

(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2004-500108

(P2004-500108A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088		4 B O 6 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76		4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00		4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/16		4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 171 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-569387 (P2001-569387)	(71) 出願人	502343861
(86) (22) 出願日	平成13年3月26日 (2001.3.26)		マイクロメット アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月20日 (2002.9.20)		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/003414		7 7 シュタッフエルゼーシュトラッセ
(87) 国際公開番号	W02001/071005		2
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001.9.27)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	00106467.4		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成12年3月24日 (2000.3.24)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N K G 2 D レセプター複合体のエピトープへの結合部位を含む多機能ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、N K G 2 D レセプター複合体の細胞外エピトープを特異的に認識する結合部位を含む第1のドメインおよびレセプターまたはリガンド機能を有する第2のドメインを含む多機能ポリペプチドに関する。さらに、本発明は、多機能ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ポリヌクレオチドまたは該ベクターを含む細胞に関する。この発明は、上述の分子のいずれかを単独または組み合わせ含む組成物、また、この発明の多機能ポリペプチドの特定の医薬用途にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) NKG2Dレセプター複合体の細胞外エピトープを特異的に認識する結合部位を含む第1のドメイン、および、

(b) レセプターまたはリガンド機能を有する第2のドメイン、を含む多機能ポリペプチド。

【請求項 2】

該結合部位が免疫グロブリン鎖の結合部位である請求項1記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 3】

該結合部位が該レセプター複合体の天然NKG2D-リガンドである請求項1記載の多機能ポリペプチド。 10

【請求項 4】

該天然NKG2D-リガンドが、MIC-A、MIC-B、ULBP-1およびULBP-2からなる群より選ばれる請求項3記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 5】

該結合部位がNKG2DまたはDAP10の細胞外エピトープを特異的に認識する請求項1ないし4記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 6】

該レセプターまたはリガンド機能が、

(i) 腫瘍関連抗原、

(ii) 感染性因子の抗原、または

(iii) 該腫瘍関連抗原や表面マーカーと相互作用する識別抗原(CD抗原)、天然リガンドもしくはレセプター、これらのフラグメント、または、これらの修飾体のような細胞の分集団の表面マーカー、

に対する抗体、フラグメント、または、これらの誘導体の抗原結合部位であり、好ましくは、(i) 腫瘍関連抗原のerbB-2、-3および-4に結合するヘレグリン、(ii) HIV感染細胞のgp120と相互作用するCD4、または(iii)メラノサイトおよびこれら由来の腫瘍(悪性黒色腫)のMSHレセプターに結合するメラノサイト刺激ホルモン(MSH)もしくは相当するケモカインレセプターに結合するケモカインまたはあらかじめ定義された特異性を有するT細胞レセプターに結合するペプチドと複合体を形成するMHC分子やこれらのフラグメントであり従ってあらかじめ定義されたMHCペプチド複合体やインフルエンザウイルスの血球凝集素(HA)と相互作用するNKp46と特異的に相互作用する特定のT細胞分集団やT細胞レセプターの抗原結合部位を認識するものである、

請求項1ないし5記載の多機能ポリペプチド。 30

【請求項 7】

該腫瘍関連抗原が、Lewis Y、Muc-1、erbB-2、-3および-4、EPCAM、EGF-レセプター(例えばEGFRタイプIまたはEGFRタイプII)、EGFR欠失ネオエピトープ、CA19-9、Muc-1、LeY、TF-、Tn-およびsTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora抗原、CD7、CD19およびCD20、CD22、CD25、Ig- およびIg-、A33およびG250、CD30、MCSPおよびgp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS)レセプタータイプII、カーボアンヒドラーゼ9、F19-抗原、Ly6、デスモグレイン4、PSCA、Wue-1、GD2およびGD3、および、TM4SP-抗原(CD63、L6、CO29、SAS)または胎児型アセチルコリンレセプター(ACHR)のアルファおよびガンマサブユニット、からなる群より得られられる請求項6記載の多機能ポリペプチド。 40

【請求項 8】

感染細胞に対する該表面マーカーが、ヒトレトロウイルス(HTLV IおよびII、HIV1および2)またはヒトヘルペスウイルス(HSV1および2、CMV、EBV)等の 50

ウイルスエンベロープ抗原；インフルエンザウイルスA、BまたはC等の血球凝集素；風疹ウイルスの糖タンパク質E1およびE2、または、狂犬病ウイルスのRGP；からなる群より選ばれる請求項6記載の多機能ポリペプチド。

【請求項9】

二重特異性抗体である請求項1ないし8いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項10】

該多機能ポリペプチドが合成、キメラおよびヒト化抗体からなる群より選ばれる請求項9記載の多機能ポリペプチド。

【請求項11】

単鎖である請求項1ないし10いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

10

【請求項12】

該2つのドメインがポリペプチドリンカーにより結合されている請求項1ないし10いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項13】

該第1および/または第2のドメインが天然抗体のV_HおよびV_L領域を真似たものもしくはこれらに相当するものである請求項1ないし12いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項14】

該ドメインの少なくとも1つが抗体の可変領域の単鎖フラグメントである請求項1ないし13いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

20

【請求項15】

該ドメインがV_LNKG2D-V_HNKG2D-V_HTA-V_L-TAまたはV_LTA-V_HTA-V_HNKG2D-V_LNKG2Dの順で並び、ここで、TAが標的抗原を示すものである、請求項1ないし14いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項16】

該標的抗原がLewis Y、Muc-1、erbB-2、-3および-4、Ep-CAM、EGF-レセプター（例えばEGFRタイプIまたはEGFRタイプII）、EGFR欠失ネオエピトープ、CA19-9、Muc-1、LeY、TF-、Tn-およびsTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora抗原、CD7、CD19およびCD20、CD22、CD25、Ig-およびIg-、A33およびG250、CD30、MCSPおよびgp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS)レセプタータイプII、カーボアンヒドラーゼ9、F19-抗原、Ly6、デスモグレイン4、PSCA、Wue-1、GD2およびGD3、および、TM4SP-抗原（CD63、L6、CO29、SAS）、胎児型アセチルコリンレセプター（AChR）のアルファおよびガンマサブユニット、からなる群より選ばれる請求項15記載の多機能ポリペプチド。

30

【請求項17】

該ポリペプチドリンカーが複数のグリシン、セリンおよび/またはアラニン残基を含む請求項12ないし16いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項18】

該ポリペプチドリンカーが複数のアミノ酸配列の連続した複製を含む請求項12ないし17いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

40

【請求項19】

該ポリペプチドリンカーが、1から5、5から10、または10から15のアミノ酸残基を含む請求項12ないし18いずれかに記載のポリペプチド。

【請求項20】

該ポリペプチドリンカーが、Gly-Gly-Gly-Gly-Serのアミノ酸配列を含む請求項4ないし19いずれかに記載の多機能ポリペプチド。

【請求項21】

少なくとも1つの更なるドメインを含む請求項1ないし20いずれかに記載の多機能ポリ

50

ペプチド。

【請求項 2 2】

該更なるドメインが共有結合または非共有結合により結合している請求項 2 1 記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 2 3】

該少なくとも 1 つの更なるドメインが、生物学的活性に適した立体配座であり、イオンを封鎖したり固体担体やあらかじめ選択された決定基に選択的に結合する能力のある立体配座を有するエフェクター分子を含む請求項 2 1 または 2 2 記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 2 4】

該更なるドメインが、補助刺激機能および/または補助活性化機能を付与する請求項 2 1 ないし 2 3 いずれかに記載の多機能ポリペプチド。 10

【請求項 2 5】

該補助刺激機能が CD 2 8 - リガンドまたは CD 1 3 7 - リガンドにより媒介される請求項 2 4 記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 2 6】

該 CD 2 8 - リガンドまたは CD 1 3 7 - リガンドが、B 7 - 1 (CD 8 0)、B 7 - 2 (CD 8 6)、アプタマ -、抗体、またはこれらの機能性フラグメントもしくは機能性誘導体である請求項 2 5 記載の多機能ポリペプチド。

【請求項 2 7】

発現により請求項 1 ないし 2 6 いずれかに記載の多機能ポリペプチドおよび/または多機能ポリペプチドの機能性部分をエンコードするポリヌクレオチド。 20

【請求項 2 8】

請求項 2 7 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 9】

請求項 2 7 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 8 記載のベクターをトランスフェクションした細胞。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 記載の細胞を培養し、請求項 1 ないし 2 6 いずれかに記載の多機能ポリペプチドもしくはこれらの機能部分を培養物から分離することを含む、該多機能ポリペプチドおよび/または多機能ポリペプチドの部分の調製方法。 30

【請求項 3 1】

請求項 1 ないし 2 6 いずれかに記載のポリペプチド、請求項 2 7 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 2 8 に記載のベクターを含む組成物。

【請求項 3 2】

補助刺激機能および/または補助活性化機能を付与する分子を更に含む請求項 3 1 記載の組成物。

【請求項 3 3】

該補助刺激機能が CD 2 8 - リガンドまたは CD 1 3 7 - リガンドにより媒介される請求項 3 1 記載の組成物。

【請求項 3 4】

該 CD 2 8 - リガンドまたは CD 1 3 7 - リガンドが、B 7 - 1 (CD 8 0)、B 7 - 2 (CD 8 6)、アプタマ -、抗体、またはこれらの機能性フラグメントもしくは機能性誘導体である請求項 3 1 記載の組成物。 40

【請求項 3 5】

医薬組成物であって、任意に医薬的に許容可能なキャリアーを更に含む請求項 3 1 ないし 3 4 いずれかに記載の組成物。

【請求項 3 6】

診断組成物であって、任意に検出に適した手段を更に含む請求項 3 1 ないし 3 5 いずれかに記載の組成物。

【請求項 3 7】

癌、感染および/または自己免疫状態、癌、即ち、悪性（充実性）腫瘍；造血癌形態（白血病およびリンパ腫）；良性前立腺肥大（BPH）、甲状腺や他の内分泌腺の自律性腺腫または結腸の腺腫のような良性腫瘍；悪性腫瘍の初期段階；ウイルス、バクテリア、真菌、原虫や蠕虫による感染性疾患；疾患を起こす免疫細胞の分集団の削減が要求される自己免疫疾患；移植による拒絶反応やアレルギーの防止、の治療に用いる医薬組成物の調製のための請求項1ないし26いずれかに記載の多機能ポリペプチド、請求項27記載のポリヌクレオチドまたは請求項28記載のベクターの使用。

【請求項38】

該感染がウイルス、バクテリアまたは真菌感染であり、該癌が頭部および頸部の癌、胃癌、食道癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌腫、肝臓および肝臓内の胆管の癌、膵臓癌、肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、乳癌腫、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、肉腫、横紋筋肉腫、リンパ腫、濾胞性非ホジキンリンパ腫、白血病、T-またはB-細胞白血病、ホジキンリンパ腫、B-細胞リンパ腫、卵巣腫瘍、子宮癌、頸部の癌、前立腺癌、生殖器の癌、腎臓癌、精巣癌、甲状腺癌、膀胱癌、プラズマ細胞腫または脳腫瘍であり、該自己免疫状態が強直性脊髄炎、急性前部ブドウ膜炎、グッドパスチャー症候群、多発性硬化症、グレーブズ病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、インシュリン依存性糖尿病、慢性関節リウマチ、尋常性天疱瘡、橋本甲状腺炎または自己免疫性肝炎である、請求項37記載の使用。

10

【請求項39】

遺伝子治療の組成物の調製のための請求項27記載のポリヌクレオチドまたは請求項28記載のベクターの使用。

20

【請求項40】

請求項1ないし26いずれかに記載のポリペプチド、請求項27記載のポリヌクレオチド、請求項28記載のベクター、請求項35記載の組成物を悪性疾患や疾患を受けた哺乳動物に導入することを含む癌、感染または自己免疫状態の治療方法。

【請求項41】

請求項1ないし26いずれかに記載のポリペプチド、請求項27記載のポリヌクレオチド、請求項28記載のベクターまたは請求項35記載の組成物を病的状態にある哺乳動物に導入することを含む病的状態を遅らせる方法。

【請求項42】

該哺乳動物がヒトである請求項40または41記載の方法。

30

【請求項43】

請求項1ないし26いずれかに記載の多機能ポリペプチド、請求項27記載のポリヌクレオチド、請求項28記載のベクター、請求項29記載の細胞または請求項31ないし36いずれかに記載の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、NKGDレセプター複合体の細胞外のエピトープを特異的に認識する結合部位を含む第1のドメインと、レセプターまたはリガンド機能を有する第2のドメインを含む多機能ポリペプチドに関する。更に、本発明は、多機能ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド、該ポリペプチドを含むベクター、該ポリヌクレオチドまたは該ベクターを含む細胞に関する。この発明は、また、上述したいずれかの分子を単独または組み合わせて含む組成物に関し、また、この発明の多機能ポリペプチドの特定の医療用途にも関する。

40

いくつかの文献が、本明細書の本文の中で引用される。これらの文献のそれぞれの開示された内容は（製造者の説明書や手順書等を含む）、本明細書の一部としてここに引用する。

先行技術文献に記載された多数の多機能ポリペプチド化合物は、悪性または感染標的細胞に対する免疫エフェクター細胞を再標的化するために開発された様々な分子形態の二重特異性抗体であり、血液循環からの病原体や自己抗体を除去し、投薬治療を補強し、または

50

、ワクチンや放射性同位体等の担体とするものである。標的細胞に対する免疫エフェクター細胞の細胞毒活性を再誘導するために設計された二重特異性抗体は、通常は、標的細胞上の腫瘍に関連したまたはウイルスの抗原を認識する結合部位およびエフェクター細胞上の引き金となる分子と相互作用する第2の結合部位を含む。二重特異性抗体アプローチとして先行技術文献に採用されたエフェクター細胞としては、T-リンパ球、NK細胞、単球および多形核好中球であった。二重特異性抗体の引き金分子は、通常、CD64、CD16、 α -T細胞レセプター(TCR)およびCD3からなる細胞表面レセプターの群から選ばれ、また、CD2、CD89、CD32、CD44、CD69およびTCR-ゼータ鎖のような他の引き金分子も評価されていた。細胞毒性T-リンパ球(表現型: $CD3^+ / CD56^- / CD8^+$)を標的細胞に再誘導する能力のある二重特異性抗体は、いずれもTCR、CD3、ゼータ鎖またはCD2への結合部位を含んでいる。しかし、TCR-複合体それ自身のいずれのエピトープも影響を受けるので(TCR、CD3またはゼータ鎖)、またはその細胞質テールと関連してsrc関連タンパク質チロシンキナーゼLckと、TCR-複合体との凝集によりTCR-シグナルに直接寄与する分子であるCD2の場合は、これらの引き金分子と結びつけることにより、TCR-複合体を経由する抗原特異的シグナル伝達は妨害される。

10

【0002】

従って、技術的課題は、それらの細胞溶解性リンパ球のレセプター特異性および/または機能を妨害することなく疾患関連細胞の直ぐ近傍においてリンパ球の特異的活性を増強する多機能ポリペプチドを提供することであった。

20

【0003】

該技術的課題の解決は、特許請求の範囲に特徴付けられる態様として提供することによりなされる。

【0004】

従って、本発明は、NKGD2レセプター複合体の細胞外エピトープを特異的に認識する結合部位を含む第1のドメインと、レセプターまたはリガンド機能を有する第2のドメインを含む多機能ポリペプチドに関する。

