０μｌのビヒクル対照（ＰＢＳ）を対照ウェル（カラム１１及び１２）に添加した。プレートを３７℃、５％のＣＯ２で７２～９６時間インキュベートした。Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｒｅ　Ｇｌｏ試薬を製造業者の指示書に従って使用して細胞生存を評価した。簡潔に述べると、アッセイプレートをインキュベーターから取り出し、室温に平衡化させてから１００μｌの室温Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｒｅ　Ｇｌｏ試薬を各１００μｌアッセイウェルに添加した。プレートをプレートシェーカー上に６００ｒｐｍで２分間配置した。プレートを室温でさらに１０分間静置しておいてから、Ｃｌａｒｉｏｓｔａｒプレートリーダー（ＢＭＧ）を使用して発光リードアウトを測定した。非処理（ビヒクルのみ）対照ウェルについての平均を算出し、各処理ウェルについての対照の％を決定することによりデータを分析した。次いで、対照の％データをＬｏｇ［処理］濃度に対してプロットし、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアで非線形回帰フィッティングを使用してＩＣ５０値を導出した。

【０４５１】

以下の細胞系を使用した。

ＰＡ－１－ヒト卵巣癌細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のｈｉＦＣＳ

ＰＡ－１　ＲＯＲ１　ｋｏ－ＲＯＲ１ノックアウトされたヒト卵巣癌細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のｈｉＦＣＳ

ＨＥＫ２９３－ヒト胚腎細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のＦＣＳ

ヒトＲＯＲ１が安定的に形質移入されたＨＥＫ２９３（ＨＥＫ２９３．ｈＲＯＲ１）－ｈＲＯＲ１を安定的に発現するヒト胚腎細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のＦＣＳ

【０４５２】

図１３は、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ１５９６８２及びＰＥＧ４－ｖａ－ＥＤＡ－ＰＮＵ１５９６８２）及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ１５９６８２）によるＲＯＲ１陽性ＰＡ－１卵巣癌細胞及びＰＡ－１　ＲＯＲ１　ｋｏ細胞の細胞殺傷についての用量応答曲線と対応するＩＣ５０値（表１７）を示す。ＰＡ－１　ＲＯＲ１　ｋｏは、ＲＯＲ１発現がノックアウトされたＰＡ－１癌細胞系である。

【０４５３】

【表１８】

表 17: G3CP-hFc コンジュゲートによる PA-1 及び PA1 ROR1 ko 癌細胞の細胞殺傷についての算出 IC_{50} 値(nM)。

	IC_{50} (nM) 96hr		
	PA-1 細胞	PA-1 ROR1 ko	PA-1/PA-1 ROR1 ko ウィンドウ
G3CPhFc(S239C)-vcPAB-EDA-PNU	0.0028	6.3	x2250
G3CPhFc(S239C)-va-EDA-PNU	0.11	11.3	x103
G3CPG4hFc(S239C)-vcPAB-EDA-PNU	0.77	7.8	X10

【０４５４】

ＲＯＲ１標的化ＶＮＡＲ－ｈＦｃコンジュゲートは、ＰＡ－１細胞系の強力な殺傷を示し、それはＲＯＲ１受容体のノックダウン時に抑制された。Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵコンジュゲートの両方についてＩＣ５０値に＞１００倍のウィンドウが存在する。

【０４５５】

図１８は、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ－ＰＮＵ、Ｇ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ＰＮＵ及び２Ｖ－ｈＦｃ－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ１５９６８２）によるＲＯＲ１ｌｏｗＨＥＫ２９３細胞及びヒトＲＯＲ１が安定的に形質移入されたＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ２９３．ｈＲＯＲ１）の細胞殺傷についての用量応答曲線と対応するＩＣ５０値（表１８）を示す。２Ｖは、ナイーブＶＮＡＲライブラリーに由来する対照ＶＮＡＲ配列であり、したがって、このタンパク質クラスの代表であるが、公知の標的を有さない。

【０４５６】

【表１９】

表 18: G3CP-hFc、G3CPG4-hFc 及び 2V-hFc コンジュゲートによる HEK293 WT 及び HEK293.hROR1 細胞の細胞殺傷についての算出 IC_{50} 値(nM)。

	IC_{50} (nM) 96hr		
	HEK293 細胞	HEK293.hROR1	HEK293/HEK293.hROR1 ウィンドウ
G3CPhFc(S239C)-vcPAB-EDA-PNU	18.1	0.008	x2263
G3CPG4hFc(S239C)-vcPAB-EDA-PNU	23.5	0.002	x11750
2VhFc(S239C)-vcPAB-EDA-PNU	10.6	9.2	X1.2

【０４５７】

ＲＯＲ１標的化ＶＮＡＲ－ｈＦｃコンジュゲートは、ＲＯＲ１受容体が安定的に形質導入されたＨＥＫ２９３．ｈＲＯＲ１細胞系の強力な殺傷を示すが、ＲＯＲ１ｌｏｗ野生型

ＨＥＫ２９３細胞について示さない。ＨＥＫ２９３対ＨＥＫ２９３．ｈＲＯＲ１細胞の殺傷について、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ　ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ＰＮＵコンジュゲートの両方についてＩＣ５０値の＞２０００倍のウィンドウが存在するが、２Ｖ－ｈＦｃ－ＰＮＵ非結合対照コンジュゲートについてウィンドウが存在しない。

【０４５８】

実施例７　－　トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）の患者由来ゼノグラフトモデルにおけるタンパク質－薬物コンジュゲートのインビボ有効性

ＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－２８患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおける有効性試験をＸｅｎＴｅｃｈ（Ｐａｒｉｓ）により実施した。

【０４５９】

アウトブレッド無胸腺（ｎｕ／ｎｕ）雌マウス（ＨＳＤ：無胸腺ヌード－Ｆｏｘｎ１ｎｕ）に、同じインビボ継代の腫瘍を皮下移植した。腫瘍移植片が十分数の動物において６０～２００ｍｍ３、好ましくは７５～１９６ｍｍ３の試験体積採用基準に達するまでマウスをモニタリングした。各群の腫瘍体積間に統計的差異が存在しないようにマウスを処理群にランダム化した。ランダム化を実験の０日目と指定した。マウスをビヒクル又はタンパク質－薬物コンジュゲートＢ１－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ、Ｂ１Ｇ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ若しくはＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵで単回用量０．３ｍｇ／ｋｇ　ｉ．ｖ．注射により２日目に処理した。全てのマウスをマウスＩｇＧで２０時間プレプライミングしてから最初のＰＤＣ投与を行った。垂直腫瘍直径を測径器で実験期間の間に週３回測定することにより腫瘍体積を評価した。式ＴＶ（ｍｍ３）＝［長さ（ｍｍ）×幅（ｍｍ）２］×０．５（式中、長さ及び幅は、それぞれ垂直に測定される腫瘍の最長及び最短の垂直直径である）を使用して絶対腫瘍体積（ＡＴＶ）を算出した。全ての動物を腫瘍サイズ測定と同時に秤量した。マウスを局所福祉及び最良の獣医学的実務指針に沿って身体的外見、挙動、有害臨床的徴候及び全般的福祉の変化について毎日観察及び報告した。

