

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-511904

(P2019-511904A)

(43) 公表日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-539977 (P2018-539977)	(71) 出願人	506139369 フレッド ハッチンソン キャンサー リサーチ センター アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル フェアビュー アベニュー ノース 1100
(86) (22) 出願日	平成29年2月2日 (2017.2.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月28日 (2018.9.28)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/016300	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 国際公開番号	W02017/136607	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		
(31) 優先権主張番号	62/290,337		
(32) 優先日	平成28年2月2日 (2016.2.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/324,876		
(32) 優先日	平成28年4月19日 (2016.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ROR1抗体およびその使用

(57) 【要約】

本開示は、ROR1またはその一部分、例えばROR1タンパク質の細胞内C末端部分、と結合するものを含む、抗ROR1結合タンパク質、ならびに免疫組織化学的方法および診断方法におけるそのような結合タンパク質の使用に関する。結合タンパク質を使用する関連キットおよび方法も提供し、同様に、疾患または状態を有する被験体を処置する方法であって、被験体は、本開示の結合タンパク質または方法によりそのような処置の候補であると決定されている、方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ROR1の細胞内プロテインキナーゼのC末端側にある前記ROR1の部分と特異的に結合する結合タンパク質であって、任意選択で、免疫グロブリン様結合タンパク質である、および/あるいは抗体もしくはその抗原結合断片であるか、または抗体もしくはその抗原結合断片を含む、結合タンパク質。

【請求項 2】

(i) 配列番号3を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号3からなる、ペプチド、および/または(ii) ROR1タンパク質のエピトープに特異的に結合する、結合タンパク質であって、前記エピトープが、(a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列内の1つもしくは複数のアミノ酸を含む、結合タンパク質。

10

【請求項 3】

配列番号15または16に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である軽鎖可変ドメイン(V_L)と、配列番号12、13または14に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である重鎖可変ドメイン(V_H)とを含む抗体またはその断片を含む結合タンパク質であって、前記抗体が、任意選択で、(i) 配列番号3を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号3からなる、ペプチド、および/または(ii) ROR1タンパク質のエピトープに特異的に結合し、前記エピトープが、(a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列内の1つもしくは複数のアミノ酸を含む、結合タンパク質。

20

【請求項 4】

配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列内に位置するエピトープに結合する、請求項1から3のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

前記ROR1またはROR1タンパク質が、ヒトROR1である、請求項1から4のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

前記ROR1および/または前記ペプチドおよび/または前記エピトープと 1×10^{-7} Mまたはそれ未満の K_d で結合する、請求項1から5のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 7】

(a) 配列番号6または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号6のバリエーションに記載の重鎖CDR1アミノ酸配列；(b) 配列番号7または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号7のバリエーションで示される重鎖CDR2アミノ酸配列；および(c) 配列番号8または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号8のバリエーションで示される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

(a) 配列番号9または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号9のバリエーションで示される軽鎖CDR1アミノ酸配列；(b) 配列番号10または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号10のバリエーションで示される軽鎖CDR2アミノ酸配列；および(c) 配列番号11または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号11のバリエーションで示される軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 9】

(i) 配列番号12、13もしくは14に記載の重鎖可変ドメイン(V_H)配列内のCDR3のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3；および/または(ii) 配列番号15もしくは16に記載の軽鎖可変ドメイン(V_L)配列内のCDR3のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

50

【請求項 10】

前記重鎖 C D R 3 が、配列番号 29 または配列番号 30 に記載の配列を含み、および / または前記軽鎖 C D R 3 が、配列番号 35 または配列番号 36 に記載の配列を含む、請求項 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

配列番号 12、13 もしくは 14 に記載の重鎖可変ドメイン (V_H) 配列内の、C D R 1 および / もしくは C D R 2 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、重鎖 C D R 1 および / もしくは重鎖 C D R 2 ; ならびに / または ($i i$) 配列番号 15 もしくは 16 に記載の軽鎖可変ドメイン (V_L) 配列内の C D R 3 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、軽鎖 C D R 1 および / もしくは軽鎖 C D R 2 をさらに含む、請求項 9 または 10 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 12】

前記重鎖 C D R 1 が、配列番号 21、22、23 または 24 に記載の配列を含み、および / または前記重鎖 C D R 2 が、配列番号 25、26、27 または 28 に記載の配列を含むか ; および / または前記軽鎖 C D R 1 が、配列番号 31 または 32 に記載の配列を含み、前記軽鎖 C D R 2 が、配列番号 33 または 34 に記載の配列を含む、請求項 11 に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

配列番号 15 または 16 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L)、および配列番号 12、13 または 14 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である重鎖可変ドメイン (V_H) を含むか ; ならびに / あるいは配列番号 37 を含む V_H 、および / または配列番号 38 を含む V_L を含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 14】

抗体またはその抗原結合断片である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 15】

抗体を含み、前記抗体が、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、請求項 14 に記載の結合タンパク質。

【請求項 16】

前記モノクローナル抗体が、6D4 と称する抗体の抗原結合部分である、および / または 6D4 と称する抗体の抗原結合部分を含む、請求項 15 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 17】

抗体の抗原結合断片を含み、前記抗原結合断片が s c F v である、請求項 16 に記載の結合タンパク質。

【請求項 18】

前記 s c F v が、モノクローナル抗体 6D4 の V_L および V_H を含む、請求項 17 に記載の結合タンパク質。

【請求項 19】

R O R 2 に結合しない、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 20】

R O R 1 の細胞内プロテインキナーゼドメインの C 末端側に位置する R O R 1 エピトープとの特異的結合について基準結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と競合する、結合タンパク質。

【請求項 21】

R O R 1 との結合および / または配列番号 3 のペプチドとの結合について請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と競合する、ならびに / あるいは請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と同じまたは重複する R O R 1 のエピトープと結合する、結合タンパク質。

【請求項 22】

50

前記基準結合タンパク質が、配列番号 6 に記載の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 に記載の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 8 に記載の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 9 に記載の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 10 に記載の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 11 に記載の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む、請求項 20 に記載の結合タンパク質。

【請求項 23】

前記基準結合タンパク質が、配列番号 15 または 16 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L)、および配列番号 12、13 または 14 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である重鎖可変ドメイン (V_H) を含む、請求項 20 または 22 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 24】

前記結合タンパク質、前記基準結合タンパク質、または両方が、抗体またはその抗原結合断片である、請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 25】

前記結合タンパク質、前記基準結合タンパク質、または両方が抗体を含み、前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 24 に記載の結合タンパク質。

【請求項 26】

前記結合タンパク質、前記基準結合タンパク質、または両方が、キメラまたはヒト化抗体である、請求項 24 または 25 に記載の結合タンパク質。

【請求項 27】

前記結合タンパク質、前記基準結合タンパク質、または両方が、抗体の抗原結合断片を含み、前記抗原結合断片が、s c F v である、請求項 24 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 28】

前記結合タンパク質、前記基準結合タンパク質、または両方が、抗原結合ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 20 から 27 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 29】

前記融合タンパク質の抗原結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である、請求項 28 に記載の結合タンパク質。

【請求項 30】

抗体の前記抗原結合断片が、s c F v である、請求項 29 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 31】

基準抗体が、モノクローナル抗体 6 D 4 である、請求項 20 から 30 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 32】

マーカーをさらに含む、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 33】

前記マーカーが、酵素、色素、蛍光標識、ペプチドタグ、またはタンパク質タグである、請求項 32 に記載の結合タンパク質。

【請求項 34】

(a) 前記結合タンパク質が、生物学的試料の細胞中に内因的に存在する前記タンパク質、前記 R O R 1 および / または エピトープと特異的に結合することができ、前記試料が、ホルマリン固定もしくは凍結された組織切片および / または 透過処理された細胞を任意選択で含むか、および / または 任意選択で被験体の腫瘍に由来するものであり、ならびに / あるいは (b) 前記結合タンパク質が、R O R 1 の内因性発現を、基準抗体が前記内因性発現を検出しない条件下で検出することができ、前記基準抗体が、任意選択で、ポリクローナル R O R 1 抗体、R O R 1 の N 末端部分を認識する R O R 1 抗体、a b 1 3 5 6 6 9、抗ヒト R O R 1 ヤギポリクローナル抗体、抗ヒト R O R 1 ウサギポリクローナル抗体、抗 R O R 1 4 A 5、および抗ヒト R O R 1 2 A 2 からなる群より選択される、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 35】

50

前記試料が、血液悪性疾患および固形腫瘍からなる群より選択される腫瘍組織に由来する、請求項 3 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3 6】

前記試料が、(a) CLL または MCL に由来するか、あるいは (b) 卵巣がん、任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌および非定型カルチノイドの中から選択される肺がん、または任意選択でトリプルネガティブ乳がんである乳がん由来する、請求項 3 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3 7】

前記試料が、骨髄、脂肪組織、副甲状腺、食道および膵臓からなる群より選択される正常組織に由来する、請求項 3 5 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 3 8】

完全長 ROR 1 と特異的に結合する、請求項 1 から 3 7 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 3 9】

請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と担体または賦形剤とを含む組成物。

【請求項 4 0】

請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 1】

前記ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞用にコドン最適化される、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 4 2】

発現制御配列に作動可能に連結されている請求項 4 0 または 4 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現構築物。

【請求項 4 3】

プラスミドまたはウイルスベクター内に存在する、請求項 4 2 に記載の発現構築物。

【請求項 4 4】

レンチウイルスベクターまたは - レトロウイルスベクターから選択されるウイルスベクター内に存在する、請求項 4 2 または 4 3 に記載の発現構築物。

30

【請求項 4 5】

請求項 4 2 から 4 4 のいずれか一項に記載の発現構築物を含むか、または発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 4 6】

請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を作製するための方法であって、請求項 4 2 から 4 5 のいずれか一項に記載の発現構築物を含むか、または発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、前記結合タンパク質を発現させるのに好適な条件下で培養するステップ、および任意選択で、前記結合タンパク質を培養物から単離するステップを含む、方法。

【請求項 4 7】

完全長 ROR 1 を発現する細胞を同定するための方法であって、細胞を請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および前記細胞への前記結合タンパク質の特異的結合を検出することによって、完全長 ROR 1 を発現する細胞を同定するステップを含む、方法。

40

【請求項 4 8】

(a) 生物学的試料を請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質または請求項 3 8 に記載の組成物と接触させるステップ、および (b) 前記結合タンパク質と前記試料中のペプチドもしくはエピトープとの特異的結合またはその欠如を検出するステップを含み、それによって、前記試料中の ROR 1 または ROR 1 エピトープの存在または非存在を検出する、検出方法。

50

【請求項 49】

(b) で検出された前記特異的結合のレベルを基準レベルと比較するステップをさらに含み、前記基準レベルと比較した結合レベルの増加が、前記試料中の ROR1 または ROR1 エピトープの存在を示す、請求項 48 に記載の検出方法。

【請求項 50】

前記試料が、被験体から得られる、請求項 48 または 49 に記載の検出方法。

【請求項 51】

前記試料が、組織切片および/または細胞を含む、請求項 48 から 50 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 52】

前記試料が、ホルマリン固定もしくは凍結された組織切片および/または透過処理された細胞を含むか、ならびに/あるいは前記試料が、血液悪性疾患および固形腫瘍からなる群より選択される腫瘍に由来し、および/または正常組織に由来する、請求項 50 または 51 に記載の検出方法。

【請求項 53】

前記試料が、(a) CLL または MCL に由来するか、あるいは (b) 卵巣がん、任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌および非定型カルチノイドの中から選択される肺がん、または任意選択でトリプルネガティブ乳がんである乳がん由来するか、あるいは (c) 骨髄、脂肪組織、副甲状腺、食道および膵臓からなる群より選択される正常組織に由来する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記細胞が、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されているか、または前記細胞が、凍結され、最適切断温度化合物に包埋されている、請求項 47 から 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記細胞中の完全長 ROR1 の存在が、免疫組織化学または免疫ブロッティングによって検出される、請求項 47 から 54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

組織試料中の ROR1 の存在を同定するための方法であって、組織試料を請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および前記組織への前記結合タンパク質の特異的結合を検出することによって、前記 ROR1 を発現する組織を同定するステップを含み、前記 ROR1 は、任意選択で完全長および/または細胞表面 ROR1 である、方法。

【請求項 57】

完全長 ROR1 を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある被験体を同定するための方法であって、前記被験体からの組織試料を請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および前記組織への前記結合タンパク質の特異的結合を検出することによって、完全長 ROR1 を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある被験体を同定するステップを含む、方法。

【請求項 58】

完全長 ROR1 を発現する細胞に関連する前記疾患が、過剰増殖性疾患または状態である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記過剰増殖性疾患または状態が、腫瘍である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記腫瘍が、任意選択で CLL または MCL である血液腫瘍であり、および/または任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイドもしくはトリプルネガティブ乳がんである、任意選択で乳がん、肺がん、卵巣がんもしくは膵がん腫瘍である、固形腫瘍である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

10

20

30

40

50

前記腫瘍が、原発性腫瘍、転移性腫瘍、または両方を含む、請求項 59 または 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記結合タンパク質を接触させる前記試料またはその一部分の中の細胞の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% が、前記方法により前記 ROR1 またはエピトープを発現すると決定された場合、前記被験体または試料が、抗 ROR1 療法での処置の候補として同定され、前記抗 ROR1 療法が、任意選択で養子細胞療法である任意選択で免疫療法である、請求項 47 から 61 のいずれかに記載の方法。

【請求項 63】

前記試料が由来する前記組織が、前記方法により、前記 ROR1 またはエピトープを均一にまたは均質に発現すると決定された場合、前記被験体または試料が、抗 ROR1 療法での処置の候補として同定され、前記抗 ROR1 療法が、任意選択で養子細胞療法である任意選択で免疫療法である、請求項 47 から 61 のいずれかに記載の方法。

【請求項 64】

前記試料を得た前記被験体に、ROR1 標的化療法を投与するステップをさらに含み、前記 ROR1 標的化療法が、任意選択で養子細胞療法である任意選択で免疫療法である、請求項 47 から 63 のいずれかに記載の方法。

【請求項 65】

過剰増殖性疾患または状態を有する被験体が、ROR1 特異的処置から恩恵を受けることになるかどうかを同定するための方法であって、前記被験体からの組織試料を請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および前記組織への前記結合タンパク質の特異的結合を検出することによって、前記被験体が ROR1 特異的処置から恩恵を受けることになるか否かを同定するステップを含む、方法。

【請求項 66】

前記特異的結合が、前記結合タンパク質を接触させた前記組織もしくはその一部分の表面積の、または前記組織もしくはその一部分の中の細胞の、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% において検出された、および / あるいは前記組織において均一にまたは均質に観察された場合には、前記被験体が、前記 ROR1 特異的処置から恩恵を受けることになる被験体として同定される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記処置が、免疫療法であり、前記免疫療法が、任意選択で養子細胞療法であり、任意選択で抗 ROR1 抗体を含むキメラ抗原受容体を含み、前記抗 ROR1 抗体が、任意選択で、R12 と称する抗体であるか、または R12 と称する抗体と結合について競合する、請求項 65 または 66 に記載の方法。

【請求項 68】

完全長 ROR1 を発現する細胞に関連する過剰増殖性疾患または状態を有する被験体の予後を決定するための方法であって、前記被験体からの組織試料を請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および前記組織への前記結合タンパク質の特異的結合を検出するステップを含み、特異的結合を検出するステップによって前記被験体が ROR1 特異的処置の非存在下で予後不良であると同定される、方法。

【請求項 69】

特異的結合を検出するステップによって前記被験体が腫瘍転移を有すると同定され、および / または前記組織試料が、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されているか、もしくは前記細胞が、凍結され、最適切断温度化合物に包埋されている、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記被験体を前記抗 ROR1 療法で処置するステップをさらに含む、請求項 47 から 69 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 1】

疾患または状態を有する被験体に抗 R O R 1 療法を投与するステップを含む処置の方法であって、被験体における前記疾患または状態の組織または試料が、表面で発現される R O R 1 の均一または均質な発現を有すると同定されている、方法。

【請求項 7 2】

前記疾患または状態が、腫瘍であり、任意選択で固形腫瘍または血液腫瘍である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記腫瘍が、C L L、M C L、乳がん、肺がん、卵巣がん、および膵がんからなる群より選択される、請求項 7 2 に記載の方法。

10

【請求項 7 4】

前記腫瘍が、肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイド、またはトリプルネガティブ乳がんである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

決定が、請求項 4 7 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法によって行われる、請求項 7 1 から 7 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 6】

前記疾患または状態が、肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイド、またはトリプルネガティブ乳がんである、請求項 1 から 7 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗 R O R 1 療法が、免疫療法を含む、請求項 7 0 から 7 6 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7 8】

前記免疫療法が、養子細胞療法を含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記免疫療法が、抗 R O R 1 抗体断片を含むキメラ抗原受容体を発現する細胞を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記抗体断片が、R 1 2 と称する抗体、その抗原結合領域を含有する抗体に由来するか、または R 1 2 と称する抗体と結合について競合する、請求項 7 9 に記載の方法。

30

【請求項 8 1】

前記細胞が、T 細胞または N K 細胞を含む、請求項 7 9 または 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記組織への前記結合タンパク質の特異的結合が、免疫組織化学または免疫ブロッティングによって検出される、請求項 4 7 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を含む、キット。

【請求項 8 4】

請求項 3 9 に記載の組成物を含む、キット。

40

【請求項 8 5】

組織試料中の完全長 R O R 1 の存在を検出するために使用される、請求項 8 3 または 8 4 に記載のキット。

【請求項 8 6】

組織試料が、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されているか、または前記組織試料が、凍結され、最適切断温度化合物に包埋されている、請求項 8 3 または 8 4 に記載のキット。

【請求項 8 7】

組織試料中の完全長 R O R 1 の存在が、免疫組織化学または免疫ブロッティングによって検出される、請求項 8 3 から 8 6 のいずれか一項に記載のキット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の利益に関する声明

この発明は、National Institutes of Healthによって付与されたCA114536およびCA138293の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

配列表に関する記述

本願に関連する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、これによって参照により本明細書に組み入れられる。配列表を含むテキストファイルの名称は、360056_437WO_SEQUENCE_LISTINGである。このテキストファイルは52.2KBであり、2017年2月1日に作成されたものであり、EFS-Web経由で電子的に提出されることになる。

10

【背景技術】

【0003】

受容体チロシンキナーゼROR1は、多種多様な腫瘍において過剰発現されるが、ごく少数の正常組織でも過剰発現される、腫瘍胎児抗原である。ROR1は、B細胞慢性リンパ性白血病(CLL)、マンツル細胞リンパ腫(MCL)、および一部の上皮がんにおいて高度に発現される。ヒトROR1は、遺伝子Ror1によりコードされ、この遺伝子Ror1は、細胞表面に局在する937アミノ酸完全長アイソフォーム(ROR1_v1)と、細胞内に局在したままである完全長ROR1のN末端部分を主として含有する短い(短縮)393アミノ酸アイソフォーム(ROR1_v2)という、2つの推定スプライスバリエントをコードしている(Hudecekら、Blood 116巻、4532頁、2010年)。

20

【0004】

腫瘍細胞表面でのROR1の高度な発現および正常組織における最小限のROR1発現に基づいて、ROR1は、治療薬で標的とするのに良い腫瘍特異的または腫瘍関連抗原である。例えば、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞がROR1発現腫瘍を標的とするように設計された(Hudecekら、Blood 116巻:4532~41頁、2010年)。患者が、ROR1を発現する悪性疾患を有するかどうか、およびROR1特異的療法に適しているかどうかを決定するために、被験体から得られる試料中のものなどの、被験体の細胞における内因性ROR1の発現、例えば組織切片中の、例えば、細胞表面で発現される形態のROR1、例えば、細胞表面で発現される完全長ROR1分子の発現を検出することができる診断試薬を有することは重要である。

30

【0005】

免疫組織化学(IHC)は、医療診断で組織中のタンパク質の存在または非存在を決定するために使用される一般的な手法である。腫瘍組織は、IHC分析に付される前に慣例的にホルマリン固定されパラフィンに包埋されている(FFPE組織)。したがって、ROR1診断用抗体は、組織学的試料において内因性発現したROR1を検出できなければならない。市販の抗ROR1抗体は、FFPE組織における内因性ROR1を有効に検出しない。さらに、ほとんどの市販抗体は、ROR1のN末端部分を標的とするものであり、完全長ROR1と完全長ROR1のアミノ末端部分のみを含有する短いROR1アイソフォームとの差を検出することができない。

40

それ故、内因性発現したROR1の検出および定量に有用な抗体に対する要求が依然として存在する。本開示は、そのような要求に応え、さらに他の関連する利点を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hudecekら、Blood(2010年)116巻、4532頁

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

ある特定の態様では、本開示は、ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側にあるROR1の部分と特異的に結合する結合タンパク質であって、任意選択で、免疫グロブリン様結合タンパク質である、および/あるいは抗体もしくはその抗原結合断片であるか、または抗体もしくはその抗原結合断片を含む、結合タンパク質に関する。

【0008】

他の態様では、本開示は、(i)配列番号3を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号3からなる、ペプチド、および/または(ii)ROR1タンパク質のエピトープに特異的に結合する結合タンパク質であって、前記エピトープが、(a)配列番号3に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b)配列番号3に記載のアミノ酸配列内の1つもしくは複数のアミノ酸を含む、結合タンパク質を提供する。

10

【0009】

さらに他の態様では、配列番号15または16に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である軽鎖可変ドメイン(V_L)と、配列番号12、13または14に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である重鎖可変ドメイン(V_H)とを含む抗体またはその断片を含む結合タンパク質であって、抗体が、任意選択で、(i)配列番号3を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号3からなる、ペプチド、および/または(ii)ROR1タンパク質のエピトープに特異的に結合し、エピトープが、(a)配列番号3に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b)配列番号3に記載のアミノ酸配列内の1つもしくは複数のアミノ酸を含む、結合タンパク質を提供する。

20

【0010】

さらに他の態様では、本開示は、ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側に位置するROR1エピトープとの特異的結合について基準結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と競合する、結合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号3のペプチドとの結合について基準タンパク質と競合する結合タンパク質を提供する。

【0011】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質を含む組成物に関する。

30

【0012】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0013】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現構築物に関する。

【0014】

ある特定の他の態様では、本開示は、本明細書に記載の発現構築物を含むか、または本明細書に記載の発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。

40

【0015】

ある特定の他の態様では、本開示による結合タンパク質を作製する方法であって、発現構築物を含むか、または発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、結合タンパク質を発現させるのに好適な条件下で培養するステップ、および任意選択で、結合タンパク質を培養物から単離するステップを含む方法を提供する。

【0016】

ある特定の他の態様では、完全長ROR1を発現する細胞を同定する方法であって、細胞を本明細書で開示する結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と細胞の特異的結合を検出することによって、完全長ROR1を発現する細胞を同定するステップを含む方法を提供する。

50

【0017】

ある特定の他の態様では、本開示は、(a)生物学的試料を本明細書で開示する結合タンパク質または組成物と接触させるステップ、および(b)結合タンパク質と試料中のペプチドもしくはエピトープとの特異的結合またはその欠如を検出するステップを含み、それによって、試料中のROR1またはROR1エピトープの存在または非存在を検出する、検出方法を提供する。

【0018】

ある特定の他の態様では、本開示は、組織試料中のROR1の存在を同定する方法であって、組織試料を本明細書で開示する結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出することによって、ROR1を発現する組織を同定するステップを含み、ROR1は、任意選択で完全長および/または細胞表面ROR1である、方法を提供する。

10

【0019】

ある特定の他の態様では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある、被験体を同定する方法であって、被験体からの組織試料を結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出することによって、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある、被験体を同定するステップを含む方法を提供する。

【0020】

ある特定の他の態様では、過剰増殖性疾患または状態を有する被験体が、ROR1特異的処置から恩恵を受けることになるかどうかを同定するための方法であって、被験体からの組織試料を本明細書で開示する結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出することによって、被験体がROR1特異的処置から恩恵を受けることになるか否かを同定するステップを含む方法を提供する。

20

【0021】

ある特定の他の態様では、過剰増殖性疾患または状態を有する被験体が、ROR1特異的処置から恩恵を受けることになるかどうかを同定するための方法であって、被験体からの組織試料を本明細書で開示する結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出することによって、被験体がROR1特異的処置から恩恵を受けることになるか否かを同定するステップを含む方法を提供する。