【0005】

本発明に関連して「多機能ポリペプチド」の用語は、3つ、4つ、5つまたは6つの異なった生物学的機能のように少なくとも2つの以上の*in vivo*または*ex vivo*状態などの病理学を含めた生理学的などに適した状態(*in vitro*も含む)下で効果を有するポリペプチドを意味する。生理学的な*in vitro*状態には、pH範囲が5から9のリン酸バッファー溶液のようなバッファー溶液を含み、また添付の実施例からも更に導き出されるものである。これらの機能は、以下に更に特定される。これらは、特定されたドメインと、ここで更に特定される分子との結合を含む。結合は、その後、カスケードの開始、レセプターへの結合、シグナル伝達経路または遺伝子発現の調整および/またはアポトーシス的な細胞死への影響などの、更なる生物学的機能の引き金となるであろう。異なる生物学的機能を付与する少なくとも2つのこれらのドメイン、好ましくはここで特定される2つのドメインは、自然と一緒に発生するものではなく、即ち、この立体配置または同一のポリペプチド、タンパク質またはタンパク質複合体のいずれも自然には、発生しないものである。

30

40

【0006】

「レセプターまたはリガンド機能」の用語は、好ましくは適合リガンドを有する細胞表面に位置する自然に発生するレセプターのような、分子の自然に発生するかまたは自然に発生しない結合機能のことを言う。このようなレセプター/リガンド対の例としては、抗体/抗原、Igスーパーファミリーの他のメンバーおよびこれらに相当するリガンド、ホルモンレセプター/ホルモンまたは炭水化物/レクチン相互作用がある。リガンドは、一般的に、しかし排他的にはなく、自然の結合相手を有する分子を意味する。上記に対応して、これらは、抗原またはホルモンでもよい。しかし、これらは、非天然の立体配置や由来のものでもよい。上述したようなレセプター/リガンドは、天然由来、組換え体または

50

(半)合成由来のものでもよい。

【0007】

NKG2Dは、DAP10とともにNKG2Dレセプター複合体を形成する(Wu(1999) Science 285;730)C型レクチン様NK細胞レセプターである(Houchins(1991)J. Exp. Med. 172:1017)。DAP10は、その細胞質ドメイン中のPL₃-キナーゼの活性配列モチーフを運び、その細胞質ドメイン中にシグナル伝達モチーフを欠いたNKG2Dへのシグナル導入モジュールとして働く。このレセプター複合体の結びつけは、NK細胞の細胞毒性を誘発するシグナル伝達カスケードの引き金となる。他のNK細胞レセプターのように、NKG2Dレセプター複合体は、特定のT細胞サブセット中、主に / - T細胞、CD8⁺ / - T細胞および減少する小数のCD4⁺ / - T細胞中で、発現していることも見出されている(Bauer(1999) Science 285:727)。

10

【0008】

NK細胞は、体液性免疫反応の優勢なエフェクターであり、これは、これらの表面Fc-レセプターCD16へのIgG-抗体の結合を通じて抗原特異性を獲得する。従って、CD16は、抗体武装NK細胞が抗原特異性により標的細胞を破壊できるようにする特異的抗原レセプターとして働く。

【0009】

T-リンパ球は、細胞性免疫反応のエフェクターであり、これは、特異的抗原レセプターとしてTCR-複合体を運ぶものである。TCR-複合体は、クローン型抗原特異性を付与する2つの可変鎖とともに、CD3-複合体およびゼータ鎖を含むいくつかの不変鎖により構成される。TCR-複合体中に見出される可変鎖の型に依存して(- および - 鎖であるか - および - 鎖であるかのいずれか)、T-リンパ球は、 / - および / - T細胞に分類することができる。細胞毒性T-リンパ球、即ち、CD8⁺ / - T細胞および / - T細胞によるTCRに媒介される標的細胞の認識は、通常、標的細胞の溶解につながる。

20

【0010】

既知のリンパ球誘導の二重特異性抗体の主要なものは、NK細胞またはT細胞のいずれかのみをリクルートする。NK細胞は、通常、Fc-レセプターIIIA複合体の主要な細胞外部分を形成しながら、CD16との結びつけを通じてリクルートされる。一方、T細胞のリクルートは、通常、T細胞レセプター(TCR)の不変多重鎖部分において、CD3との結びつけを通じて媒介される。T細胞のTCRと同様に、NK細胞のCD16に関連したゼータ鎖において誘導される二重特異性抗体は、エフェクターリンパ球の双方の型を結びつける能力を有する(WO00/03016)。しかし、CD3において誘導されるもののように、ゼータ鎖において誘導される二重特異性抗体は、非細胞毒性CD4⁺T細胞も活性化し、これは、in vivoで異なったCD8⁺T細胞が望ましくない副作用の一因となるものである。例えば、これは、標的細胞の細胞毒性による除去に基本的に寄与することなく、全身的にサイトカインを放出することによるものである。

30

【0011】

この発明のNKG2D特異的多機能分子は(これは、好ましい態様の、上述した第1と第2のドメインを含む二重機能性分子である)、先行技術で知られたリンパ球誘導の二重特異性抗体とは対照的に、通常細胞毒性ではないCD4⁺ / - T細胞のような他の細胞型には基本的には触れずに、例外的な正確さをもって、細胞毒性の表現型を自然に運ぶリンパ球の全範囲、即ち、NK細胞、CD8⁺ / - T細胞および / - T細胞、をリクルートする能力を有する。

40

【0012】

本発明に用いられる「細胞毒性リンパ球のリクルート」の用語は、再誘導された溶解のみに限定されず、細胞毒性とT細胞プライミングの補強も含むものである。

【0013】

従って、この発明のNKD2D誘導の分子は、徹底的かつ排他的にすべての等価の細胞毒

50

性リンパ球をリクルートするという正確さのために、独特のものである。先行技術で知られているリンパ球誘導の二重特異性抗体との異なる相違として、本発明の多機能分子は、対応するシグナル伝達カスケードの上流の細胞質の段階などの、細胞毒性リンパ球の特異的抗原レセプターと直接および間接のいずれでも結びつかない。即ち、この発明の多機能ポリペプチドがこれらに結合しないため、T細胞レセプター複合体の機能が損なわれることはない。T細胞レセプターにより付与されるシグナルのシグナル伝達カスケードの下流は、このため、この発明の多機能ポリペプチドとの相互作用により影響されることはない。その結果、細胞毒性リンパ球の活性化および/または増殖は選択的に支援され、これは、その抗原レセプター特異性のために、この発明の多機能分子により認識される標的細胞に対する特異的免疫反応に結び付けられるものである。

10

【0014】

T - およびNK - 細胞の該上流シグナル伝達カスケードは、下流シグナル伝達カスケードのエフェクター分子のリクルートを担うITAMポリペプチド、Srcキナーゼ、ZAP-70/SykおよびLATとSLP-76のようなアダプタータンパク質を含むものである。下流シグナル伝達カスケードは、PLC、Grb2、Vav、CblおよびNckと同様にPI3キナーゼのような分子を含むものである。

【0015】

特異的抗原レセプターとの結びつきおよび/または対応するシグナル伝達カスケードの上流の細胞質段階を避けることにより、この発明の多機能ポリペプチドは、NK細胞のFcレセプター複合体のCD16やTリンパ球のTCR複合体のCD3成分に結合するなどの、先行技術で知られた他のリンパ球誘導の二重特異性抗体よりも、特異的抗原認識の小さい度合いで有利に作用する。特に、標的細胞の特異的免疫反応により媒介されるリンパ球エフェクターの機能は、先行技術の二重特異性抗体による特異的抗原レセプターとの結びつきおよび/または対応するシグナル伝達カスケードの上流の細胞質段階を通じて、支配されうる。一方、NKG2Dレセプター複合体により結びつけられるこの発明の多機能分子は、特異的抗原レセプターおよび細胞質のシグナル伝達カスケードの上流段階のいずれにも直接に関連付けられるものではないが、特異的抗原レセプターを通じて同じ標的細胞を認識する細胞毒性リンパ球の活性化を補強することができる。

20

【0016】

これは、添付の実施例に記載されている驚くべき結果を説明するものである。そして、その実施例とは、

30

【0017】

(i) 抗原特異的T細胞レセプター複合体との結びつきを通じて媒介される強いプライミングシグナル、および

(ii) 第2のT細胞シグナルの優勢な媒体であるB7-1により供給される最高の補助刺激、

の存在にもかかわらず、NKG2Dに媒介されるシグナルは、ナイーブCD8⁺T細胞のプライミングを加速することができるというものである。

【0018】

更に、TCR - 複合体またはCD16との結びつきによりそれぞれ引き起こされるCD8⁺T細胞およびNK細胞の細胞毒性が、NKG2Dに媒介されるシグナルを通じて補強されるという驚くべき発見もある(実施例6)。

40

【0019】

しかし、最も驚くべきことに、T - 細胞のプライミングと同様にNK - およびT - 細胞の細胞毒性は、NKG2D誘導の抗体分子によってでさえ補強され、これら自身では実施的に再誘導された溶解は引き起こされない(実施例5および6)。

【0020】

従って、細胞毒性リンパ球をリクルートする異なった性質を有するこの発明の多機能NKG2D誘導ポリペプチドは、異なった目的に有利に選択されるであろう。例えば、純粋な免疫調節が必要な場合、NKG2D誘導の分子が好まれ、これは、それ自身による再誘導

50

の溶解を引き起こさない。しかし、リンパ球細胞毒性を直接引き起こす多機能NK G 2 D誘導ポリペプチドが用いられたときに、標的細胞の除去がより明確になるであろう。しかも、多機能NK G 2 D誘導ポリペプチドは、CD 8⁺ T細胞とNK細胞を別々にリクルートするものであり、ある特定の応用にも好ましいものとなりうる。

【0021】

本発明の方法の好ましい態様として、該結合部位は、免疫グロブリン鎖の結合部位である。

【0022】

本発明の方法の他の好ましい態様として、該結合部位は、該レセプター複合体の天然NK G 2 Dリガンドである。

【0023】

本発明の方法の特に好ましい態様として、該天然NK G 2 Dリガンドは、MIC - A、MIC - B、ULBP 1およびULBP 2からなる群より選ばれる。

【0024】

本発明の方法の他の好ましい態様として、該結合部位は、NK G 2 DまたはDAP 10の細胞外エピトープを特異的に認識する。

【0025】

更に、本発明の方法の好ましい態様として、該レセプターまたはリガンド機能は、腫瘍関連抗原、感染性因子の抗原、または、該腫瘍関連抗原や表面マーカーと相互作用する識別抗原(CD抗原)、天然リガンド、レセプター、これらのフラグメントまたはこれらの修飾体のような細胞の分集団の表面マーカー、に対する抗体、フラグメントまたはこれらの誘導体の抗原結合部位であり、好ましくは、腫瘍関連抗原のerbB - 2、 - 3、 - 4に結合するヘレグリン、HIV感染細胞のgp 120と相互作用するCD4、メラノサイトおよびこれら由来の腫瘍(悪性黒色腫)のMSHレセプターに結合するメラノサイト刺激ホルモン(MSH)もしくは相当するケモカインレセプターに結合するケモカインまたはあらかじめ定義された特異性のT細胞レセプターに結合するペプチドと複合体を形成するMHC分子やこれらのフラグメントであり従ってあらかじめ定義されたMHCペプチド複合体やインフルエンザウイルスの血球凝集素(HA)と相互作用するNKp46と特異的に相互作用する特定のT細胞分集団やT細胞レセプターの抗原結合部位を認識するものである。

【0026】

インフルエンザウイルスの血液凝集素が、NK細胞を直接活性化すると同様に、NK細胞によるウイルス感染標的細胞の溶解を補強することが、これまでの報告に示された(Trinchiere, Adv. Immunol. 47 (1989), 187-376 and Alsheikhly, Scand J Immunol., 17 (1983), 129-38 and Alsheikhly, Scand J Immunol. 22 (1985), 529-38)。NKp46の細胞外ドメインと免疫グロブリン(Ig)のFc部からなる融合タンパク質が、一時的にトランスフェクションされた293細胞の細胞表面に発現した血液凝集素 - ノイラミニダーゼ(HN)糖タンパク質に直接結合することが、ごく最近示された(Mandelboim, Nature 409 (2001), 1055-60)。健康なドナーの抹消血液リンパ球由来のNK系であるNK Gal細胞の添加は、非トランスフェクションの細胞より少なくとも4倍以上のHN - トランスフェクション293T細胞の溶解を引き起こした(Mandelboim, Nature 409 (2001), 1055-60)。同様の結果が、インフルエンザウイルス感染の標的細胞でも得られた。これらのデータは、NKp46と血液凝集素との直接の相互作用があることを示し、更に、NK細胞によるインフルエンザウイルス感染細胞の除去の機構が、ウイルス感染細胞上に表出した血液凝集素(HA)とNK細胞表面に表出したNKp46との相互作用によるものであることを示すものである。

【0027】

10

20

30

40

50

インフルエンザウイルスの血液凝集素 (HA) と結合できる該レセプターまたはリガンド機能は、例えば以下のようなモノクローナル抗体由来のものである。

【0028】

a) インフルエンザ A ウイルス株 H3 の 155, 159, 188, 189, 193, 198, 199, 201 残基に結合するモノクローナル抗体 IIB4 (Kostolansky, J Gen 81 (2000), 1727-35)。

【0029】

b) H3N2 インフルエンザ A 株の HA を認識するインフルエンザウイルス A / A i c h i / 2 / 68、A / V i c t o r i a / 3 / 75 および A / P h i l i p p i n e s / 2 / 82 (すべて H3N2) からのプロメライン - 切断血液凝集素 (BHA) により順次免疫されたマウス由来のモノクローナル抗体 LMBH6 (Vanlandschoot, J. Gen. Virol. 79 (1998), 1781-91)。

【0030】

c) HA - H2 のステム領域に誘導されたモノクローナル抗体 (MoAb) C179 (Lipatov, Acta Virol. 41 (1997), 337-40)。

【0031】

この態様において、該第2のドメインは、ひとつの好ましい態様として、癌、ウイルス感染または自己免疫状態等のヒトの疾患の病的進行に伴う細胞表面分子の細胞外部分である抗原を示すものである。このような標的細胞の除去や機能的沈静化は、この発明の二重機能分子の *in vivo* への応用により容易にでき、従って、治療における利益を与えるものとなる。

【0032】

該抗体の「フラグメント」は、完全な抗体の結合特異性を保持し、Fab, F(ab')₂ および Fv フラグメントを含むものである。該抗体の「誘導體」も、結合特異性を保持し、scFv フラグメントを含むものである。更なる情報としては、Marlow および Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press, Cold Spring Harbor 1988 を参照のこと。

【0033】

ヒト癌疾患は、例えば、乳癌腫、乳癌、結腸癌、膵臓癌、卵巣癌、腎臓細胞および頸部の癌腫、黒色腫、小細胞肺癌 (SCLC)、頭部および頸部の癌、胃癌、横紋筋肉腫、前立腺癌、濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL)、B細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、T および B細胞白血病およびホジキンリンパ腫のような癌である。

【0034】

腫瘍関連抗原は、CEA (Sundblad Hum. Pathol. 27, (1996) 297-301, Ilantzis Lab. Invest. 76 (1997), 703-16)、EGFR タイプ I (Nouri, Int. J. Mol. Med. 6 (2000), 495-500) および EpCAM (17-1A / KSA / GA733-2, Balzar J. Mol. Med. 77 (1999), 699-712) のような汎癌膜抗原を含む。EGFR タイプ I はグリオーム、結腸癌腫の EpCAM、MRD (最小残留疾患)、結腸癌腫で特に過剰発現する。EGFR タイプ II (Her-2, ErbB 2, Sugano Int. J. Cancer 89 (2000), 329-36) は、乳癌腫で調整され、TAG-72 糖タンパク質 (sTN 抗原, Kathan Arch. Pathol. Lab. Med. 124 (2000), 234-9) は、乳癌で発現するのが見出されている。EGFR 欠失ネオエピトープは、腫瘍関連抗原としても働くであろう (Sampson Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), 7503-8)。抗原 A33 (Ritter Biochem. Biophys. Res. Commun. 236 (1997), 682-6), Lewis-Y (DiCarlo Onco. 1 Rep. 8 (2001), 387-92)、Cora 抗原 (CEA - 関連細胞吸着分子 CEACAM 6, CD66c, NCA-90, Kinugasa Int. J. Cancer 76 (1998),