【０４６０】

図１４は、ビヒクル対照と対比した腫瘍成長に対するタンパク質－薬物コンジュゲートの効果を示す。全てのタンパク質薬物コンジュゲートは十分忍容され、このＲＯＲ１＋ＴＮＢＣ　ＰＤＸモデルにおいて高度に統計的に有意なインビボ有効性を示す。Ｂ１Ｇ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵは、Ｂ１－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵと同等のインビボ有効性のレベルを保持する（データ示さず）。ループライブラリーバリアントＧ３ＣＰ－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵは親Ｂ１融合体と比べて改善された有効性を示し、０．３ｍｇ／ｋｇ単回用量レジメンで両方のループライブラリーバリアントについて完全且つ持続的な退縮が観察された。

【０４６１】

有効性試験をＸｅｎＴｅｃｈ（Ｐａｒｉｓ）によりＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－１０患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおいても実施した。

【０４６２】

アウトブレッド無胸腺（ｎｕ／ｎｕ）雌マウス（ＨＳＤ：無胸腺ヌード－Ｆｏｘｎ１ｎｕ）に、同じインビボ継代の腫瘍を皮下移植した。腫瘍移植片が十分数の動物において７５～１９６ｍｍ３の試験体積採用基準に達するまでマウスをモニタリングした。各群の腫瘍体積間に統計的差異が存在しないようにマウスを処理群にランダム化した。ランダム化を実験の０日目と指定した。マウスをビヒクル又はタンパク質－薬物コンジュゲートＢ１－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ、Ｂ１Ｇ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ、Ｇ３ＣＰ－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ若しくはＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ若しくはＧ３ＣＰ－ｈＦｃ－ｖａ－ＥＤＡ－ＰＮＵで０．３ｍｇ／ｋｇの用量、ｉ．ｖ．注射で３回、４日間隔（３×Ｑ４Ｄ、２、６及び１０日目）で処理した。全てのマウスをマウスＩｇＧで２０時間プレプライミングしてから最

初のＰＤＣ投与を行った。垂直腫瘍直径を測径器で実験期間の間に週３回測定することにより腫瘍体積を評価した。式ＴＶ（ｍｍ３）＝［長さ（ｍｍ）×幅（ｍｍ）２］×０．５（式中、長さ及び幅は、それぞれ垂直に測定される腫瘍の最長及び最短の垂直直径である）を使用して絶対腫瘍体積（ＡＴＶ）を算出した。全ての動物を腫瘍サイズ測定と同時に秤量した。マウスを局所福祉及び最良の獣医学的実務指針に沿って身体的外見、挙動、有害臨床的徴候及び全般的福祉の変化について毎日観察及び報告した。

【０４６３】

図１９は、ビヒクル対照と対比した腫瘍成長に対するタンパク質－薬物コンジュゲートの効果を示す。全てのタンパク質薬物コンジュゲートは十分忍容され、このＲＯＲ１＋ＴＮＢＣ　ＰＤＸモデルにおいて高度に統計的に有意なインビボ効力を示し、この投与レジメンについて完全且つ持続的な退縮が観察された。

【０４６４】

実施例８　－　バイパラトピックループバリアントＶＮＡＲ薬物コンジュゲート

バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃ薬物コンジュゲート

上記のとおりＦｃ領域中に人工操作されている追加のシステインを有する、実施例５に記載のバイパラトピック抗ＲＯＲ１ループライブラリーＶＮＡＲ－ｈＦｃ融合体を生成し、そのシステインは、標識及び細胞毒性薬のマレイミド誘導体での部位特異的標識を可能にした。

【０４６５】

バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃ－薬物コンジュゲートの生成

バイパラトピックＲＯＲ１結合タンパク質Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）を、実施例６に記載の部分的還元、再フォールド及び標識法を使用してＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＥ又はＭＡ－ＰＥＧ４－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ１５９６８２とコンジュゲートさせた。コンジュゲートをＳＥＣにより精製し、分析ＨＩＣ、分析ＳＥＣ及びＬＣ－ＭＳにより分析した。表１９は、調製されたコンジュゲートをまとめる。

【０４６６】

【表２０】

表 19：バイパラトピック VNAR-PNU コンジュゲートの特徴のまとめ

タンパク質	ペイロード	脱グリコシル化還元質量，Da		MS による DAR	コンジュゲート収率（全体）	HMW 凝集物
		予測	実測		%	%
G3CP-P3A1 hFc (S239C+KIH)	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,178.0 & 40,462.4	40,180.7 & 40,465.1	2.0	50	<1
G3CP-P3A1 hFc (S239C+KIH)	MC-vc-PAB-MMAE	40,091.3 & 39,059.9	40,087.3 & 40,371.7	2.0	63	<1
G3CPG4-P3A1 hFc (S239C+KIH)	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,168.9 & 40,462.4	40,170.9 & 40,464.8	2.15	44	<1
G3CPG4-P3A1 hFc (S239C+KIH)	MC-vc-PAB-MMAE	40,082.2 & 40,375.7	40,077.7 & 40,371.3	2.0	65	<1
P3A1 hFc (S239C)	MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682	40,398.8	40,402.6	2.16	60	<1