30

【0022】

ある特定の他の態様では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する過剰増殖性疾患または状態を有する被験体の予後を決定するための方法であって、被験体からの組織試料を本明細書で開示する結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出するステップを含み、特異的結合を検出するステップによって被験体がROR1特異的処置の非存在下で予後不良であると同定される、方法を提供する。

【0023】

ある特定の他の態様では、疾患または状態を有する被験体に抗ROR1療法を投与するステップを含む処置の方法であって、被験体における疾患または状態の組織または試料が、表面で発現されるROR1の均一または均質な発現を有すると同定されている、方法を提供する。一部の実施形態では、決定は、上で開示した方法により行われる。

40

【0024】

別の態様では、本開示は、本明細書で開示する、結合タンパク質もしくは免疫グロブリン様結合タンパク質、または組成物を含む、キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、ROR1スプライスバリエントの概略図を示す。Ror1は、次のような2つのスプライスバリエントとして発現される：細胞表面に局在するROR1の完全長937アミノ酸アイソフォーム（本明細書では「ROR1__v1」と呼ばれる）；およびROR1__v1の細胞外N末端部分のみを含み（すなわち、膜貫通ドメインとチロシンキ

50

ナーゼドメインを含有する細胞内C末端部分とを欠き)、したがって、細胞膜に局在しない、短縮393アミノ酸スプライスアイソフォーム(本明細書では「ROR1_v2」と呼ばれる)。

【0026】

【図2】図2は、リアルタイムPCRにより測定された正常なヒトおよびアカゲザルからの様々な異なる組織における完全長ROR1転写物の発現レベルを例証する。異なる2ドナーからの初代慢性リンパ性白血病(CLL)細胞であって、高レベルのROR1を発現することが公知である細胞を、陽性対照として使用した(Hudecekら、Blood 116巻、4532頁、2010年を参照されたい)。

【0027】

【図3A】図3Aおよび3Bは、様々な組織に対する市販および公開抗ROR1抗体の免疫組織化学(IHC)による試験結果を示す。染色は、抗ROR1抗体の結合を示す。(A)市販および公開抗ROR1抗体を、正常扁桃組織(ROR1⁻)、CCLおよびマンツル細胞リンパ腫(MCL)細胞(ROR1⁺、完全長)、K562細胞(ROR1⁻)、ならびに完全長ROR1を過剰発現するようにトランスフェクトされたK562細胞(ROR1⁺、完全長)においてROR1と特異的に結合するそれらの能力について試験した。(B)市販のおよび以前に公開された抗ROR1抗体を使用する、ROR1トランスフェクトK562細胞、対照K562細胞、CCLリンパ節および扁桃組織に関するIHC染色。

【図3B】同上。

【0028】

【図4】図4は、抗ROR1モノクローナル抗体2A2(Biolegend、Sandiego、CA)によるROR1結合が、ホルマリン固定組織試料に関して低減されることを示す。ROR1を発現するROR1⁺細胞(CCLおよびK562/ROR1細胞)を一晩ホルマリン固定した。上のパネルは、非固定細胞と比較して、ホルマリン固定ROR1⁺細胞における、抗ROR1モノクローナル抗体2A2を使用して行ったフローサイトメトリー分析によるROR1の検出低減を例証するものである。下のパネルは、ROR1を過剰発現するようにトランスフェクトされたK562細胞が、CCL細胞により内因性発現されるレベルよりはるかに高レベルのROR1タンパク質を発現することを免疫プロットによって実証するものである。

【0029】

【図5】図5は、マウスの免疫化に使用したペプチドのROR1のC末端部分における位置(アミノ酸404~937)を示す。図5に示されているC末端アミノ酸配列(それぞれ、ヒトについては配列番号51、およびマウスについては配列番号53)は、完全長ROR1(ROR1_v1)(例えば、ヒトについては配列番号1にまたはマウスについては配列番号52に対応する完全長ROR1)のみに存在する。ヒトROR1抗体産生のためのマウスの免疫化に使用したペプチドの位置および配列が囲み枠で示されている(配列番号2、3、54および55に対応する)。

【0030】

【図6A】図6Aおよび6Bは、ROR1のC末端部分と結合する抗体の産生についてのポリクローナルマウス血清およびハイブリドーマクローンのスクリーニングを例証する。(A)130kDa ROR1タンパク質を検出するための免疫プロット分析によるROR1⁻K562細胞およびROR1⁺CCL細胞溶解物に対する複数のポリクローナルマウス血清のスクリーニング。(B)CCL細胞において発現される完全長ROR1のみに結合することができる抗体の産生についての免疫プロット分析によるハイブリドーマクローンのスクリーニング結果。抗ROR1抗体を産生するクローンが、CCL細胞溶解物において130kDaバンドの存在により検出された。抗ROR1モノクローナル抗体クローン6D4(矢印により示されているレーン)は、CCL細胞溶解物において強い130kDaバンドを示す。クローン4A11もまた強い130kDaバンドを示す。

【図6B】同上。

10

20

30

40

50

【0031】

【図7】図7は、完全長ROR1過剰発現細胞（K562/ROR1⁺細胞）とROR1を発現しない細胞（ROR1⁻と呼ばれる、K562細胞）とを使用する、IHCによるROR1特異性についての抗ROR1モノクローナル抗体6D4の試験結果を示す。抗体6D4は、K562/ROR1⁺細胞での過剰発現された完全長ROR1の明瞭な高度の細胞表面染色と、K562細胞（ROR1⁻）での最小のバックグラウンド染色を示した。

【0032】

【図8】図8は、ROR1⁺（CLLおよびMCLリンパ節）およびROR1⁻（扁桃）組織に関する抗ROR1モノクローナル抗体6D4（右パネル）のIHCによる試験結果を示す。抗体6D4は、CLLおよびMCL腫瘍リンパ節において、正常扁桃組織では検出不能だった内因性完全長ROR1の明瞭な細胞表面染色を示した。

10

【0033】

【図9A】図9Aおよび9Bは、モノクローナル抗体（mAb）6D4についてのFFPE細胞のIHC染色を他のクローンに由来するモノクローナル抗体と比較して示す。（A）対照K562細胞、ROR1トランスフェクトK562細胞、およびCLLリンパ節に対する濃縮ハイブリドーマ上清のIHCスクリーニングからの代表クローン。（B）6D4 mAbでのFFPE処理CLL P BMC（n=2）のIHC染色と抗ROR1 mAb 2A2でのフローサイトメトリー染色のペア。

【図9B】同上。

20

【0034】

【図10A】図10Aから10Cは、mAb 6D4およびアイソタイプによるFFPE細胞のIHC染色、ならびに細胞溶解物のROR1発現についての免疫プロット分析をさらに例証する。（A）6D4 mAbでのFFPE ROR1トランスフェクト細胞株および対照細胞株（左パネル）ならびにROR1⁺腫瘍細胞株（右パネル）のIHC染色。スケールバーは、50μmを表す。抗ROR1 6D4 mAb抗体（実線）、抗ROR2抗体（R&D Biosystems - FAB20641G）（破線）、およびアイソタイプ抗体（陰影灰色）でのフローサイトメトリー染色のペア。（B）アイソタイプと比較しての6D4 mAbによるFFPE扁桃組織ならびにCLLおよびMCLリンパ節の染色。（C）6D4 mAbでのROR1⁻およびROR1⁺細胞株の免疫プロット分析。

30

【図10B】同上。

【図10C】同上。

【0035】

【図11】図11は、ROR1⁺腫瘍のIHCスコア付けの代表的な画像を示す。「スコア0」は、染色がないことを示す。「スコア1」は、膜染色が高倍率で可視の低レベル染色を示す。「スコア2」および「スコア3」は、低倍率で可視の高度の膜染色を示す。

【0036】

【図12】図12は、抗ROR1モノクローナル抗体6D4を用いてIHCにより分析した、上皮がんにおける完全長ROR1の発現を示す。明瞭な細胞表面染色が卵巣がん、肺腺癌およびトリプルネガティブ乳がんにおいて観察された。

40

【0037】

【図13】図13は、抗体6D4により検出された、肺がん亜型（腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、および非定型カルチノイド）におけるROR1発現を示す。アイソタイプ対照抗体での染色と比較して、この抗体でこれらのがん型の各々においてROR1染色が観察された。

【0038】

【図14】図14は、重要な正常ヒト組織に由来する組織切片に関する抗体6D4およびアイソタイプ対照を使用する染色の結果を示す。

【0039】

50

【図15】図15は、抗体6D4を使用して検出された、正常ヒト組織のサブセット（副甲状腺、食道、膵臓）に関するROR1の発現を示す。

【0040】

【図16A】図16Aから16Cは、6D4 mAbを使用する、卵巣がんにおける膜ROR1染色を示す。（A）6D4 mAbで染色された卵巣がん亜型試料の代表的なIHC画像。スケールバーは、100 μ mを表す。中央のパネルにおける四角の中の領域が、下のパネルにおいて10倍に拡大されている。（B）卵巣がんの異なる亜型におけるROR1⁺腫瘍のパーセント。（C）ROR1⁺卵巣がんサブセットにおけるROR1^{高度}およびROR1^{低度}腫瘍のパーセント。

【図16B】同上。

【図16C】同上。

【0041】

【図17A】図17Aから17Cは、6D4 mAbを使用する、乳がんにおける膜ROR1染色を示す。（A）6D4 mAbで染色された乳がん亜型組織試料の代表的なIHC画像。スケールバーは、100 μ mを表す。中央のパネルにおける四角の中の領域が、下のパネルにおいて10倍に拡大されている。（B）乳がんの異なる亜型におけるROR1⁺腫瘍のパーセント。（C）ROR1⁺乳がんサブセットにおけるROR1^{高度}およびROR1^{低度}腫瘍のパーセント。

【図17B】同上。

【図17C】同上。

【0042】

【図18A】図18Aから18Dは、6D4 mAbを使用する、肺がんにおける膜ROR1染色を示す。（A）6D4 mAbで染色された肺がん亜型試料におけるROR1発現の代表的なIHC画像。スケールバーは、100 μ mを表す。中央のパネルにおける四角の中の領域が、下のパネルにおいて10倍に拡大されている。（B）肺がんの異なる亜型におけるROR1⁺腫瘍のパーセント。（C）ROR1⁺肺がんサブセットにおけるROR1^{高度}およびROR1^{低度}腫瘍のパーセント。（D）ROR1⁺肺腺癌の原発性および適合する転移性リンパ節におけるROR1発現の代表的なIHC画像。スケールバーは、50 μ mを表す。

【図18B】同上。

【図18C】同上。

【図18D】同上。

【0043】

【図19A】図19Aおよび19Bは、mAb 6D4を使用して膵臓腺癌におけるROR1発現を示す。（a）膵臓腺癌におけるROR1染色の代表的なIHC画像。スケールバーは、100 μ mを表す。右端のパネルは、中央のパネルの拡大画像である。（B）膵臓腺癌におけるROR1⁺腫瘍のパーセント。

【図19B】同上。

【0044】

【図20A】図20Aから20Fは、mAb 6D4でのIHC染色、その後の免疫プロットによる検証によって示された、正常ヒト組織におけるROR1発現を示す。（A）6D4 mAbでのヒト副甲状腺および膵島における膜ROR1染色。スケールバーは、100 μ mを表す。中央のパネルにおける四角の中の領域が、下のパネルにおいて10倍に拡大されている。（B）ヒト胃腸管の異なる領域におけるROR1発現。スケールバーは、100 μ mを表す。中央のパネルにおける四角の中の領域が、下のパネルにおいて10倍に拡大されている。（C）ROR1染色は、正常ヒト大脳、小脳、心臓、肺、脾臓および肝臓にはない。スケールバーは、100 μ mを表す。（D）6D4 mAbを使用する、正常組織におけるROR1の免疫プロット分析。（E）ポリクローナル抗ROR1を使用する、ROR1^{高度}正常組織の分析の免疫プロット。（F）組織溶解物がPNGase FでN結合型グリコシル化を除去するように処理された、正常組織におけるROR1発

10

20

30

40

50

現の免疫プロット検証。脱グリコシル化ROR1が100kDaで泳動している。

【図20B】同上。

【図20C】同上。

【図20D】同上。

【図20E】同上。

【図20F】同上。

【0045】

【図21】図21は、CLL PBMC、分化脂肪細胞、および正常ヒト胃腸組織におけるRor1（完全長ROR1をコードするもの、ROR1__v1）の転写物発現を示す。

【0046】

【図22A】図22Aから22Dは、ROR1-CAR T細胞活性とROR1発現との関係を例証する。(A)ROR1-CAR T細胞またはmock形質導入T細胞による、異なる標的細胞とともに2:1のT細胞:標的比で24時間培養した後の、サイトカイン(IFN-、GM-CSF、およびIL-2)産生(2つの独立した実験を平均したデータ)。(B)前駆脂肪細胞(pre adipocyte)からin vitroで分化した成熟脂肪細胞の6D4 mAbでのROR1染色。(C)異なる2ドナーからのROR1-CAR T細胞またはmock形質導入T細胞による、脂肪細胞、膵島細胞または膵腺房細胞とともに2:1のT細胞:標的比で24時間培養した後の、IFN-産生。(D)ROR1-CAR T細胞またはmock形質導入T細胞をCFSE標識標的とともに5:1のT細胞:標的比でインキュベートした。高レベルのヨウ化プロピジウム(PI高度)標的細胞を有する細胞の百分率を24時間後に測定した。

【図22B】同上。

【図22C】同上。

【図22D】同上。

【0047】

【図23A】図23Aから23Dは、ヒトROR1とアカゲザルROR1との間の類似性を例証し、そしてmAb 6D4とアカゲザルROR1の結合を示す。(A)mAb 6D4によって認識されるヒトROR1配列(配列番号3)、マウスROR1配列(配列番号57)およびアカゲザルROR1配列(配列番号59)のアラインメント。(B)アカゲザルROR1に対する抗体6D4の結合。抗体6D4を(A)K562(ROR1-)細胞および(B)アカゲザルROR1を発現するK562細胞に対してIHCによって試験した。抗体6D4を(C)アカゲザルT細胞(ROR1-)および(D)アカゲザルROR1をトランスフェクトしたアカゲザルT細胞に対しても試験した。抗体6D4は、K562細胞またはアカゲザルT細胞のいずれかにおいて過剰発現されたとき、完全長アカゲザルROR1の明瞭な細胞表面染色を示した。(C)アカゲザル副甲状腺および膵島におけるROR1染色。中央のパネルにおける四角の中の領域が、右のパネルにおいて10倍に拡大されている。(D)マカク胃腸管の異なる領域におけるROR1染色の代表的なIHC画像。中央のパネルにおける四角の中の領域が、右のパネルにおいて10倍に拡大されている。スケールバーは、100μmを表す。

【図23B】同上。

【図23C】同上。

【図23D】同上。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本開示は、結合タンパク質、例えば、免疫グロブリン様結合タンパク質、例えば抗体(その抗原結合断片を含む)であって、例えば、ROR1もしくはそのエピトープまたはROR-1由来ペプチド、例えば、表面で発現される、内因性のおよび/または完全長のROR1に特異的である、例えば、それらと特異的に結合する、結合タンパク質を提供する。それらの結合タンパク質をコードする核酸、それらの結合タンパク質を発現する宿主細胞、およびそれらの使用方法も提供する。本明細書で提供する結合タンパク質は、一部の

10

20

30

40

50

態様では、ROR1のC末端部分と特異的に結合し、したがって、細胞表面に位置することが判明している、ROR1の完全長アイソフォームの発現を検出するために使用することができ、一部の実施形態では、細胞内に一般に局在するそのC末端部分を欠く短縮ROR1アイソフォームとは結合しない。加えて、一部の態様では、免疫グロブリン様結合タンパク質は、例えばホルマリン固定されパラフィンに包埋された(FPE)細胞または組織において、完全長ROR1の発現を検出するために使用することができ、したがって、ROR1治療剤またはレジメンに伴う診断ツールとしてまたはコンパニオン診断薬として有用である。例えば、本明細書で提供する免疫グロブリン様結合タンパク質は、被験体がROR1特異的療法から恩恵を受けることになるかどうか、そのような療法を投与、継続もしくは調整すべきかどうか、および/または特定の腫瘍型をそのように処置すべきかどうかを決定するために使用することができる。提供される実施形態のいずれかにおいて使用するための療法の例は、免疫療法、例えば、抗体療法および/もしくは養子免疫療法、ならびに/またはROR1特異的キメラ抗原受容体(CAR)修飾細胞、例えばT細胞を含むものである。

10

【0049】

免疫療法などのROR1特異的療法の投与を含むものなどの、治療方法も提供する。ある特定の実施形態では、療法は、抗ROR1抗体もしくはその断片、例えば、そのような抗体断片を含むCARであるか、または抗ROR1抗体もしくはその断片、例えば、そのような抗体断片を含むCARを含む。さらなる実施形態では、療法は、CARが、ヒトROR1の細胞外部分などの、ROR1と特異的に結合する、CAR修飾細胞であるか、またはそのようなCAR修飾細胞を含む。一部の実施形態では、CARは、scFvなどの抗体断片を含む結合ドメインを介してROR1と結合する。一部の態様では、CARは、スペーサー、例えば、1つもしくは複数の抗体定常領域および/またはヒンジ領域を含み、一部の態様では、CARは、膜貫通ドメイン、ならびに1つまたは複数の、一般には1つより多くの細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータ由来のもしくは他の一次シグナル伝達ドメイン、ならびに/または共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば、CD28および/もしくは41BBに由来するものをさらに含む。

20

【0050】

一部の実施形態では、CARおよび/または抗体は、エピトープ特異性であるか、エピトープ特異性を含むか、もしくはエピトープ特異性を共有し、ならびに/またはR12と称する抗ROR1 IgG1抗体(これは、例えば、Yangら、PLOS ONE、6巻:e21018、2011年;Hudecekら、Clin. Cancer Res、19巻:3153頁、2013年;米国特許出願公開第2013/0251642号に開示されている)、および/もしくはその抗原結合部分、例えばscFv、および/もしくはそのCDRを含む抗体と、結合について競合する。R12の抗原結合scFv断片を含有するキメラ抗原受容体(CAR)は、CAR療法において抗腫瘍反応性を有効に促進することが実証されている(Hudecekら、2013年;国際PCT公開番号WO 2014/031687)。

30

【0051】

一部の実施形態では、疾患または状態は、腫瘍であるか、または腫瘍を含み、該腫瘍は、原発性であってもよく、または転移性であってもよい。一部の態様では、疾患または状態は、任意選択でCLLまたはMCLである血液腫瘍であり、および/または任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイドもしくはトリプルネガティブ乳がんである、任意選択で乳がん、肺がん、卵巣がんもしくは膵がん腫瘍である、固形腫瘍である。一部の態様では、疾患もしくは状態における細胞の、またはそれに関連する組織の、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%は、治療により認識されるROR1またはそのエピトープもしくはペプチドを発現し、および/あるいはそのようなタンパク質またはエピトープまたはペプチドは、そこで均一にまたは均質に発現される。一部の態様では、そのような発現は、本明細書で提供する抗体を使用して、および/またはそのような抗体とともに使用される検

40

50

出方法を使用して、決定されたものである。

【0052】

本開示をより詳細に示す前に、本明細書で使用される一定の用語の定義を提供することは、本開示の理解の助けになるだろう。さらなる定義は、本開示を通して示す。

【0053】

本明細書では、任意の濃度範囲、百分率範囲、比の範囲、または整数範囲は、別段の指示がない限り、述べられている範囲内の任意の整数の値、および適宜、その分数（例えば、整数の十分の一および百分の一）を含むと解されるものとする。また、任意の物理的特徴、例えば、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚さに関して本明細書で述べられている任意の数値範囲は、別段の指示がない限り、述べられている範囲内の任意の整数を含むと解されるものとする。

10

【0054】

本明細書で使用される用語「約」は、別段の指示がない限り、示されている範囲、値または構造の $\pm 20\%$ を意味する。

【0055】

本明細書で使用される用語「1つの(a)」および「1つの(an)」は、列挙されている成分の「1つまたは複数」を指すと解されたい。代替案（例えば「または」）の使用は、代替案のどちらか一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると解されたい。

【0056】

加えて、本明細書に記載の構造および置換基の様々な組み合わせに由来する個々の化合物または化合物群は、あたかも各化合物または化合物群が個々に記載されている場合と同程度に、本願により開示されていると解されたい。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本開示の範囲内である。

20

【0057】

本明細書で使用される用語「含む(include)」、「有する」および「含む(comprise)」は、同義的に使用され、これらの用語および異表記は、非限定的と解釈されることを意図したものである。

【0058】

用語「から本質的になる」は、特許請求の範囲を、明記されている材料もしくはステップに、または特許請求された発明の基本的特徴に著しい影響を与えないものに限定する。例えば、タンパク質ドメイン、領域もしくはモジュール（例えば、結合ドメイン、ヒンジ領域、リンカーモジュール）、またはタンパク質（1つもしくは複数のドメイン、領域もしくはモジュールを有し得る）は、ドメイン、領域、モジュールまたはタンパク質のアミノ酸配列が、併せて、ドメイン、領域、モジュールもしくはタンパク質の長さの最大20%（例えば、最大15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%または1%）に寄与し、かつドメイン、領域、モジュールまたはタンパク質の活性（例えば、結合タンパク質の標的結合親和性）に実質的な影響を与えない（すなわち、活性を50%を超えて、例えば、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または1%も低下させない）、伸長、欠失、変異、またはそれらの組み合わせ（例えば、アミノもしくはカルボキシ末端またはドメイン間のアミノ酸）を含む場合、特定のアミノ酸配列「から本質的になる」。

30

40

【0059】

本明細書で使用される「ROR1」または「受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1」は、UniProtKB番号Q01973-1、Q01973-2もしくはQ01973-3のいずれか1つのヒト基準アミノ酸配列との相同性を有する哺乳動物受容体チロシンキナーゼポリペプチド、または基準アミノ酸配列のコンセンサス配列、またはそのアイソフォームもしくはバリエーションもしくは断片である。例示的ホモログは、UniProtKB番号Q9Z139-1のマウスアミノ酸配列である。その完全長形態のROR1は、(1)免疫グロブリン様ドメインとFrizzledドメインとクリングルドメイン

50

とを含有する細胞外部分、(2)膜貫通部分、および(3)チロシンキナーゼドメインを含有する細胞内部分を含み(図1)、これを本明細書では「完全長ROR1」または「ROR1__v1」と呼ぶ。ある特定の実施形態では、完全長ROR1は、例えば配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む、ヒト完全長ROR1である。ROR1は、完全長ROR1のN末端部分を含むが完全長ROR1の膜貫通および細胞内部分を欠く、細胞内アイソフォーム(Hudecekら、Blood 116巻:4532頁、2010年)として見いだされることもあり、これを本明細書では「短縮ROR1」または「短いアイソフォームROR1」または「ROR1__v2」と呼ぶ。

【0060】

本明細書で使用される用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって連結されているアミノ酸残基で構成された化合物を指す。用語「タンパク質」は、用語「ポリペプチド」と同義語であることもあり、または加えて、2つまたはそれより多くのポリペプチドの複合体を指すこともある。ポリペプチドは、他の成分(例えば、共有結合されているもの)、例えば、タグ、標識、生物活性分子、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含有することもある。特定の実施形態では、ポリペプチドは、断片であってもよい。本明細書で使用される「断片」は、基準配列において見いだされる1つまたは複数のアミノ酸を欠くポリペプチドを意味する。断片は、基準配列において見いだされる結合ドメイン、抗原またはエピトープを含むことができる。基準ポリペプチドの断片は、基準配列のアミノ酸配列のアミノ酸の少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより多くを有することができる。