148-53) および MUC-1 (ムチン) は、結腸癌腫に関連する (Iida Oncol. Res. 10 (1998), 407-14)。Thomsen Friedenreich-抗原 (TF, Gal1-3GalNAc6S-O-Thr/Ser) は、結腸癌腫のみならず (Baldus Cancer 82 (1998), 1019-27)、乳癌においても見出されている (Glinisky Cancer. Res. 60 (2000), 2584-8)。頭部および頸部の癌での Ly-6 および デスモグレイン 4 の過剰発現 (Eshel J. Biol. Chem. 275 (2000), 12833-40)、および、胃癌腫での E-カドヘリンネオオピトープの過剰発現が、記載されている (Fukudome Int. J. Cancer 88 (2000), 579-83)。前立腺特異的膜抗原 (PSMA, Lapidus Prostate 45 (2000), 350-4)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA, Gu Oncogene 191 (2000) 288-96) および STEAP (Hubert, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999), 14523-8) は、前立腺癌に関連する。胎児型アセチルコリンレセプター (AChR) のアルファおよびガンマサブユニットは、横紋筋肉腫の特異的な免疫組織化学的マーカーである (RMS, Gattenlohner Diagn. Mol. Pathol. 3 (1998), 129-34)。

【0035】

CD20 と濾胞性非ホジキンリンパ腫との関連 (Yatabe Blood 95 (2000), 2253-61, Vose Oncology (Huntingt) 2 (2001) 141-7)、CD19 と B-細胞リンパ腫との関連 (Kroft Am. J. Clin. Pathol. 115 (2001), 385-95)、Wue-1 プラズマ細胞抗原と多発性骨髄腫との関連 (Greiner Virchows Arch 437 (2000), 372-9)、CD22 と B 細胞白血病との関連 (dArena Am. J. Hemato. 64 (2000), 275-81)、CD7 と T 細胞白血病との関連 (Porwit-MacDonald Leukemia 14 (2000), 816-25) および CD25 と特定の T および B 細胞白血病との関連が、記載されている (Wu Arch. Pathol. Lab. Med. 124 (2000), 1710-3)。CD30 は、ホジキンリンパ腫と関連付けられた (Mir Blood 96 (2000), 4307-12)。黒色腫のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (MCSP, Eisenmann Nat. Cell. Biol. 8 (1999), 507-13) とガングリオシド GD3 の発現が、黒色腫で観察された (Welte Exp Dermatol 2 (1997), 64-9)。一方、GD3 が、小細胞肺癌でも見出されている (SCLC, Brezicka Lung Cancer 1 (2000), 29-36)。ガングリオシド GD2 の発現が、SCLC および神経芽細胞腫でも調整されていた (Cheresh et al. Cancer Res. 10 (1986), 5112-8)。卵巣癌は、ミューレリアン阻害基質 (MIS) レセプタータイプ II と関連し (Masiakos Clin. Cancer Res. 11 (1999), 3488-99)、腎臓癌は、頸部癌と同様にカーボアンハイドラーゼ 9 の発現と関連していた (MN/CAIX, Grabmaier Int. J. Cancer 85 (2000) 865-70)。CA19-9 の上昇した発現レベルが、膵臓癌で見出された (Nazli Hepatogastroenterology 47 (2000), 1750-2)。

【0036】

本発明の方法の最も好ましい態様として、該腫瘍関連抗原は、Lewis Y、CEA、Muc-1、erbB-2、-3 および -4、Ep-CAM、E-カドヘリンネオエピトープ、EGF-レセプター (例えば、EGFR タイプ I または EGFRTIタイプ II)、EGFR 欠失ネオエピトープ、CA19-9、Muc-1、LeY、TF-、Tn- および sTn- 抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora 抗原、CD7、CD1

9 および CD 20、CD 22、CD 25、Ig - および Ig - 、A 33 および G 25
0、CD 30、MCSP および gp 100、CD 44 - v 6、MT - MMPs、(MIS
)レセプタータイプ II、カーボアンハイドラーゼ 9、F 19 - 抗原、Ly 6、デスモグ
レイン 4、PSCA、Wue - 1、GD 2 および GD 3、および、TM 4 SF - 抗原 (C
D 63、L 6、CO - 29、SAS) または胎児型アセチルコリンレセプター (ACh
R) のアルファおよびガンマサブユニット、からなる群より選ばれる。

【0037】

インフルエンザ A、B および C は、すべてセグメント化されたゲノムを有しているが、特
定のインフルエンザ A サブタイプとインフルエンザ B のみが、ヒトに対する重症の疾患の
原因となる。インフルエンザの 2 つの主要なタンパク質は、表面糖タンパク質 - 血液凝集
素 (HA) とノイラミニダーゼ (NA) である。血液凝集素 (HA) は、宿主細胞レセプ
ターとの結合およびウイルス粒子の膜融合に関連し、抗体の中和の主要な標的を示す。イ
ンフルエンザの感染力は、特定の宿主のプロテアーゼによる HA の切断に依存する。ここ
で、NA は、細胞からの子孫ウイルス粒子の放出に関連する。自然のインフルエンザの宿
主である鳥では、ウイルスは、胃腸感染の原因となり、排泄物 - 経口ルートを通じ伝染す
る。哺乳動物では、インフルエンザサブタイプの複製は、呼吸性上皮細胞に限られている
が、全身的な合併症も起こりうる。

10

【0038】

風疹ウイルス (RV) は、はしかとして知られる疾患の原因物質である。風疹は、小児期
に多い疾患であり、世界中にわたって風土性のものである。風疹の自然感染は、ヒトにお
いてのみ起こり通常は軽いものであるが、大人では多発性関節痛などの合併症が起こるこ
とがある。妊娠期間の最初の 3 分の 1 の間での女性への RV の感染は、先天性風疹症候群
(CRS) として知られる、新生児の種々の先天性欠陥を引き起こす。RV 感染が奇形発
生に結びつくという経路は、解明されてはいない。感染した胎児組織についての細胞病理
学は、器官形成に伴う前駆体細胞の細胞分化の阻害とともに、ネクローシスおよび/また
はアポトーシスが起こることを示唆している。風疹ウイルス (RV) 粒子は、2 つの糖化
膜タンパク質、E 1 および E 2 を含んでおり、これは、ヘテロダイマーとして存在し、ウ
イルス粒子表面にウイルススパイク複合体を形成する。E 1 - E 2 ヘテロダイマーの形成
は、細胞内輸送と、E 1 および E 2 双方の細胞表面での発現に不可欠のものである (Y
a n g , J . V i r o l . 7 2 (1 9 9 8) , 8 7 4 7 - 8 7 5 5) 。風疹ウイ
ルス感染細胞で発現する糖タンパク質 E 1 および E 2 は、この発明の多機能ポリペプチド
が結合する標的分子である。

20

30

【0039】

狂犬病は、野生生物にとり重大な疾患であり、犬における狂犬病は世界の多くの開発途上
国で今もなお主要な公衆衛生の問題である。狂犬病ウイルスは、動物が噛むことによる唾
液を通じて伝染する。ごく最近、しばしば暴露したと気がつかないうちに、こうもりがヒ
トへの狂犬病を伝染することが発見された。この古典的な形態では、狂犬病はよく知られ
ているが、ランドリー - ギャン - バレー症候群と診断されるこれに似た症例の麻痺性の疾
患の場合、疑わしい問題が残る。狂犬病に暴露した後は、非免疫患者の場合、創傷部位の
洗浄、狂犬病ワクチンおよびヒト狂犬病 - 特異的免疫グロブリンの投与により、狂犬病を
防ぐことができる。

40

【0040】

狂犬病糖タンパク質 RGP は、狂犬病ウイルス感染の生物学的および病理学的に重要な 5
05 アミノ酸のタイプ I の膜透過糖タンパク質である。RGP は、宿主による中和抗体の
発生も刺激する。N - 架橋糖化は、免疫原性および GRP の細胞表面の発現に必要なもの
である (Wojczyk, Biochemistry 34 (1995), 259
9 - 2609)。感染細胞表面に発現した狂犬病ウイルスの RGP は、この発明の多機能
ポリペプチドが結合する標的分子である。

【0041】

本発明の方法の他の最も好ましい態様として、感染細胞の該表面マーカーは、ヒトレトロ

50

ウイルス（HTLV IおよびII、HIV 1および2）やヒトヘルペスウイルス（HSV 1および2、CMV、EBV）等のウイルスエンベロープ抗原、インフルエンザウイルス（インフルエンザA、BまたはC）等の血液凝集素、風疹ウイルスの糖タンパク質E 1およびE 2や狂犬病ウイルスの糖タンパク質RGP、からなる群より選ばれる。

【0042】

本発明の方法の他の好ましい態様として、該多機能ポリペプチドは、二重特異性分子、好ましくは二重特異性抗体である。二重特異性抗体の構造および世代についての更なる情報は、WO/00/06605を参照のこと。

【0043】

本発明の方法の特に好ましい態様として、該多機能ポリペプチドは、合成、キメラおよびヒト化抗体からなる群より選ばれる。 10

【0044】

本発明の方法の更に好ましい態様として、該多機能ポリペプチドは、単鎖である。

【0045】

本発明の方法の更なる好ましい態様として、該2つのドメインは、ポリペプチドリンカーにより結合されている。

【0046】

本発明の方法の他の好ましい態様として、該第1および/または第2のドメインは、天然抗体のV_HおよびV_L領域を真似たものもしくはこれに相当するものである。このような抗体の例には、ヒト、ネズミ、ラット、らくだの抗体；不朽化B-細胞（例えばハイブリドーマ細胞）、コンビナトリアル抗体ライブラリーの*in vitro*部分（例えばブラージュディスプレイによる）またはIgトランスジェニックマウス由来の抗体が含まれる。 20

【0047】

本発明の方法の更に好ましい態様として、該ドメインの少なくともひとつは、該抗体の可変領域の単鎖のフラグメントである。

【0048】

本発明の方法の更なる好ましい態様として、該ドメインは、V_LNKG2D-V_HNKG2D-V_HTA-V_L-TAまたはV_LTA-V_HTA-V_HNKG2D-V_LNKG2Dの順で並ぶものであり、ここでTAは標的抗原を示す。 30

【0049】

本発明の方法の特に好ましい態様として、該腫瘍関連抗原は、Lewis Y、CEA、Muc-1、erbB-2、-3および-4、Ep-CAM、E-カドヘリンネオエピトープ、EGF-レセプター（例えばEGFR タイプIまたはEGFR タイプII）、EGFR欠失ネオエピトープ、CA19-9、Muc-1、LeY、TF-、Tn-およびsTn-抗原、TAG-72、PSMA、STEAP、Cora抗原、CD7、CD19およびCD20、CD22、CD25、Ig- およびIg-、A33およびG250、CD30、MCSPおよびgp100、CD44-v6、MT-MMPs、(MIS)レセプタータイプII、カーボアンヒドラーゼ9、F19-抗原、Ly6、デスモグレイン4、PSCA、Wue-1、GD2およびGD3、および、TM4SP-抗原（CD63, L6, CO-29, SAS）、胎児型アセチルコリンレセプター（AChR）のアルファおよびガンマサブユニット、からなる群より選ばれる。 40

【0050】

本発明の方法の他の好ましい態様として、該ポリペプチドリンカーは、複数のグリシン、セリンおよび/またはアラニン残基を含む。

【0051】

本発明の方法の更に特に好ましい態様として、該ポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列の複数の連続した複製を含む。

【0052】

更に、本発明の方法の特に好ましい態様として、該ポリペプチドリンカーは、1から5、 50

5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸残基を含む。

【0053】

本発明の方法の最も好ましい態様として、該ポリペプチドリンカーは、G l y - G l y - G l y - G l y - S e r のアミノ酸配列を含む。

【0054】

本発明の方法の更に好ましい態様として、該多機能ポリペプチドは、少なくとも1つの更なるドメインを含む。

【0055】

標的細胞に特異的な免疫反応は、この発明の二重特異性分子と、標的細胞に補助刺激または補助活性化特性を付与する因子との併用によりさらに支援されうる。

10

【0056】

追加的な因子との併用の1つの選択肢として、この発明の分子がそれ自身追加的な機能のドメインを備えており、これは例えば他のアミノ酸リンカーを通じて結合するものである。これらの追加的なドメインは、例えばCD28 - やCD137 - の結びつけを媒介しうる(下記参照)。さらに、この発明の二重特異性分子の誘導体が1以上の追加的な機能ドメインを含んで構成されてもよいと考えられる。

【0057】

あるいは、この発明の分子は、例えばCD28を結びつける該分子の1つとCD137を結びつける他の1つのように、組成物中の1以上の追加的な因子とも併用されるであろう。

【0058】

上述のこれらの因子は、例えば標的細胞を特異的に認識する結合部位と、T - およびNK - 細胞上でCD28と相互作用するB7 - 1 (CD80) またはB7 - 2 (CD86) の細胞外ドメインとからなりうる。あるいは、B7 - 1 またはB7 - 2 は、CD28 - 特異的抗体の結合部位に置き換わりうる。T - リンパ球上では、CD28は補助刺激分子として働き、これは抗原特異的TCRの結びつけを通じて主要なT細胞活性化の間に(=第1のシグナル)、いわゆる第2のシグナルを媒介するために絶対必要なものである。NK細胞上では、CD28は、CD28リガンドを発現する標的細胞に対する細胞毒性の誘発に寄与する(Chambers (1996) Immunity 5: 311)。この発明の二重特異性分子と優先的に併用されうる他の因子としては、標的細胞を特異的に認識する結合部位と、CD137 - 特異的抗体やCD137 - リガンドの細胞外部分の結合部位とからなりうる。

20

30

【0059】

本発明の方法の最も好ましい態様として、該更なるドメインは、共有結合または非共有結合にて結合している。

【0060】

本発明の方法の他の最も好ましい態様として、該少なくとも1つの更なるドメインは、生物学的活性に適した立体配座であり、イオンを封鎖したり固体担体やあらかじめ選択された決定基に選択的に結合する能力のある立体配座を有するエフェクター分子を含む。

【0061】

本発明の方法の更に最も好ましい態様として、該更なるドメインは、補助刺激機能および/または補助活性化機能を付与する。

40

【0062】

本発明の方法の特に好ましい態様として、該補助刺激機能は、CD28 - リガンドまたはCD37 - リガンドにより媒介される。

【0063】

本発明の方法の更に特に好ましい態様として、該CD28 - リガンドまたはCD37 - リガンドは、B7 - 1 (CD80)、B7 - 2 (CD86)、アダプター、抗体、またはこれらの機能性フラグメントもしくは機能性誘導体である。

【0064】

抗体の「機能性フラグメント」の用語は、該抗体の結合特異性を保持した抗体のフラグメ

50

ントとして定義される(例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" LSH Press, Cold Spring Harbor, 1988を参照)。このようなフラグメントの例としては、FabとF(ab)₂フラグメントがある。該抗体の「機能性誘導体」は、該抗体の結合特異性を保持もしくは実質的に保持している。該誘導体の例としては、scFvフラグメントがある。

【0065】

この発明はまた、その発現によりこの発明の多機能ポリペプチドおよび/または多機能ポリペプチドの機能性部分をエンコードするポリヌクレオチドにも関連する。「機能性部分」の用語は、この発明の多機能ポリペプチド構造の第1、第2または更なるドメインの特定の機能を付与する部分として、この発明に従って定義される。