【０４６７】

癌細胞系の表面上のＲＯＲ１へのバイパラトピックＶＮＡＲ－Ｆｃ－ＰＮＵコンジュゲートの結合を、上記の方法を使用するフローサイトメトリーにより測定した。ＶＮＡＲ－ｈＦｃ－ＰＮＵ分子の結合を１００μＬのＰＥ－抗ヒト抗体（ＪＩＲ）の添加及び３０分間の氷上でのインキュベーションにより決定した。ＶＮＡＲ－ｈＦｃ濃度に応じた蛍光強度の増加からＫＤａｐｐ値を算出した。図２０ａ及びｂは、ＲＯＲ１ｈｉＡ５４９肺腺癌細胞及びＲＯＲ１ｌｏｗＡ４２７細胞へのバイパラトピックＶＮＡＲ－Ｆｃ－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ　ＰＡＢ　ＥＤＡ　ＰＮＵ１５９６８２）の結合を、対応するモノパラトピックＰＮＵコンジュゲートとともに示す。Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵはＡ５４９細胞に強力に結合し、ＫＤａｐｐはそれぞれ０．９２ｎＭ及び１．８３ｎＭであるが、Ａ４２７細胞への結合はほとんど示さない。Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵは、対応するＧ３ＣＰ－ｈＦｃ－ＰＮＵ及びＰ３Ａ１－ｈＦｃ－ＰＮＵコンジュゲートと比較して大きいレベルのＡ５４９細胞への飽和結合を実証する（図２０ａ）。同様に、Ｇ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵは、対応するＧ３ＣＰＧ４－ｈＦｃ－ＰＮＵ及びＰ３Ａ１－ｈＦｃ－ＰＮ

Ｕコンジュゲートと比較して大きいレベルのＡ５４９細胞への飽和結合を実証する（図２０ｂ）。

【０４６８】

抗ＲＯＲ１バイパラトピックＶＮＡＲ薬物コンジュゲートで処理された癌細胞についてのインビトロ細胞生存アッセイ

Ｃｅｌｌ Ｔｉｔｒｅ Ｇｌｏアッセイを実施例６に記載のとおり実施した。細胞をＶＮＡＲ－ｈＦｃコンジュゲートと３７℃、５％のＣＯ２で９６時間インキュベートし、細胞生存の％を用量応答に応じて決定した。対照の％データをＬｏｇ［処理］濃度に対してプロットし、ＩＣ５０値をＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアにおいて非線形回帰フィッティングを使用して導出した。

【０４６９】

以下の細胞系を使用した。

ＰＡ－１－ヒト卵巣癌細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のｈｉＦＣＳ

ＰＡ－１ ＲＯＲ１ ｋｏ－ＲＯＲ１ノックアウトされたヒト卵巣癌細胞系：ＥＭＥＭ、１０％のｈｉＦＣＳ

Ｋａｓｕｍｉ－２－ヒト前駆Ｂ細胞白血病細胞系：ＲＰＭＩ １６４０、１０％のｈｉＦＣＳ

ＭＨＨ－ＥＳ１－ヒトユーイング肉腫細胞系：ＲＰＭＩ １６４０、１０％のｈｉＦＣＳ

【０４７０】

図２１は、Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１ ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１ ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ ＰＡＢ ＥＤＡ ＰＮＵ１５９６８２）によるＲＯＲ１陽性ＰＡ－１卵巣癌細胞及びＰＡ－１ ＲＯＲ１ ｋｏ細胞の細胞殺傷についての用量応答曲線を示す。ＰＡ－１ ＲＯＲ１ ｋｏは、ＲＯＲ１発現がノックアウトされたＰＡ－１癌細胞系である。

【０４７１】

表２０は、Ｇ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１ ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１ ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ＰＮＵコンジュゲート（ＰＥＧ４－ｖｃ ＰＡＢ ＥＤＡ ＰＮＵ１５９６８２）によるＫａｓｕｍｉ－２、ＭＨＨ－ＥＳ１、ＰＡ－１及びＰＡ－１ ＲＯＲ１ ｋｏ細胞の細胞殺傷についてのＩＣ５０値を示す。細胞表面ＲＯＲ１受容体数を各細胞系についてＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｑｕａｎｔｉｂｒｉｔｅビーズを使用するフローサイトメトリーにより決定した。

【０４７２】

【表２１】

表 20: G3CP-P3A1 hFc (S239C+KIH)-PNU 及び G3CPG4-P3A1 hFc (S239C+KIH)-PNU コンジュゲートによる PA-1 及び PA1 ROR1 ko 癌細胞の細胞殺傷についての算出 IC_{50} 値(nM)。

	IC50 (nM)			
	Kasumi-2	MHH-ES1	PA1	PA1.ROR1ko
ROR1 受容体 / 細胞	5,086	2,342	12,249	0
G3CP-P3A1 hFc (S239C + KIH) vcPAB-EDA-PNU	0.016	0.3	0.003	6.3
G3CPG4-P3A1 hFc (S239C + KIH) vcPAB-EDA-PNU	0.141	1	0.009	7.8

【０４７３】

ＲＯＲ１標的化バイパラトピックＶＮＡＲ－ｈＦｃコンジュゲートは、ＲＯＲ１＋癌細胞系の強力な殺傷を示すが、ＲＯＲ１陰性ＰＡ１．ＲＯＲ１ｋｏ細胞系について示さない。

【０４７４】

実施例９　－　トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）の患者由来ゼノグラフトモデルにおけるバイパラトピックタンパク質－薬物コンジュゲートのインビボ有効性

ＲＯＲ１＋ＨＢＣｘ－２８患者由来ＴＮＢＣゼノグラフトモデルにおける有効性試験をＸｅｎＴｅｃｈ（Ｐａｒｉｓ）により実施した。

【０４７５】

アウトブレッド無胸腺（ｎｕ／ｎｕ）雌マウス（ＨＳＤ：無胸腺ヌード－Ｆｏｘｎ１ｎｕ）に、同じインビボ継代の腫瘍を皮下移植した。腫瘍移植片が十分数の動物において１００～２００ｍｍ３の試験体積採用基準に達するまでマウスをモニタリングした。各群の腫瘍体積間に統計的差異が存在しないようにマウスを処理群にランダム化した。ランダム化を実験の０日目と指定した。マウスをビヒクル又はバイパラトピックタンパク質－薬物コンジュゲートＧ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１　ｈＦｃ（Ｓ２３９Ｃ＋ＫＩＨ）ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵで２日目の単回用量０．３ｍｇ／ｋｇ　ｉ．ｖ．注射又は４日間隔（３×Ｑ４Ｄ、２、６及び１０日目）の３×０．１ｍｇ／ｋｇ　ｉ．ｖ．注射のいずれかにより処理した。全てのマウスをマウスＩｇＧで２０時間プレプライミングしてから最初のＰＤＣ投与を行った。垂直腫瘍直径を測径器で実験期間の間に週３回測定することにより腫瘍体積を評価した。式ＴＶ（ｍｍ３）＝［長さ（ｍｍ）×幅（ｍｍ）２］×０．５（式中、長さ及び幅は、それぞれ垂直に測定される腫瘍の最長及び最短の垂直直径である）を使用して絶対腫瘍体積（ＡＴＶ）を算出した。全ての動物を腫瘍サイズ測定と同時に秤量した。マウスを局所福祉及び最良の獣医学的実務指針に沿って身体的外見、挙動、有害臨床的徴候及び全般的福祉の変化について毎日観察及び報告した。