10

20

【0061】

本明細書に記載の「バリエーション」ポリペプチド種は、本明細書に提示の基準ポリペプチドと比べて、1つまたは複数の部位に1つもしくは複数の非天然アミノ酸、1つもしくは複数のアミノ酸置換、1つもしくは複数のアミノ酸挿入、1つもしくは複数のアミノ酸欠失、またはそれらの組み合わせを有する。ある特定の実施形態では、「バリエーション」は、基準ポリペプチドと比べて実質的に同様の活性(例えば、酵素機能、免疫原性)または構造を有するポリペプチドを意味する。基準ポリペプチドのバリエーションは、当技術分野において公知の配列アラインメントプログラムおよびパラメータによって決定して、基準ポリペプチドのアミノ酸配列との少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、またはそれより高い配列同一性を有することができる。バリエーションは、例えば、遺伝的多型またはヒトによる操作の結果として得ることができる。アミノ酸の保存的置換は周知であり、自然に起こることもあり、またはタンパク質が組換えで産生されるときに導入されることもある。アミノ酸置換、欠失および付加を、当技術分野において公知の変異誘発方法を使用してタンパク質に導入してもよい(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、2001年を参照されたい)。オリゴヌクレオチド誘導部位特異的(またはセグメント特異的)変異誘発手順を利用して、所望される置換、欠失または挿入に応じて変化させた特定のコドンを含む変化したポリペプチドを得てもよい。あるいは、ランダムまたは飽和変異誘発技術、例えば、アラニンスキャニング変異誘発、エラープロードポリメラーゼ連鎖反応変異誘発、およびオリゴヌクレオチド誘導変異誘発を使用して、ポリペプチドバリエーションを調製してもよい(例えば、Sambrookら、上掲を参照されたい)。

30

40

【0062】

2つまたはそれより多くのポリペプチドまたは核酸分子配列の文脈での用語「同一の」または「同一性パーセント」は、当技術分野において公知の方法、例えば配列比較アルゴリズムを使用して、手動アラインメントにより、または目視検査により測定して、比較ウ

50

インドウまたは指定領域にわたって比較し、最もよく一致するように整列させたとき、同じである2つもしくはそれより多くの配列もしくは部分配列、または指定領域にわたって同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの指定百分率（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%同一性）を有する2つもしくはそれより多くの配列もしくは部分配列を意味する。例えば、配列同一性および配列類似性パーセントの決定に好適な好ましいアルゴリズムは、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、Altschulら（Nucleic Acids Res. 25巻：3389頁、1977年）およびAltschulら（J. Mol. Biol. 215巻：403頁、1990年）に、それぞれ記載されている。

10

【0063】

本明細書で使用される「融合タンパク質」は、天然ではタンパク質中で一緒に見いだされない少なくとも2つの異なるドメインを有する、一本鎖ポリペプチドを含む。融合タンパク質をコードする核酸分子を、PCRを使用して構築すること、組換えにより作出すること、もしくは同様のことができ、またはそのような融合タンパク質を合成により作製することができる。融合タンパク質は、他の成分（例えば、共有結合されているもの）、例えば、タグまたは生物活性分子をさらに含有することもある。

【0064】

「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、3' - 5' ホスホジエステル結合によって連結されているデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかを含有する、一本鎖もしくは二本鎖直鎖状または環状ポリヌクレオチドを指す。核酸分子は、RNA、DNA、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、cDNA、またはベクターDNAを含む。

20

【0065】

本開示のポリヌクレオチドのバリエーションも企図される。バリエーションポリヌクレオチドは、本明細書に記載の基準ポリヌクレオチドと少なくとも80%、85%、90%、95%、99%または99.9%同一であるか、または約65 ~ 68 で0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、もしくは約42 で0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドというストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で規定配列の基準ポリヌクレオチドとハイブリダイズするものである。ポリヌクレオチドバリエーションは、本明細書に記載の機能性を有する免疫グロブリン様結合タンパク質またはその抗原結合断片をコードする能力を保持する。

30

【0066】

用語「単離される」は、材料がその元の環境（例えば、その材料が天然に存在する場合には天然環境）から除去されることを意味する。例えば、生きている動物内に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然系に共存する材料の一部またはすべてから分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であることもあり、ならびに/またはそのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは、組成物（例えば、細胞溶解物）の一部であることもあり、およびさらには、そのようなベクターもしくは組成物が核酸もしくはポリペプチドにとっての天然環境の一部でない点で単離されていることもある。

40

【0067】

核酸配列を細胞に挿入する文脈での用語「導入される」は、「トランスフェクション」、「形質転換」または「形質導入」を意味し、核酸分子を細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチドまたはミトコンドリアDNA）に組み込むことができるか、自律レプリコンに変換することができるか、または（例えば、トランスフェクトされたmRNAを）一過性に発現することができる、真核または原核細胞への核酸配列の組み込みへの言及を含む。

50

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される「異種」または「外因性」核酸分子、構築物または配列は、宿主細胞にとって生得的なものではないが、宿主細胞からの核酸分子または核酸分子の一部と相同であり得る、核酸分子または核酸分子の部分を指す。異種または外因性核酸分子、構築物または配列の供給源は、異なる属または種からのものであり得る。ある特定の実施形態では、異種または外因性核酸分子は、例えばコンジュゲーション、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、または同様のものにより、宿主細胞または宿主ゲノムに付加され（すなわち、宿主細胞または宿主ゲノムに内因性のものでも生得的なものでもなく）、付加された分子は、宿主ゲノムに組み込まれることもあり、または染色体外遺伝物質として（例えば、自己複製ベクターのプラスミドもしくは他の形態として）存在することもあり、および複数のコピーで存在することもある。加えて、「異種の」は、宿主細胞に導入された外因性核酸分子によってコードされている非生得的酵素、タンパク質または他の活性を、たとえ宿主細胞が同種タンパク質または活性をコードしていたとしても、指す。

10

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される用語「内因性」または「生得的」は、宿主細胞中に通常存在する遺伝子、タンパク質または活性を指す。さらに、親遺伝子、タンパク質または活性と比較して変異、過剰発現、シャッフル、重複または別様に变化している遺伝子、タンパク質または活性は、それでもやはり、その特定の宿主細胞に内因性または生得的であると見なされる。例えば、第1の遺伝子からの内因性制御配列（例えば、プロモーター、翻訳減衰配列）を使用して、第2の生得的遺伝子または核酸分子の発現を変化させるまたは調節することができ、その場合、第2の生得的遺伝子または核酸分子の発現または調節は、親細胞における通常の発現または調節とは異なる。

20

【 0 0 7 0 】

「免疫組織化学」（IHC）は、細胞および組織試料などの、組織学試料中の抗原の存在を、抗原に特異的な抗体を使用して検出するために使用される技術を意味する。細胞または組織試料は、被験体または生物学的供給源から得られる、いずれの組織または細胞であってもよい。「被験体」または「生物学的供給源」は、例えば、ヒトもしくは非ヒト動物、初代細胞、細胞培養物、または培養に適合させた細胞株であり得、これらには、染色体に組み込まれた核酸分子もしくはエピソーム組換え核酸分子もしくは異種核酸分子を含むし得る遺伝子操作された細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、不死化したもしくは不死化可能な細胞もしくは細胞株、分化したもしくは分化可能な細胞もしくは細胞株、形質転換細胞もしくは細胞株、または同様のものが含まれる。ある特定の実施形態では、生物学的試料は、ヒトからのものである。「ヒト患者」は、完全長ROR1などのROR1の発現もしくは過剰発現に関連する任意の疾患もしくは状態に罹患しているか、またはそのような疾患もしくは状態を発症するもしくは再発するリスクがある、ヒト被験体を意味する。

30

【 0 0 7 1 】

「免疫プロット」または「免疫プロットティング」（ウェスタンプロットとも呼ばれる）は、ゲル電気泳動を使用してタンパク質を分離し、分離されたタンパク質を、抗原に特異的な抗体またはその断片もしくはバリエーションで染色する、組織ホモジネートまたは抽出物の試料中の抗原（例えば、ROR1）の存在を検出するために使用される技術を意味する。

40

【 0 0 7 2 】

ROR1に特異的な結合タンパク質

ROR1タンパク質および/またはその一部分と一般に特異的に結合するROR1結合タンパク質などの結合タンパク質を提供する。結合タンパク質は、結合ドメインを含み、本明細書において一部の実施形態で開示する結合タンパク質は、完全長ROR1アイソフォーム中に存在するが短縮ROR1アイソフォーム中には存在しないROR1のC末端部分と結合するので、完全長ROR1を特異的に検出する。対照的に、ほとんどの市販およ

50

び公開抗ROR1抗体は、完全長ROR1(ROR1__v1)形態と短縮ROR1(ROR1__v2)形態の両方に存在する、ROR1のN末端部分に対するものである。したがって、本開示の免疫グロブリン結合ドメインおよび免疫グロブリン様タンパク質を使用して、高い程度の特異性で(例えば、内因性)完全長ROR1を発現する細胞および組織を同定することができる。

【0073】

さらに、本開示の免疫グロブリン結合ドメインおよびタンパク質は、例えばがん細胞により、内因性発現された完全長ROR1を検出することができる。加えて、本明細書で開示する免疫グロブリン様結合タンパク質は、ホルマリン固定されパラフィンに包埋された(FPE)組織試料などの組織学試料における完全長ROR1の内因性発現を検出するのに有用である。比較すると、市販および公開抗ROR1抗体は、組織学試料において内因性発現したROR1に一貫性なく結合するか、そのようなROR1を弱く検出するか、または一般には検出することができない。例えば、そのような市販の抗体は、ホルマリン固定されパラフィンに包埋された組織学的試料における内因性ROR1発現を検出ししない。したがって、本明細書で開示する免疫グロブリン結合ドメインおよびタンパク質は、公知の抗ROR1抗体と比較して、内因性発現したROR1を検出するのにより高い感度も(より大きい特異性に加えて)示す。

【0074】

本明細書で使用される「結合ドメイン」または「結合領域」は、標的(例えば、抗原、リガンド)を特異的に認識してその標的と結合する能力を有するタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドまたはペプチド(例えば、抗体、受容体)もしくはその一部分を指す。結合ドメインは、目的の生体分子または別の標的についての任意の天然に存在する、合成、半合成または組換えで産生された結合パートナーを含む。例示的結合ドメインとしては、免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域(例えば、ドメイン抗体、sFv、一本鎖Fv断片(scFv)、Fab、F(ab')₂)、受容体外部ドメイン、またはリガンドが挙げられる。免疫グロブリン可変ドメイン(例えば、scFv、Fab)は、本明細書では「免疫グロブリン結合ドメイン」と呼ばれる。特定の標的に特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための様々なアッセイが公知であり、そのようなアッセイには、ウェスタンブロット、ELISAおよびBiacore(登録商標)分析が含まれる。

【0075】

ある特定の実施形態では、結合ドメインは、より大きいポリペプチドまたはタンパク質の一部であり、「結合タンパク質」と呼ばれる。「免疫グロブリン結合タンパク質」または「免疫グロブリン様結合タンパク質」は、1つまたは複数の免疫グロブリン結合ドメインを含有するポリペプチドであって、様々な免疫グロブリン関連タンパク質足場または構造の任意の形態、例えば、抗体もしくはその抗原結合断片、scFv-Fc融合タンパク質、またはそのような免疫グロブリン結合ドメインもしくは他の結合ドメインのうちの2つもしくはそれより多くを含む融合タンパク質であり得る、ポリペプチドを指す。

【0076】

指定ドメインの「C末端」側に結合する結合ドメインまたはタンパク質は、指定ドメイン内に位置するまたは指定ドメインよりもタンパク質のC末端の近くに位置するエピトープと結合する、結合ドメインまたはタンパク質を指す。例えば、「ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側」への結合は、細胞内プロテインキナーゼドメイン内に位置するか、細胞内プロテインキナーゼドメインに隣接して(該ドメインの隣にもしくは約10~約15アミノ酸以内に)および該ドメインよりもROR1のC末端の近くに位置するか、またはROR1のC末端と細胞内プロテインキナーゼドメインの間に位置する、ROR1の部分との結合を指す。

【0077】

ある特定の態様では、本開示は、ROR1のC末端部分に特異的に結合する結合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、結合タンパク質は、ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側に特異的に結合する。特定の実施形態では、結合タンパク質

10

20

30

40

50

は、免疫グロブリン様結合タンパク質である。さらなる実施形態では、結合タンパク質は、抗体もしくはその抗原結合断片であるか、または抗体もしくはその抗原結合断片を含む。上述の実施形態のいずれにおいても、ROR1は、ヒトROR1であってもよい。例えば、一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、例えば、6D4またはその抗原結合断片、例えば、配列番号37および/または38に記載の配列を含むもの、あるいは1つもしくは複数のそのCDRを含む抗体、またはROR1もしくはROR1ペプチドとの結合についてそのような抗体と競合する抗体である。

【0078】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリン、受容体、または他の結合ドメインもしくは結合タンパク質と特異的に結合することができる、任意のアミノ酸配列またはタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、一般に、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基を含有し、特異的三次元構造特性はもちろん特異的電荷特性も有することができる。

【0079】

ある特定の実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質は、配列番号2、3、4、5、54または55に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%同一であるアミノ酸配列内に位置するエピトープと特異的に結合することができる。さらなる実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質は、配列番号2、3、54または55に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%同一であるアミノ酸配列内に位置するエピトープと特異的に結合することができる。さらなる実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質は、N-NPRYPNYMFP SQGITPQGQIAGFI GPPPIP-C(配列番号3)のアミノ酸配列内に位置するエピトープと特異的に結合する。

【0080】

ある特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、(i)配列番号3を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号3からなる、ペプチド、および/または(ii)ROR1タンパク質のエピトープに特異的に結合し、エピトープが、(a)配列番号3に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b)配列番号3に記載のアミノ酸配列内の1つもしくは複数のアミノ酸を含む。

【0081】

特異的実施形態では、本開示の結合タンパク質は、配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列内に位置するエピトープに結合する。

【0082】

結合ドメインの供給源としては、ヒト、齧歯類、鳥類、ウサギおよびヒツジを含む、様々な種からの抗体可変領域(抗体、sFv、scFv、Fabもしくは可溶性V_Hドメインまたはドメイン抗体としてフォーマットすることができるもの)が挙げられる。結合ドメインのさらなる供給源としては、他の種、例えば、ラクダ科動物(ラクダ、ヒトコブラクダもしくはラマからのもの; Ghahroudiら、FEBS Letters 414巻: 521頁、1997年; Vinckeら、J. Biol. Chem. 284巻: 3273頁、2009年; Hamers-Castermanら、Nature 363巻: 446頁、1993年およびNguyenら、J. Mol. Biol. 275巻: 413頁、1998年)、テンジクザメ(Rouxら、Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 95巻: 11804頁、1998年)、スポットテッドラットフィッシュ(Nguyenら、Immunogenetics 54巻: 39頁、2002年)、またはヤツメウナギ(Herrinら、Proc. Nat'l Acad. Sci

10

20

30

40

50

．(USA)105巻：2040頁、2008年、およびAlderら、Nature Immunol. 9巻：319頁、2008年)からの抗体の可変領域が挙げられる。これらの抗体は、重鎖可変領域のみを使用して抗原結合領域を形成することができるようであり、すなわち、これらの機能性抗体は、重鎖のみのホモ二量体である(「重鎖抗体」と呼ばれる)(Jespersら、Nature Biotechnol. 22巻：1161頁、2004年；Cortez-Retamozoら、Cancer Res. 64巻：2853頁、2004年；Baralら、Nature Med. 12巻：580頁、2006年；およびBarthelemyら、J. Biol. Chem. 283巻：3639頁、2008年)。

【0083】

抗体技術の当業者によって理解されている用語には、本明細書において明確に異なって定義されていない限り、各々、当技術分野で獲得された意味が与えられる。用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続されている少なくとも2本の重(H)鎖と2本の軽(L)鎖を含むインタクト抗体、ならびにインタクト抗体によって認識される抗原標的分子と結合する能力を有するまたは保持する、インタクト抗体の任意の抗原結合部分または断片、例えば、scFv、FabまたはFab' 2断片を指す。したがって、本明細書での用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含み、該ポリクローナルおよびモノクローナル抗体には、インタクト抗体およびそれらの機能性(抗原結合)抗体断片が含まれ、そのような抗体断片には、抗原結合断片(Fab)断片、F(ab')₂断片、Fab'断片、Fv断片、組換えIgG(rIgG)断片、一本鎖抗体断片(一本鎖可変断片(scFv)を含む)、およびシングルドメイン抗体(例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ)断片が含まれる。この用語は、免疫グロブリンの遺伝子操作された形態および/または別様に修飾された形態、例えば、イントラボディ(intrabody)、ペプチボディ(peptibody)、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、ならびにヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性、例えば二重特異性、抗体、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)およびテトラボディ(tetrabody)、タンデムジscFv、タンデムトリscFvを包含する。別段の記述がない限り、用語「抗体」は、その機能性抗体断片を包含すると解されたい。この用語は、任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む、インタクトまたは完全長抗体も包含し、そのようなクラスまたはサブクラスには、IgGならびにその

【0084】

モノクローナル抗体またはその抗原結合部分は、非ヒト、キメラ、ヒト化またはヒトのものであってもよい。免疫グロブリン構造および機能は、例えば、Harlowら編、Antibodies: A Laboratory Manual、14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988年)に総説されている。

【0085】

例えば、用語「V_L」および「V_H」は、抗体軽鎖および重鎖それぞれからの可変結合領域を指す。可変結合領域は、「相補性決定領域」(CDR)および「フレームワーク領域」(FR)として公知の、別個の明確に定義された部分領域(sub-region)で構成されている。用語「CL」は、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体軽鎖からの定常領域を指す。用語「CH」は、「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」を指し、この領域は、抗体アイソタイプに依存して、CH1、CH2およびCH3(IgA、IgD、IgG)、またはCH1、CH2、CH3およびCH4ドメイン(IgE、IgM)へとさらに分割可能である。「Fab」(抗原結合断片)は、抗原と結合する抗体の部分であり、可変領域と、鎖間ジスルフィド結合によって軽鎖に連結されている重鎖のCH1とを含む。

【0086】

「超可変領域」または「HVR」と同義の用語「相補性決定領域」および「CDR」が

10

20

30

40

50

、抗原特異性および/または結合親和性を付与する、抗体可変領域内のアミノ酸の非連続配列を指すことは、当技術分野において公知である。一般に、各重鎖可変領域に3つのCDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)があり、各軽鎖可変領域に3つのCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)がある。「フレームワーク領域」および「FR」が、重鎖および軽鎖の可変領域の非CDR部分を指すことは、当技術分野において公知である。一般に、各完全長重鎖可変領域に4つのFR(FR-H1、FR-H2、FR-H3およびFR-H4)があり、各完全長軽鎖可変領域に4つのFR(FR-L1、FR-L2、FR-L3およびFR-L4)がある。

【0087】

所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、いくつかの周知スキームのいずれかを使用して容易に決定することができ、そのようなスキームには、Kabataら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991年)によるもの(「Kabata」番号付けスキーム)、Al-Lazikaniら(J. Mol. Biol. 273巻: 927~948頁、1997年)によるもの(「Chothia」番号付けスキーム)、MacCallumら(J. Mol. Biol. 262巻: 732~745頁、1996年)によるもの(「Contact」番号付けスキーム)、Lefranc MPら(Dev. Comp. Immunol. 7巻: 55~77頁、2003年)によるもの(「IMGT」番号付けスキーム)、およびHonegger AおよびPlueckthun A(J. Mol. Biol. 309巻: 657~70頁、2001年)によるもの(「Aho」番号付けスキーム)が含まれる。

10

20

30

【0088】

所与のCDRまたはFRの境界は、同定に使用されるスキームによって変わり得る。例えば、Kabataスキームは、構造アラインメントに基づき、その一方でChothiaスキームは、構造情報に基づく。KabataスキームとChothiaスキームの両方の番号付けは、最も一般的な抗体領域配列長に基づくものであり、挿入には挿入文字、例えば「30a」によって対応し、一部の抗体には欠失が出現する。2つのスキームは、ある特定の挿入および欠失(「インデル」)を異なる位置に配置するため、結果として異なる番号付けになる。Contactスキームは、複雑な結晶構造の分析に基づくものであり、多くの点でChothia番号付けスキームと類似している。

30

40

【0089】

下の表1はKabata、ChothiaおよびContactスキームによってそれぞれ同定されるCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3およびCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の例示的位置境界を列挙するものである。CDR-H1については、Kabata番号付けスキームとChothia番号付けスキームの両方を使用する残基番号付けが列挙されている。FRは、CDR間に位置し、例えば、FR-L1は、CDR-L1とCDR-L2の間に位置する、など。示されているKabata番号付けスキームは、H35AおよびH35Bに挿入を配置するため、Chothia CDR-H1ループの末端は、示されているKabata番号付け規定を使用して番号付けしたとき、ループの長さに依存してH32とH34の間で変動することに注目される。

【表 1】

表 1.例示的 CDR 位置境界

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat 番号付け ¹⁾)	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 番号付け ²⁾)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101

10

20

1 - Kabat ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第 5 版、Public Health Service、National Institutes of Health, Bethesda, MD、1991 年。

2 - Al-Lazikani ら、*J. Mol. Biol.*、273 巻:927~948 頁、1997 年。

【0090】

したがって、別段の指定がない限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域、の「CDR」または「相補性決定領域」または個々の指定 CDR（例えば、CDR - H 1、CDR - H 2）は、上述のスキームのいずれかによって定義される、ある（または特異的）相補性決定領域を包含すると解されたい。例えば、特定の CDR（例えば、CDR - H 3）が、所与の V_H または V_L アミノ酸配列内の対応する CDR のアミノ酸配列を含有すると述べられている場合、そのような CDR は、上述のスキームのいずれかによって定義される可変領域内の対応する CDR（例えば、CDR - H 3）の配列を有すると解される。一部の実施形態では、指定 CDR 配列が指定される。同様に、別段の指定がない限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域、の FR または個々の指定 FR（例えば、FR - H 1、FR - H 2）は、公知スキームのいずれかによって定義される、ある（または特異的）フレームワーク領域を包含すると解されたい。一部の事例では、Kabat、Chothia または Contact 法によって定義される CDR などの、特定の CDR（単数または複数）または FR（単数または複数）の同定のためのスキームが指定される。他の場合、CDR または FR の特定のアミノ酸配列が与えられる。

30

40

【0091】

提供する抗体の中には、抗体断片もある。「抗体断片」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の部分を含む、インタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、抗体は、可変重鎖領域を含む一本鎖抗体断片、可変軽鎖領域を含む一本鎖抗体断片、または両方を含む一本鎖抗体断片、例えば scFv である。

50

【0092】

シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である。

【0093】

抗体断片は、例えば、インタクト抗体のタンパク質分解性消化、および組換え宿主細胞による産生などの、様々な技術によって作製することができる。一部の実施形態では、抗体は、組換えで産生された断片、例えば、合成リンカー、例えばペプチドリリンカー、によって連結された2つもしくはそれより多くの抗体領域または抗体鎖を有するものなどの、天然に存在しない配置 (arrangement) および/または天然に存在するインタクト抗体の酵素的消化によって産生することができない配置を含む断片である。一部の態様では、抗体断片は、scFvである。

10

【0094】

本明細書で使用される「Fc領域部分」は、1つまたは複数の定常ドメイン、例えば、CH2、CH3、CH4またはそれらの任意の組み合わせを含み得る、抗体からのFc断片の重鎖定常領域セグメント(「結晶性断片」領域またはFc領域)を指す。ある特定の実施形態では、Fc領域部分は、IgG、IgAもしくはIgD抗体のCH2およびCH3ドメインまたはそれらの任意の組み合わせ、あるいはIgMまたはIgE抗体のCH3およびCH4ドメインおよびそれらの任意の組み合わせを含む。他の実施形態では、CH2CH3またはCH3CH4構造は、同じ抗体アイソタイプからの部分領域ドメインを有し、ヒトのもの、例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgEまたはIgM(例えば、ヒトIgG1からのCH2CH3)である。バックグラウンドにより、Fc領域は、免疫グロブリンのエフェクター機能、例えば、ADCC(抗体依存性細胞介在性細胞傷害)、CDC(補体依存性細胞傷害)および補体結合、Fc受容体(例えば、CD16、CD32、FcRn)との結合、Fc領域を欠くポリペプチドと比べて長いin vivoでの半減期、プロテインA結合、ならびにおそらくさらには経胎盤移行に關与する(Caponら、Nature 337巻:525頁、1989年を参照されたい)。ある特定の実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質において見いだされるFc領域部分は、これらのエフェクター機能の1つまたは複数を媒介することができる、あるいはこれらの活性の1つもしくは複数またはすべてを、例えば当技術分野において公知の1つまたは複数の変異によって、欠くであろう。