10

【0066】

ポリヌクレオチドは、DNA、RNAまたは、PNA等のこれらの誘導体でよい。好ましくは、該ポリヌクレオチドは、DNAである。

【0067】

さらに、この発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターに関連する。

【0068】

多数の適したベクターが分子生物学の当業者に知られており、その選択は、必要とする機能に依存し、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージおよび遺伝子工学で汎用されている他のベクターを含む。当業者によく知られた方法を用いて、種々のプラスミドとベクターを構築することができる。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989), (1994)に記載された技術を参照のこと。この発明のベクターは、標的細胞に輸送するためにリボソームに再構成することができる。

20

【0069】

ベクターは、例えばファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターでよい。レトロウイルスベクターは、複製コンピテントまたは複製欠損でよい。後者では、ウイルス増殖は、一般的に宿主細胞の補完によってのみ起こるのである。

30

【0070】

ポリヌクレオチドは、宿主中の増殖のための選択可能なマーカーを含むベクターと結合されてもよい。一般的に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿のような沈殿中や、荷電した脂質との複合体中に導入される。ベクターがウイルスの場合は、適当なパッケージング細胞系を用いて *in vitro* でパッケージングし、宿主細胞にトランスフェクションすればよい。

【0071】

ポリヌクレオチド挿入は、いくつかの例を挙げると、ファージラムダPLプロモーター、大腸菌の *lac*、*trp*、*phoA* および *tac* プロモーター、SV40の早期および晚期プロモーター、およびレトロウイルスLTRsのプロモーターのような適当なプロモーターに有効に結合するべきである。他の適したプロモーターは、当業者に知られるであろう。発現構築物は、さらに転写開始、終了のための部位、および、転写された領域には、翻訳のためのリボソーム結合部位を含みうる。構築物に発現した転写のコード部分は、好ましくは翻訳されるポリペプチドの最初に翻訳開始コドン、終わりに適当に位置した終止コドン(UAA、UGAまたはUAG)を含みうる。

40

【0072】

すでに示したように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択可能なマーカーを含みうる。このようなマーカーは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素、G4

50

18 またはネオマイシン耐性、大腸菌や他のバクテリア中での培養のためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適当な宿主の代表的な例としては、これに限定されないが、大腸菌、ストレプトマイセスおよびチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 細胞のようなバクテリア細胞；酵母細胞のような真菌細胞；ショウジョウバエ S2 およびスポドペテラ (*Spodoptera*) Sf9 細胞のような昆虫細胞；CHO、COS、293 およびボウズ (*Bowes*) 黒色腫細胞のような動物細胞；植物細胞が含まれる。上述の宿主細胞の適当な培地および条件は、この技術分野で知られている。

【0073】

バクテリアに好ましく用いられるベクターとしては、QIAGEN, Inc. から入手可能な pQE70、pQE60 および pQE-9；Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能な pBluescript ベクター、Phagescript ベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能な ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 が含まれる。

【0074】

好ましい真核細胞のベクターとしては、Stratagene から入手可能な pWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXTI および pSG；Pharmacia から入手可能な pSVK3、pBPV、pMSG および pSVL がある。一般的に、典型的なクロニングベクターには、pBscript sk、pGEM、pUC9、pBR322 および pGBT9 が含まれる。典型的な発現ベクターには、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT が含まれる。他の適したベクターも、当業者にとって非常に明白である。

【0075】

さらに、例えば、上述したようにポリペプチドをエンコードする核酸分子をゲノム中にすでに含む哺乳動物細胞も使用できるが、弱いプロモーター等のために同様のものを発現しないか、または、適切に発現しない。従って、同様のものの発現を誘発するように、哺乳動物細胞の該ポリペプチドをエンコードする内因性の核酸分子の直ぐ近傍に強いプロモーターのような調節塩基配列を導入すればよい。

【0076】

この文脈において「調整塩基配列」の用語は、エンコードする遺伝子の直ぐ近傍での細胞のゲノムへの組込により、ポリペプチドの発現を増加させるために用いることができる核酸分子を意味する。このような調整塩基配列は、プロモーター、エンハンサー、不活性化サイレンサーイントロン配列、3' UTR および / または 5' UTR コード領域、タンパク質および / または RNA 安定化要素、調節タンパク質をエンコードする核酸分子を含み、例えば、転写因子、遺伝子発現を誘発するまたは引き金となることができるもの、または、遺伝子発現を活性化および / または遺伝子産物量を増加させるものとして知られている他の遺伝子発現制御要素などである。該調整塩基配列の導入は、ポリペプチドの発現の増加および / または誘発を導き、結果として細胞中のポリペプチド量の増加をもたらす。従って、本発明は、新規のおよび / または増加したポリペプチドの発現を提供することを目的とする。

【0077】

この発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチドをトランスフェクションした細胞に関する。

【0078】

この発明の細胞は、真核細胞（例えば、酵母、昆虫または哺乳動物）または原核細胞でよい。もっとも好ましくは、この発明の細胞は、例えば CHO-細胞、COS、293 またはボウズ (*Bowes*) 黒色腫細胞等の細胞系の仲間のヒト細胞のような哺乳動物のものである。

【0079】

宿主細胞への構造の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン性脂質-媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法によりなされるであろう。このような方法は、Davis, Basic Methods In Molecular Biology (1986)のような、多くの標準的な研究マニュアルに記載されている。実際、ポリペプチドが組み替えベクターを欠いた宿主細胞により発現することは、特に予想されることである。

【0080】

本発明は、さらに、添付の実施例やここに記載されるように、この発明の多機能ポリペプチドおよび/または多機能ポリペプチドの機能性部分の発現をエンコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を提供するものである。アミノ酸配列SEQ ID 3および4に相当するヌクレオチド(nt) 64~462および(nt) 123~462からのヒトNKG2Dの2つの異なるフラグメントの核酸配列は、図1に示すcDNA-テンプレートからのPCR-増幅により得られた。得られたプラスミドVV1-NKG2-D(nt 64~462)およびVV1-NKG2-D(nt 123~462)を用いて、添付の実施例に示すように6~8週齢の3匹のBALB/cマウスを免疫した。得られたリンパ球は、添付の実施例に示すようにハイブリドーマの選択を行うためにSP2/0マウスミエロマ細胞(American Tissue Type Collection, USA)と融合した。11B2、8G7および6E5と指定された3つのハイブリドーマは、ヒトCD8⁺T-リンパ球およびNK-細胞双方の表面の天然NKG2Dと反応するモノクローナル抗体を産生することが示された(より詳細には、添付の実施例を参照)。サブクローン11B2D10、8G7C10および6E5A7の上清は、(添付の実施例に示されるように)CD56⁺NK-およびCD8⁺T-細胞上のNKG2Dと反応することが示された。これらのサブクローンはブダペスト条約の規定に従い、2001年3月23日にDSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany)に寄託され、取得番号DSM ACC 2496, DSM ACC 2497, DSM ACC 2498をそれぞれ得た。

【0081】

さらに、この発明は、例えばMack, 1995, PNAS, 92, 7021に記載されているように、本発明の細胞を培養し多機能ポリペプチドまたはそれらの機能性部分を培養物から単離することを含むこの発明の多機能ポリペプチドおよび/または多機能ポリペプチドの部分を調製する方法に関する。

【0082】

ポリペプチドは、硫酸アンモニウムやエタノールによる沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーなどのよく知られた方法により、組み換え細胞培地から回収し、精製することができる。もっとも好ましくは、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)が精製に用いられる。

【0083】

組み換え産物の製造に用いられた宿主に依存して、ポリペプチドはグリコシル化されているか、またはグリコシル化されていないことがある。さらに、ポリペプチドは、ある場合には宿主に媒介されるプロセスの結果として初期の(修飾された)メチオニン残基を含んでいることもある。従って、翻訳開始コドンとしてエンコードされたN-末端メチオニンが、一般的には真核細胞内で翻訳後にいずれのタンパク質からも高い効率で除去されることは、この技術分野でよく知られたことである。ほとんどの原核細胞においてもほとんどのタンパク質のN-末端メチオニンが効率的に除去される一方、いくつかのタンパク質では、N-末端メチオニンが共有結合的に結合しているアミノ酸の性質に依存して、この原

10

20

30

40

50

核細胞での除去プロセスは効率的ではない。

【0084】

例えばこの技術分野で知られた *in vitro* 翻訳アッセイを用いることにより、細胞を必要としない系においてもタンパク質が発現されることも理解される。

【0085】

「発現」の用語は、細胞におけるタンパク質またはヌクレオチド配列の産生を意味する。しかし、該用語は、細胞を必要としない系におけるタンパク質の発現も含むものである。それは、その産物をエンコードするDNAからRNA産物への転写、転写後修飾および/またはタンパク質産物またはポリペプチドへの翻訳、また、起こりうる翻訳後修飾を含む。前掲を参照のこと。用いられた特異的な構造と状態に依存し、タンパク質は細胞、培地またはこれらの両方から回収されうる。この出願において「タンパク質」および「ポリペプチド」の用語は、相互に交換可能なものである。「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマー（アミノ酸配列）を意味し、特定の分子鎖長を意味するものではない。従って、ペプチドおよびオリゴペプチドは、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などポリペプチドの翻訳後修飾をも意味しまたは含むものである。前掲を参照のこと。その定義に含まれるものとしては、例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸アナログ（例えば、非天然アミノ酸等を含む）を含むポリペプチド、置換された結合を有するポリペプチド、また、自然に起こるもしくは自然に起こらない双方のこの技術分野で知られた他の修飾がある。例えば、天然タンパク質を発現するのみならず、融合ポリペプチドとしてのタンパク質を発現したり、例えば培地へのタンパク質の分泌に耐えるためなど、宿主細胞の特異的な区画にタンパク質を向わせるシグナル配列を付加することが可能であることは、当業者によく知られたことである。この発明のタンパク質は、タンパク質精製を容易にするために付加された1（のポリペプチド）またはそれ以上の付加ポリペプチドドメインを有する組み換えタンパク質として発現することもありうる。このような精製を容易にするドメインには、これに限定されないが、固定化金属での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレートペプチド、固定化免疫グロブリンでの精製を可能にするプロテインAドメイン、FLAGエクステンション/アフィニティ精製系（ImmuneX Corp, Seattle WA）に利用されるドメインなどが含まれる。ファクターXAやエンテロキナーゼ（*In vitro* Gen, San Diego CA）のような切断可能なリンカー配列を、精製ドメインと目的のタンパク質との間に包含することは、精製を容易にするために有用である。このような発現ベクターは、細胞周期相互作用タンパク質とコンプライズした融合タンパク質の発現を提供し、チオレドキシンに続く6つのヒスチジン残基をエンコードする核酸および、エンテロキナーゼ切断部位を含んでいる。ヒスチジン残基は、IMIA C（固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー、Porath, Protein Expression and Purification 3 (1992), 263-281に記載されている）での精製を容易にする一方、エンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質からのタンパク質の精製手段を提供する。組み換え産物に加え、この発明のタンパク質のフラグメントは、固相技術を用いた直接ペプチド合成により産生されうる（Stewart et al (1969) Solid Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154参照）。*In vitro*でのタンパク質合成は、手動操作もしくは自動操作の技術によってなされうる。自動合成は、例えば、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer, Foster City CA）を用いて、製造者から提供される説明書に従って行うことができる。この発明のポリペプチドの種々のフラグメントは、完全長の分子を生産するために化学的方法を用いて個別にまたは組み合わせて、化学的に合成および/または修飾されうる。一旦発現または合成されると、本発明のタンパク質は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電

10

20

30

40

50

気泳動などのこの技術分野で標準的な手順に従って精製されうる (Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)。医薬用途には、少なくとも約90から95%の均質性を有する実質的に純粋なタンパク質が好ましく、98から99%またはそれ以上の均質性のものがもっとも好ましい。一旦精製されると、部分的にまたは望む均質性で、タンパク質は、治療(体外的なものも含め)に用いられ、または、アッセイ手順の発展および実行のために用いられうる。

【0086】

この発明はまた、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターを含む組成物に関する。

10

【0087】

本発明の組成物の好ましい態様として、該組成物は、補助刺激機能および/または補助活性化機能を付与する分子をさらに含む。

【0088】

この態様では、組成物は、上記に定義したように該更なるドメインを含むかまたは含まない多機能ポリペプチドを含みうる。もし、多機能ポリペプチドが補助刺激機能および/または補助活性化機能を付与する更なるドメインを含む場合は、この発明の組成物に含まれる該更なる分子は同一かまたは異なる補助刺激機能および/または補助活性化機能を有しうる。

【0089】

該組成物では、含有される成分は、以下でさらに特定されるように、好ましくは無菌状態で、任意にバッファーまたは水溶液中で、バイアル瓶などの1またはそれ以上の容器に個別に包装され、一緒にされる。

20

【0090】

本発明の組成物の特に好ましい態様として、該補助刺激機能は、CD28-リガンドまたはCD137-リガンドにより媒介される。

【0091】

本発明の組成物の他の特に好ましい態様として、該CD28-リガンドまたはCD137-リガンドは、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、アプタマー、抗体、またはこれらの機能性フラグメントもしくは機能性誘導体である。

30

【0092】

本発明の組成物のさらに好ましい態様として、該組成物は、医薬に許容されるキャリアーを任意にさらに含む医薬組成物である。

【0093】

組成物はまた、望む処方に依存して、医薬に許容され、通常は無菌の、無毒のキャリアーや希釈剤を含むことができ、そしてこれらは、動物やヒトに投与する医薬組成物を処方するのに通常用いられる賦形剤として定義される。希釈剤は、組み合わせによる生物学的活性に影響しないように選択される。このような希釈剤の例としては、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液、ブドウ糖液、ハックス液がある。さらに、医薬組成物または処方、他のキャリアー、アジュバント、または、非毒性、非治療性、非免疫性の安定剤なども含みうる。治療に効果的な投与量は、症状や状態を改善するタンパク質、抗体、アンタゴニストまたは阻害剤の量による。

40

【0094】

これらの化合物の治療効果および毒性は、細胞培養や、例えば、ED50(母集団の50%に治療効果のある投与量)およびLD50(母集団の50%に致死となる投与量)などの動物実験による標準的な医薬開発手順により決定することができる。治療効果および毒性の投与量比は、治療の指標であり、LD50/ED50の比として表現することができる。

【0095】

適した医薬キャリアーの更なる例は、この技術分野でよく知られており、また、リン酸バ

50

ッファー溶液、水、油/水エマルジョンのようなエマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、無菌溶液などを含む。このようなキャリアーを含む組成物は、よく知られた通常の方法で処方することができる。これらの医薬組成物は、適した投与量で患者に投与することができる。適した組成物の投与は、例えば、静脈内、腹膜内、皮下、筋肉内、局所的または皮内の投与などの異なった方法により実施されうる。投薬計画は、医師の参加の下に臨床要因により決定される。医療分野でよく知られているように、患者それぞれへの投与は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および投与経路、一般的な健康状態、同時に投与される他の医薬などの多くの要因に依存する。典型的な投与量は、例えば、 0.001 から $1000 \mu\text{g}$ の範囲（または、この範囲での発現または発現阻害のための核酸の範囲）であり、しかし、この例示の範囲を下回るもしくは上回る投与量も、特に前述の要因を考慮して想定されている。一般的には、医薬組成物の通常の投与としての投薬計画では、1日当たり $1 \mu\text{g}$ から 10mg 単位の範囲となる。もし、投薬計画が継続的注入の場合は、体重 1kg に対し1分当たり $0.1 \mu\text{g}$ から 10mg 単位の範囲となる。