【０４７６】

図２２は、ビヒクル対照と対比した腫瘍成長に対するタンパク質－薬物コンジュゲートの効果を示す。全てのタンパク質薬物コンジュゲートは十分忍容され、両方のバイパラト

ピックループライブラリーバリアントＧ３ＣＰ－Ｐ３Ａ１－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵ及びＧ３ＣＰＧ４－Ｐ３Ａ１－ｈＦｃ－ｖｃ－ＰＡＢ－ＥＤＡ－ＰＮＵは、このＲＯＲ１＋ＴＮＢＣ　ＰＤＸモデルにおいて優れたインビボ効力を示し、両方の薬剤について腫瘍退縮が観察された。

【０４７７】

実施例１０　－　ＲＯＲ１　ＶＮＡＲ二重特異体

　ＲＯＲ１結合ＶＮＡＲについての二重特異的標的組み合わせは、例えば、半減期延長のためのＨＳＡ；ＲＯＲ１及び血清アルブミンの二重特異的エンゲージメントＲＴＫ、例えばＥＧＦＲ、Ｈｅｒ３；細胞の表面上でのＥＧＦＲ及びＲＯＲ１の両方又はＨＥＲ３及びＲＯＲ１の両方の二重特異的標的化を含む。

【０４７８】

　既に考察され、本明細書に例示されるＶＮＡＲ　ＢＡ１１は、ＨＳＡ結合ＶＮＡＲの一例である。ＨＳＡ結合ＶＮＡＲ（例えば、ＢＡ１１）を含む二重特異的分子及び別の特異的結合分子が考察される。

【０４７９】

　２つの異なる長さのＧ４Ｓリンカーを介してＮ末端ＲＯＲ１　ＶＮＡＲをＣ末端抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ（クローンＯＫＴ３）と組み合わせるＲＯＲ１×ＣＤ３二重特異的配列をＣＨＯ細胞（Ｅｖｉｔｒｉａ）中で発現させ、ＩＭＡＣ（ＨｉｓＴｒａｐ　Ｅｘｃｅｌ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）により、次いでＳＥＣ（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　２６／６０、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）により精製した。同様に、Ｎ末端バイパラトピックＲＯＲ１　ＶＮＡＲをＣ末端抗ＣＤ３　ｓｃＦｖと組み合わせるバイパラトピックＲＯＲ１×ＣＤ３二重特異的配列もＣＨＯ（Ｅｖｉｔｒｉａ）中で発現させた。

【０４８０】

　ＣＤ３　ＢｉＴＥ様アプローチ；ＲＯＲ１　ＶＮＡＲ二重特異的抗ＣＤ３　ｓｃＦｖクローンＯＫＴ３（国際公開第２０１４０２８７７６号パンフレット　Ｚｙｎｇｅｎｉａ）としての使用のためのＣＤ３結合配列の例並びにオリエンテーション及びそのヒト化誘導体。

ＶＨ－［Ｇ４Ｓ］３－ＶＬ

（化１３５）

ＤＩＫＬＱＱＳＧＡＥＬＡＲＰＧＡＳＶＫＭＳＣＫＴＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨＷＶＫＱＲＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＴＤＫＳＳＳＴＡＹＭＱＬＳＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＩＱＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＲＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＹＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＳ（配列番号１４９）

ヒト化抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ＵＣＨＴ１（Ａｒｎｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　２００４　１０１（４６）１６２６８－１６２７３）及びその誘導体

ＶＬ－［Ｇ４Ｓ］３－ＶＨ

（化１３６）

ＭＤＩＱＭＴＱＴＴＳＳＬＳＡＳＬＧＤＲＶＴＩＳＣＲＡＳＱＤＩＲＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＤＧＴＶＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＳＧＶＰＳＫＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹＳＬＴＩＳＮＬＥＱＥＤＩＡＴＹＦＣＱＱＧＮＴＬＰＷＴＦＡＧＧＴＫＬＥＩＫＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＭＫＩＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＧＹＴＭＮＷＶＫＱＳＨＧＫＮＬＥＷＭＧＬＩＮＰＹＫＧＶＳＴＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹＭＥＬＬＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＳＧＹＹＧＤＳＤＷＹＦＤＶＷＧＱＧＴＴＬＴＶＦＳ（配列番号１５０）

【０４８１】

実施例１１　－　ＲＯＲ１　ＣＡＲ－Ｔアプローチ

本出願に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子をベースとするキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を生成することができる。さらに、このようなＣＡＲを発現する人工操作Ｔ細胞も生成することができ、次いでそれを例えば養子細胞療法で使用することができる。

【０４８２】

簡潔に述べると、ＲＯＲ１特異的ＣＡＲをコードする核酸構築物を産生することができる。ＲＯＲ１特異的ＣＡＲは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン及び本明細書に記載のＲＯＲ１特異的抗原結合分子を含む細胞外ドメインを含み得る。次いで、核酸構築物をウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）中に取り込むことができる。

【０４８３】

Ｔ細胞は、処置を必要とする患者から単離することができ、次いでそれを、例えばレトロウイルス形質移入又はＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ－９などのアプローチを使用する遺伝子編集により、ＣＡＲをコードする核酸構築物を発現するようにそれを改変することができる。