20

30

【0095】

加えて、抗体は、Fab領域とFc領域の間に通常は位置するヒンジ配列を有する(しかし、ヒンジの下方セクションが、Fc領域のアミノ末端部分を含むこともある)。バックグラウンドにより、免疫グロブリンヒンジは、Fab部分が空間内を自由に移動できるように可撓性スペーサーとしての機能を果す。定常領域とは対照的に、ヒンジは、構造的に多様であり、免疫グロブリンクラス間およびさらにはサブクラス間で配列と長さの両方が異なる。例えば、ヒトIgG1ヒンジ領域は、自由に可撓性であり、これにより、Fab断片は、それらの対称軸の周りを回転し、2つの重鎖間ジスルフィド架橋の第1の架橋を中心とする球内に移動することが可能になる。比較すると、ヒトIgG2ヒンジは比較的短く、また4つの重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された堅いポリプロリン二重らせんを含有し、この二重らせんが可撓性を制限する。ヒトIgG3ヒンジは、その固有の伸長したヒンジ領域(IgG1ヒンジの約4倍の長さ)の点で他のサブクラスとは異なり、このヒンジ領域は、62個のアミノ酸(21個のプロリンおよび11個のシステインを含む)を含有し、非可撓性ポリプロリン二重らせんを形成するが、Fab断片がFc断片から比較的遠くに離れているので、より大きい可撓性をもたらす。ヒトIgG4ヒンジは、IgG1より短い、IgG2と同じ長さを有し、その可撓性は、IgG1とIgG2の間である。

40

【0096】

50

本明細書で使用される、ヒトIgG1重鎖の定常領域内のアミノ酸残基の位置は、別段の定めがない限り、Kabat番号付け規定に従ってヒトIgG1の可変領域が128のアミノ酸残基で構成されていると仮定して、番号付けされる。ヒトIgG1重鎖の番号付けされた定常領域は、その後、他の免疫グロブリン重鎖の定常領域内のアミノ酸残基に番号付けするための基準として使用される。ヒトIgG1重鎖以外の免疫グロブリン重鎖の定常領域内の目的のアミノ酸残基の位置は、目的のアミノ酸残基と整列する、ヒトIgG1重鎖内のアミノ酸残基の位置である。ヒトIgG1重鎖の定常領域と他の免疫グロブリン重鎖の定常領域間のアラインメントは、デフォルトパラメータを用いてClustal W法を使用するMegalignプログラム(DNA STAR Inc.)などの、当技術分野において公知のソフトウェアプログラムを使用して行うことができる。本明細書に記載の番号付けシステムによれば、例えば、ヒトIgG2 C_H2領域は、他のC_H2領域と比較してそのアミノ末端付近にアミノ酸欠失を有することもあるが、ヒトIgG2 C_H2における296に位置する「N」の位置は、この残基がヒトIgG1 C_H2における297位の「N」と整列するので、やはり297位と見なされる。

10

【0097】

一部の実施形態では、免疫グロブリン様結合タンパク質は、抗体またはその抗原結合断片である。例えば、結合タンパク質は抗体を含み、抗体は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。ある特定の実施形態では、免疫グロブリン様結合タンパク質は、モノクローナル抗体6D4またはその抗原結合断片である。

20

【0098】

ある特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質、例えば、抗体またはその結合断片は、配列番号6、7および8に記載の配列を含む重鎖またはその一部分を含有する。一部の実施形態では、重鎖またはその一部分は、配列番号21、25および29、ならびに/または22、26および29、ならびに/または23、27および29、ならびに/または24、28および30に記載のアミノ酸配列(例えば、CDR配列)を含む。一部の実施形態では、重鎖またはその一部分は、配列番号37またはそれと少なくとも90、95、96、97、98もしくは99%の同一性を有する配列を含み、および/あるいは配列番号12、13または14に記載の配列と少なくとも90、95、96、97、98もしくは99%の同一性または100%の同一性を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号8、29または30の配列、および配列番号11、35または36の配列を含む。ある特定の実施形態では、結合タンパク質、例えば、抗体またはその断片は、配列番号9、10および11に記載の配列を含む軽鎖またはその一部分を含有する。一部の実施形態では、軽鎖またはその一部分は、配列番号31、33および35、ならびに/または32、34および36に記載のアミノ酸配列(例えば、CDR配列)を含む。一部の実施形態では、軽鎖またはその一部分は、配列番号38を含むか、またはそれと少なくとも90、95、96、97、98もしくは99%の同一性を有する配列を含み、および/あるいは配列番号15または16に記載の配列と少なくとも90、95、96、97、98もしくは99%の同一性または100%の同一性を含む。一部の実施形態では、重鎖またはその一部分は、V_Hであるか、またはV_Hを含み、一部の実施形態では、軽鎖またはその一部分は、V_Lであるか、またはV_Lを含む。

30

40

【0099】

ある特定の実施形態では、結合タンパク質は、(a)配列番号6または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号6のバリエーションに記載の重鎖CDR1アミノ酸配列；(b)配列番号7または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号7のバリエーションで示される重鎖CDR2アミノ酸配列；および(c)配列番号8または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号8のバリエーションで示される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質は、(a)配列番号9または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号9のバリエーションで示される軽鎖CDR1アミノ酸配列；(b)配列番号10または1つもしくは2つのアミノ酸置換を有する配列番号10のバリエーションで示される軽鎖CDR2アミノ酸配列；および(c)

50

配列番号 1 1 または 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換を有する配列番号 1 1 のバリエーションで示される軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 5 または 1 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L)、および配列番号 1 2、1 3 または 1 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。上述の実施形態のいずれにおいても、免疫グロブリン様結合タンパク質は、抗体またはその抗原結合断片、例えば、モノクローナル抗体もしくは操作されたモノクローナル抗体またはその結合断片である。

【 0 1 0 0 】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示する結合タンパク質は、(i) 配列番号 1 2、1 3 もしくは 1 4 に記載の重鎖可変ドメイン (V_H) 内の C D R 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3；および / または (i i) 配列番号 1 5 もしくは 1 6 に記載の軽鎖可変ドメイン (V_L) 内の C D R 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む。さらなる実施形態では、重鎖 C D R 3 は、配列番号 2 9 もしくは配列番号 3 0 に記載の配列を含み、および / または軽鎖 C D R 3 は、配列番号 3 5 もしくは配列番号 3 6 に記載の配列を含む。そのような実施形態では、結合タンパク質は、配列番号 1 2、1 3 もしくは 1 4 に記載の重鎖可変ドメイン (V_H) 内の、C D R 1 および / もしくは C D R 2 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、重鎖 C D R 1 および / もしくは重鎖 C D R 2；ならびに / または (i i) 配列番号 1 5 もしくは 1 6 に記載の軽鎖可変ドメイン (V_L) 内の C D R 3 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、軽鎖 C D R 1 および / もしくは軽鎖 C D R 2 を、さらに含み得る。特定の実施形態では、重鎖 C D R 1 は、配列番号 2 1、2 2、2 3 もしくは 2 4 に記載の配列を含み、および / または重鎖 C D R 2 は、配列番号 2 5、2 6、2 7 もしくは 2 8 に記載の配列を含むか；および / または軽鎖 C D R 1 は、配列番号 3 1 もしくは 3 2 に記載の配列を含み、軽鎖 C D R 2 は、配列番号 3 3 もしくは 3 4 に記載の配列を含む。

【 0 1 0 1 】

ある特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、配列番号 1 5 または 1 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L)、および配列番号 1 2、1 3 または 1 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である重鎖可変ドメイン (V_H) を含むか、ならびに / または結合タンパク質は、配列番号 3 7 を含む V_H、および / または配列番号 3 8 を含む V_L を含む。

【 0 1 0 2 】

ある特定の他の実施形態では、結合タンパク質は、抗体の抗原結合断片、例えば、s c F v (短いペプチドリンカーによって接続されている、重鎖可変ドメイン (V_H) と軽鎖可変ドメイン (V_L)) を含む。例えば、本開示の免疫グロブリン様結合タンパク質は、配列番号 1 5 または 1 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L) を有する s c F v を含むか、あるいは配列番号 3 8 の配列と、配列番号 1 2、1 3 または 1 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である重鎖可変ドメイン (V_H) とを含むか、あるいは配列番号 3 7 の配列、またはそれと少なくとも 9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含む。ある特定の実施形態では、s c F v は、配列番号 1 2、1 3 または 1 4 に記載のアミノ酸配列を有する V_H を含むか、あるいは配列番号 3 7 の配列、またはそれと少なくとも 9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % の同一性を有する配列と、配列番号 1 5 または 1 6 に記載のアミノ酸配列を有する V_L とを含むか、あるいは配列番号 3 8、またはそれと少なくとも 9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含む。特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、モノクローナル抗体 6 D 4 またはその結合断片の可変ドメイン V_L および V_H を有する s c F v を含む。

【 0 1 0 3 】

さらに他の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、配列番号 1 5 または 1 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である軽鎖可変ドメイン (V_L)、および配列番号 1 2、1 3 または 1 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である重鎖可変ド

10

20

30

40

50

メイン (V_H) を含む抗体またはその断片を含み、抗体は、任意選択で、(i) 配列番号 3 を含むペプチドであって、前記ペプチドが、任意選択で配列番号 3 からなる、ペプチド、および/または(ii) ROR1 タンパク質のエピトープに特異的に結合し、エピトープが、(a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列内にあるか、および/または(b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列内の 1 つもしくは複数のアミノ酸を含む。

【0104】

なおさらなる実施形態では、本開示の結合タンパク質は、ROR2 に結合しない。

【0105】

本明細書で使用される「特異的に結合する」または「に特異的な」は、一部の実施形態では、結合タンパク質(例えば、抗ROR1抗体)または結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)が、試料中の任意の他の分子または成分と有意に会合または結合しないが、標的分子と $10^5 M^{-1}$ に等しいまたはそれより高い親和性または K_d (すなわち、 $1/M$ の単位を有する特定の結合相互作用の平衡会合定数) (この会合反応についての結合速度 [k_{on}] の解離速度 [k_{off}] に対する比に相当する) で会合または結合することを指す。結合ドメイン(またはそれらの融合タンパク質)は、「高親和性」結合ドメイン(またはそれらの融合タンパク質)および「低親和性」結合ドメイン(またはそれらの融合タンパク質)として分類することができる。「高親和性」結合ドメインは、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、または少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、好ましくは、少なくとも $10^8 M^{-1}$ または少なくとも $10^9 M^{-1}$ の K_d を有する結合ドメインを指す。「低親和性」結合ドメインは、最大 $10^8 M^{-1}$ 、最大 $10^7 M^{-1}$ 、最大 $10^6 M^{-1}$ 、最大 $10^5 M^{-1}$ の K_d を有する結合ドメインを指す。あるいは、 M の単位を有する特定の結合相互作用の平衡解離定数 (K_d) (例えば、 $10^{-5} M \sim 10^{-13} M$) として親和性を定義することができる。

【0106】

特定の標的に特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するためのおよび結合ドメインまたは融合タンパク質親和性を決定するための様々なアッセイ、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、分析用超遠心分離、分光法および表面プラズモン共鳴(Biacore(登録商標))分析は、公知である(例えば、Scatchardら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 51巻: 660頁、1949年; Wilson、Science 295巻: 2103頁、2002年; Wolffら、Cancer Res. 53巻: 2560頁、1993年; および米国特許第5,283,173号、5,468,614号または等価物を参照されたい)。

【0107】

ある特定の実施形態では、上述の結合タンパク質のいずれも、ヒトROR1などのROR1と高親和性で結合する。例えば、ヒトROR1への高い親和性を有する免疫グロブリン様結合タンパク質は、 1×10^{-7} またはそれ未満の K_d で結合する。

【0108】

上述の実施形態のいずれにおいても、結合タンパク質は、ヒトROR1と結合することができ、一部の態様では、マウスROR1などの別の種のROR1と結合しないか、または特異的に結合せず、および/またはアカゲザルなどのさらに別の種のROR1と結合する。

【0109】

なおさらなる実施形態では、本開示は、ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側に位置するROR1エピトープとの特異的結合について基準結合タンパク質(例えば、免疫グロブリン様結合タンパク質、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合結合タンパク質)と競合する、結合タンパク質(例えば、免疫グロブリン様結合タンパク質、抗体もしくはその抗原結合断片、または融合結合タンパク質)を提供する。用語「競合する」は、同じエピトープについて競合する免疫グロブリン様結合タンパク質または抗体もしくはその結合断片の文脈で使用される場合、試験されている免疫グロブリン結合タ

10

20

30

40

50

ンパク質または抗体もしくはその結合断片が、基準免疫グロブリン様結合タンパク質または抗体もしくはその結合断片とROR1エピトープの特異的結合を防止または阻害する、アッセイによって決定される免疫グロブリン様結合タンパク質間の競合を意味する。例えば、抗体6D4またはその結合断片によって認識される同じエピトープまたは重複するエピトープに結合する試験抗体は、エピトープを含有する標的タンパク質(ROR1)またはその断片との結合について競合することができるであろう。競合結合アッセイは、当技術分野において公知であり、ラジオイムノアッセイ(RIA)、競合的酵素免疫測定法(EIA)およびサンドイッチ競合アッセイを含む。一部の実施形態では、本開示の結合タンパク質と本明細書で開示する基準タンパク質とは、ROR1との結合および/または配列番号3のペプチドとの結合について競合する、および/またはROR1の同じもしくは重複するエピトープと結合する。一部の実施形態では、基準結合タンパク質は、配列番号6に記載の重鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号7に記載の重鎖CDR2アミノ酸配列、配列番号8に記載の重鎖CDR3アミノ酸配列、配列番号9に記載の軽鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号10に記載の軽鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号11に記載の軽鎖CDR3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、免疫グロブリン様結合タンパク質は、ROR1の細胞内プロテインキナーゼドメインのC末端側に位置するROR1エピトープとの特異的結合について基準免疫グロブリン結合タンパク質と競合し、基準結合タンパク質は、配列番号15または16に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である軽鎖可変ドメイン(V_L)、および配列番号12、13または14に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。一部の実施形態では、基準結合タンパク質は、配列番号15、16または38に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%同一である軽鎖可変ドメイン(V_L)、および配列番号12、13、14または37に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%同一である重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。特定の実施形態では、基準結合タンパク質は、モノクローナル抗体6D4またはその抗原結合断片を含む。

【0110】

より多くの実施形態では、結合タンパク質、基準結合タンパク質または両方は、各々個々に、抗体またはその抗原結合断片である。例えば、結合タンパク質、基準結合タンパク質または両方は、モノクローナル抗体であってもよい、抗体を含み得る。特定の実施形態では、例えば、基準結合タンパク質は、モノクローナル抗体6D4である。一部の実施形態では、結合タンパク質、基準結合タンパク質または両方は、各々個々に、キメラまたはヒト化抗体を含み得る。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質、基準結合タンパク質または両方は、抗体の抗原結合断片を含み、抗原結合断片は、scFvである。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質、基準結合タンパク質または両方は、抗原が哺乳動物またはヒトROR1などのROR1である、抗原結合ドメイン(例えば、モノクローナル抗体6D4からのscFv)を含む融合タンパク質である。ある特定の実施形態では、融合タンパク質の抗原結合ドメインは、抗体の抗原結合断片である。例えば、融合タンパク質は、抗体の抗原結合断片を含み得、抗原結合断片は、哺乳動物またはヒトROR1などのROR1に特異的なscFvである。

【0111】

一部の実施形態では、本明細書で開示する結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質は、マーカー、例えば、酵素、色素、蛍光標識、DNAバーコード(例えば、5ヌクレオチド長から最大75ヌクレオチド長までの範囲のもの)、またはタグをさらに含む。本明細書で使用される「ペプチドタグ」または「タンパク質タグ」は、目的のタンパク質に取り付けられているか、融合しているか、またはその一部であり、異種または非

内因性同族結合分子が特異的に結合する、固有のペプチド配列であって、特に、タグの付いているペプチドもしくはタンパク質が、タンパク質もしくは他の材料の不均質な集団の一部である場合、またはタグの付いているペプチドまたはタンパク質を発現する細胞が、細胞の不均質な集団（例えば、生物学的試料）の一部である場合、その結合特性を使用して、タグの付いているペプチドもしくはタンパク質、またはタグの付いているペプチドもしくはタンパク質を発現する細胞を検出、同定、単離もしくは精製、追跡、濃縮または標的化することができる、固有のペプチド配列を指す。

【0112】

ある特定の実施形態では、マーカーは、蛍光標識、例えば、シアニン色素、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセイン、もしくはそのスルホン化誘導体、または蛍光タンパク質を含む。あるいは、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質は、発色性受容体酵素、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP）を含むことができる。他の実施形態では、マーカーは、タグ分子であり得る。一部の実施形態では、マーカーは、*in vitro* イメージングに使用されるタグであり得る。さらなる実施形態では、マーカーは、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を単離するために使用されるタグであり得る。なおさらなる実施形態では、マーカーは、例えば、Mycタグ、HisタグまたはStreptタグ（登録商標）などの、ペプチドタグまたはタンパク質タグである。

10

【0113】

上述の実施形態のいずれにおいても、結合タンパク質は、(a) 生物学的試料の細胞中に内因的に存在するタンパク質、ROR1および/またはエピトープと特異的に結合することができる、試料は、ホルマリン固定もしくは凍結された組織切片および/または透過処理された細胞を任意選択で含むか、および/または任意選択で被験体の腫瘍に由来するものである。一部の実施形態では、試料は、血液悪性疾患および固形腫瘍からなる群より選択される腫瘍組織に由来する。特定の実施形態では、試料は、(a) CLLまたはMCLに由来するか、あるいは(b) 卵巣がん、任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌および非定型カルチノイドの中から選択される肺がん、または任意選択でトリプルネガティブ乳がんである乳がん由来する。さらに他の実施形態では、試料は、骨髄、脂肪組織、副甲状腺、食道および膵臓からなる群より選択される、正常組織に由来する。

20

【0114】

上述の実施形態のいずれにおいても、結合タンパク質は、任意選択で、完全長ROR1と特異的に結合する。

30

【0115】

上述の実施形態のいずれにおいても、結合タンパク質は、ROR1の内因性発現を、基準抗体が前記内因性発現を検出しない条件下で検出ことができ、基準抗体は、任意選択で、ポリクローナルROR1抗体、ROR1のN末端部分を認識するROR1抗体、ab135669、抗ヒトROR1ヤギポリクローナル抗体、抗ヒトROR1ウサギポリクローナル抗体、抗ROR1 4A5、および抗ヒトROR1 2A2からなる群より選択される。

40

【0116】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質または抗体もしくはその結合断片と薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを含む組成物を提供する。診断および治療上の使用のための薬学的に許容される担体は、薬学技術分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro (編集)、第18版、1990年)に、およびCRC Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients、CRC Press LLC (S. C. Smolinski編、1992年)に記載されている。例示的な薬学的に許容される担体には、任意のアジュバント、担体、賦形剤、流動促進剤 (glidant)、希釈剤、保存薬、色素/着色剤、界面活性剤、湿潤剤

50

、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶媒、乳化剤、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、生理的 pH の滅菌食塩水およびリン酸緩衝食塩水は、好適な薬学的に許容される担体であり得る。保存薬、安定剤、色素または同種のものが、医薬組成物に提供されることもある。加えて、抗酸化剤および懸濁剤が使用されることもある。医薬組成物は、希釈剤、例えば水、緩衝液、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、低分子量ポリペプチド（約 10 残基未満）、タンパク質、アミノ酸、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、デキストリン）、キレート剤（例えば、EDTA）、グルタチオン、ならびに他の安定剤および賦形剤も、含有することがある。中性緩衝食塩水、または非特異的血清アルブミンと混合された食塩水は、例示的な希釈剤である。

【0117】

抗 ROR1 結合タンパク質の使用

別の態様では、本開示は、完全長 ROR1 を発現する細胞を同定する方法を提供する。一部の実施形態では、細胞表面で ROR1 を発現する細胞、および / または ROR1 を発現する細胞を同定する方法は、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と細胞を接触させるステップ、および結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と細胞の特異的結合を検出することによって、完全長 ROR1 を発現する細胞を同定するステップを含む。ある特定の実施形態では、検出されることになる完全長 ROR1 は、細胞によって通常発現されるまたは内因性発現される ROR1 である。さらなる実施形態では、接触させることになる細胞は、内因性または異種 ROR1 を過剰発現するように遺伝子改変されたものである。ある特定の実施形態では、細胞は、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されている。他の実施形態では、細胞は、凍結され、最適切断温度化合物 (Optimal Cutting Temperature compound) (OCT) に包埋されている。例えば、そのような調製された細胞または組織は、細胞中の完全長 ROR1 の存在について免疫組織化学により探索される。さらに他の実施形態では、細胞中の完全長 ROR1 の存在は、細胞から得られる溶解物を探索することにより行われる免疫プロットによって検出される。

【0118】

さらに別の態様では、(a) 生物学的試料を本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と接触させるステップ、および (b) 結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と試料中のペプチドもしくはエピトープとの特異的結合またはその欠如を検出するステップを含み、それによって、試料中の ROR1 または ROR1 エピトープの存在または非存在を検出する、検出方法を提供する。一部の実施形態では、検出方法は、(b) で検出された特異的結合のレベルを基準レベルと比較するステップをさらに含み、基準レベルと比較した結合レベルの増加は、試料中の ROR1 または ROR1 エピトープの存在を示す。特定の実施形態では、試料は、被験体から得られる。さらなる実施形態では、試料は、組織切片および / または細胞を含む。ある特定の実施形態では、試料は、ホルマリン固定もしくは凍結された組織切片および / または透過処理された細胞を含むか、および / または試料は、血液悪性疾患および固形腫瘍からなる群より選択される腫瘍に由来し、および / または正常組織に由来する。例えば、特定の実施形態では、試料は、(a) CLL または MCL に由来するか、あるいは (b) 卵巣がん、任意選択で肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌および非定型カルチノイドの中から選択される肺がん、または任意選択でトリプルネガティブ乳がんである乳がん由来するか、あるいは (c) 骨髄、脂肪組織、副甲状腺、食道および膵臓からなる群より選択される正常組織に由来する。一部の実施形態では、試料は、ホルマリン固定されパラフィンに包埋されている細胞を含み、または細胞は、凍結され、最適切断温度化合物 (OCT) に包埋される。一部の実施形態では、細胞中の完全長 ROR1 の存在は、免疫組織化学または免疫プロットングにより検出される。

【0119】

さらに別の態様では、本開示は、組織試料中の ROR1 の存在を同定する方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、組織試料を本明細書に記載の結合タンパク質または免

10

20

30

40

50

疫グロブリン様結合タンパク質と接触させるステップ、および組織との特異的結合を検出することによって、ROR1を発現する組織を同定するステップを含み、ROR1は、任意選択で完全長および/または細胞表面ROR1である。ある特定の実施形態では、組織試料は、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されている。他の実施形態では、組織試料は、凍結され、最適切断温度化合物(OCCT)に包埋されている。さらなる実施形態では、組織試料中の完全長ROR1の存在は、免疫組織化学により検出される。なおさらなる実施形態では、組織試料中の完全長ROR1の存在は、細胞溶解物を探索することにより行われる免疫プロットによって検出される。

【0120】

一部の実施形態では、細胞または組織試料中の完全長ROR1の量を定量する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、細胞または組織を本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と細胞の特異的結合を定量することによって、細胞または組織の完全長ROR1の量を定量するステップを含む。一部の実施形態では、細胞によって発現される完全長ROR1は、通常は内因性発現されるROR1である。他の実施形態では、細胞は、ROR1を過剰発現するように遺伝子操作されたものである。さらなる実施形態では、細胞または組織試料は、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されている。他の実施形態では、細胞または組織試料は、凍結され、最適切断温度化合物(OCCT)に包埋されている。なおさらなる実施形態では、細胞または組織試料中の完全長ROR1の量は、免疫組織化学により検出される。さらに他の実施形態では、細胞中の完全長ROR1の量は、細胞溶解物を探索することにより行われる免疫プロットによって検出される。

【0121】

本開示のさらに別の態様には、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある、被験体を同定する方法がある。本開示の特定の実施形態では、被験体または生物学的供給源は、悪性の疾患、障害もしくは状態を含む、疾患、障害もしくは状態を有することが疑われるものであってもよく、または有するリスクがあるものであってもよい。本明細書で使用される「リスク」は、指定された疾患または状態を発症する被験体の尤度(確率)である。リスクは、被験体が、ある期間(例えば、1、2、3、4または5年)以内に疾患を発症する尤度の表現である。「高リスク」は、被験体が指定された疾患または状態を発症する可能性が50%より高いことを示す。反対に、「低リスク」は、被験体が指定された疾患または状態を発症する可能性が50%未満であることを示す。一部の実施形態では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある、被験体を同定する方法は、被験体からの組織試料を本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と接触させるステップ、およびそれによって、ROR1または完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有する、または有するリスクがある、被験体を同定するステップを含む。