10

【0096】

日々の経口投与計画では、総体重につき約 0.1 から 80mg/kg が好ましく、より好ましくは 0.2 から 30mg/kg 、さらに好ましくは 0.5 から 15mg/kg である。日々の非経口投与計画では、総体重につき約 $0.1 \mu\text{g/kg}$ から約 100mg/kg であり、好ましくは約 $0.3 \mu\text{g/kg}$ から約 10mg/kg 、より好ましくは約 $1 \mu\text{g/kg}$ から 1mg/kg である。日々の局所的な投与計画では、好ましくは 0.1mg から 150mg を1日に1から4回、好ましくは2から3回投与することとなる。日々の吸入による投与計画では、好ましくは、1日当たり約 0.01mg/kg から約 1mg/kg となる。

20

【0097】

周期的な評価によって、経過を観察できる。投与量は変化するものであるが、DNAの静脈内投与の好ましい投与量は、DNA分子の約 10^6 から 10^{12} コピーである。DNAは、例えば、内部または外部の標的部位への生物的 (biolistic) 輸送や動脈の部位にカテーテルを挿入することにより、標的部位に直接投与することもできる。例えば、ポリヌクレオチド、核酸分子、ポリペプチド、抗体、化合物医薬、医薬前駆体またはこれらの医薬に許容される塩を含む組成物は、経口的、局所的、非経口的または吸入など、通常医薬投与に用いられるいかなる経路によっても適切に投与しうる。許容される塩には、酢酸、メチルエステル、HCl、硫酸、塩化物などが含まれる。医薬は、通常の手順に従い医薬と標準的な医薬キャリアーとを組み合わせる調製した通常の投与形状で投与される。本発明に従って特定され、得られる医薬および医薬前駆体は、既知の第2の治療活性化合物と組み合わせる通常の投与量により投与されうる。このような治療活性化合物には、例えば、上述したものが含まれる。これらの手順には、望まれる調製物が適切に得られるようにその成分を、混合、粒状化、圧縮または溶解することが含まれうる。医薬に許容されるキャリアーまたは希釈剤の形状および性質が、組み合わせられる活性成分の量、投与経路、および他のよく知られた変数により指示されることは、正しく認識されるであろう。キャリアーは、処方中の成分と両立できるという意味において「許容可能」であり、その投与者に有害でないことが必要である。使用される医薬キャリアーは、例えば、個体または液体のいずれでもよい。個体キャリアーの例としては、ラクトース、石膏、蔗糖、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などがある。液体キャリアーの例としては、リン酸バッファー溶液、シロップ、ピーナッツオイルやオリーブオイルなどの油、水、エマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、無菌溶液などがある。同様に、キャリアーや希釈剤は、モノステアリン酸グリセロールやジステアリン酸グリセロールを単独またはワックスとともに用いるなど、この技術分野でよく知られた遅延物質を含みうる。広く種々の医薬形状を用いることができる。従って、固体キャリアーが用いられる場合は、調製物は錠剤、粉末またはペレット形状でハードゼラチンカプセルに収められたもの、または、トローチやロゼンジの形状のものがある。個体キャ

30

40

50

リアーの量は、大きく変化するものであるが、好ましくは、約 25 mg から約 1 g となる。液体キャリアーが用いられる場合は、調製物はシロップ、エマルジョン、ソフトゼラチンカプセル、アンプルのような無菌注射可能溶液、または、非水溶性液体サスペンションの形状となる。

【0098】

組成物は局所的にも投与され、これは、非全身的投与となる。これは、表皮や口腔への外的な適用およびこのような化合物を耳、眼または鼻にしみこませ、血流に著しく入らないようにすることも含まれる。対照的に、全身投与は、経口、静脈内、腹膜内および筋肉内投与により行われる。

【0099】

局所投与に適した処方は、皮膚を通して炎症部位にしみこむのに適したりニメント剤、ローション、クリーム、軟膏またはペーストなどの液状または半液状調製物を含み、また、眼、耳または鼻に投与するのに適したドロップも含む。有効成分は、局所投与のためには、0.001% から 10% w/w、例えば処方の重量に対して 1% から 2% 含まれうる。これは処方の 10% w/w の量を含みうるが、好ましくは 5% w/w 以下、より好ましくは 0.1% から 1% w/w である。

【0100】

本発明によるローションは、例えば、UV 防御のために用いるのに適した皮膚や眼に適用するのに適したものも含まれる。眼のローションは、任意に殺菌剤を含んだ無菌水溶液を含み、ドロップの調製と同様の方法により調整できる。皮膚に適用するローションやリニメント剤は、アルコールやアセトンのような皮膚の乾燥を促進し、冷やす物質を含み、および/またはグリセリンなどの保湿剤やひまし油やラッカセイ油などの油を含みうる。

【0101】

本発明によるクリーム、軟膏またはペーストは、外用のための有効成分の半個体処方である。これらは、高度の分離されたまたは粉末化された形状で有効成分が混合され、適した機械の助けを借りて、脂肪もしくは非脂肪の基剤とともに、単独か、溶液または水もしくは非水溶性液体中へのサスペンションとして調製されうる。基剤には、プロピレングリコールやマクロゲルなどのアルコールとともに、固体、軟質または液体パラフィンのような炭化水素、グリセリン、ビーズワックス；金属石けん；粘滑薬；アーモンド、トウモロコシ、ラッカセイ油、ひまし油、オリーブオイルのような天然由来の油；羊毛脂肪またはその誘導体またはステアリン酸、オレイン酸などの脂肪酸が含まれる。処方は、アニオン、カチオンまたはソルビタンエステルやそれらのポリオキシエチレン誘導体などの非イオン性界面活性剤、などのいずれの適した界面活性剤も組み込むことができる。天然ゴム、セルロース誘導体またはシリカのような無機物質、ラノリンのような他の成分、等の分散剤も含みうる。

【0102】

本発明によるドロップは、無菌溶液、油性溶液、またはサスペンションを含み、殺菌性のおよび/または殺真菌性の薬剤および/または他の適した防腐剤を、好ましくは界面活性剤を含めて、適切な水溶液に有効成分を溶解することにより調製できる。得られた溶液は、濾過により浄化し、適切な容器に移され、密閉され、オートクレーブや 98 - 100 で 30 分間保持することにより殺菌されうる。あるいは、溶液は、濾過により殺菌され、無菌技術により容器に移される。ドロップに包含するのに適した殺菌剤および殺真菌剤の例としては、硝酸または酢酸フェニル水銀 (0.002%)、塩化ベンザルコニウム (0.01%)、酢酸クロロヘキシジン (0.01%) がある。油性溶液の調製に適した溶媒には、グリセリン、希釈アルコールおよびプロピレングリコールが含まれる。本発明による組成物は、非経口的に投与でき、これは静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内、腸内、膈内または腹膜内の投与によるものである。非経口投与の中で、皮下および筋肉内の形態が一般的には好ましい。このような投与の適切な投与形態は、通常の技術により調製することができる。組成物は、吸入によっても投与でき、これは、鼻孔内および経口吸入投与によるものである。このような投与の適切な投与形態は、エアロゾル処方や定量吸入器などのも

10

20

30

40

50

のであり、通常の技術により調製することができる。

【0103】

本発明の組成物の異なった好ましい態様として、該組成物は、検出のために適した手段を任意にさらに含む診断組成物である。

【0104】

該検出のための手段には、例えば、発色団、蛍光色素、放射性ヌクレオチド、ビオチンまたはDIGがある。これらのラベル化手段は、ヌクレオチドアナログに結合しうる。増幅されたcDNAのラベル化は、添付の実施例、または、特にSpirin(1999), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 3108-3115に記載されているように行うことができる。

10

【0105】

本発明は、本発明の多機能ポリペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターを、癌、感染および/または自己免疫状態、癌、即ち、悪性(充実性)腫瘍;造血癌形態(白血病、リンパ腫);良性前立腺肥大(BPH)、甲状腺や他の内分泌腺の自律性腺腫、結腸の腺腫のような良性腫瘍;悪性腫瘍の初期段階;ウイルス、バクテリア、真菌、原虫や蠕虫による感染性疾患;疾患を起こす免疫細胞の分集団の削減が要求される自己免疫疾患;移植による拒絶反応やアレルギーの防止、の治療に用いる医薬組成物の調製に用いるものにも関する。

【0106】

本発明を用いる好ましい態様として、該感染がウイルス、バクテリアまたは真菌感染であり、該癌が頭部および頸部の癌、胃癌(gastric cancer)、食道癌(oesophagus cancer)、胃癌(stomach cancer)、結腸直腸癌、結腸癌、肝臓および肝臓内の胆管の癌、膵臓癌、肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、乳癌腫、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、肉腫、横紋筋肉腫、リンパ腫、濾胞性非ホジキンリンパ腫、白血病、T-またはB-細胞白血病、ホジキンリンパ腫、B-細胞リンパ腫、卵巣腫瘍、子宮癌、頸部の癌、前立腺癌、生殖器の癌、腎臓癌、精巣癌、甲状腺癌、膀胱癌、プラズマ細胞腫または脳腫瘍であり、該自己免疫状態が強直性脊髄炎、急性前部ブドウ膜炎、グッドパスチャー症候群、多発性硬化症、グレーブズ病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、インシュリン依存性糖尿病、慢性関節リウマチ、尋常性天疱瘡、橋本甲状腺炎または自己免疫性肝炎のものである。

20

30

【0107】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターを、遺伝子治療のための組成物の調製に用いるものにも関する。

【0108】

上述のホスホトニンペプチドやポリペプチドをエンコードする種々のポリヌクレオチドおよびベクターが、単独または標準的なベクターおよび/または遺伝子輸送系を用い、また、任意に医薬に許容可能なキャリアーや賦形剤とともに、これらのいかなる組み合わせによっても投与されることは、本発明で予定されていることである。例えば、この発明のポリヌクレオチドは、例えば、上述の障害に関連した疾患の遺伝子治療や遺伝子診断のために、細胞中において単独またはこの発明の(ポリ)ペプチドを発現するためのベクターの一部として用いることができる。この発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、順次(ポリ)ペプチドを産生する細胞に導入される。投与に次いで、該ポリヌクレオチドまたはベクターは、検体のゲノムに安定的に統合されうる。一方、ウイルスベクターは、ある特定の細胞または組織に特異的に用いられ、その細胞中で維持されうる。適した医薬キャリアーおよび賦形剤は、この技術分野でよく知られている。この発明に従って調製されるポリヌクレオチドまたはベクターは、上述の疾患の異なった種類のもを予防し、治療または遅らせるために用いることができる。

40

【0109】

上述の態様として、本発明のベクターは、好ましくは遺伝子転移または標的ベクターとなる。遺伝治療は、治療遺伝子の導入に基づいており、例えば、ex-vivoやin v

50

*in vivo*技術による細胞へのワクチン接種は、遺伝子転移の最も重要な適用の一つである。*in vitro*や*in vivo*での遺伝子治療のために適したベクター、方法または遺伝子輸送系は、文献に記載されており、また、当業者に知られている。例えば、Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodua, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-2251; Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242; Anderson, *Nature* 392 (Supp. 1998), 25-30; Wang, *Gene Therapy* 4 (1997), 393-400; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US-A 5,580,859; US-A-5,589,466; US-A-4,394,448、または、Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640、および、これらに引用されている文献を参照のこと。

【0110】

この発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、細胞に直接導入またはリポソームまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルス、レトロウイルス）を介した導入のために設計されうる。好ましくは、該細胞は生殖系細胞；胎児性細胞、卵細胞またはこれら由来の誘導物であり、もっとも好ましい細胞は幹細胞である。上述したように、適した遺伝子輸送系は、リポソーム、レセプター媒介輸送系、裸のDNAおよびヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスなどのウイルスベクターを含みうる。遺伝子治療のための体内の特定部位への核酸の輸送は、Williams (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 2726-2729)に記載されているようなバイオリスティック輸送系を用いることによっても達成されうる。導入されたポリヌクレオチドおよびベクターは、該細胞に導入された後に遺伝子産物を発現し、好ましくは該細胞の生存期間中にはこの状態のまま維持されることが理解される。例えば、適切な調節塩基配列による制御の下にポリヌクレオチドを安定的に発現する細胞系は、当業者によく知られた方法によって作製することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いる代わりに、本発明のポリヌクレオチドと選択マーカーを同一かまたは異なるプラスミドを用いて宿主を形質転換することもできる。外来DNAの導入に続き、作製された細胞は、培地中で1-2日間成長し、選択媒地に移される。組み換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、プラスミドが染色体中に安定的に統合された細胞の選択を可能にし、順次クローン化し細胞系に拡散する細胞増殖巣を形成するように成長する。このような作製された細胞系は、例えばリン酸摂取の活性化や刺激に關与する化合物の検出のスクリーニング方法にも特に有用である。

【0111】

これらに限定されないが、例えば tk^- 、 $hgprt^-$ または $aprt^-$ 細胞それぞれにおける、ヘルペス単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (Wigler, *Cell* 11 (1977), 223)、ヒポキサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1962), 2026) またはアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, *Cell* 22 (1980), 817) など、多数の選択系が使用できる。また、抗代謝産物耐性剤も選択の基礎として用いることもでき、メトトレキサート耐性を付与する $dhfr$ (Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 3567; O'Hare, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527)、ミコフェノ

ール酸耐性を付与する g p t (M u l l i g a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 8 (1 9 8 1) , 2 0 7 2)、アミノグリコサイド G - 4 1 8 耐性を付与する n e o (C o l b e r r e - G a r a p i n , J . M o l . B i o l . 1 5 0 (1 9 8 1) , 1)、ハイグロマイシンの耐性を付与する h y g r o (S a n t e r r e , G e n e 3 0 (1 9 8 4) , 1 4 7)、または、ピユーロマイシン (p a t , ピユーロマイシン N - アセチルトランスフェラーゼ) などを用いることができる。他の選択可能な遺伝子として、例えば、細胞にトリプトファンの位置でインドールを利用させる t r p B ; 細胞にヒスチジンの位置でヒスチノールを利用させる h i s D (H a r t m a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 (1 9 8 8) , 8 0 4 7) ; および、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤耐性を付与する O D C (オルニチンデカルボキシラーゼ)、2 - (ジフルオロメチル) - D L - オルニチン、D F M O (M c C o n l o g u e , 1 9 8 7 , I n : C u r r e n t C o m m u n i c a t i o n s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y e d .)、が記載されている。

10

【0112】

この発明はさらに、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターまたは本発明の組成物を該悪性腫瘍や疾患により影響を受けている哺乳動物に導入することを含む、癌、感染または自己免疫状態の治療方法に関する。

【0113】

投与に適した経路および投与量等は、上記にあるようにこの発明の医薬組成物と関連して述べた。

20

【0114】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターまたは本発明の組成物を該病的状態により影響を受けている哺乳動物に導入することを含む、病的状態の進行を遅らせる方法に関する。

【0115】

本発明の1つの方法の好ましい態様として、該哺乳動物はヒトである。

【0116】

最後に、この発明は、本発明の多機能ポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の細胞または本発明の組成物を含むキットに関する。

30

【0117】

本発明のキットまたは診断組成物の構成要素は、任意にバッファーおよび/または溶液中で、バイアル瓶のような容器に包装されたものでありうる。適当な場合には、該構成要素の1またはそれ以上は、1つの同一の容器に包装されうる。さらに、または、あるいは、該構成要素の1またはそれ以上は、例えばニトロセルロースフィルターやナイロン膜のような固体担体、または、マイクロタイタープレートのウェルに取り込まれうる。

【0118】

【実施例】

< 実施例 1 : 組み換え N K G 2 D の作製 >

40

N K G 2 D 抗原の細胞外部分をコードする D N A 配列を得るために、逆転写による末梢血液単核細胞の R N A 由来の c D N A をポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) のテンプレートとして使用した。

全 R N A は、標準的なプロトコール (J . E . C o l i g a n , W i l e y I n t e r s i e n c e 1 9 9 1) に従いフィコール密度遠心分離により全血液サンプルから分離した末梢血液単核細胞より調製した。