【０４８４】

次いで、人工操作Ｔ細胞を患者中に再注入して病態を処置する、例えば癌を処置することができる。

【図面】

【図１】



Figure 1

【図２】

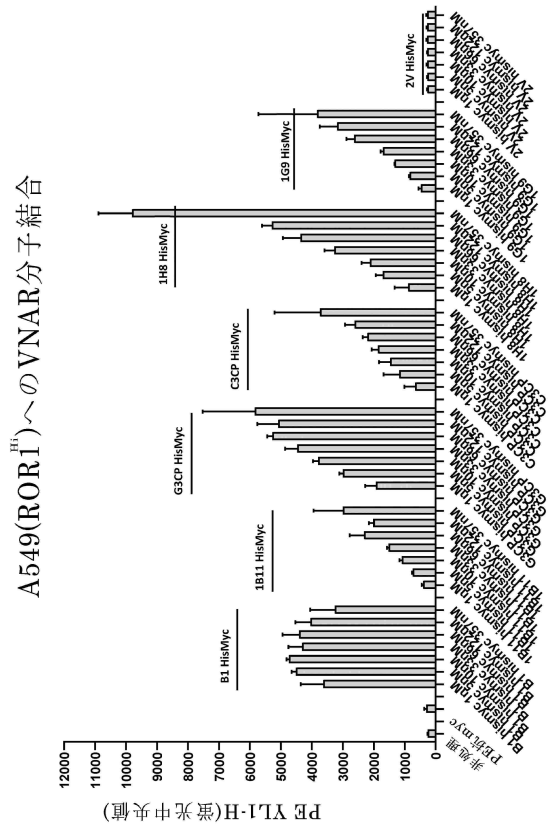


Figure 2

【図３】

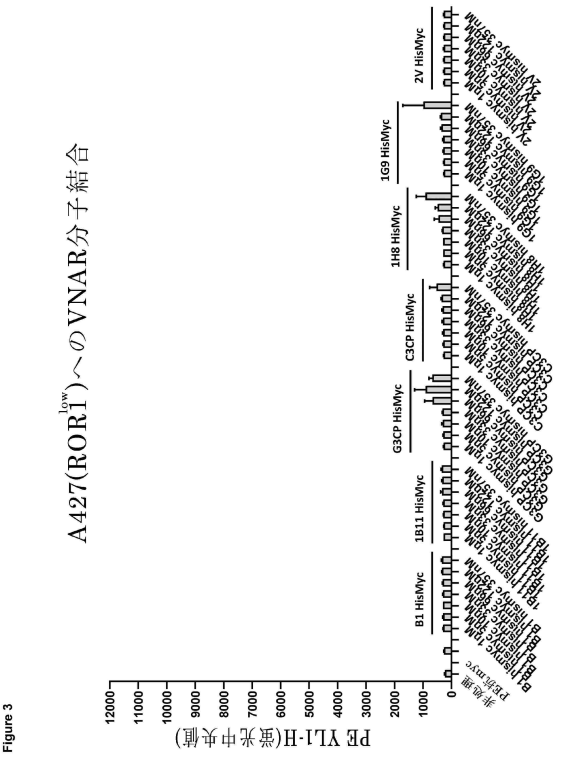


Figure 3

【図４】

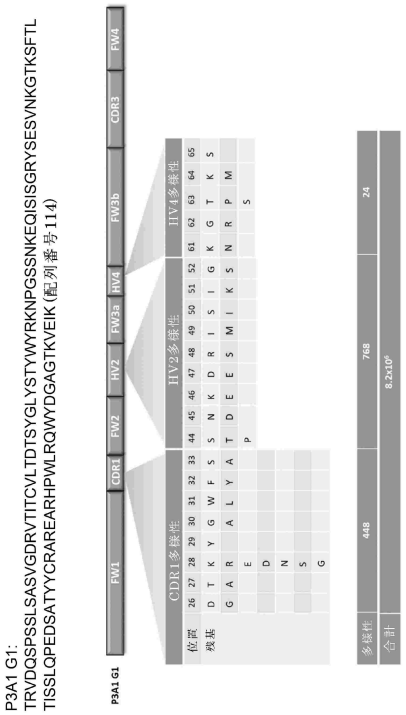
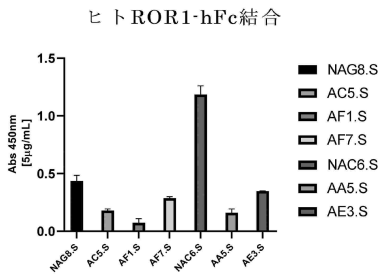


Figure 4

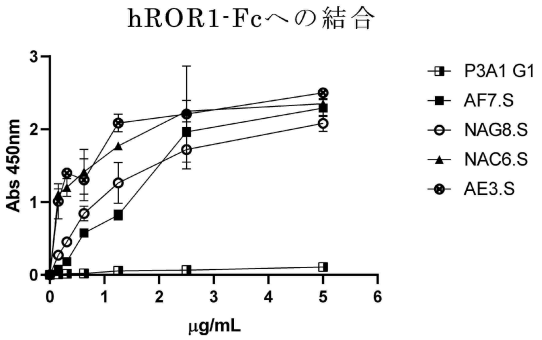
【図５】

Figure 5



【図６】

Figure 6



【図７】

Figure 7

GGGGSGGGGSGGGGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISL
SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ
HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV
TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN
WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK（配列番号158）

VNAR融合体のためのリンカーヒトIgG1配列

N末端VNAR hFc(リンカー-hFc配列)

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号159)

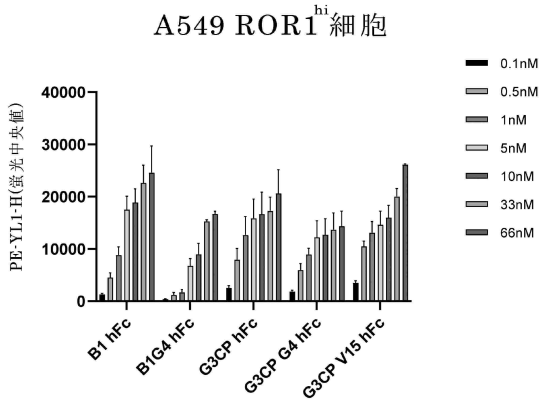
バイオコンジュゲーションのためのシステイン人工操作バリアント
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号160)

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPGK(配列番号161)

C末端hFc VNAR(hFc-リンカー配列)
DKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号162)