【0122】

例えば、被験体は、被験体から採取した細胞または組織の試験試料が、検出可能なレベルの完全長ROR1または対象試料と比較して増加したレベルの完全長ROR1を有した場合、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有すると、または有するリスクがあると、同定され得る。ある特定の事例では、被験体は、完全長ROR1が試験試料中に存在するが、対照中に存在しないか、または対照では検出不能である場合、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有すると、または有するリスクがあると同定され得る。さらなる例では、試験レベルと対照レベルとの差は、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約5.5倍、約6倍、約6.5倍、約7倍、約7.5倍、約8倍、約8.5倍、約9倍、約9.5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、またはそれより高い倍数であり得る。生物学的試料は、試験される場合、または「対照」と比較される場合、「試験試料」と呼ばれる。本明細書で使用される「対照」

10

20

30

40

50

は、同じ患者および同じ組織からの非罹病試料；目的の疾患を有さない、もしくは有することが疑われる、被験体からの試料；目的の疾患を有さない、もしくは有することが疑われる、様々な被験体からの試料のプール（例えば、2～約100,000の被験体からの試料を含む）；または目的の疾患を有さない、もしくは有することが疑われる、1または複数の被験体からのデータ（例えば、1～約5,000～約10,000～約100,000～約1,000,000もしくはそれより多くの被験体からのバイオマーカーレベルに関する情報を含むデータベース）を指す。ある特定の実施形態では、「試験試料」は、分析され、結果（すなわち、ROR1の発現）は、複数の分析した非罹病または正常試料に由来するデータを有するデータベースから算出された平均のまたはある特定の同定されたベースラインレベルを含む「対照」と比較される。

10

【0123】

一部の実施形態では、標的分子の標準または公知ベースラインレベル（例えば、「正常」レベル）の尺度を提供する「基準」または「標準」を任意選択でアッセイに含めてもよい。ある特定の実施形態では、基準試料は、健常個体（すなわち、目的の疾患を有さない個体または有することが疑われる個体）からの試料のプール（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くの試料を合わせたもの）である。ある特定の事例では、「試験試料」および「対照試料」は、基準試料とともにアッセイで調査されることになる。これらの事例では、「試験」および「対照」試料は、基準試料と比較されることになるので、まとめて「標的試料」と呼ばれることもある。

20

【0124】

ある特定の実施形態では、被験体は、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患を有することが疑われることもあり、または有するリスクがあることもあり、本開示のある特定の他の実施形態では、被験体にそのような疾患のリスクまたは存在がないことが分かっていることもある。一部の実施形態では、被験体は、年齢、性別、食事、民族性、家族歴またはそれらの組み合わせなどの、特異的特徴によって識別される亜集団に属するため、リスクを有することまたはリスクがあることが疑われる。一部の実施形態では、被験体は、遺伝子の変異または遺伝性疾患を有する場合、リスクがあることが疑われる。一部の実施形態では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する疾患は、過剰増殖性疾患または状態である。例えば、ある特定の実施形態では、過剰増殖性疾患または状態は、腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、血液腫瘍、例えば、CLLまたはMCLであり得る。さらなる実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍、例えば、乳がん、肺がん、卵巣がんまたは膵がん腫瘍であり得る。例えば、一部の実施形態では、がんは、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、または非定型カルチノイドである。ある特定の実施形態では、肺がんは、肺腺癌である。ある特定の他の実施形態では、乳がんは、トリプルネガティブ乳がんである。一部の実施形態では、腫瘍は、原発性腫瘍、転移性腫瘍、または両方を含む。

30

【0125】

結合タンパク質の特異的結合を検出するステップを含む上述の方法のいずれにおいても、方法は、ROR1またはエピトープを発現させる方法によって決定して、組織の表面積の、または組織中の細胞の、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%において特異的結合が検出された場合、被験体または試料を、抗ROR1療法（例えば、養子細胞療法などの免疫療法）による処置の候補として同定するステップをさらに含む。

40

【0126】

結合タンパク質の特異的結合を検出するステップを含む上述の方法において、方法は、方法によって決定して、試料が由来する組織が、ROR1またはそのエピトープを均一にまたは均質に発現すると判明した場合、被験体または試料を抗ROR1療法（例えば、養子細胞療法などの免疫療法）での処置の候補として同定するステップをさらに含む。

【0127】

本開示のさらに他の態様では、過剰増殖性疾患または状態を有する被験体が、ROR1特異的処置から恩恵を受けることになるかどうかを同定するための方法であって、被験体

50

からの組織試料を本明細書に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出することによって、ROR1特異的処置から恩恵を受けることになる被験体を同定するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、ROR1特異的処置は、免疫療法、例えば、Hudecekら(Blood 116巻: 4532~41頁、2010年)に記載のROR1 CARなどのROR1 CARを発現するT細胞を投与することを含むT細胞療法である。例示的なROR1 CARは、ROR1の細胞外部分を標的とし、したがって、完全長ROR1アイソフォームを標的とするが、細胞内アイソフォームを標的としない。したがって、一部の実施形態では、ROR1 CAR T細胞療法から恩恵を受けることになる被験体を同定する方法であって、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と組織の特異的結合によって示されるような完全長ROR1の発現により、被験体が治療から恩恵を受けることができると同定される、方法を提供する。ある特定の実施形態では、処置は、免疫療法であり、免疫療法は、任意選択で養子細胞療法であり、任意選択で抗ROR1抗体を含むキメラ抗原受容体を含み、抗ROR1抗体は、任意選択で、R12と称する抗体であるか、またはR12と称する抗体と結合について競合する。抗体R12は、Yangら(PLoS ONE 6巻: e21018、2011年)およびHudecekら(Clin. Cancer Res. 19巻: 3153頁、2013年)に開示されており、同書に開示されている抗体およびその抗原結合断片は、参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、被験体は、ROR1またはそのエピトープを発現させる方法によって決定して、組織の表面積の、または組織中の細胞の、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%において、または少なくとも60%~少なくとも85%、もしくは少なくとも50%~少なくとも90%の範囲において、特異的結合が検出された場合、ROR1特異的処置から恩恵を受けることになる被験体として同定される。一部の実施形態では、被験体は、ROR1またはそのエピトープを均一にまたは均質に発現する、試料が由来する組織が、方法により決定された場合、ROR1特異的処置からの恩恵を受けることになる被験体として同定される。特定の実施形態では、ROR1特異的処置は、養子細胞療法などの免疫療法である。上述の実施形態のいずれにおいても、ROR1特異的処置は、抗ROR1結合タンパク質または抗体、例えば、R12と称する抗体である抗体、またはR12抗体と結合について競合する結合タンパク質もしくは抗体である抗体を含む、キメラ抗原受容体を含む。

【0128】

本発明のさらに多くの態様では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する過剰増殖性疾患または状態を有する被験体の予後を決定するための方法であって、被験体からの組織試料を本明細書に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質と組織の特異的結合を検出するステップを含み、組織における完全長ROR1との特異的結合を検出するステップによって被験体がROR1特異的処置の非存在下で予後不良であると同定される、方法を提供する。本明細書で使用される「予後」は、特異的疾患、障害または状態に罹患している被験体についての臨床転帰(clinical outcome)の尤度である。がんに関して、予後は、被験体が(例えば、1、2、3、4もしくは5年間)生存する尤度(確率)、または腫瘍が転移する尤度の表現である。「予後不良」は、被験体が指定された時点(例えば、1、2、3、4もしくは5年)まで生存しない可能性が50%より高いこと、または腫瘍が転移する可能性が50%より高いことを示す。反対に、「予後良好」は、被験体が指定された時点(例えば、1、2、3、4もしくは5年)まで生存する可能性が50%より高いこと、または腫瘍が転移しない可能性が50%より高いことを示す。

【0129】

一部の実施形態では、結合タンパク質と組織の特異的結合によって示される、完全長ROR1を検出するステップによって、被験体は、腫瘍、腫瘍転移、または両方を有すると同定される。一部の実施形態では、完全長ROR1を発現する細胞に関連する過剰増殖性

疾患または状態を有する被験体の予後を決定するための方法は、被験体からの組織試料を本明細書に記載の結合タンパク質と接触させるステップ、および結合タンパク質の組織との特異的結合を検出するステップを含み、組織における完全長 R O R 1 を検出することによって被験体は R O R 1 特異的処置の非存在下で予後不良であると同定される。これらの実施形態のいずれにおいても、組織試料は、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されているか、または組織試料は、凍結され、O C T に包埋されている。ある特定の実施形態では、組織試料中の完全長 R O R 1 の存在は、免疫組織化学または免疫プロットングにより検出される。

【 0 1 3 0 】

結合タンパク質の特異的結合を検出するステップを含む上述の実施形態のいずれにおいても、方法は、免疫療法などの抗 R O R 1 療法で被験体を処置するステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、免疫療法は、養子細胞療法を含む。これらの実施形態のいずれにおいても、抗 R O R 1 療法は、R O R 1 に特異的なキメラ抗原受容体を含み、R O R 1 に特異的なキメラ抗原受容体は、抗 R O R 1 抗体結合タンパク質または結合ドメインを含む。ある特定の実施形態では、R O R 1 に特異的なキメラ抗原受容体は、R 1 2 と称する抗体からの結合ドメインを含むか、または R 1 2 抗体と結合について競合する結合ドメインを含む。

【 0 1 3 1 】

ある特定の実施形態では、ヒト被験体における療法の有効性を評価する方法であって、療法を投与し、療法の有効性を決定することによる方法を本明細書で提供する。「有効性」は、療法が、腫瘍のサイズまたは数などの疾病負荷をいかによく処置または低減させるかの尺度である。検出可能な R O R 1 の低減は、疾病負荷の低減および良好な有効性の指標である。検出可能な R O R 1 レベルに変化がないこと、または検出可能な R O R 1 レベルの低下した速度は、療法が、腫瘍抑制性 (t u m o r o s t a t i c) であることの指標であり得る。検出可能な R O R 1 レベルにおける増加の統計的に有意な速度に対して効果がないことは、不良な有効性、最小の有効性、または有効性欠如の指標である。ある特定の実施形態では、有効性は、生存期間と相関関係があり得る。例えば、対照と比較して統計的に有意に患者の生存期間を増加させる療法は、より高い有効性と相関している。反対に、対照と比較して統計的に有意に生存期間を増加させない療法は、不良な有効性、最小の有効性、または有効性なしと相関している。

【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、療法の有効性は、対照とまたは以前に測定されたレベルと比較した細胞または組織試料における完全長 R O R 1 の発現の測定により評価される。一部の実施形態では、細胞または組織試料は、ホルマリン固定されパラフィンに包埋されているか、または細胞は凍結され、最適切断温度化合物 (O C T) に包埋されている。試料中の完全長 R O R 1 のレベルは、完全長 R O R 1 と特異的に結合する結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質の量を検出することにより測定される。一部の実施形態では、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と細胞または組織の特異的結合は、免疫組織化学または免疫プロットングにより検出される。方法の一部の態様では、評価されることになる療法は、外科手術、化学療法、細胞障害性療法、免疫介在療法、標的化療法、放射線療法、もしくは放射線化学療法、またはそれらの任意の組み合わせである。一部の実施形態では、療法により過剰増殖性障害または状態、例えばがんが処置される。一部の実施形態では、療法は、H u d e c e k ら (B l o o d 1 1 6 巻 : 4 5 3 2 ~ 4 1 頁、2 0 1 0 年) に記載の R O R 1 C A R などの R O R 1 C A R を発現する T 細胞を投与することを含む T 細胞療法などの、免疫療法である。

【 0 1 3 3 】

さらなる態様では、本開示は、疾患または状態を有する被験体に抗 R O R 1 療法を投与するステップを含む処置の方法であって、被験体における疾患または状態の組織または試料が、表面で発現される R O R 1 の均一または均質な発現を有すると同定されている、方法を提供する。ある特定の実施形態では、疾患または状態は、腫瘍、例えば、固形腫瘍ま

10

20

30

40

50

たは血液腫瘍である（例えば、腫瘍は、CLL、MCL、乳がん、肺がん、卵巣がんもしくは膵がん腫瘍であるか、または腫瘍は、肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイド、もしくはトリプルネガティブ乳がんである）。ある特定の実施形態では、処置方法は、肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイドおよびトリプルネガティブ乳がんの中から選択される疾患または状態を有する被験体に投与するステップを含む。特定の実施形態では、抗ROR1療法は、免疫療法、例えば養子細胞療法、またはR12と称する抗体（Yangら、PLoS One 6巻：e21018、2011年、およびHudecekら、Clin. Cancer Res. 19巻：3153頁、2013年を参照されたく、同書に記載の抗体およびその抗原結合断片は参照により本明細書に組み入れられる）などの抗ROR1抗体断片を含むキメラ抗原受容体を発現する細胞を含む。

10

【0134】

一部の実施形態では、疾患または状態を有する被験体に抗ROR1療法を投与するステップを含む処置の方法であって、被験体における疾患または状態の組織または試料が、表面で発現されるROR1の均一または均質な発現を有すると同定されている、方法を提供する。ある特定の実施形態では、疾患または状態は、腫瘍であり、任意選択で固形腫瘍または血液腫瘍である。一部のさらなる実施形態では、腫瘍は、CLL、MCL、乳がん、肺がん、卵巣がん、および膵がんからなる群より選択される。特定の実施形態では、腫瘍は、肺腺癌、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、非定型カルチノイド、またはトリプルネガティブ乳がんである。一部の実施形態では、抗ROR1療法は、養子細胞療法などの免疫療法を含む。一部の実施形態では、免疫療法は、抗ROR1抗体断片を含むキメラ抗原受容体を発現する細胞を含む。特定の実施形態では、キメラ抗原受容体は、R12と称する抗体、その抗原結合領域を含有する抗体、またはR12と称する抗体と結合について競合する抗体に由来する、抗ROR1抗体断片を含む。なおさらなる実施形態では、キメラ抗原受容体を発現する細胞は、T細胞またはNK細胞を含む。上述の実施形態では、表面で発現されるROR1の発現は、本明細書で開示する方法を使用して決定された。

20

【0135】

別の態様では、本開示は、本発明による診断方法を行うのに有用な材料を含むキットを提供する。ある特定の態様では、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、細胞または組織試料中の完全長ROR1の存在を検出するために使用される。一部のそのような実施形態では、キットは、組織試料中の完全長ROR1の存在を検出するために使用され、組織試料は、ホルマリン固定され、パラフィンに包埋されている。他の実施形態では、組織試料は、凍結され、OCTに包埋されている。一部の実施形態では、組織試料中の完全長ROR1の存在は、免疫組織化学または免疫プロットにより検出される。一部の実施形態では、キットは、HRPを含む二次抗体を含む。

30

【0136】

さらに他の態様では、組成物を含むキットであって、組成物が、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と担体または賦形剤とを含む、キットを提供する。一部の実施形態では、キットは、細胞または組織試料中の完全長ROR1の存在を検出するために使用される。一部の実施形態では、試料は、ホルマリン固定されパラフィンに包埋されている組織試料である。他のそのような実施形態では、組織試料は、凍結され、OCTに包埋されている。一部の実施形態では、組織試料中の完全長ROR1の存在は、免疫組織化学または免疫プロットにより検出される。一部の実施形態では、キットは、HRPを含む二次抗体を含む。

40

【0137】

本明細書に記載の完全長ROR1の存在を同定する方法は、臨床検査室、実験室、または医師（practitioner）によって行われることがある。本発明は、これらの異なる状況で使用することができるキットを提供する。本明細書における方法に従って生物学的試料を特徴付けるための、および被験体における過剰増殖性疾患または状態を診断

50

するための、材料および試薬を、キットで組み立てることができる。ある特定の態様では、キットは、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質と、本開示の方法に従ってキットを使用するための指示とを含む。

【0138】

本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を含むキットは、抗原結合分子を係留するための1つまたは複数の支持体 (s u b s t r a t e) (マイクロアレイスライド、ビーズ、プラスチックチューブ、または他の表面を含む)、二次抗体、標識用緩衝液または試薬、洗浄用緩衝液または試薬、免疫検出用緩衝液または試薬、および検出手段をさらに含むことができる。手順の種々のステップを行うためにこれらの緩衝液および試薬を使用するためのプロトコルをキットに含めることもできる。試薬を固体 (例えば、凍結乾燥) 形態で供給してもよく、または液体形態で供給してもよい。本開示のキットは、個々の緩衝液または試薬各々のための異なる容器 (例えば、スライド、バイアル、アンプル、試験管、フラスコまたはピン) を任意選択で含むことができる。各成分は、そのそれぞれの容器内にアリコートにされていると、または濃縮形態で提供されていると、一般に好適であろう。開示する方法のある特定のステップを行うのに好適な他の容器を提供することもできる。キットの個々の容器は、商業販売のために厳重に密封された状態で好ましくは維持される。

10

【0139】

ある特定の実施形態では、本開示のキットは、対照試料、対照スライド、基準試料、基準スライド、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。本開示の1つまたは複数の方法に従ってキットを使用するための指示は、被験体から得た生物学的試料を処理するための指示、試験を行うための指示、もしくは結果を解釈するための指示、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。本開示のキットは、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を監督する政府機関 (例えば、FDA) によって指示された形式での注意書きをさらに含むことができる。

20

【0140】

抗ROR1結合タンパク質産生のための核酸および宿主細胞

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の免疫グロブリン結合ドメインまたは免疫グロブリン様結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある特定の実施形態では、免疫グロブリン結合ドメインまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、ある特定の型の細胞における発現を増進させるように、または最大にするように、コドン最適化することができる (例えば、Scholtensら、Clin. Immunol. 119巻: 135~145頁、2006年)。本明細書で使用される「コドン最適化」ポリヌクレオチドは、宿主細胞tRNAレベルの存在量に応じてサイレント変異で修飾されたコドンを有する異種ポリペプチドである。

30

【0141】

一部の実施形態では、核酸分子は、2つまたはそれより多くのドメインが切断部位によって隔てられている、結合タンパク質 (例えば、抗体重鎖および軽鎖、またはV_HおよびV_L結合領域を含む抗体結合ドメイン) をコードする。ある特定の実施形態では、切断部位は、V_HもしくはV_Lのアミノ末端側の約2~約20個のアミノ酸、V_HもしくはV_Lのカルボキシ末端側の約2~約20個のアミノ酸、自己切断型アミノ酸配列、またはそれらの組み合わせを含む。ある特定の実施形態では、切断部位は、結合タンパク質ドメインのアミノ末端またはカルボキシ末端の約2~約15、約2~約10、または約2~約5個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、切断部位は、ブタテッショウイルス-1からの2Aペプチド (P2A) (例えば、配列番号17に記載のアミノ酸配列)、ウマ鼻炎Aウイルスからの2Aペプチド (E2A) (例えば、配列番号19に記載のアミノ酸配列)、Thosasaasignavirusからの2Aペプチド (T2A) (例えば、配列番号18に記載のアミノ酸配列)、口蹄疫ウイルスからの2Aペプチド (F2A) (例えば、配列番号20に記載のアミノ酸配列) またはそれらの任意の組み合わせを含む、自己切断型アミノ酸配列である (例えば、Kimら、PLOS One 6巻: e18556、2

40

50

011年を参照されたく、同書に記載の2A核酸およびアミノ酸配列は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0142】

さらに別の態様では、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現構築物を提供する。本開示は、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質、およびペプチドタグまたはタンパク質タグをコードするポリヌクレオチドを含む発現構築物も提供する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現制御配列に作動可能に連結されていることがある。本明細書で使用される「発現構築物」は、好適な宿主において核酸分子の発現を果すことができる好適な制御配列に作動可能に連結されている核酸分子を含有するDNA構築物を指す。発現構築物は、ベクター(例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター)内に存在してもよく、またはゲノムに組み込まれていてもよい。用語「作動可能に連結される」は、単一ポリヌクレオチド断片上の2つまたはそれより多くのポリヌクレオチドが、あるポリヌクレオチドの機能が他のポリヌクレオチドによる影響を受けるように、会合していることを指す。例えば、プロモーターとコード配列は、プロモーターがそのコード配列の発現に影響を与えることができる(すなわち、コード配列が、プロモーターの転写制御下にある)場合、作動可能に連結している。用語「発現制御配列」(調節配列とも呼ばれる)は、それらが作動可能に連結されているコード配列の発現およびプロセッシングを果す、ポリヌクレオチド配列を指す。例えば、発現制御配列としては、転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列; 効率的RNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシングおよびポリ

10

20

【0143】

一部の実施形態では、発現構築物は、ベクター内に存在する。「ベクター」は、別の核酸を輸送することができる核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、RNAベクター、または直鎖状もしくは環状DNAもしくはRNA分子であってもよく、これらは、染色体、非染色体、半合成もしくは合成核酸を含み得る。例示的なベクターは、自己複製能力があるもの(エピソームベクター)、または連結されている核酸を発現させる能力があるもの(発現ベクター)である。例示的なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、バルボウイルス(例えば、アデノ随伴ウイルス)、コロナウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、例えばオルトミクソウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)、ラドウイルス(例えば、狂犬病および水疱性口内炎ウイルス)、パラミクソウイルス(例えば、麻疹およびセンダイ)、プラス鎖RNAウイルス、例えばピコルナウイルスおよびアルファウイルス、ならびに二本鎖DNAウイルスが挙げられ、二本鎖DNAウイルスには、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス)、およびボックスウイルス(例えば、ワクシニア、鶏痘およびカナリアボックス)が含まれる。他のウイルスとしては、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが挙げられる。レトロウイルスの例としては、トリ白血病肉腫、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが挙げられる(Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, *Fundamental Virology*, 第3版, B. N. Fieldsら編, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996年)。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミドである。一部の他の実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターである。一部のそのような実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである。

30

40

【0144】

50

ある特定の他の態様では、本開示は、本明細書に記載の発現構築物もしくはベクターを含むか、または本明細書に記載の発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。本明細書で使用される用語「宿主」は、目的のポリペプチド（例えば、抗ROR1抗体またはその抗原結合断片）を産生するための異種または外因性核酸分子での遺伝子修飾の標的となる細胞または微生物を指す。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、異種または外因性タンパク質の生合成に関係するまたは関係しない所望の特性を付与する他の遺伝子修飾（例えば、検出可能なマーカーの包含）を、任意選択で、既に有することもあり、または含むように修飾されることもある。1つより多くの異種または外因性核酸分子を、別の核酸分子として、複数の個々に制御された遺伝子として、ポリシストロニック核酸分子として、融合タンパク質をコードする単一の核酸分子として、またはそれらの任意の組み合わせとして、宿主細胞に導入することができる。2つまたはそれより多くの外因性核酸分子を宿主細胞に導入する場合、2つまたはそれより多くの外因性核酸分子を、単一の核酸分子として（例えば、単一のベクターを用いて）導入し、別々のベクターを用いて、宿主染色体の単一の部位または複数の部位に組み込むことができることは理解される。言及した異種核酸分子またはタンパク質活性の数は、コードする核酸分子の数またはタンパク質活性の数を指し、宿主細胞に導入される別々の核酸分子の数を指さない。

10

【0145】

なおさらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を作製する方法であって、発現構築物もしくはベクターを含むか、または本明細書に記載の発現構築物により提供されるポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を発現させるのに好適な条件下で培養するステップ、および任意選択で、結合タンパク質または免疫グロブリン様結合タンパク質を培養物から単離するステップを含む方法を提供する。

20

【実施例】

【0146】

（実施例1）

ROR1転写物発現の組織分布

ROR1転写物の発現を、様々なヒトおよびアカゲザル組織のパネルにおいて定量的リアルタイムPCRによって特徴付けた。RT-qPCRアッセイを使用して、ヒトおよびマカク組織におけるROR1発現を決定した。ほとんどの組織からのcDNAは、BioChain（登録商標）から入手し、追加のcDNA試料は、SuperScript-II First-Strand-Synthesis Kitを使用して、ヒト膵臓および結腸（Clontech）ならびに初代B-CLL細胞からのRNA（1μg）で出発して調製した。7900HT Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）でのPower-SYBR-Green-PCRミックスを使用する10μL反応に、cDNA（2μL）を使用した。