R N A 調製は、市販の調製キット (Q u i a g e n) を用い製造者の説明書に従い行った。

c D N A 合成は、標準的なプロトコール (S a m b r o c k , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s 1 9 8 9 , s e c o n d e d

50

ition)に従って行った。

PCRでは、次の配列を有する2つのプライマーを用いた。

フォワードプライマー： 5' - AGGTGTACACTCCTTATTCAACCA
AGAAGTTCAAAATTC - 3' (SEQ ID 87)

リバープライマー： 5' - TCATCCGGACACAGTCCCTTTGCATG
CAGATG - 3' (SEQ ID 88)

NKG2D cDNAテンプレートへの配列のハイブリダイズに加え、PCR増幅産物をクローニングできるように、フォワードプライマーはBsrGI - 部位を含み、リバープライマーはBspEI - 部位を含む。

PCR反応の産物は、アガロースゲル電気泳動により単離し、市販のキット(Quiaagen)を用いて製造者の説明書に従い精製し、標準プロトコール(Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, second edition)を用いて制限酵素BsrGIおよびBspEIとともにインキュベートした。その後最終精製工程を行った。 10

図1に示すように、NKG2D細胞外ドメインのコード配列は、BsrGIを介してネズミIg - 重鎖リーダー配列に融合し、また、BspEI部位は、XmaI部位と融合し、これにより終止コドンに続くポリヒスチジン標識のコード配列に結合する(SEQ ID 1 and 2)。

N - 末端リーダーペプチドのコード配列、NKG2D細胞外ドメインおよびC - 末端ヒスチジン - 標識からなる図1に示されるEcoRI/SalI - DNAフラグメントは、同じく制限酵素EcoRIおよびSalIにより消化されることにより調製されるプラスミドベクターpFastBac1中にクローンされた。このプラスミドは、Bac-to-Bacバキュロウイルス発現系の一部である(Gibco BRL, 製造者の説明書はインターネットサイトにより入手可能である：<http://www2.lifetechnology.com/catalog/techline/molecularbiology/ManualsPPS/bac.pdf>。特に断らない限り、Bac-to-Bacバキュロウイルス発現系に関連するすべての手順は、これらの説明書に従った。)。

1ngの正確なプラスミドクローンのDNAを、DH10Bacコンピテント細胞に導入した(Bac-to-Bac発現系)。この大腸菌株は、(i)Tn7転移機能を提供するヘルパープラスミド(pMON7124)と(ii)バキュロウイルスシャトルベクターであるいわゆるバックミド(pMON14272)の2つの他のプラスミドをすでに有している。これらの細胞に第3のプラスミドを導入した後、pFastBac1に挿入されたコード配列は、転移のための特異的標的部位を含むバックミド中に転移により移される。これは、LacZコード配列の除去をもたらし、これにより製造者の説明書に従ってBluo-gal、IPTGおよび抗体の組み合わせを含む寒天プレート上での青白選択による組み換えバックミドを用いてコロニーを選択する可能性を提供できる。

溶解性のNKG2D配列を有する組み換えバックミドを含む白のコロニーを選択し、1晩培養した。製造者により提供される特別のプロトコールを用いて、これらの1晩の培養物からバックミドDNAを調製した。 40

バックミドDNAは、製造者の説明書に従いCellfectin試薬(Bac-to-Bac発現系)を用いてSF-9昆虫細胞をトランスフェクトするために用いた。トランスフェクションから3日後、トランスフェクトした細胞の培地上清の組み換えバキュロウイルスを採取した。この上清は、低力価(1ミリリットル当たり約 2×10^7 プラーク形成単位(pfu))、小スケール(2ml)のウイルスストックである(昆虫細胞培地の説明書、バキュロウイルスおよびバキュロウイルス発現系でのタンパク質の発現の宣伝は、インターネットサイトで入手可能である：<http://www.invitrogen.com/manuals.html>。特に断らない限り、昆虫細胞培地およびタンパク質発現に関連するすべての手順は、これらの説明書に従った)。タンパク質発現のためには、高力価で大スケールのウイルスストックが必要であった。そのような 50

ウイルスストックを得るために、以下の工程を行った。

2 × 10⁶ の S F 9 細胞をそれぞれ接種した 2 つの 25 cm² の組織培養フラスコを、それぞれ 30 μl の初期ウイルスストックで感染させた。10 日後培養地上清を小スケール - 高力価ウイルスストックとして採取した。そして、1 ミリリッター当たり 2.0 × 10⁶ 細胞密度の S F 9 細胞の分散培養物 500 ml を、5 ml の第 2 のウイルスストックに感染させた。感染の進行を、トリパンプルー除去法による細胞活性の測定によりモニターした。細胞活性が 10 % 以下となったところで、ウイルスストックを採取し、遠心分離により細胞からウイルス上清を分離した。この大スケールストックのウイルス力価を測定した。この目的では、S F - 9 細胞を、ウェル当たり 1 × 10⁴ 細胞の密度で 96 - ウェル組織培養プレートに加えた。全部で 24 ウェルを以下の希釈の高力価ストックの 1 つにそれぞれ感染させた。10 μl のウェル当たり 1 : 10⁵ 希釈、10 μl のウェル当たり 1 : 10⁶ 希釈および 10 μl のウェル当たり 1 : 10⁷ 希釈である。体積は、ウェル当たり 120 μl に調整した。14 日後細胞活性を、トリパンプルー除去法により測定した。この希釈により、活性細胞を有するウェルと有しないウェルのバランス関係から、予測した十分に正確なウイルス力価は 1 × 10⁸ から 1 × 10⁹ p f u / m l と見積もられた。タンパク質発現の時間経過を、2.3 × 10⁶ 細胞 / m l で S F 9 細胞の 2 つのサスペンション培地による感染実験で、細胞当たり 5 p f u から 10 p f u の M O I (感染の多重性) により測定した。感染した培地のサンプルは、感染後 24、48、72 および 96 時間後に引き抜いた。これらのサンプルは、標準プロトコールにしたがいウエスタンブロットにより分析した。溶解性 N K G 2 D は、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗 - ヒスチジン - 標識抗体により検出した。

従って、最適の M O I および感染後の最適のインキュベーション時間を用いて、500 ml の培地体積で多重サスペンション培地での大スケールでのタンパク質の発現を行った。溶解性の N K G 2 D を、M a c k (1995) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 92 : 7021 に記載されているように、N i - N T A - カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる C - 末端ヒスチジン標識を介して、培地上清から精製した。

【 0 1 1 9 】

< 実施例 2 : ヒトリンパ球の天然 N K G 2 D に対するモノクローナル抗体の発生 >

b a l b / c × C 5 7 ブラックのかけあわせの 10 週齢 F 1 マウスを抗原 N K G 2 D の溶解性細胞外ドメインにより免疫した。抗原は、濃度 100 μg / m l で 0.9 % N a C l に溶解した。溶液は、次に完全フロイントアジュバントで 1 : 2 に乳化し、50 μl を個々のマウスに注射した。完全フロイントアジュバントを不完全フロイントアジュバントに置き換えた以外は同様の方法によって、4、8 および 12 週後に追加免疫をマウスに行った。最初の追加免疫から 10 日後に、血液サンプルを採取し、N K G 2 D 抗原に対する抗体血清力価を E L I S A により調べた。血清力価は、免疫されている動物については、免疫されていないものより 1000 倍以上高かった。2 回目の追加免疫の 3 日後に、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y (C o l i g a n , K r u i s b e e k , M a r g u l i e s , S h e v a c h a n d S t r o b e r , W i l e y I n t e r s c i e n c e , 1992) に記載されているような標準のプロトコールに従い、ハイブリドーマ細胞系を発生させるために、脾臓細胞を P 3 × 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞 (A T T C C R L - 1580) と融合した。P E G 融合の後、細胞をマイクロタイタープレートのウェル当たり 100 . 000 の細胞で接種し、10 % ウシ胎児血清、300 単位 / m l の組み換えヒトインターロイキン 6 および選択のための H A T 添加物の補給の下、200 μl の R P M I 1640 培地で育成した。密に成長したウェルからの培地上清を以下の E L I S A にて調べた。

96 U 底プレート (N u n c , m a x i s o r b) のウェルを、濃度 5 μg / m l で組み換え N K G 2 D 抗原とともに 4 で一晚被覆した。被覆したウェルを、洗浄バッファ (0.1 M N a C l , 0.05 M N a 2 H P O 4 p H 7.3 , 0.05 % T w e e n 20 , 0.05 % N a N 3) にて 3 回洗浄し、次に洗浄バッファに分

10

20

30

40

50

散させた2%のスキムミルク粉末を200 μ l/ウェルにて室温で1時間インキュベートすることを通じてブロックした。次の工程として、ハイブリドーマの上清を希釈せずおよび数回希釈して室温にて2時間インキュベートした。さらに3回の洗浄工程の後、結合したモノクローナル抗体を、マウス免疫グロブリンに対するホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートポリクローナル抗体により検出した。5回の洗浄の後、ELISAをTMB置換溶液(テトラメチルベンジジン、Roche Mannheim)の添加により最後に現像した。着色した沈殿を、15分後にELISAリーダーを用い405nmで測定した。

強いELISAシグナルを示す10クローンからの上清を、次の分析のために選択した。これらのハイブリドーマクローンを同定するために、そしてこれはインタクトなNK細胞およびTリンパ球の天然NKG2D抗原と反応しうるモノクローナル抗体を産生するものであるが、以下のフローサイトメトリー分析を行った。

1 \times 10⁶のPBMCを50 μ lの希釈していないハイブリドーマ上清とともに氷上で30分間インキュベートし、結合したモノクローナル抗体をPBSで1:100に希釈したウサギ抗-マウスIg抗体(Dako Hamburg, Code No. F0313)のフルオレセイン(FITC)コンジュゲートF(ab')₂フラグメントにより検出した。次の工程として、細胞結合FITCコンジュゲート抗体の自由価は、1:10に希釈した50 μ lのマウス血清(Sigma immunochemicals, Deisenhofen, M-5905)とともに30分間細胞をインキュベートすることによりブロックした。NK細胞とT細胞とを区別するために、ラベル化したPBMCをここで分けた。半量を1:100に希釈したT細胞特異的3色コンジュゲート抗-CD8抗体(Caltac Laboratories; Burlingame; USA, Code No. MHC D0306)により染色し、他の半量を1:25に希釈したNK細胞特異的フィコエリトリン(PE)コンジュゲート抗-CD56抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, Cat. No. 347747)で染色した。NK細胞またはT細胞をそれぞれ特異的に染色するラベル化されていない抗-CD16および抗-CD6抗体を、最初のラベル化工程のポジティブコントロールとして用い、組み換えNKG2Dと反応するハイブリドーマ上清の代わりに特異性を持たないネズミのモノクローナル抗体をネガティブコントロールとして用いた。

細胞は、FACSスキャン(Becton Dickinson, Heidelberg)のフローサイトメトリーにより分析した。FACS染色と蛍光強度による測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 1992)に記載されているように行った。

2色蛍光分析は、CD8⁺およびCD56⁺細胞でそれぞれポジティブゲートを適用して行い、これによりCD8⁺Tリンパ球およびNK細胞それぞれ別個にFITC媒介蛍光を検出できる。参照コントロール抗体とともにCD8⁺Tリンパ球とNK細胞の区別された染色を比較したところ、ハイブリドーマ細胞系8R23の上清は、NK細胞およびT細胞両方に強い反応性を示し、一方、2つの異なる上清は、両方のリンパ球サブセットに弱い反応性しか示さなかった。

あるいは、ヒトNKG2Dに対するモノクローナル抗体は、マウスの遺伝子による免疫により発生させた。この目的のため、アミノ酸配列SEQ ID 3および4に相当するヌクレオチド(nt)64から462およびnt123から462由来のヒトNKG2Dの異なるフラグメントを、図1に示すcDNAテンプレートからPCR増幅を行った。なお、このcDNAテンプレートは、アスパラギン(N)およびバリン(V)、または、トリプトファン(W)およびバリン(V)のそれぞれ側面に位置する細胞外NKG2Dセグメントをエンコードする。PCRプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを用いた。

nt123-462のNKG2Dフラグメントの増幅には、NKG2D-short-f
(5'-ATCAAGCTTGTGGATATGTTACAAAAATAACT-3'

10

20

30

40

50

) (SEQ ID 80) および NK G 2 D - s t o p - r (5 ' - C G C G G T G G C G G C C G C T T A C A C A G T C C T T T G C A T G - 3 ') (SEQ ID 82) を、 nt 64 - 462 の NK G 2 D フラグメントの増殖には、 NK G 2 D - f (5 ' - A T C A A G C T T G A A C C A A G A A G T T C A A A T T C C - 3 ') (SEQ ID 81) および NK G 2 D - s t o p - r (5 ' - C G C G G T G G C G G C C G C T T A C A C A G T C C T T T G C A T G - 3 ') (SEQ ID 82) を用いた。

遺伝子による免疫のためのプラスミドは、図4に示すようにベクター V V 1 (G E N O V A C A G , G e r m a n y) の制限エンドヌクレアーゼ部位 H i n d I I I および N o t I にこれらの PCR 産物をフレーム単位でそれぞれクローニングすることにより構築した。 10

得られたプラスミド V V 1 - N K G 2 - D (n t 64 - 462) および V V 1 - N K G 2 - D (n t 123 - 462) は、N-末端に myc エピトープにより標識された溶解性細胞外 NK G 2 - D フラグメントを分泌する。myc エピトープは、溶解性 NK G 2 - D フラグメントの発現を確認するために用いた。この目的のため、構築物は、一時的トランスフェクションにより B O S C - 23 細胞中 (O n i s h i (1996) E x p H e m a t o l 24 : 324) に発現され、C y t o p e r m / C y t o f i x (B e c t o n D i c k i n s o n) の添加によりパーフォレートされた。myc に標識された NK G 2 - D フラグメントは、ポリクローナルフィコエリトリンラベル化のウサギ抗 - マウス免疫グロブリン抗体に続くネズミ抗 - myc モノクローナル抗体 (9 E 1 0 , A T C C , C R L - 1729) との反応後の F A C S キャン分析により細胞間で染色した。 20

公表されている手順 (K i l p a t r i c k (1998) H y b r i d o m a 17 : 569) に従いヘリオス遺伝子銃 (B i o - R a d , G e r m a n y) を用いて V V 1 - N K G 2 - D (n t 123 - 462) により3回免疫した後、6から8週齢の3匹の B A L B / c マウスを V V 1 - N K G 2 - D (n t 64 - 462) により6回免疫し、2匹のマウスを V V 1 - N K G 2 - D (n t 64 - 462) により3回免疫した。免疫プラスミドの最後の適用の1週間後に、それぞれのマウスは、DNA 適用部位に Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンを含まないリン酸バッファー中で $50 \mu g / ml$ の濃度で組み換えヒト NK G 2 - D タンパク質 (実施例 1 を参照) の $300 \mu l$ を皮内注射により追加した。 30

4日後、マウスを殺しそのリンパ球をポリエチレングリコール (H y b r i M a x ; S i g m a - A l d r i c h , G e r m a n y) を用いて S P 2 / 0 マウスミエローマ細胞 (A m e r i c a n T i s s u e T y p e C o l l e c t i o n , U S A) と融合し、96 ウェルマイクロタイプレートでウェル当たり 100,000 の細胞で接種して 10% ウシ胎児血清およびハイブリドーマ選択のための H A T 添加剤 (K i l p a t r i c k (1998) H y b r i d o m a 17 : 569) を補給した $200 \mu l$ の D M E M 媒地で成長させた。