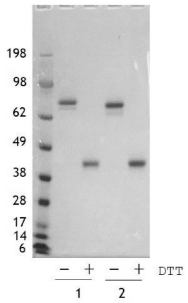
【図８】

Figure 8



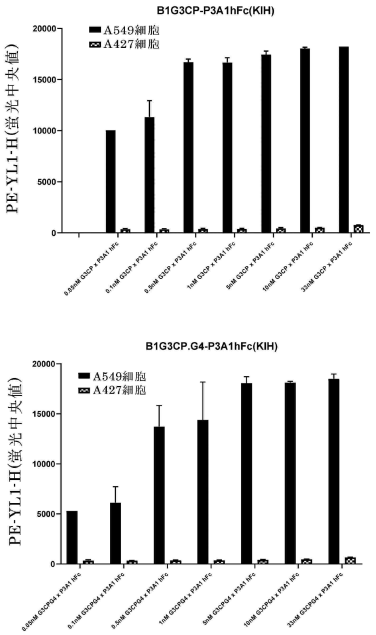
【図９】

Figure 9



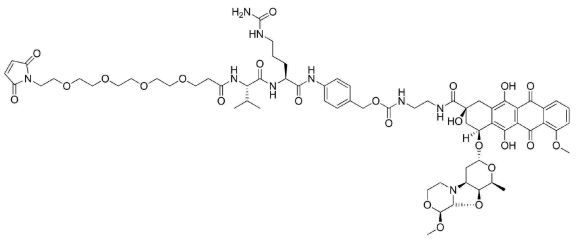
【図１０】

Figure 10

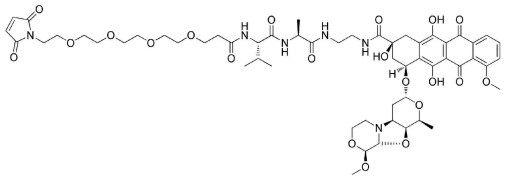


【図１１】

Figure 11



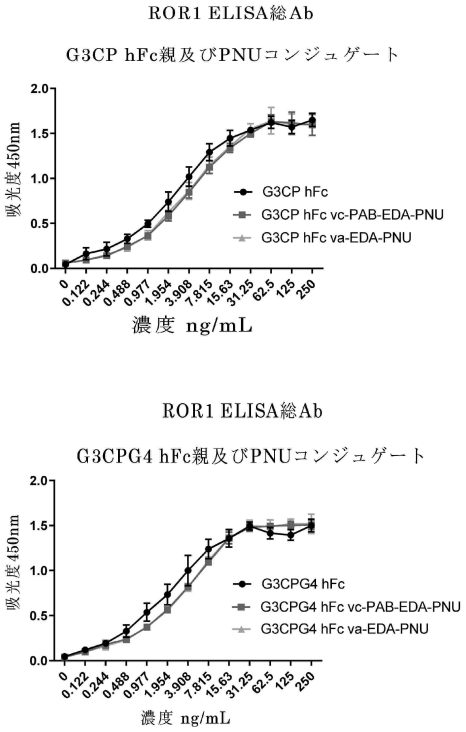
MA-PEG4-vc-PAB-EDA-PNU159682



MA-PEG4-va-EDA-PNU159682

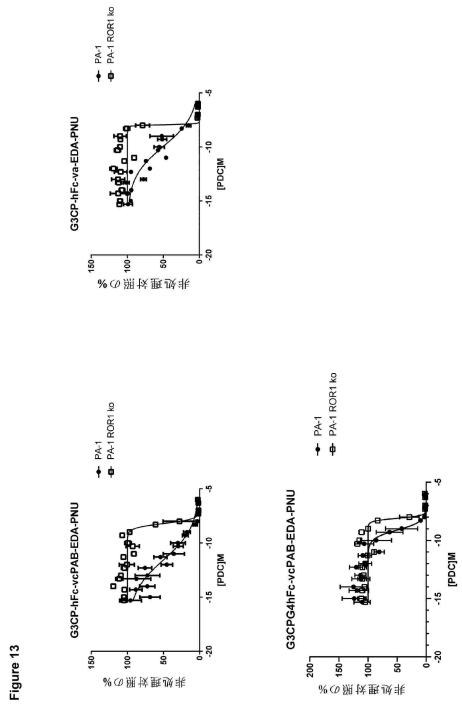
【図１２】

Figure 12



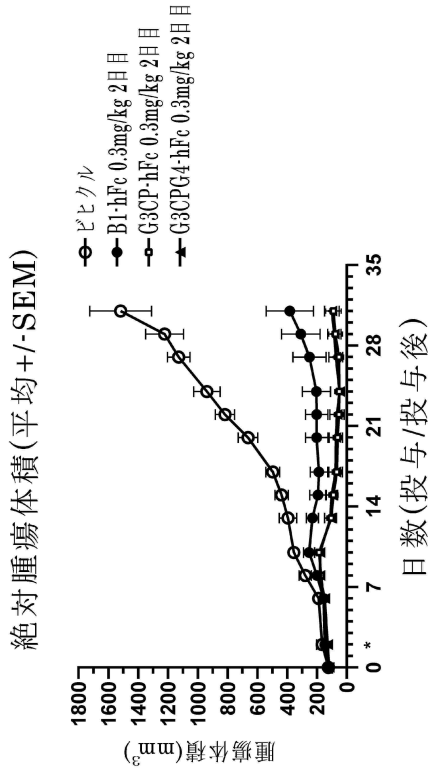
【図１３】

Figure 13



【図１４】

Figure 14



【図１５】

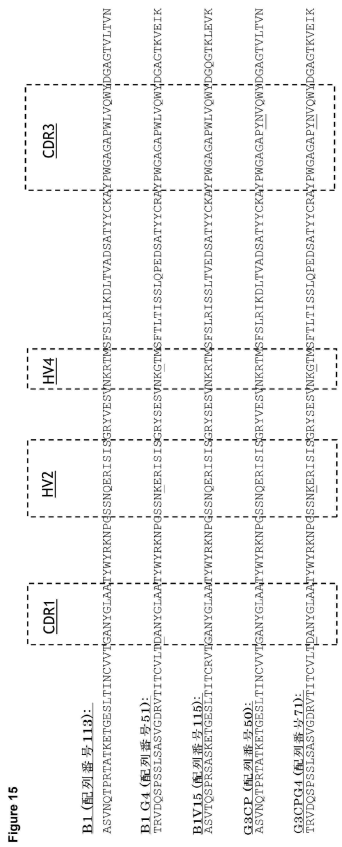


Figure 15

【図１６】

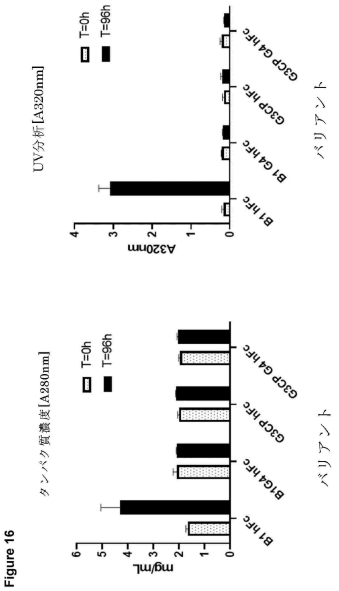


Figure 16

【図１７】

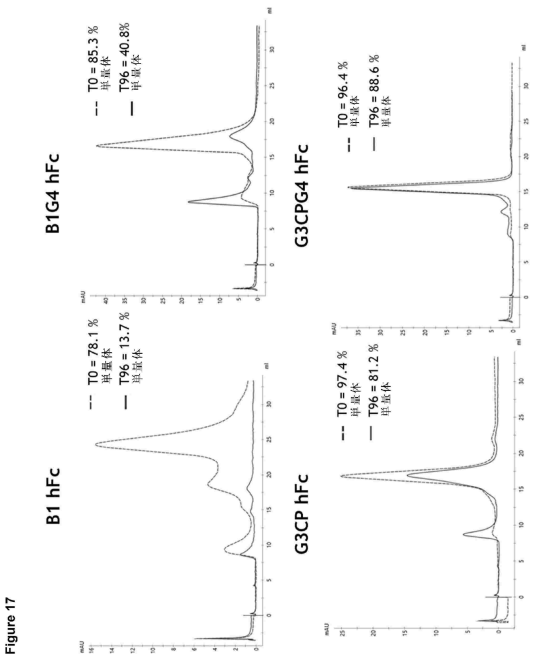


Figure 17

【図１８】