30

【化 1】

ヒト ROR1-F: 5'-AGCGTGCGATTCAAAGGATT-3' [配列番号 :39],

ヒト ROR1-R: 5'-GACTGGTGCCGACGATGACT-3' [配列番号 :40],

ヒト GAPDH-F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' [配列番号 :41],

ヒト GAPDH-R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' [配列番号 :42],

ヒト TBP-F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' [配列番号 :43],

ヒト TBP-R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3' [配列番号 :44],

10

アカゲザル ROR1-F: 5'-AGCTTGCGATTCAAAGGATT-3' [配列番号 :45],

アカゲザル ROR1-R: 5'-GACTGGTGTTGATGATGACT-3' [配列番号 :46],

アカゲザル GAPDH-F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' [配列番号 :47],

アカゲザル GAPDH-R: 5'-GAAGATGGTGATGGGGCTTC-3' [配列番号 :48],

アカゲザル TBP-F: 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' [配列番号 :49], および

アカゲザル TBP-R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3' [配列番号 :50]

を含む遺伝子特異的フォワード (F) およびリバース (R) プライマーを使用して、ハウスキピング遺伝子 GAPDH および TATA 結合タンパク質 (TBP) の幾何平均に ROR1 発現を正規化した。

20

【 0 1 4 7 】

プライマー効率および倍数変化は、Pfaffl 法 (Nucleic Acids Res . 29 巻 : e 45 、 2001 年) を使用して決定し、発現は、初代 B - CLL 細胞と比べて決定した。

【 0 1 4 8 】

図 2 に示されているように、Ror1 転写物発現レベルは、ほとんどの正常組織において本質的に検出不能であった。しかし、高レベルの ROR1 を発現することが公知である CLL 細胞と比較して、低レベルの Ror1 転写物が脂肪および脾臓において検出可能であった。したがって、高度な ROR1 発現が腫瘍に存在し、その一方で正常組織が最小乃至は検出不能の ROR1 発現を示すことに鑑みて、ROR1 は本質的に腫瘍関連抗原であるので、ROR1 は良好な治療標的となり、そして、そのような治療薬は最小乃至は検出不能の毒性を有する可能性が高い。

30

【 0 1 4 9 】

(実施例 2)

他の抗 ROR1 抗体は ROR1 を免疫組織学的に検出することができない

いくつかの公開されているまたは市販の抗 ROR1 抗体を免疫組織化学 (IHC) 試薬として様々な細胞株および組織で試験して、ROR1 発現を特異的に検出するそれらの能力を調査した。ホルマリン固定されパラフィンに包埋された (FFPE) 細胞および組織を用いて、各抗体について公開されている具体的なプロトコールを使用して、IHC アッセイを行った。試験した抗ヒト ROR1 抗体は、抗ヒト ROR1 ab135669 (abcam (登録商標) 、 Cambridge 、 MA からのウサギポリクローナル抗体) (Zhang ら、Sci . Rep . 24 巻 : 5811 頁、2014 年) 、抗ヒト ROR1 (R&D Systems 、 Minneapolis 、 MN からのヤギポリクローナル抗体 AF2000) (Dave ら、PLOS One 7 巻 : e52655 、 2012 年) 、抗ヒト ROR1 #4102 (Cell Signaling Technologies 、 Danvers 、 MA からのウサギポリクローナル抗体) (Yamaguchi ら、Cancer Cell 21 巻 : 348 頁、2012 年) 、抗ヒト ROR1 4A5 (マウスモノクローナル抗体) (Zhang ら、Am . J . Pathol . 18

40

50

1 巻：1903 頁、2012 年)、および抗ヒト ROR1 2A2 (BioLegend、San Diego、CA からのマウスモノクローナル抗体)であった。

【0150】

市販の ROR1 特異的抗体での IHC 染色は、公開されているプロトコールを使用した (Zhangら、2014 年; Daveら、2012 年; Yamaguchiら、2012 年; Zhangら、2012 年を参照されたい)。4A5 モノクローナル抗体については、抗原賦活化 (Trilogy - 30 分、高塩濃度緩衝液 - 30 分) の後、一次抗体 (8 μg/mL) 一晚、そして CSA 増幅 (研究者プロトコール) または抗マウスポリマーを続けた。すべての抗体についての染色を DAB で可視化した。

【0151】

第 1 の実験では、ROR1 発現を次の細胞において決定した: (1) K562 (ROR1⁻) 細胞 (陰性対照)、(2) 扁桃組織 (ROR1⁻) (陰性対照)、(3) 完全長 ROR1 を過剰発現する、Ror1 をトランスフェクトした K562 細胞 (ROR1⁺) (陽性対照)、(4) CLL リンパ節 (ROR1⁺、完全長)、および MCL リンパ節 (ROR1⁺、完全長)。公開されている抗体のいくつかは、K562 細胞において完全長 ROR1 の過剰発現を検出することができた (褐色染色によって証明される) が、試験した公知の抗体はいずれも、CLL および MCL リンパ節において内因性発現した完全長 ROR1 を検出することができなかった (図 3A)。

【0152】

第 2 の実験では、ROR1 発現が、(1) Ror1 をトランスフェクトした K562 細胞 (ROR1⁺)、(2) K562 (ROR1⁻) 細胞、(3) CLL リンパ節組織 (ROR1⁺、完全長)、および (4) 扁桃組織 (ROR1⁻) において決定された。第 1 の実験と同様、試験した抗 ROR1 抗体のほとんどは、ROR1 を過剰発現する形質導入細胞を染色したが、FFPE CLL リンパ節試料を染色しなかった (図 3B)。様々な抗原賦活化および染色条件を使用する試みにもかかわらず、正常扁桃において最小バックグラウンドでの CLL リンパ節における ROR1 の再現可能な検出のための条件は、同定されなかった (データを示さない)。

【0153】

入手可能な試薬が ROR1 を染色できなかったことは、いくつかの理由に起因する可能性があった。完全長 ROR1 の N 末端領域における抗体により認識されるエピトープは、ホルマリン固定により破壊される可能性があり、IHC ステップの抗原賦活化手順は、抗体認識に十分なエピトープを回復させることができない可能性がある。この可能性と一致して、CLL 細胞の、または完全長 ROR1 を過剰発現するようにトランスフェクトされた K562 細胞のホルマリン固定は、サイトメトリー分析による ROR1 の検出を低下させた (図 4、上のパネル)。さらに、ROR1 を過剰発現するようにトランスフェクトされた K562 細胞を免疫プロットすることにより、CLL 細胞と比較してはるかに高レベルの ROR1 が検出された (図 4、下のパネル)。それ故、現在入手可能な抗 ROR1 試薬には、がん組織において発現される内因性 ROR1 レベルを検出するのに十分な感度がない可能性がある。

【0154】

したがって、ある特定の入手可能な抗 ROR1 抗体は、例えば、腫瘍および/または他の組織上での、例えばホルマリン固定された組織または他の調製組織における、内因性 ROR1 発現を、最適に感度のよい特異的な様式で検出する能力の点で、完全に満足できるものではない。

【0155】

(実施例 3)

完全長 ROR1 に特異的な抗体

内因性完全長 ROR1 (ROR1_{v1}) を検出することができるが、短い細胞内 ROR1 アイソフォーム (ROR1_{v2}) と交差反応しない、一部の態様では診断、検出および/または予後用試薬として有用である、抗体を生成した。特に、完全長 ROR1 内に

10

20

30

40

50

のみ存在する（および一般に、例えばがん細胞の、細胞表面に局在する唯一のアイソフォームである）ROR1のC末端部分を使用して、抗体のパネルを生成した。簡単に言うと、ヒトROR1のC末端領域内に位置するアミノ酸に対応する4つのペプチドのセット（図5）を用いて、雌BALB/cおよびCD1マウスに免疫化した。ROR1は、マウスとヒトとの間で高度に保存される（97%アミノ酸相同性）ので、ヒトROR1とマウスROR1との間で最大のアミノ酸相違を有する（しかし、ヒトプロテオームにおける他の配列とはほとんど相同性を有さない）ROR1__v1の細胞内領域からのペプチドを、マウスの免疫応答の惹起を助長するために選択した。4つの合成ペプチドをKLHにカップリングさせた。免疫化されたマウスからのポリクローナル血清を試験して、高力価抗ROR1抗体を有するマウスを同定した。WES免疫プロットデバイス（ProteinSimple、Bio-Techne）を使用してROR1⁺CLLおよびK562 ROR1⁻細胞溶解物に対する免疫プロットを行うことにより、ポリクローナル血清をスクリーニングした。次いで、従来の方法を使用して、高い抗ROR1力価を有するマウスの脾細胞からハイブリドーマを作製してモノクローナル抗体を生成し、蛍光標識標的抗原との結合に基づいて1222のクローンを選択した。ハイブリドーマを採取し、ROR1ペプチドカクテルを保有するサイトメトリーピースアレイを使用してペプチド結合についてランク付けした。

【0156】

上位133のハイブリドーマクローンからの上清を、免疫プロットおよび免疫組織化学（IHC）分析を使用してスクリーニングした。免疫プロット分析は、ROR1に特異的な抗体についての上清の初期スクリーニングに使用した。溶解緩衝液[10mM Tris-HCl (pH 8.0)、130mM NaCl、1% (v/v) Triton X-100、5mM EDTA、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche)]を使用して、全細胞溶解物を調製した。細胞ペレットを溶解緩衝液に細胞 1×10^7 個/mlで再懸濁させ、10分間、氷上でインキュベートし、その後、13,000rpmおよび4で15分間、遠心分離した。BCA Protein Assayキット (Thermo Scientific Pierce) を使用して、上清中のタンパク質濃度を決定した。CLL細胞からの細胞溶解物を、標準的プロトコールを使用してWES免疫プロットシステム (Altogen Labs, Austin, TX) で泳動させ、抗マウスHRPで可視化した。免疫化されたマウスからのポリクローナル血清を、初代CLL細胞 (ROR1⁺) およびROR1⁻K562細胞からの溶解物に対する免疫プロットによりスクリーニングして、完全長ROR1に対応する130kDaバンドを検出する血清を同定した（図6A）。CLL細胞の溶解物における130kDa ROR1バンド (ROR1__v1) を認識するいくつかのクローンを同定した（図6B）。クローン6D4は、免疫プロットングにより明瞭な130kDa ROR1バンドを特異的に検出した（図6B）。ハイブリドーマ6D4には、その後のサブクローニングとペプチド結合の反復検証のラウンドを2ラウンド行った。

【0157】

ROR1__v1を検出したクローンを、次いで、異なるFFPE組織 (K562/ROR1⁺細胞株、K562細胞、CLLリンパ節、および複数の正常扁桃組織) のパネルに対してIHC分析により試験した。組織の4マイクロメートル切片を切り出し、Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) で染色した。H2緩衝液で20分間、スライドを前処理した。内因性ペルオキシダーゼを3%過酸化水素で5分間、ブロックした。タンパク質ブロックを10分間適用した (抗体希釈剤中、15%ヤギ血清、5%ヒト血清)。マウス抗ROR1 6D4モノクローナル抗体については、抗体を1:50希釈で使用し、組織に30分間適用し、その後、Leica PowerVision HRPマウス特異的ポリマー (PV6110) を使用して12分間、一切の結合6D4抗体を検出し、染色をRefine DAB (Leica Biosystems) およびヘマトキシリン対比染色で可視化した。アイソタイプ対照 (IgG) スライド (Jackson ImmunoResearch La

10

20

30

40

50

boratories)を各試行に含めた。特異的結合は、DAB基質の褐色の色によって示された。

【0158】

クローン6D4からの精製モノクローナル抗体を次の細胞型のFFPE検体に対して試験した：(1)K562細胞(ROR1⁻)、および(2)完全長ROR1を過剰発現するようにトランスフェクトされたK562細胞(K562/ROR1⁺)。抗ROR1モノクローナル抗体6D4は、K562/ROR1⁺に対して高レベルの明瞭な膜染色を実証し、かつROR1⁻K562細胞でのバックグラウンド染色がないことを実証した(図7)。抗ヒトROR1 6D4抗体を、初代ヒトCLLおよびMCL腫瘍リンパ節のパネルに対しても試験して、正常ヒト扁桃組織(ROR1⁻)を陰性対照として用いて内因性完全長ROR1発現を検出することができるかどうかを決定した。抗ROR1モノクローナル6D4は、CLLおよびMCL腫瘍細胞において明瞭な特異的膜染色を実証し、正常扁桃組織に対するバックグラウンド染色はなかった(図8)。これらの結果は、トランスフェクト細胞におけるROR1過剰発現の検出に加えて、精製モノクローナル抗ROR1 6D4抗体は、少なくとも2つの異なる腫瘍型において内因性発現したROR1を感度よく検出することができることを実証する。

10

【0159】

対照的に、多くの他のクローンからの上清は、ROR1を過剰発現するK562細胞を染色したが、FFPE CLLリンパ節における内因性ROR1を検出することができなかった(図9Aおよび9B)。

20

【0160】

マウスを免疫化するのに使用した4つの異なるROR1ペプチドの混合物からの、1つのROR1ペプチド断片に、抗ROR1モノクローナル抗体クローン6D4が特異的に結合した。抗ROR1モノクローナル抗体6D4は、完全長ROR1(ROR1__V1)のC末端領域に位置する、ヒトROR1ペプチド内のエピトープ786-NPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIP-814(配列番号3)と結合することが判明した(図5を参照されたい)。二次標的デコンボリューション(BD(商標)Elispospot、San Jose、CA)用のサイトメトリービーズアレイ(CBA)を使用して、そのエピトープをマッピングした。

30

【0161】

総合すれば、これらの研究は、抗ROR1モノクローナル抗体6D4が、ヒト細胞および組織、例えば、がんにおいて内因性発現した完全長ROR1を特異的かつ感度よく検出することができることを実証する。

【0162】

(実施例4)

モノクローナル抗体6D4の特異性の検証

精製6D4モノクローナル抗体をROR1およびROR2との結合についてさらに評価した。簡単に言うと、ヒトROR1__v1をコードする核酸分子(NP__005003.2)、およびROR2をコードする核酸分子(pDOMR223-ROR2-Addgene)を、Leisegangら(J. Mol. Med. 86巻:573頁、2008年)により記載されたようにレトロウイルスベクターにクローニングした。細胞株K562、JeKo-1、MDA-MB-231、NCI-H1975、および293TをATCCから入手した。ヒトROR1__v1、ヒトROR2(配列番号56)およびアカゲザルROR1__v1(配列番号58)ペプチドを発現するレトロウイルスベクターを用いて、K562細胞に形質導入した。抗ROR1(クローン2A2-Miltenyi)および抗ROR2(R&D Biosystems-FAB20641G)またはアイソタイプを用いて、以前に記載されたようにフロー染色(flow staining)を行った(Bergerら、Cancer Immunol. Res. 3巻:206頁、2015年を参照されたい)。

40

【0163】

50

抗体 6 D 4 は、非形質導入 K 5 6 2 細胞またはヒト R O R 2 を発現する K 5 6 2 細胞に対して最小のバックグラウンドで K 5 6 2 / R O R 1 を染色し、ならびに十分に特徴付けされたクローン 2 A 2 を使用するフローサイトメトリーにより細胞表面 R O R 1 染色も示す、J e K o - 1、M D A - M B - 2 3 1 および N C I - H 1 9 7 5 を含む、造血および上皮性腫瘍細胞株を染色した (図 1 0 A)。ヒト R O R 2 を発現する K 5 6 2 細胞では染色が観察されなかった (図 1 0 A、下の左側)。精製 6 D 4 を C L L および M C L リンパ節ならびに P B M C の染色についても試験し、正常ヒト扁桃に対して最小のバックグラウンドで均一な膜染色が観察された (図 1 0 B)。K 5 6 2 / R O R 1、初代 C L L および M C L 細胞、ならびに R O R 1 + 腫瘍株からの溶解物の 6 D 4 での免疫プロットは、完全長 R O R 1 と一致する 1 3 0 k D a バンドを検出した (図 1 0 C)。

10

【 0 1 6 4 】

これらの結果は、6 D 4 モノクローナル抗体が、以前の試薬より高い感度で、かつ R O R 2 に対する交差反応性を伴わずに、原発性腫瘍上での完全長 R O R 1 の内因性細胞表面発現を特異的に検出することを実証する。

【 0 1 6 5 】

(実施例 5)

R O R 1 を発現する固形腫瘍を同定するための抗 R O R 1 モノクローナル抗体 6 D 4 の使用

抗 R O R 1 モノクローナル抗体 6 D 4 が、罹病組織などの組織における内因性 R O R 1、例えば、固形腫瘍における R O R 1 細胞表面発現を検出することができるかどうかを決定するために、精製抗 R O R 1 モノクローナル抗体 6 D 4 を、乳がん、肺がん、卵巣がんおよび膵がんのホルマリン固定されパラフィンに包埋された (F F P E) 試料に関する免疫組織化学 (I H C) アッセイに使用した。

20

【 0 1 6 6 】

I H C 試料は、上の実施例 3 で説明したように調製した。2名の独立した認定病理学者が腫瘍組織に細胞表面 R O R 1 についてのスコアを付け、それらのスコアを平均した。「0 - 陰性」、「1 - 抗体での低度の膜染色」、「2 または 3 - 抗体での高度の膜染色」として組織にスコアを付けた (図 1 1)。均質な染色および限局的染色を、それぞれ、腫瘍の 5 0 % 超に対する染色および 3 0 % 未満に対する染色と定義した。

30

【 0 1 6 7 】

上皮がん腫瘍細胞に対する 6 D 4 抗体の感度および特異性

第 1 の研究において、抗 R O R 1 モノクローナル抗体 6 D 4 は、アイソタイプ対照と比較して、完全長 R O R 1 を発現する腫瘍細胞と感度よく、特異的に結合することができることが判明した。特に、R O R 1 は、トリプルネガティブ乳がん、肺腺癌および卵巣がん組織を有する患者のサブセットにおいて高度に発現されることが判明した (図 1 2)。この研究では、卵巣がん、肺腺癌およびトリプルネガティブ乳がんのそれぞれ 5 0 %、7 5 % および 5 0 % は均質な R O R 1 発現を有することが観察された。図 1 3 に示されているように、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌および非定型カルチノイドを含む、様々な肺がん型においても染色が観察された。図 1 4 および 1 5 に示されているように、抗体は、正常ヒト組織のサブセット (副甲状腺、膵島、および食道領域を含む) においてのみ、低レベルの R O R 1 を検出した。

40

【 0 1 6 8 】

上皮がんにおける R O R 1 発現

a . 卵巣がん

以前に公開された研究において、卵巣がんのおおよそ 5 0 % は R o r 1 転写物を発現することが判明し、高い R o r 1 転写物レベルを有する腫瘍を有する患者は、好ましくない無病および無転移生存期間を有した (Zhang ら、Scientific Reports 4 巻 : 5 8 1 1 頁、2 0 1 4 年)。しかし、その研究での R O R 1 の I H C 分析は、染色を主として腫瘍細胞の細胞質および核に限局したものであり、これは、腫瘍細胞株上の完全長 R O R 1 _ v 1 の細胞表面発現とは異なった。

50

【0169】

それ故、様々な組織学の159の卵巣がんからなる2つの組織マイクロアレイを、IHCにおいて6D4モノクローナル抗体を使用して調査した。卵巣がんの50パーセント(50%)は、主として膜および細胞質の6D4での染色を示した(図16A)。腫瘍の92%において、ROR1は、均一に発現され、これを細胞の50%より多くの明確な膜染色と定義し、陽性腫瘍における染色強度は、細胞表面染色の強度に基づいて高度または低度と分類することができた(図11)。組織学的亜型に分類して、類内膜腺癌のおおよそ90%は、ROR1⁺であり、陽性腫瘍の60%は、ROR1^{高度}であり、漿液性乳頭状癌の74%は、ROR1⁺であって、50%がROR1^{高度}にグレード分けされ、粘液性腺癌の44%は、ROR1⁺(31% ROR1^{高度})であり、漿液性腺癌の37%は、ROR1⁺(50% ROR1^{高度})であった(図16B、16C)。細胞表面ROR1は、卵巣がんのある特定の亜型、例えば、明細胞癌および粘液性乳頭腺癌では、低いか、または存在しない。少数の転移性試料(1明細胞、4漿液性乳頭状、および7漿液性腺癌)を調査し、転移性漿液性乳頭状腺癌の75%および漿液性腺癌の40%がROR1⁺であった。これらの結果は、6D4 mAbが、卵巣がんの大部分において細胞表面、完全長ROR1を検出し、ROR1発現の予後的意義の決定にもROR1標的化療法に適格な患者の同定にも有用であり得ることを実証する。

10

【0170】

b. 乳がん

ROR1遺伝子発現は、公けに利用可能なGEOデータベースを使用して乳がんにおいて以前に調査され、高度なROR1発現が、上皮間葉転換(EMT)遺伝子シグネチャーおよびより低い無転移生存期間と相関した(Zhangら、PloS One 7巻:e31127、2012年;Cuiら、Cancer Research 73巻:3649頁、2013年)。これらの報告の1つにより、原発性のがんの70%においてIHCによりROR1タンパク質発現が観察された(乳房小葉(lobular breast)の75%および乳管(ductal breast)の70%はROR1⁺であった)が、その研究で使用された試薬での染色は、核および細胞質に限局されたものであり、これは、検出されたタンパク質が、ROR1の細胞表面、完全長バリエーションではない可能性があることを示唆する(Zhangら、2012年)。独立したグループが、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)においてIHCによりROR1を調査し、22%はROR1⁺であり、これらの患者は、より短い無疾患生存期間を有することが判明した(Chienら、Virchows Archiv 468巻:589頁、2016年)。

20

30

【0171】

本研究では、6D4 mAbを使用して、24のER/PR⁺、12のHer2⁺および60のTNBC試料をROR1について分析した(図17A~17C)。低度のROR1染色がER/PR⁺のわずかな百分率で観察され(12% ROR1⁺)、HER2⁺腫瘍ではROR1発現は観察されなかった。しかし、ROR1は、TNBCで高度に発現され、試料の57%はROR1⁺であり、56%がROR1^{高度}としてグレード分けされ、74%が均質な染色を示した(図17B~17C)。

40

【0172】

c. 肺がん

以前の研究において、マイクロアレイおよびPCRによりROR1転写物が非小細胞肺がんにおいて同定された(Yamaguchiら、Cancer Cell 21巻:348頁、2012年;Karachaliouら、Translational Lung Cancer Research 3巻:122頁、2014年)。種々のポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いるIHCにより、全肺がんの40%を構成する肺腺癌の24~90%においてROR1の染色が示された(Zhangら、The American Journal of Pathology 181巻:1903頁、2012年;Yamaguchiら、Cancer Cell 21巻:348頁、2012年;Liuら、PloS One 10巻:e0127092、2015年)。他の肺が

50

ん垂型における ROR1 発現は、十分に特徴付けされていない。

【0173】

6D4 mAb を使用して種々の組織学的型の 137 の原発性肺がんにおいて ROR1 発現を調査した。ROR1 発現は、肺腺癌において最も高頻度であり（42% が ROR1⁺ であって、38% が ROR1^高 にグレード分けされる）、少数（12%）の扁平上皮癌に ROR1⁺ 染色があった（図 18A ~ 18C）。本発明者らは、腺扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌、および非定型カルチノイド腫瘍においても ROR1 染色を観察したが、これらの腫瘍は、陽性頻度の正確な推定のために調査するには少なすぎた（図 18B ~ 18C）。すべての ROR1⁺ 肺腫瘍が均質な染色を示した。

【0174】

ROR1 は、EMT および腫瘍の移動において役割を果たすと報告されているので、本発明者らは、適合する転移病変における ROR1 発現を評価して、原発性腫瘍における ROR1 発現が維持されるかどうかを決定した。50% が ROR1⁺ 腫瘍を有する肺腺癌患者からの 30 の原発性および適合する転移性リンパ節において、ROR1 発現を調査した。ROR1⁺ 原発性腫瘍を有する患者において、適合する転移性リンパ節の 60% は、ROR1⁺ のままであり、40% は、ROR1⁻ であった（図 18D）。2 名の患者に関して、原発性腫瘍は ROR1⁻ であったが、転移性リンパ節は ROR1⁺ であった。これらの結果は、肺腺癌における ROR1 発現増加と転移能とに直接的な相関関係がない可能性があること、または ROR1 発現の維持が、遠隔転移部位での腫瘍増殖に必要な可能性を示唆している。