密に成長したウェルからの培地上清を上述のように固定化組み換え NK G 2 D の E L I S A により調べた。陽性の E L I S A シグナルを示す 122 のクローンからの上清を、更なる分析のために選択した。これらのハイブリドーマクローンを同定するために、そしてこれはインタクトな NK 細胞および $CD8^+$ T リンパ球の天然 NK G 2 D 抗原と反応しうるモノクローナル抗体を産生するものであるが、細胞を以下の F A C S キャン (B e c t o n D i c k i n s o n , H e i d e l b e r g) のフローサイトメトリー分析を行った。 40

健康なドナーの末梢血液からの単核細胞 (P B M C) を、フィコール密度勾配遠心分離により単離した。マイクロタイプレートのそれぞれのウェルで、 $200,000$ の P B M C を希釈しないハイブリドーマ上清とともにインキュベートした。氷上での 30 分間のインキュベーションの後、細胞を P B S で 2 回洗浄し、次にヤギ抗 - マウス I g G および 50

IgM抗体のフルオレセイン(FITC)コンジュゲートF(ab')₂フラグメント(Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, USA, Code 115-096068; 1:100)により氷上で30分間染色した。細胞を、PBSで2回洗浄し、次に2つの異なる抗体ラベル混合物により染色した。CD8⁺T細胞の染色には、100,000のPBMCをフィコエリトリン(PE)コンジュゲートCD16抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, Code No. 347617)および3色コンジュゲートCD8抗体(Caltac Laboratories, Burlingame, USA, Code No. MHCD0806)とともに30分間さらにインキュベートした。NK細胞の染色には、もう一方の半量のPBMCをフィコエリトリン(PE)コンジュゲートCD56抗体(Becton Dickinson, Heidelberg, Code No. 347747)および3色コンジュゲートCD3抗体(Caltac Laboratories, Burlingame, USA, Code No. MHCD0306)とともに30分間さらにインキュベートした。ラベル混合物中の異なる抗体間での交差反応をさけるために、マウス血清(Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Cat. No. 054H-8958)は、1:10の最終希釈で添加した。

3色蛍光分析を、CD8⁺(3色)に対してポジティブゲートおよびCD16⁺(PE)細胞に対してネガティブゲートを適用することにより行い、CD8⁺NK-細胞からのいかなる汚染シグナルを受けることなく、CD8⁺Tリンパ球(表現型:CD8⁺、CD16⁻)にのみ排他的に帰属するFITC媒介の蛍光を検出することができた。同様に、3色蛍光分析を、CD56⁺(PE)に対してポジティブゲートおよびCD3⁺細胞(3色)に対してネガティブゲートを適用することにより行い、CD56⁺Tリンパ球からのいかなる汚染シグナルを受けることなく、NK-細胞(表現型:CD56⁺、CD3⁻)にのみ排他的に帰属するFITC媒介の蛍光を検出することができた。図5に示すように、11B2、8G7および6E5として示されたハイブリドーマの上清は、ヒトCD8⁺Tリンパ球およびNK細胞両方の表面の天然NKGD2と反応するモノクローナル抗体を含んでいた。ハイブリドーマの上清の染色において、10H9は固定化組み換えNKGD2と反応する多くのモノクローナル抗体の代表例として示すものであり、しかしこれは、インタクトな細胞の天然NKGD2レセプター複合体に結合する能力を有しないものである。FACS染色と蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley Interscience, 1992)に記載されているように行った。

CD56⁺NK細胞およびCD8⁺T細胞のNKGD2-Dと反応する抗体を産生するハイブリドーマを、96ウェルマイクロタイタープレート上で限られた希釈により1度サブクロニングした。ポジティブサブクローンを、細胞成長を示すウェルから採取した上清とともにインキュベートしたNKGD2陽性NK細胞(Bauer (1999) Science 285: 727)のフローサイトメトリーにより同定した。細胞結合モノクローナル抗体は、ウサギ抗-マウスIg抗体(Dako Hamburg, Code No. F0313)のフルオレセイン(FITC)コンジュゲートF(ab')₂フラグメントにより検出した。サブクローン11B2D10、8G7C10および6E5A7を、NKGD2誘導二重特異性抗体の構築のためにさらに用いた(実施例3参照)。

【0120】

<実施例3:抗-NKGD2×抗-EpCAM二重特異性単鎖抗体の構築>
二重特異性抗体を図2に示すように構築した。ハイブリドーマ11B2D10 (SEQ ID 7-16), 8G7C10 (SEQ ID 27-36), 6E5A7 (SEQ ID 37-46)および6H7E7 (SEQ ID 17-26)から増幅された可変領域のPCRフラグメントをTAKクロニングベクターGEM-T Easy (Promega, Cat. No. A1360)に直接クロニングしたことを

除いて、Orlandi (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833に記載されているように、インタクトな細胞の天然NKG2Dに結合する抗体の可変領域VLおよびVHを、対応するハイブリドーマ細胞系の全RNAからクローニングした。次に、クローニングしたVLおよびVH領域を、scFvフラグメントをドメイン配置VL/VHに一致させるための2段階融合PCRのテンプレートとして用いた。この目的に用いられるVL特異的プライマーペアは、5'VLB5RRV (5'AGG TGT ACA CTC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GTC TCC A 3' (SEQ ID 83))および3'VLGS15 (5'GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC 3' (SEQ ID 84))のオリゴヌクレオチドからなり、VHプライマーペアは、5'VHGS15 (5'GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT TC T CAG GT (GC) (AC) A (AG) CTG CAG (GC) A G TC (AT) GG 3' (SEQ ID 85))および3'VHBSpEI (5'AAT CCG GAG GAG ACG GTG ACC GTG GTC C CT TGG CCC CAG 3' (SEQ ID 86))のオリゴヌクレオチドからなる。最初のPCRの工程として、VHおよびVL増幅産物を以下のPCRプログラムにより得た。第1のサイクルとして94で5分間変成、37で2分間アニーリング、72で1分間伸長；94で1分間変成、37で2分間アニーリング、72で1分間伸長を6サイクル；94で1分間変成、55で1分間アニーリング、72で45秒間伸長を18サイクル；72で2分間末端延長を行った。融合PCRの第2の工程として、VHおよびVL-PCRフラグメントをアガロースゲルから精製し、オリゴヌクレオチドプライマー5'VLB5RRVおよび3'VHBSpEIと混合し、以下のPCRプログラムを行った。94で5分間1回変成；94で1分間変成、55で1分間アニーリング、72で1.5分間伸長を8サイクル；72で2分間末端延長を行った。抗-NKG2D scFv-フラグメントをエンコードするVL/VH融合産物を、アガロースゲルから精製し、制限酵素BsrGI/BspEIにより消化した。WO0003016の図10に記載されたEcoRI/SalIクローニングDNAフラグメントを含む哺乳動物発現ベクターpEF-DHFR (Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021)を、制限酵素BsrGI/BspEIにより消化し750bpフラグメントを放出させ、残ったベクターフラグメントを精製し、抗-NKG2D scFv-フラグメントのクローニングに用いた。従って、得られた哺乳動物発現ベクターの誘導體pEF-DHFRは、Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021に記載されたように二重特異性単鎖抗体をエンコードするEcoRI/SalI-DNA挿入を含み、これはNKG2DおよびEpCAMに対して誘導される。EpCAMは、多くの上皮腫瘍により発現され、ネズミモノクローナル抗体とともに切除された結腸直腸癌のアジュバント処理のための標的抗原としてすでに用いられている。抗-NKG2D×抗-EpCAM二重特性単鎖抗体の発現プラスミド (SEQ ID 47-49)を、エレクトロポレーションによりDHFR-欠失CHO-細胞にトランスフェクトし、安定なトランスフェクション体の選択、遺伝子増幅およびタンパク質生産をMack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021に記載されたように行った。二重特異性抗体を、Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021に記載されたようにNi-NTA-カラムを用いたC-末端ヒスチジン標識を介して培地上清から精製した (図3参照)。

【0121】

<実施例4：DAP-10の細胞外ドメインに誘導される抗体>

NKG2Dレセプター複合体の細胞外ドメインと反応する抗体も、以下のプロトコールにより得ることができる。

6 から 8 週齢の B A L B / c マウスを 30 のアミノ酸 (S E Q I D 5 , Q T T P G E R S S L P A F Y P G T S G S C S G C G S L S L P) またはその一部を含むヒト D A P - 10 の完全細胞外ドメインに相当するペプチドにより免疫することにより得られ (W u (1999) S c i e n c e 285 : 730)、それぞれキャリアタンパク質とコンジュゲートされうる。例えば、D A P 10 (S E Q I D 6 , Q T T P G E R S S L P A F Y P G T S G S C) の細胞外ドメインの N - 末端の 21 のアミノ酸を含むペプチドは、C - 末端システインのメルカプト基を介して直接マレインイミド活性 K L H に結合しうる。コンジュゲートしたものは、100 μ g / ml の濃度で 0.9 % N a C l に溶解され、次に完全フロイントアジュバント 1 : 2 で乳化され、マウス当たり 50 μ l を個々に感染されうる。完全フロイントアジュバントを不完全フロイントアジュバントに置き換える以外は同様にして、マウスは、最初の免疫の 4、8 および 12 週後に追加免疫を受けうる。最初の追加免疫の 10 日後、血液サンプルを採取し、K L H のために上述したように 21 重合 D A P - 10 ペプチドとコンジュゲートした固定化 B S A の E L I S A により抗体血清力価を調べることができる。第 2 の追加免疫の 3 日後、陽性血清力価を有するマウスからの脾臓細胞を、Current Protocols in Immunology (Coligan , Kruisbeek , Margulies , Shevach and Strober , Wiley Interscience , 1992) に記載される標準プロトコールに従いハイブリドーマ細胞系を発生させるために P 3 \times 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞 (A T C C C R L - 1580) と融合しうる。P E G 融合の後、細胞をマイクロタイプレート中でウェル当たり 100 . 000 の細胞で接種し、10 % ウシ胎児血清、300 単位 / ml の組み換えヒトインターロイキン 6 および選択のための H A T 添加剤を補給した 200 μ l の R P M I 1640 媒地で成長させうる。密に成長したウェルからの培地上清を、以下の E L I S A による D A P 10 ペプチドとの反応性により調べることができる。

96 U 底プレート (N u n c , m a x i s o r b) のウェルを、濃度 5 μ g / ml でペプチド - B S A - コンジュゲートとともに 4 で一晚被覆する。被覆したウェルを、洗浄バッファ (0.1 M N a C l , 0.05 M N a₂ H P O₄ p H 7.3 , 0.05 % T w e e n 20 , 0.05 % N a N₃) にて 3 回洗浄し、次に洗浄バッファに分散させた 2 % のスキムミルク粉末を 200 μ l / ウェルにて室温で 1 時間インキュベートすることを通じてブロックする。次の工程として、ハイブリドーマの上清を希釈せずおよび数回希釈して室温にて 2 時間インキュベートする。さらに 3 回の洗浄工程の後、結合したモノクローナル抗体を、マウス免疫グロブリンに対するホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートポリクローナル抗体により検出できる。5 回の洗浄の後、E L I S A を T M B 置換溶液 (テトラメチルベンジジン、R o c h e) の添加により最後に現像できる。着色した沈殿を、15 分後に E L I S A リーダーを用い 405 nm で測定する。これらのペプチド - 反応性ハイブリドーマクローンを同定するために、そしてこれはインタクトな N K - 細胞と C D 8⁺ T リンパ球の N K G 2 D レセプター複合体の D A P - 10 に結合する能力のあるモノクローナル抗体を産生するものであるが、P B M C の 3 色蛍光分析を実施例 2 に示すように行いうる。

インタクトな N K - 細胞および C D 8⁺ T リンパ球を染色するモノクローナル抗体の可変領域を、対応するハイブリドーマ細胞系からクローニングし、実施例 3 に記載されたように二重特異性単鎖抗体を構築するために用いることができる。

【 0 1 2 2 】

< 実施例 5 : N K G 2 D 誘導の抗体による天然 C D 8⁺ T 細胞の補強したプライミング >
i n v i t r o のプライミング実験として、ナイーブヒト C D 8⁺ T 細胞を、以下のよう
に単離した。

健康なドナーから得た 500 ml の末梢血液からフィコール密度遠心分離により単核細胞 (P B M C) を調製した。C D 8⁺ T 細胞を、市販の細胞分離キット (R & D S y s t e m s , H C D 8 C - 1000) を用いたネガティブ選択により単離した。C D 8⁺ T 細胞カラムに 2 \times 10⁸ の P B M C を流した。なおこれは、カラム当たり 1 μ g のモノ

クローナル抗-CD11b抗体(Coulter 0190)を補給した製造者の抗体カクテルとともにプレインキュベートされたものである。プライムされた非増殖の細胞毒性CD8⁺T細胞は、ナイーブCD8⁺Tリンパ球とCD45RA⁺/RO⁻表現型を共有するので、元のT細胞サブセットを取り除くために追加的細胞精製マーカーとしてCD11bを導入した。従って、CD11b⁻/CD8⁺T細胞のみがCD45-アイソフォームに基づく精製工程に入って最終的にナイーブCD8⁺Tリンパ球を得ることとなり、これは、ナイーブCD4⁺T細胞がCD45RA⁺/RO⁻表現型を運ぶようなものである。CD8⁺T細胞の精製は、抗-CD8抗体による単染色後のフローサイトメトリーにより制御した。CD11b陽性CD8⁺T細胞はいつもCD28陰性となり逆もまた同様であるため、CD8⁺T細胞調製物からのCD11b⁺細胞の欠落を抗-CD28抗体による単線色により確認した。

ポリクローナルヒツジ抗-マウスIg抗体(Dynal, 110.01)とコンジュゲートしたマグネティックビーズに続いてネズミモノクローナル抗-CD45RO抗体(PharMingen, UCHL-1, 31301)とのインキュベーションを通じ、CD45RO⁺細胞を精製したCD8⁺T細胞から取り出した。残っているナイーブCD8⁺T細胞の純度は、抗-CD45RA/抗-CD45ROによる二重染色後のフローサイトメトリーによる測定により、>95%であることを確認した。末梢血液500ml当たりのナイーブCD8⁺T細胞の平均収率は、 5×10^6 (CD8)であった。

ナイーブCD8⁺T細胞による*in vitro*のプライミング実験は、以下のように行った。

ウェル当たり25,000のEpCAMでトランスフェクトされたCHO-細胞を96ウェル平底培地プレートで2時間インキュベートした。なおこのプレートは、PBSで1:1000に希釈されたポリクローナルウサギ抗-マウスIgG1抗体(Dako, Z0013)により一晚被覆されたものである。細胞がプラスチックに吸着した後、14,000radで放射線照射した。その後、ウェル当たり50,000の精製ナイーブCD8⁺T細胞を、10%ヒトAB血清、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシン、2mMグルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES-バッファー、1x非必須アミノ酸(Gibco)および50μM-メルカプトエタノールを補給したRPMI1640培地に加えた。WO9925818(実施例7)に記載されたEpCAM特異的B7-1/4-7単鎖構築物を500ng/mlで、1μg/mlのネズミIgG1アイソタイプコントロール(Sigma, M-7894)、および、250ng/mlまたは50ng/mlの二重特異性単鎖抗体(bsc)EpCAMxC3(Mack(1995)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7021)あるいは二重特異性単鎖抗体なしで、これらに加えた。500ng/mlのB7-1/4-7単鎖構築物は、CD8⁺T細胞上でのCD45-アイソフォームの発現にそれ自身影響を与えない最大濃度であった。平行した実験として、IgG1アイソタイプコントロールを、最終濃度1μg/mlでネズミNKG2D特異的IgG1抗体BAT221を含む希釈した、イタリアジェノバのDr. Morettaから親切にも提供されたハイブリドーマ上清に置き換えたことを除いては、同一濃度および同一の組み合わせのbscEpCAMxC3およびB7-1/4-7単鎖構築物を用いた。あるいは、NKG2D特異的モノクローナル抗体は、SEQ ID 47-49および72-79のようにNKG2DおよびEpCAMに結合する二重特異性抗体に置き換えることができる。モノクローナル抗体と対照的に、二重特異性抗体は、固体担体上に固定化されない。