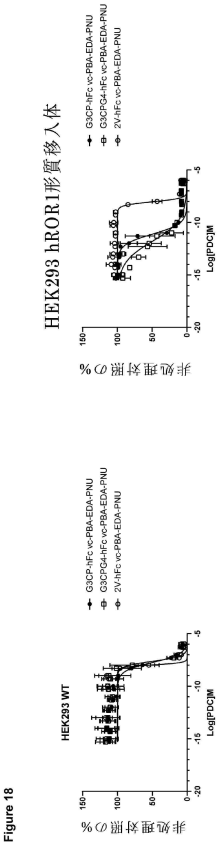


Figure 18

【図１９】

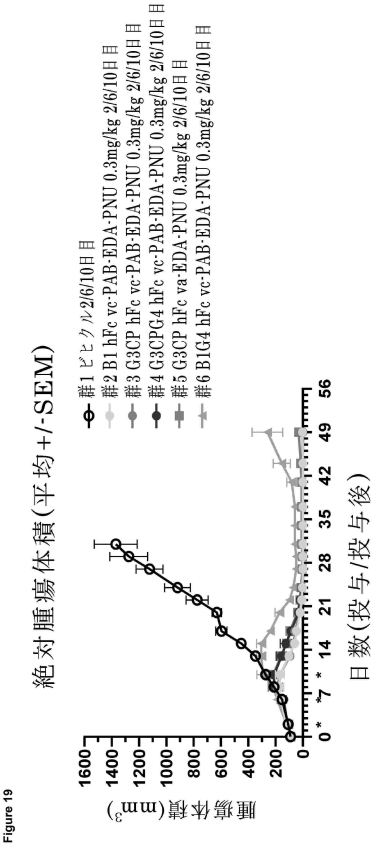


Figure 19

【図２０Ａ】

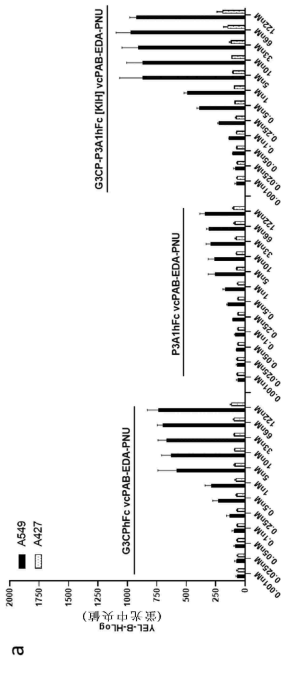


Figure 20a

【図２０Ｂ】

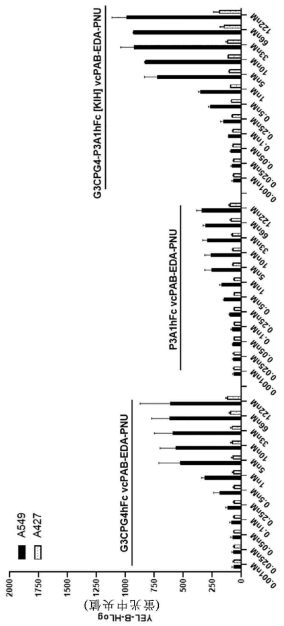


Figure 20b

【図２１】

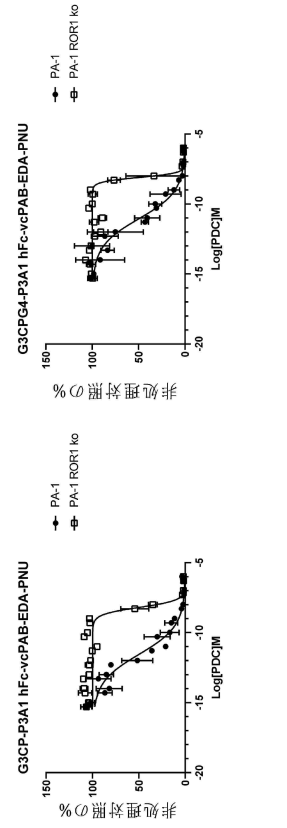


Figure 21

【図２２】

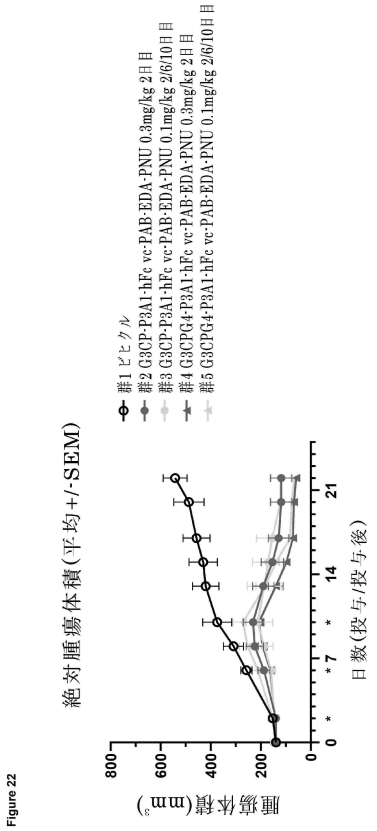


Figure 22

【配列表】

20245004050000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/086667

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/086667

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-6, 10-14(completely); 8, 9, 16-37, 58-86, 93-104(partially)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 A61K47/68 C07K16/18 C07K16/28
ADD.