【0175】

d. 膵がん

膵臓腺癌は、ある研究で ROR1 を高頻度に（83%）発現すると以前に報告されている（Zhang ら、The American Journal of Pathology 181 巻：1903 頁、2012 年）。

【0176】

6D4 mAb を使用して膵臓腺癌の 38 症例において細胞表面 ROR1 発現を決定した（図 19A）。驚くべきことに、本発明者らは、ほんの一部の腫瘍（15%）において ROR1 が低レベルで発現することを見いだした（図 19B）。

【0177】

要約

全体的に見て、一般的な上皮がんについての本分析は、細胞表面で発現される高レベルの完全長 ROR1 が卵巣がん、TNBC および肺腺癌のかなりの割合に存在することを示す。ROR1 染色は典型的には均質であり、これは、そのような腫瘍細胞の圧倒的多数が ROR1 標的化療法に感受性であり得ることを示唆している。

【0178】

これらの結果は、ROR1 を表面で発現する造血性または固形腫瘍におけるものを含む、抗 ROR1 キメラ抗原受容体（CAR）をその細胞表面で発現する免疫細胞を含む、免疫療法などの ROR1 特異的療法で標的となる腫瘍関連抗原標的としての ROR1 の有用性を裏付ける。さらに、抗 ROR1 モノクローナル抗体 6D4 は、高感度の特異的な診断試薬として、または ROR1 特異的療法のためのコンビオン診断薬として有用である。

【0179】

（実施例 6）

正常アカゲザルおよびヒト組織における ROR1 発現

ヒト

ROR1 を標的とする抗体または養子 T 細胞療法に対する懸念は、正常組織上での ROR1 の発現に起因するオン標的オフ腫瘍（on-target, off-tumor）毒性の可能性である（Morgan ら、Molecular Therapy 18 巻：843 頁、2010 年；Lamers ら、Molecular Therapy 21 巻：904 頁、2013 年；Hassan ら、Clinical Cancer Resea

10

20

30

40

50

rch 13巻: 5144頁、2007年)。全組織溶解物のリアルタイムPCRまたは免疫プロットにより正常組織におけるROR1発現を分析した以前の研究により、ほとんどの正常組織においてROR1は存在しないか、または低レベルで発現されることが判明した(Baskarら、Clinical Cancer Research 14巻: 396頁、2008年; Hudecekら、Blood 116巻: 4532頁、2010年; Daveら、PloS One 7巻: e52655、2012年; Fukudaら、PNAS 105巻: 3047頁、2008年)。全組織cDNAプールまたは溶解物は、ROR1を検出する際の重要な第一段階であるが、発現が少数の細胞または組織領域に局在した場合、発現を検出できないことがある。フローサイトメトリーを使用して、細胞表面で発現される完全長ROR1が、*in vitro*で脂肪細胞前駆体から分化した脂肪細胞上に、および骨髄での正常B細胞分化の初期に存在することが証明された(Hudecekら、2010年)。いくつかの研究によって、以前に入手可能であった抗体試薬を用いてIHCを使用して正常組織におけるROR1発現が調査されたが、脂肪細胞を除いて正常組織において細胞表面で発現されるROR1は報告されていない(Daveら、2012年; Choiら、Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia 15巻、補遺: S167、2015年)。

10

【0180】

6D4 mAbは、ROR1に対して高感度かつ特異的であり、他の抗体で試験してROR1陰性であると以前に考えられていた正常組織上のROR1を検出する可能性があった。それ故、2つのヒト多臓器正常組織マイクロアレイパネルを使用してIHCによりROR1発現を評価した。ROR1は、脳、心臓、肺および肝臓には存在しなかったが、正常な副甲状腺、膵島細胞、および胃腸管の複数の領域において有意な細胞表面染色が検出された(図20A~20C)。細胞表面ROR1は、食道の基底上皮内層において、胃前庭部粘膜の表面および小窩上皮細胞において、ならびに十二指腸粘膜(吸収細胞、杯細胞および腺窩上皮)において発現された(図20B)。腸粘膜上でのROR1発現は、内腔上皮上および細胞間結合部間より高度であるように見えた(図20B)。細胞表面ROR1は、空腸でも回腸でも見られず、低レベルが上行および下行結腸の表面および腺窩上皮において観察された(図20B)。

20

【0181】

以前の研究により正常組織ではIHCによりROR1が検出されなかった事実にかんがみて、6D4を用いて観察された細胞表面染色が別のタンパク質との交差反応性を反映しないことを確認するために、免疫プロット分析を行った。陽性組織の急速凍結試料を入手し、6D4および以前に公開されたポリクローナルヤギ抗ROR1抗体(Daveら、2012年)を用いる免疫プロット分析用に細胞溶解物を調製した。加えて、ROR1__v1に特異的なプライマー(Bergerら、Cancer Immunology Research 3巻: 206頁、2015年)を用いるリアルタイムPCR用にcDNAを調製した。CLL細胞からの溶解物において、ならびに副甲状腺、膵島、胃前庭部および胃体部、食道、十二指腸および結腸からの溶解物において、6D4とポリクローナルヤギ抗ROR1抗体の両方を使用する免疫プロットにより、130kDa完全長ROR1タンパク質と一致するバンドが検出された(図20Dおよび20E)。ROR1バンドは、副甲状腺などの組織からの溶解物では、N結合型グリコシル化などの翻訳後修飾の差におそらく起因して、CLLと比較してわずかに高い分子量であった(図20D)。N結合型グリコシル化を除去するPNGaseFで溶解物を処理すると、100kDaの脱グリコシル化ROR1タンパク質バンドが、Kauckaら(Acta Physiologica 203巻: 351頁、2011年)によって以前に報告されたように陽性組織において検出された(図20F)。リアルタイムPCRによるヒト腸組織におけるRor1__v1転写物の測定は、胃および脂肪細胞において有意なRor1転写物が示したが、これらの組織における転写物レベルは、CLL患者からの末梢血試料よりも低かった(図21)。

30

40

【0182】

50

これらの研究は、いくつかの正常成人組織において細胞表面で発現される完全長ROR1を検出するのに十分な感度が抗体6D4にあることを示す。脂肪細胞（米国特許第9,163,258号）以外に、以前の報告により、副甲状腺、膵島、および胃腸管の領域（食道、胃および十二指腸を含む）においてROR1は検出されなかった。

【0183】

アカゲザル

ヒト組織における上述の知見にもかかわらず、ROR1 CARにより認識されるエピトープが保存され、正常マカク組織が同様のレベルのRor1転写物を発現するため、好適であると考えられている前臨床アカゲザル（Macacca mulatta）モデルにおいて、ROR1-CAR T細胞の安全性が以前に実証された（Bergerら、*Cancer Immunology Research* 3巻：206頁、2015年）。非常に高用量の機能性CAR-T細胞の注入でさえ、マカクにおいて毒性は認められなかった（Bergerら、2015年）。

10

【0184】

ROR1タンパク質が、マカクにおいてヒトの場合と同じ正常組織において発現されるかどうかをさらに評価するために、アカゲザルROR1（例えば、配列番号58）を認識する6D4 mAbの能力を試験した。配列番号59に対応するアカゲザルROR1エピトープは、ヒトROR1における対応する配列とアミノ酸が1個異なる（図23A）。先ず、K562およびアカゲザルT細胞にアカゲザルROR1（XP_014996735）をBergerら（2015年）に記載されたように形質導入し、6D4 mAbで染色した。アカゲザルROR1を発現するように形質導入された細胞は、6D4抗体の結合を示す褐色染色を示した（図23B）。加えて、正常アカゲザル組織パネルに関してIHCを行い、IHCは、副甲状腺、膵島および胃腸管（食道基底部分皮、胃前庭部粘膜の小窩上皮細胞、および十二指腸粘膜の腸腺を含む）を含む、ヒト組織において観察されたのと同様の細胞表面ROR1を同じ組織において示した（図23Cおよび23D）。しかし、ROR1は、ヒト結腸において検出された低いレベルとは対照的に、アカゲザル結腸では検出されなかった。

20

【0185】

これらの結果は、ROR1の発現パターンが、アカゲザルおよびヒト組織において非常に類似していることを示す。Bergerら（2015年）において観察されたマカクにおけるROR1 CAR-T細胞注入後の毒性の臨床的、生化学的または組織学的証拠の欠如は、非炎症正常組織へのROR1-CAR T細胞の輸送があまりにも少量なので毒性を引き起こすことができない可能性があること、または抗原のレベルがこれらの組織では*in vivo*でのCAR-T細胞認識に不十分である可能性があることを示す。

30

【0186】

（実施例7）

ROR1特異的CARはROR1発現に比例して細胞を標的とする

6D4 mAbにより検出されるROR1のレベルが、ROR1特異的CARを発現するT細胞による認識に十分であるかどうかを決定するために、本発明者らは、初代ヒト分化脂肪細胞、膵島細胞および腺房細胞をROR1-CAR T細胞と共培養し、培養上清中のサイトカインを測定した。初代脂肪細胞をヒト白色前駆脂肪細胞（Promo Cell）（Hudecekら、*Blood* 116巻：4532頁、2010年）から分化させた。初代ヒト膵島の2000の膵島等価物、腺房細胞、および膵島培養用の培地をProdo Labsから入手した。Hudecekら（*Clinical Cancer Research* 19巻：3153頁、2013年）に記載されているように、ROR1特異的R12scFv CARを発現させるためにROR1 CARレンチウイルスをヒトT細胞に形質導入した。初代脂肪細胞、膵島、および腺房細胞を、独立した2ドナーから調製した形質導入していないT細胞およびROR1-CAR T細胞とともに、2:1のT細胞：標的比で共培養した。24時間の共培養後に上清を回収し、サイトカイン産生をマルチプレックスイムノアッセイ（Luminex）によってアッセイした。標的

40

50

細胞に標識するためのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) とヨウ化プロピジウム (PI) とを使用して 5 : 1 の T 細胞 : 標的比で標的殺滅を行って、24 時間のインキュベーション後に死滅標的細胞の百分率のスコアを付けた (Zaritskaya ら、Expert Review of Vaccines 9 巻 : 601 頁、2010 年を参照されたい)。

【0187】

同じドナーからの mock T 細胞ではなく ROR1 - CAR T 細胞は、初代脂肪細胞および臍島細胞とともにインキュベートしたとき、インターフェロン、GM-CSF、および IL-2 を分泌した (図 22A ~ 22C)。in vitro での培養中のサイトカイン分泌レベルは、標的上での ROR1 発現に比例した。加えて、ROR1 - CAR T 細胞は、ROR1⁺ K562 / ROR1 細胞および分化脂肪細胞を溶解したが、K562 細胞を溶解しなかった (図 22D)。

10

【0188】

これらの知見は、ROR1 - CAR T 細胞が、mAb 6D4 によって示される ROR1 発現に比例して細胞を標的とするという結論を裏付ける。

【0189】

本明細書において言及するおよび / または出願データシートに列挙する、米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許公表文献のすべては、2016 年 2 月 2 日に提出した米国特許仮出願第 62 / 290,337 号および 2016 年 4 月 19 日に提出した米国特許仮出願第 62 / 324,876 号を含めて、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。上記の様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を得ることができる。様々な特許、出願および公表文献の概念を利用するために必要に応じて実施形態の態様を変更して、またさらなる実施形態を得ることができる。上記の詳細な説明に照らして、これらおよび他の変更を実施形態に加えることができる。

20

【0190】

一般に、下記の特許請求の範囲において使用する用語は、本明細書および本特許請求の範囲において開示する特定の実施形態に本特許請求の範囲を限定すると解釈すべきでなく、そのような特許請求の範囲を伴う均等物の全範囲とともにすべての可能な実施形態を含むと解釈すべきである。したがって、本特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

30

【 図 7 】

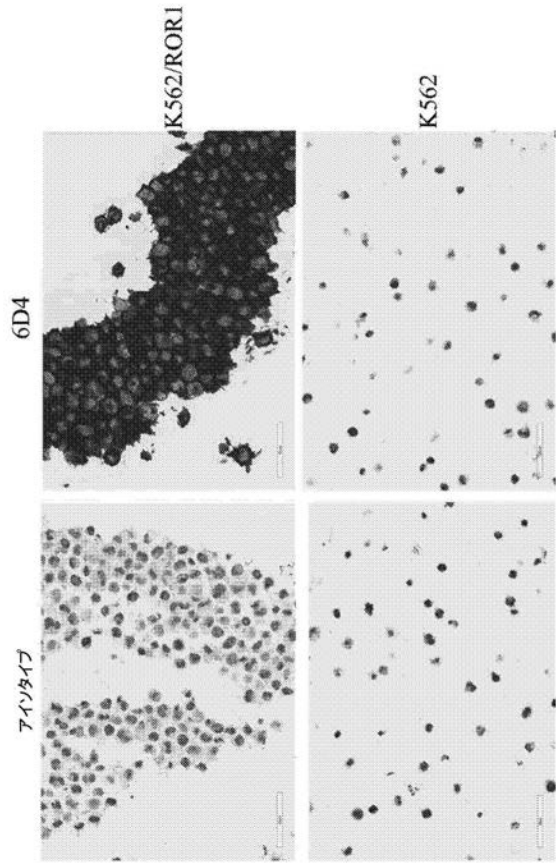


FIG. 7

【 図 8 】

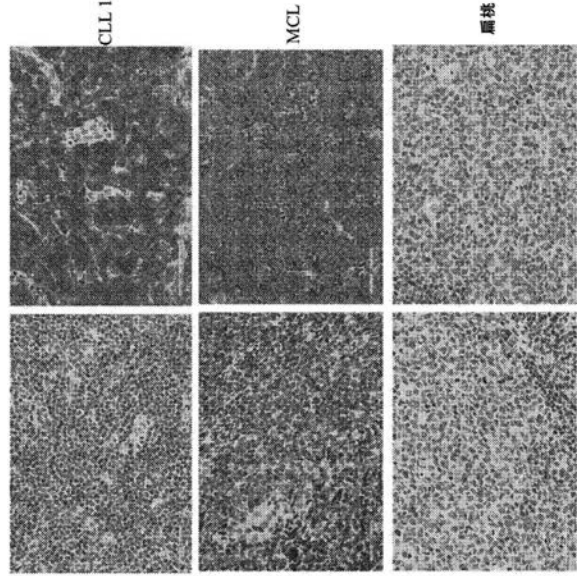


FIG. 8

【 図 9 A 】

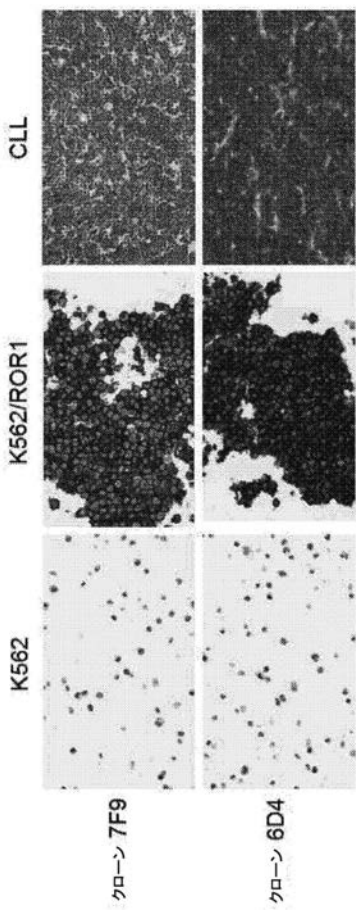


FIG. 9A

【 図 9 B 】

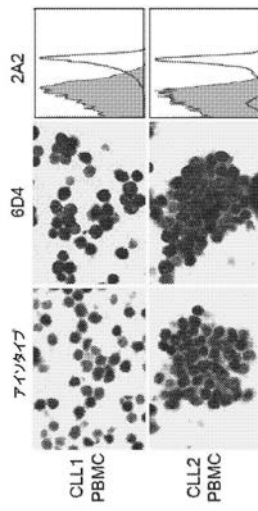


FIG. 9B

【 図 1 0 A 】

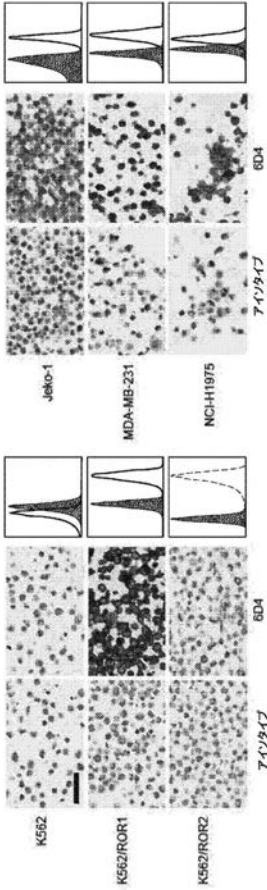


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】

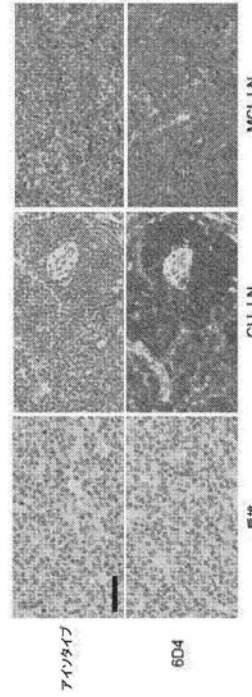


FIG. 10B

【 図 1 0 C 】

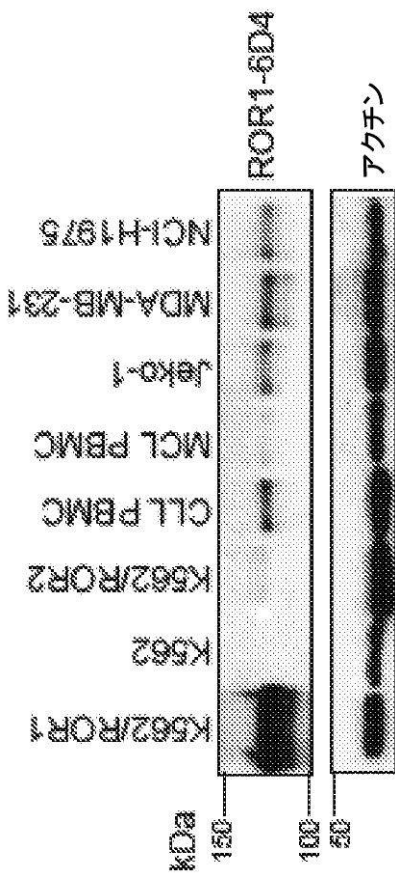


FIG. 10C

【 図 1 1 】

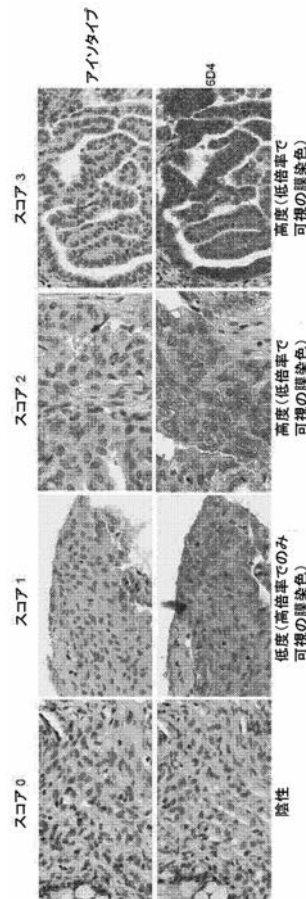


FIG. 11

【 図 1 2 】

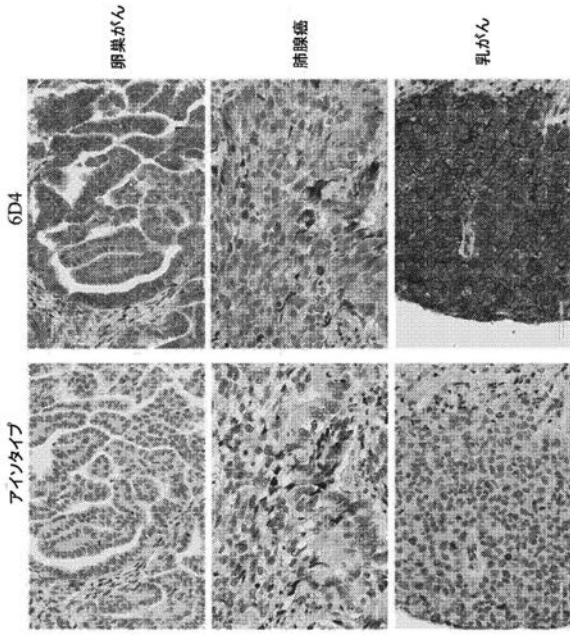


FIG. 12

【 図 1 3 】

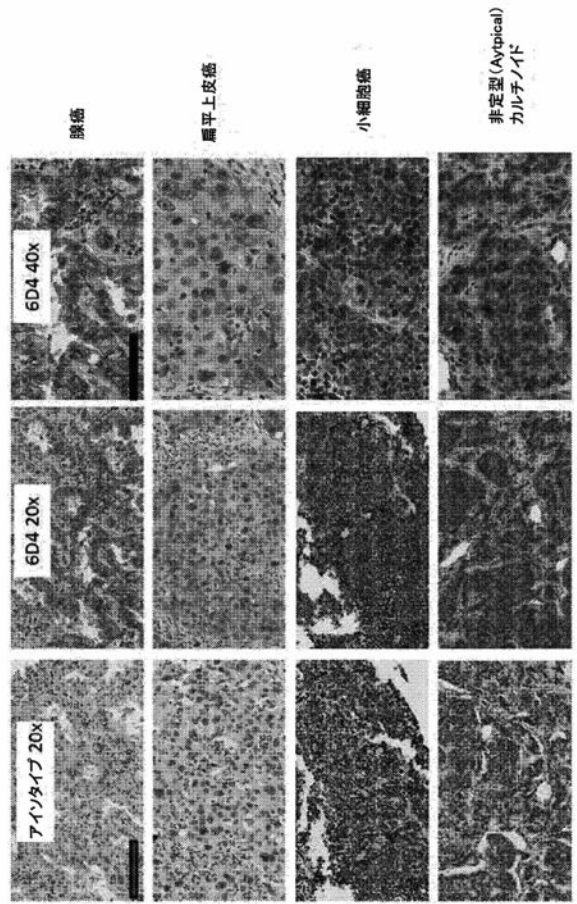


FIG. 13

【 図 1 4 】

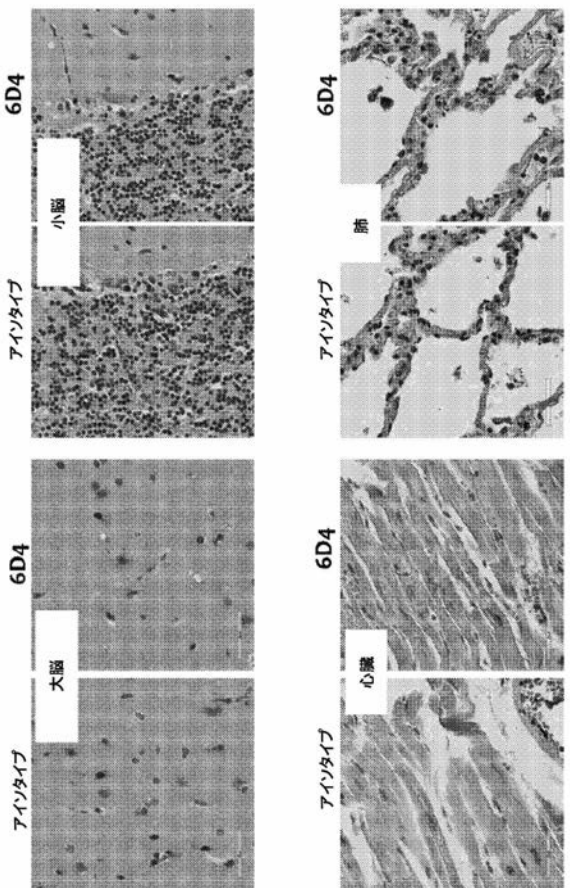


FIG. 14

【 図 1 5 】

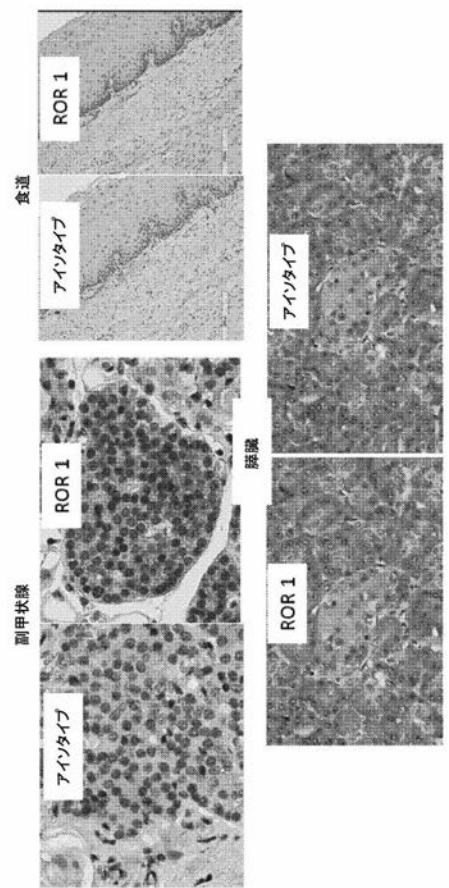


FIG. 15

【図 16 A】

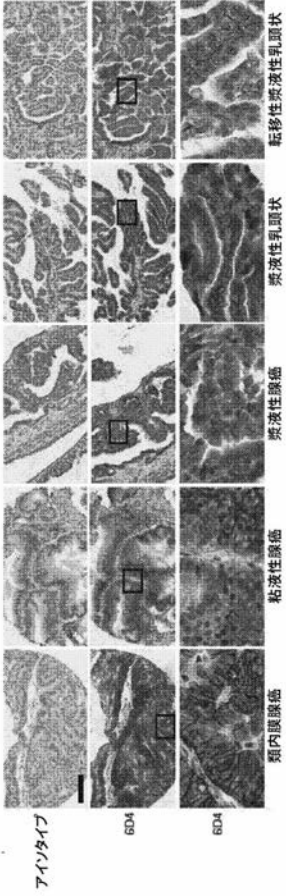


FIG. 16A

【図 17 A】

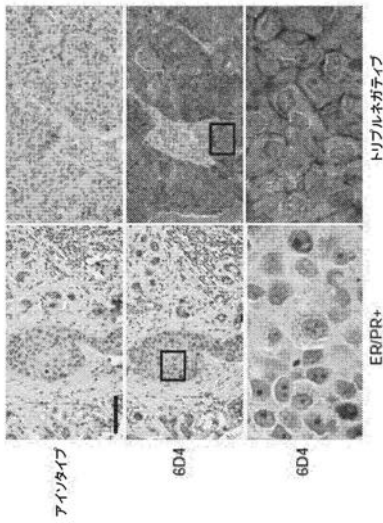
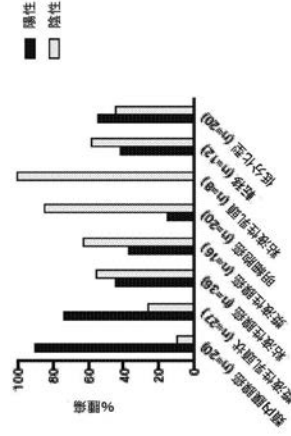
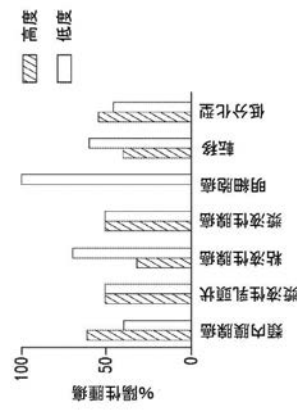


FIG. 17A

【図 16 B】



【図 16 C】



【図 17 B】

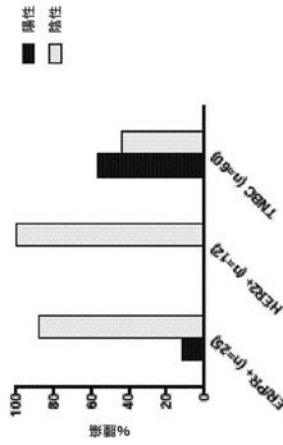


FIG. 17B

FIG. 16B

FIG. 16C

【図 17C】

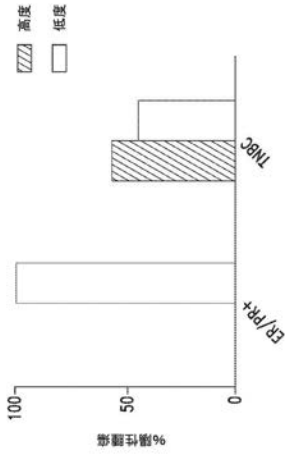


FIG. 17C

【図 18A】

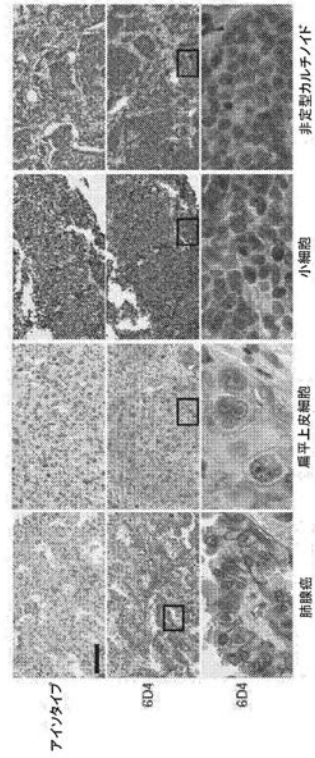


FIG. 18A

【図 18B】

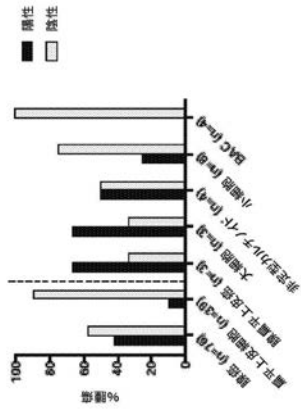


FIG. 18B

【図 18D】

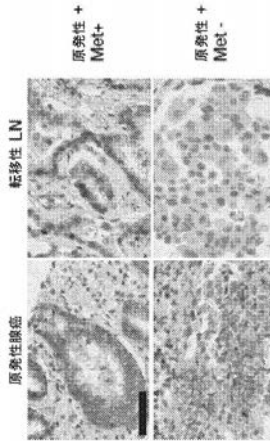


FIG. 18D

【図 18C】

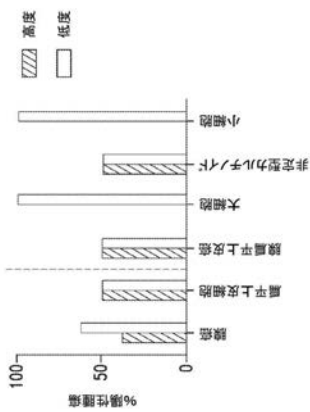


FIG. 18C

【図 19A】

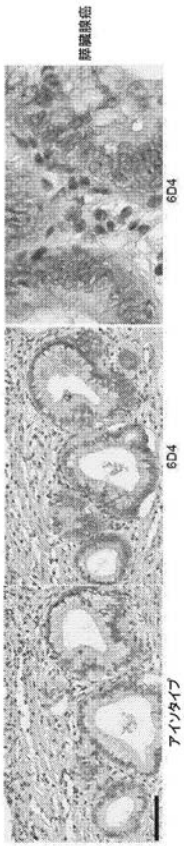


FIG. 19A

【図 19B】

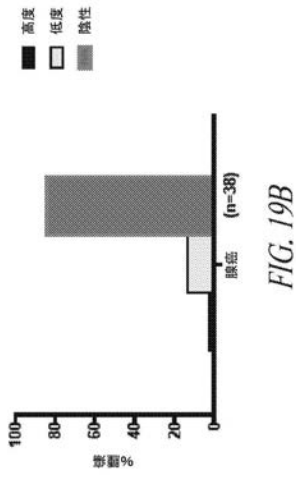


FIG. 19B

【図 20A】

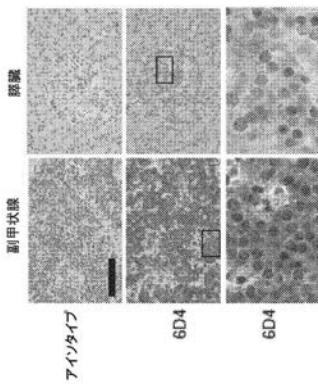


FIG. 20A

【図 20B】

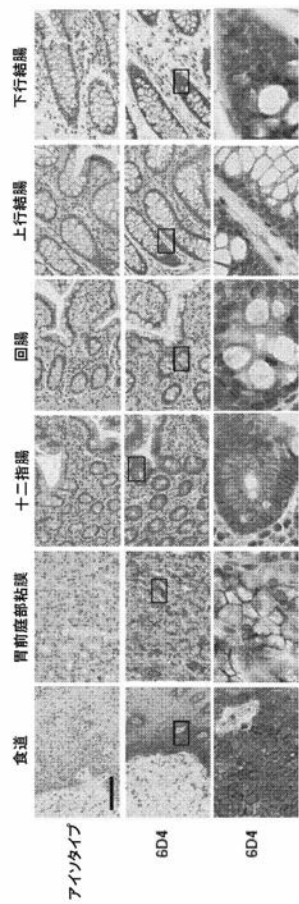


FIG. 20B

【図20C】

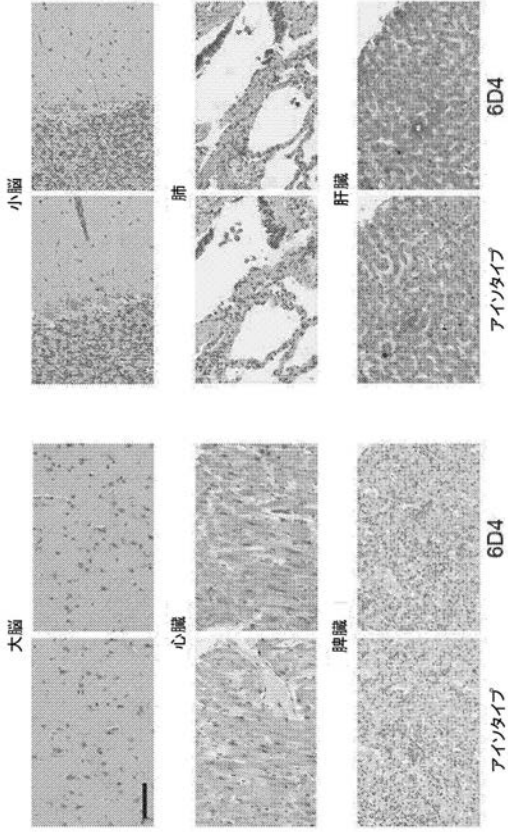


FIG. 20C

【図20D】

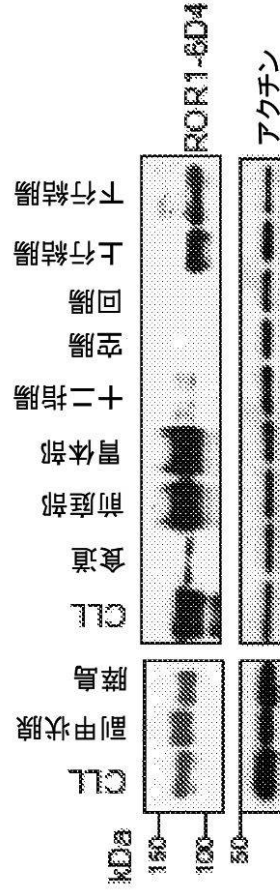


FIG. 20D

【図20E】

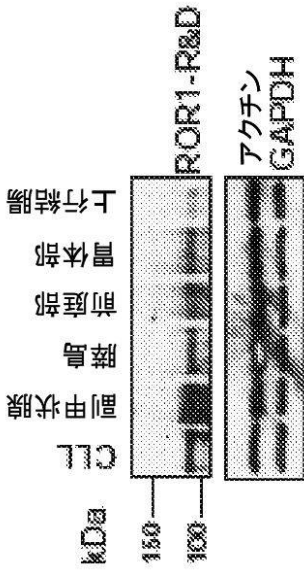


FIG. 20E

【図20F】

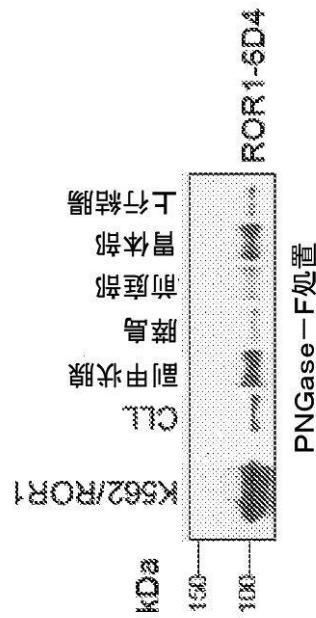


FIG. 20F

【 図 2 1 】

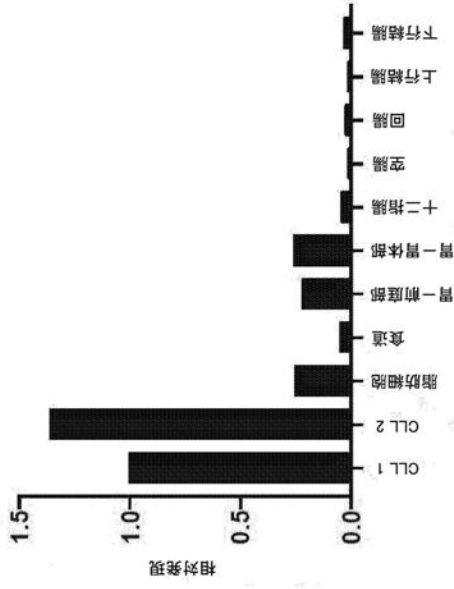


FIG. 21

【 図 2 2 A 】

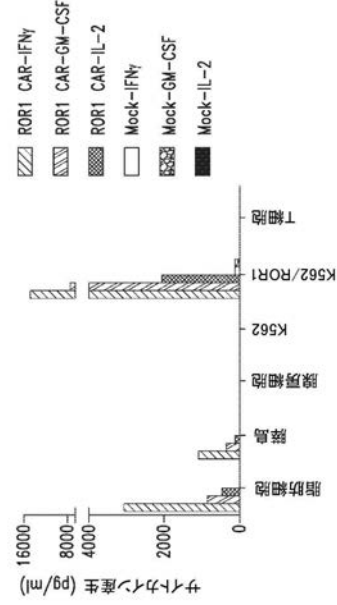


FIG. 22A

【 図 2 2 B 】

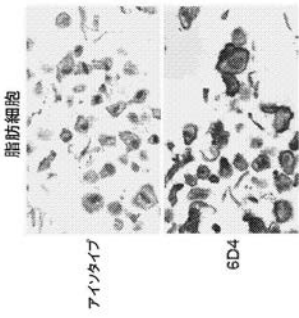


FIG. 22B

【 図 2 2 C 】

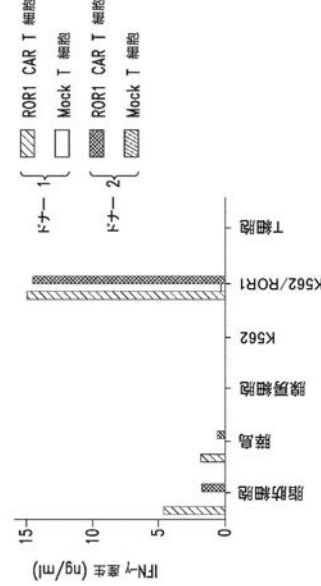


FIG. 22C

【 図 2 2 D 】

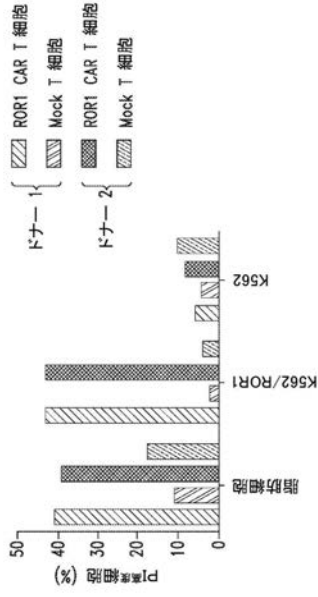


FIG. 22D

【 図 2 3 A 】

ヒト	マウス	アカゲザル
配列番号 3	配列番号 57	配列番号 59
N P R Y P N Y M F P S Q G I T P Q G Q I A G F I G P P I P F A I		

FIG. 23A

【 図 2 3 B 】

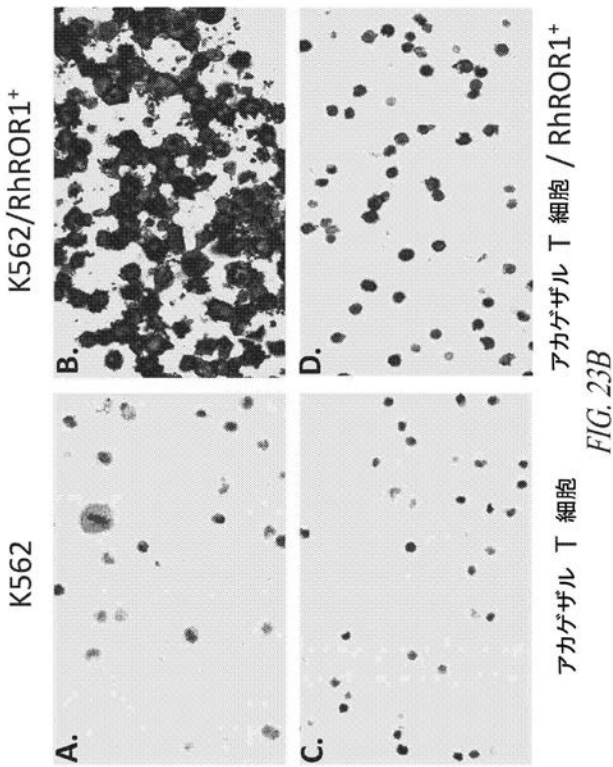


FIG. 23B

【 図 2 3 C 】

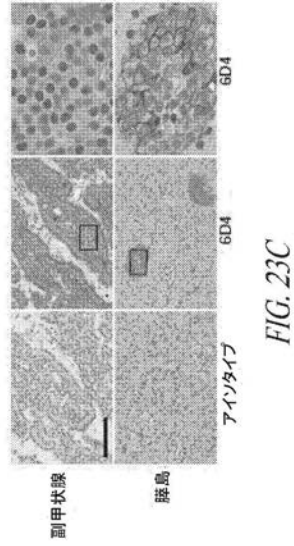


FIG. 23C

【 図 2 3 D 】

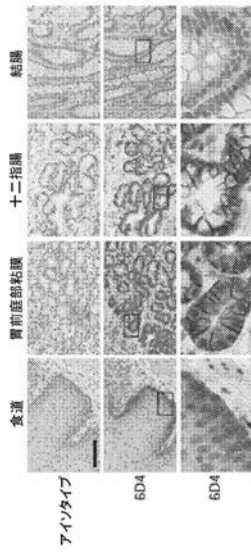


FIG. 23D

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成30年10月3日 (2018.10.3)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2019511904000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/016300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG J ET AL: "Therapeutic potential and challenges of targeting receptor tyrosine kinase ROR1 with monoclonal antibodies in B-cell malignancies", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US , vol. 6, no. 6 1 June 2011 (2011-06-01), pages E21018.1-E21018.15, XP002670875, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0021018 Retrieved from the Internet: URL:http://www.plosone.org/article/info%3A doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0021018 [retrieved on 2011-06-15] abstract ----- -/--	71-80
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 19 April 2017		Date of mailing of the international search report 02/05/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/016300

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. forming part of the international application as filed:
- 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/US2017/016300

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMIR H DANESHMANESH ET AL: "Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 123, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1190-1195, XP002622341, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/IJC.23587 [retrieved on 2008-06-10]	2,21
Y	see paragraph "Production of anti-ROR1 and specificity testing" page 1191, RH column; see paragraph "Surface staining and flow cytometry" and "Dual color fluorescence in situ hybridization" page 1192, RH column; paragraph Discussion on page 1194, RH column, second paragraph	1,3-20, 22-70, 81-87
X	----- Daneshmanesh: "Phone ROR1 antibody (Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor 1) (C-Term) Antigen: Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor 1 (ROR1) 2 Images available", 31 December 2008 (2008-12-31), XP055365338, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546292 [retrieved on 2017-04-19]	2,21
Y	see Item "immunogen"	1,3-20, 22-70, 81-87
X	----- Anonymous: "Product Datasheet: ARP63925_P050 - ROR1 Antibody - C-terminal region (ARP63925_P050) - Aviva Systems Biology", 1 January 2016 (2016-01-01), XP055365381, Retrieved from the Internet: URL:http://www.avivasysbio.com/sd/tds/html_datasheet.php?sku=ARP63925_P050 [retrieved on 2017-04-19]	2,21
Y	the whole document	1,3-20, 22-70, 81-87

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D

(81)指定国 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, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, 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, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY , MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 パラクリシュナン, アシュウイニ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 9, シアトル, 4 ティーエイチ アベニュー ダブリュー. 2 9 0 4

(72)発明者 ホフストロム, ベンジャミン ジー.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 2, シアトル, イー. リパブリカン ストリート 1 6 0 8, アpartment 3 0 1

(72)発明者 ランドルフ - ハベッカー, ジュリー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 7, シアトル, 1 2 ティーエイチ アベニュー エヌ ダブリュー 9 7 2 1

(72)発明者 リデル, スタンリー アール.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5, サマミッシュ, 2 6 8 ティーエイチ プレイス エスイー 1 7 6 3

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA24 AA26 BA13 BB20 BB22 BB24 CA18 CA19 CA25

CB01 CB02 CB17 CB26 DA13 DA14 DA30 DA36 DA37 FA11

FA19 FA28 FA37 FB01 FB02 FB03 FB12 FB15 GB01 GB02

GB03 GC15 JA01

4B063 QA01 QA07 QA18 QA19 QQ08 QR48 QS33

4B064 AG27 CA01 CA19 CC24

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 BA41 DA50 DA76 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	抗ROR1抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2019511904A	公开(公告)日	2019-05-09
申请号	JP2018539977	申请日	2017-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	弗莱德哈钦森癌症研究中心		
申请(专利权)人(译)	弗雷德·哈钦森癌症研究中心		
[标]发明人	リデルスタンリーアール		
发明人	バラクリシュナン, アシュウイニ ホフストロム, ベンジャミン ジー. ランドルフ-ハベッカー, ジュリー リデル, スタンリー アール.		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/04 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P15/00 A61P11/00 A61P1/18 A61P35/04 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P1/18 A61P11/00 A61P15/00 C07K16/2803 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N33/57492 G01N2333/70503		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/04 A61K39/395.N A61P35/00 A61P35/02 A61P15/00 A61P11/00 A61P1/18 A61P35/04 G01N33/48.P G01N33/53.D D G01N33/574.D		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA11 2G045/FA19 2G045/FA28 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GB01 2G045/GB02 2G045/GB03 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/290337 2016-02-02 US 62/324876 2016-04-19 US		
其他公开文献	JP2019511904A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及抗ROR1结合蛋白，包括与ROR1或其部分结合的那些，例如ROR1蛋白的细胞内C末端部分，以及这些结合蛋白在免疫组织化学和诊断方法中的用途。还提供了相关试剂盒和使用该结合蛋白的方法，以及治疗患有疾病或病症的受试者的方法，其中所述受试者是根据本公开的结合蛋白或方法进行这种治疗的候选者。还提供了已经确定的方法。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-539977 (P2018-539977)	(71) 出願人	506139389
(86) (22) 出願日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		フレッド ハッチンソン キャンサー リ
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月28日 (2018.9.28)		サーチ センター
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/016300		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
(87) 国際公開番号	W02017/136607		フェアビュー アベニュー ノース 1
(87) 国際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		1 0 0
(31) 優先権主張番号	62/290,337	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成28年2月2日 (2016.2.2)		弁理士 山本 秀敏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/324,876		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成28年4月19日 (2016.4.19)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗 ROR 1 抗体およびその使用