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)
A61P A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOVALENA ET AL.: EXP OPIN BIOL THER, vol. 14, no. 10, 2014, pages 1527-1539, XP002806000, cited in the application the whole document -----	1-6, 8-10, 12-14, 16-37, 58-86, 93-104
A	WO 2019/122445 A1 (ALMAC DISCOVERY LTD [GB]) 27 June 2019 (2019-06-27) the whole document -----	1-6, 8-10, 12-14, 16-37, 58-86, 93-104

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
23 March 2022	30/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bumb, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086667

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/122447 A1 (ALMAC DISCOVERY LTD [GB]) 27 June 2019 (2019-06-27) cited in the application the whole document -----	1-6, 8-10, 12-14, 16-37, 58-86, 93-104

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/086667

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019122445 A1	27-06-2019	AU 2018387855 A1	09-07-2020
		AU 2018391026 A1	16-07-2020
		BR 112020012463 A2	24-11-2020
		BR 112020012464 A2	24-11-2020
		CA 3086760 A1	27-06-2019
		CA 3086795 A1	27-06-2019
		CN 111670045 A	15-09-2020
		CN 112074534 A	11-12-2020
		EP 3727433 A1	28-10-2020
		EP 3728320 A1	28-10-2020
		JP 2021508458 A	11-03-2021
		JP 2021509014 A	18-03-2021
		KR 20200104328 A	03-09-2020
		KR 20200104329 A	03-09-2020
		RU 2020121782 A	24-01-2022
		RU 2020121784 A	26-01-2022
		SG 11202005771P A	29-07-2020
		SG 11202005774Q A	29-07-2020
		US 2021317204 A1	14-10-2021
		WO 2019122445 A1	27-06-2019
		WO 2019122447 A1	27-06-2019
WO 2019122447 A1	27-06-2019	AU 2018387855 A1	09-07-2020
		AU 2018391026 A1	16-07-2020
		BR 112020012463 A2	24-11-2020
		BR 112020012464 A2	24-11-2020
		CA 3086760 A1	27-06-2019
		CA 3086795 A1	27-06-2019
		CN 111670045 A	15-09-2020
		CN 112074534 A	11-12-2020
		EP 3727433 A1	28-10-2020
		EP 3728320 A1	28-10-2020
		JP 2021508458 A	11-03-2021
		JP 2021509014 A	18-03-2021
		KR 20200104328 A	03-09-2020
		KR 20200104329 A	03-09-2020
		RU 2020121782 A	24-01-2022
		RU 2020121784 A	26-01-2022
		SG 11202005771P A	29-07-2020
		SG 11202005774Q A	29-07-2020
		US 2021317204 A1	14-10-2021
		WO 2019122445 A1	27-06-2019
		WO 2019122447 A1	27-06-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2021/086667

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6, 10-14(completely); 8, 9, 16-37, 58-86, 93-104(partially)

VNAR of structure CDR1-HV2-HV4-CDR3 binding ROR1, comprising one each of [SEQs 1-5; CDR1], [SEQs 6-7; HV2], [SEQs 8-9; HV4], [SEQs 10-24; CDR3].
These features are related to the solution to the problem of providing variants of known anti-ROR1 vNAR B1, where modifications are in V-region.
Antibody competing therewith.

---

2. claims: 7, 15(completely); 8, 9, 16-37, 58-86, 93-104(partially)

VNAR of structure CDR1-HV2-HV4-CDR3 binding ROR1, comprising one each of [SEQs 25-30; CDR1], [SEQs 61-34; HV2], [SEQs 35-388-9; HV4], [SEQs 39; CDR3].
These features are related to the solution to the problem of providing even further anti-ROR1 VNARs.
Antibody competing therewith.

---

3. claims: 38-57(completely); 60-76, 78-86, 93-101, 103, 104(partially)

VNAR of structure CDR1-HV2-HV4-CDR3 binding ROR1, which is conjugated to a second moiety
These features are related to the solution to the problem of modifying known or new anti-ROR1 VNARs.

---

4. claims: 87-92, 105-114(completely); 93-101(partially)

VNAR of structure CDR1-HV2-HV4-CDR3 binding ROR1, which is conjugated to a second moiety
These features are related to the solution to the problem of modifying known or new anti-ROR1 VNARs.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	4C086
C12N	*15/63 (2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15		
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08		
C12P	*21/02 (2006.01)*	C12P	21/02	C	
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*35/02 (2006.01)*	A61P	35/02		
A61K	*47/68 (2017.01)*	A61K	47/68		
A61K	*31/704 (2006.01)*	A61K	31/704		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	123	
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*38/02 (2006.01)*	A61K	38/02		
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	V	
G01N	*33/531 (2006.01)*	G01N	33/531	A	
C12N	*5/0783 (2010.01)*	C12N	5/0783		

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,IT,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

アルマック ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 トム ジェニファー

イギリス国 クレイガボン ビーティ６３ ５キューディ シーゴー インダストリアル エステイト ２０ アルマック ハウス アルマック ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 カミンスキー アンドレイ

イギリス国 クレイガボン ビーティ６３ ５キューディ シーゴー インダストリアル エステイト ２０ アルマック ハウス アルマック ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 コットン グラハム ジョン

イギリス国 クレイガボン ビーティ６３ ５キューディ シーゴー インダストリアル エステイト ２０ アルマック ハウス アルマック ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 バレーレ キャロライン ジェーン

イギリス国 アバディーンシャー エイビー２５ ２ゼットピー アバディーン フォレスターヒル ロード フォレスターヒル ヘルス リサーチ コンプレックス リバティー ビルディング エラスモゲン リミテッド内

(72)発明者 コヴァレワ マリーナ

イギリス国 アバディーンシャー エイビー２５ ２ゼットピー アバディーン フォレスターヒル ロード フォレスターヒル ヘルス リサーチ コンプレックス リバティー ビルディング エラスモゲン リミテッド内

(72)発明者 ポーター アンドリュー ジャスティン ラドクリフ

イギリス国 アバディーンシャー エイビー２５ ２ゼットピー アバディーン フォレスターヒル ロード フォレスターヒル ヘルス リサーチ コンプレックス リバティー ビルディング エラスモゲン リミテッド内

Ｆターム（参考） 4B064 AG20 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01

Fターム（参考） 4B065 AA26X AA91X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA09 AA11 AA24 AA29 AA36 AA53 BB01 BB11 BB13 BB15
BB21 CC27 EE59
4C084 AA17 AA27 BA41 MA05 MA13 MA16 MA28 MA35 MA37 MA43
MA52 MA56 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 AA27 BB11 BB41 BB42 DD88
EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 EA10 MA01 MA04 MA13 MA16 MA28 MA35 MA37
MA43 MA52 MA56 MA66 NA14 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 DA50 DA76 EA22 EA29 FA72
FA74 GA22 GA26