すべての実験は、同じウェルにて3回行った。さらに、2つの同じ96ウェルプレートの組を、3日および6日目にフローサイトメトリーに利用するのに十分な細胞を得るために調製した。3日目に、1つの96ウェルプレートから上清を採取し、市販のELISAキット(PharMingen, 2600KK)を用いてTNF-濃度を測定した。細胞を同様に採取し、CD45アイソフォーム発現のフローサイトメトリー分析を行った。さらに、上清の半分を第2の96ウェルプレートのそれぞれのウェルから取り出し、B7-

1 / 4 - 7 単鎖構築物、b s c E p C A M × C D 3、B A T 2 2 1 および / またはアイソタイプコントロールの濃度に一致するように調製した新しい培地に置き換えた。6 日目に、この 9 6 ウェルプレートの細胞を採取し、その C D 4 5 アイソフォーム発現パターンをフローサイトメトリーにより分析した。一般的には、3 つの同じウェルからの細胞および上清 (3 倍量) をそれぞれフローサイトメトリーおよびサイトカイン分析のためにプールした。

フローサイトメトリーを F A C スキャン (B e c t o n D i c k i n s o n) にて行った。C D 4 5 アイソフォーム発現のフローサイトメトリー分析を、P E - コンジュゲートモノクローナル抗 - C D 4 5 R A 抗体 (C o u l t e r , 2 H 4 , 6 6 0 3 9 0 4) および F I T C - コンジュゲートモノクローナル抗 - C D 4 5 R O 抗体 (D A K O , U C H L 1 , F 0 8 0 0) で 1×10^5 の細胞を氷上で 3 0 分間二重染色することより行った。T 細胞精製のフローサイトメトリーによるモニターを、3 色 - コンジュゲートモノクローナル抗 - C D 8 抗体 (M e d a c , M H C 0 8 0 6) および F I T C - コンジュゲートモノクローナル抗 - C D 2 8 抗体 (M e d a c , M H C D 2 8 0 1) による単染色により同様に行った。

これらのプライミング実験では、主要シグナルは、二重特異性単鎖抗体 (b s c A b) E p C A M × C D 3 により媒介され、従って T - 細胞レセプター (T C R) を通じた特異的抗原認識を模倣しており、第 2 のまたは補助刺激シグナルは、T - 細胞の C D 2 8 の結びつけを通じた E p C A M - 特異的 B 7 - 1 / 4 - 7 単鎖構築物により媒介された。従って、ナイーブ C D 8 ⁺ T 細胞のプライミングの N K G 2 D - 誘導の抗体の影響を測定することができ、これは、T C R 様および補助刺激シグナルを通じて活性化されるものである。E p C A M - 特異的構築物を備えた非 - ヒト刺激細胞を、バックグラウンドシグナルを避けるために用い、これは、補助刺激レセプターを付带的に発現するヒト刺激細胞をもたらす。T 細胞プライミングの動態は、C D 4 5 R A および C D 4 5 R O の発現を測定することと同時に 3 日目および 6 日目にフローサイトメトリーによりモニターした。図 6 に示すように、ナイーブ T 細胞のほぼ全量は、B 7 - 1 / 4 - 7 単鎖構築物 (5 0 0 n g / m l) および b s c A b E p C A M × C D 3 (2 5 0 n g / m l) の存在下で 6 日のうちに、C D 4 5 - 表現型がプライムされた T 細胞、即ち、C D 4 5 R A ⁺ / R O ⁺ に変化した。従って、中間状態が 3 日目に観察された。驚くべきことに、N K G 2 D - 誘導の抗体のさらなる存在は、ナイーブ C D 8 ⁺ T 細胞の増殖とプライミングをさらに加速させた。ナイーブ T 細胞が T C R 様および補助刺激シグナル単独を通じて刺激された場合に少ない割合でシグナルを受けるのに比べて、さらなる N K G 2 D - シグナルを細胞が受けた場合には、図 6 B の右下象限の 3 日目におかれた C D 8 ⁺ T 細胞の高い割合から、このことが結論づけられる。T N F - α は、通常はプライムされた C D 8 ⁺ T 細胞から産生され、それらのナイーブ対応物から産生されるのではないから、補強された T 細胞プライミングの効果は、N K G 2 D - 誘導の抗体の不存在下でプライムされたものと比較して N K G 2 D - シグナルを受ける C D 8 ⁺ T 細胞の上清の 3 日目に測定される T N F - α の高い濃度により確認することができる (図 7) 。

6 日目のフローサイトメトリーの結果でさえ (図 6 C および E) 、プライミングの工程がほぼ完結した場合は、N K G 2 D に媒介される T 細胞プライミングのサポートを示している。6 日間のうちでの C D 4 5 R A - 発現の損失は、図 6 C の右下に位置する C D 8 ⁺ T 細胞の高い割合で測定されるように、N K G 2 D に媒介されるシグナルの不存在下よりも存在下において、より大きいことが確認された。

【 0 1 2 3 】

< 実施例 6 : N K G 2 D 誘導の抗体は、T C R - または F c γ R I I I - 複合体それぞれとの結びつけを通じて引き金となる C D 8 ⁺ T 細胞と N K 細胞の細胞毒性を補強する。> 細胞毒性リンパ球、即ち、C D 8 ⁺ T 細胞および N K 細胞の N K G 2 D 誘導抗体によるリクルートを検査するために、我々は、標的としてネズミ F c γ R 陽性 P 8 1 5 細胞系および、エフェクターとして M e l a n - A 特異的ヒト C D 8 ⁺ T 細胞クローン (M e l a n - A 細胞) または N K L 細胞 (B a u e r (1 9 9 9) S c i e n c e 2 8 5 :

10

20

30

40

50

727)のいずれかを用いた⁵¹Cr放出分析を行った。細胞の細胞毒性を測定する⁵¹Cr放出分析は、Mack (1995) Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7021に記載されているものにわずかな修正を加えて行った。10.000の⁵¹Crラベル化P815細胞を、丸底マイクロタイタープレートのウェル当たり50.000のMelan-A細胞または200.000のNKL細胞のいずれかと混合した。NKL細胞を、5μg/mlのCD16抗体(3G8)、および/または、ネズミNKG2D特異的モノクローナル抗体BAT221を含む希釈したハイブリドーマ上清の存在下で、4時間インキュベートした。Melan-A細胞は0.2μg/mlのCD3抗体(OKT3)および/または希釈したBAT221上清の存在下で、4時間インキュベートした。最大の⁵¹Cr放出は、Malyバッファー(2%SDS/0.37%EDTA/0.53%Na₂CO₃)を用いた標的細胞の溶解により測定した。自然の⁵¹Cr放出は、エフェクター細胞および抗体の不存在下でインキュベートした標的細胞により測定した。抗体の不存在下でエフェクター細胞とともにインキュベートした標的細胞は、ネガティブコントロールとして用いた。特異的分解は、[(cpm、実測放出量) - (cpm、自然放出量)] / [(cpm、最大放出量) - (cpm、自然放出量)]により算出した。細胞毒性分析は、3つのサンプルにより行った。図8に示すように、BAT221は、公表されたNKG2D抗体(Bauer (1999) Science 285: 727)とは対照的に、それ自身実質的に標的細胞溶解を引き起こすことはなかった。予期されたように、CD16-およびCD3-抗体は、NKL細胞およびMelan-A細胞それぞれにより再誘導された標的細胞溶解を引き起こした。しかし、それ自身細胞毒性ではないが、BAT221は、Melan-A細胞のTCR-複合体およびNKL細胞のFcRIII-複合体との結びつけによって引き金となる標的細胞の細胞毒性を驚くほどに補強した。あるいは、P815細胞は、例えばSEQ ID 47-49および72-79のようにNKG2DおよびEpCAMに結合する二重特異性抗体と交換したEpCAM陽性Kato-細胞およびNKG2D特異的モノクローナル抗体に置き換えることができる。CD8⁺T細胞のTCR-複合体は、CD3および標的細胞の表面抗原に結合する二重特異性抗体や、処理されたMHC I-複合標的細胞抗原の特異的TCR-認識によって、結びつけられうる。NK細胞のFcRIII-複合体は、CD16および標的細胞の表面抗原に結合する二重特異性抗体や、例えばそのFc部分を介してFcRIIIに結合したヒトEpCAM抗体のような標的細胞特異的モノクローナル抗体によって、結びつけられうる。

【0124】

<実施例7：標的結合部位のC-末端に位置するNKG2D結合部位を有する二重特異性単鎖抗体>

5匹のBalb/cマウスを、実施例2に記載されたようにヒトNKG2Dにより遺伝子的に免疫した。NKG2D-レセプター複合体の発現パターンに似せてヒトリンパ球表面の血清抗体反応性によりマウスを同定するために、実施例2に記載されたようにPBM Cの3色蛍光分析を、1:10、1:20および1:40に希釈されたマウス血清を用いて行った。図9に示すように、わずか1つのマウス血清(No.4)が、CD8⁺Tリンパ球およびNK細胞の双方に対して強い染色を示した。このマウスの脾臓細胞を、WO9925818(実施例6)に記載されているようにコンビナトリアル抗体ライブラリーの構築のための免疫グロブリンレパートリーとして用いた。クローニングされた抗体レパートリーは、二重特異性単鎖抗体の抗原結合部位に相当するC-末端部分を真似て、N2-VH-VL-融合タンパク質として繊維状ファージに表出した。NKG2D反応性scFv-フラグメントの選択は、NKG2D陽性NKL細胞の3回のパニングに続く17-1A-またはEpCAM-抗原のためにWO9925818に記載されているように、固定化組み換えNKG2Dタンパク質の2回のライブラリーパニングを通じて行った。細胞パニングは、4での45分間の穏やかな振とうに続く500μlのファージサスペンション中で2-5×10⁶のNKL細胞を再分散することによりPBS/10%FCS中で行った。その後、細胞および結合したファージ粒子は、卓上遠心分離器にて2500rpmで

2 分間遠心分離した。そして、得られたペレットを、再遠心分離に続いて 1 ml の P B S / 1 0 % F C S で再分散することにより 2 回洗浄した (3 回目のパニング) 。 4 回目のパニングの間に 3 回の洗浄工程を、 5 回目のパニングの間に 5 回の洗浄工程を行った。特異的に結合したファージ粒子を、再分散および、 3 0 μ l の 2 M T r i s - 塩基 (p H 1 2) での中和に続く 5 0 0 μ l の H C l - グリシンでの 1 0 分間インキュベーションにより、 N K L 細胞から溶出した。溶出物は、新規の感染していない E . c o l i X L 1 ブルー培地の感染に用いた。 5 回のファージ産生およびこれに続く抗原結合性 s c F v - 表出ファージの選択の後、 E . c o l i 培地からのプラスミド D N A を、 4 回目および 5 回目のパニングに対応して単離した。 N - 末端に N 2 ドメインを運ぶ溶解性 s c F v - 抗体フラグメントの産生のために、遺伝子 I I I - 産物の C T - ドメインをエンコードする D N A フラグメントを、 S p e l / N o t I にて切除し、 N - 末端 I g - ヒンジ領域および C - 末端フラグ - エピトープ (図 1 0 、 S E Q I D 5 0 および 5 1) の側面に位置するヒト p 5 3 の 4 分裂ドメイン (R h e i n n e c k e r (1 9 9 6) J i m m u n e) . 1 5 7 : 2 9 8 9) に置き換えた。ライゲーションの後、得られたプラスミド D N A のプールを、 1 0 0 μ l の熱ショックコンピテント E . c o l i X L 1 ブルー細胞に形質導入し、カーベニシリン L B - 寒天に配置した。単一のコロニーを、クローニングされた V H - と V L - 領域および W O 9 9 2 5 8 1 8 (実施例 6) に記載されているように溶解性抗体フラグメントのペリプラズムでの発現のためのインタクトな可変領域の完全性のために、スクリーニング - P C R により確認した。ペリプラズム調製物は、固定化組み換え N K G 2 D およびペルオキシダーゼ - コンジュゲート抗 - F l a g M 2 抗体 (S i g m a , A - 8 5 9 2) で検出される特異的に結合する N 2 - s c F v - p 5 3 - 融合タンパク質の E L I S A により調べた。図 1 1 に示すように、 4 回目および 5 回目のパニングからの多くの N K G 2 D 反応性クローンが同定できた。陽性クローンの s c F v - エンコードフラグメントは、ファージ表出ベクターから B s p E I により切除し、仔牛腸ホスファターゼの脱リン酸化に続く B s p E I および X m a I の消化により調製されたプラスミドベクター B S - C T I (W O 0 0 - 0 6 6 0 5 、 図 2 を参照) 中にサブクローンした。 s c F v - フラグメントの正しい配向は、制限酵素 B s p E I および S p e l による分析的消化により確認した。 B S - C T I への挿入により、 s c F v - エンコードフラグメントは、フレーム単位で H i s ₆ - 標識 (S E Q I D 5 2 - 7 1) に融合した。次の工程として、 s c F v - フラグメントは、 B S - C T I から B s p E I および S a l I により切除し、 E p C A M - 特異的モノクローナル抗体 M 7 9 の s c F v - フラグメントを E p C A M に高い親和性で結合する (= b s c 3 B 1 0 x C D 3) モノクローナル抗体 3 B 1 0 に置き換えたことを除き、 M a c k (1 9 9 5) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 2 : 7 0 2 1 に記載されたように E p C A M - 特異的、 C D 3 - 誘導の二重特異的単鎖抗体を含む哺乳動物発現ベクター p E F - D H F R 中に B s p E I / S a l I をサブクローンした。従って、 C D 3 - 特異的 s c F v - フラグメントは、 N K G 2 D - 反応性 s c F v - フラグメントに置き換えられ、その結果 E p C A M - 特異的、 N K G 2 D - 誘導の二重特異性単鎖抗体を得た (S E Q I D 7 2 - 7 9) 。 C H O / d h f r - 細胞を、抗体様分子の一時的発現のために選んだ。細胞のトランスフェクションは、製造者のプロトコールに従い T r a n s F a s t トランスフェクション試薬 (P r o m e g a , H e i d e l b e r g) を用いて行った。要約すると、トランスフェクションの 2 0 時間前にウェル当たり 2 . 5 $\times 10^5$ の細胞を 6 ウェルプレートに接種した。トランスフェクション混合物は、抗体配列または - ガラクトシダーゼ遺伝子を含む 6 μ g のプラスミド D N A を、補給なしの 1 m l M E M アルファ培地に添加することにより調製した。混合の後、 3 0 μ l の T r a n F a s t 試薬を加えた。混合物をボルテックスし、室温で 1 5 分間インキュベートした。そして、培地を細胞から除去し、トランスフェクション混合物と置き換えた。 3 7 での 1 時間のインキュベーションの後、トランスフェクション混合物を吸引し、新しい完全 M E M アルファを細胞に添加した。タンパク質産物を、トランスフェクションの 4 から 5 日後に F A C S 分析により分析した。上清を 4 から 5 日後に採取した。細胞破片を取り除くために、上清を遠心分離した。抗体の機能

を、Kato I I I細胞の抗-EpCAM特異的部分の結合試験により分析した。サンプル当たり、 4×10^5 の細胞を、 $25 \mu\text{l}$ のFACSバッファー(1%熱不活化FBS、PBS中0.05% Na_3N)で希釈した $75 \mu\text{l}$ のトランスフェクト細胞上清中でインキュベートした。サンプルは、4で30分間インキュベートした。 $200 \mu\text{l}$ のFACSバッファーで細胞を2回洗浄した後、細胞を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-Penta.His抗体(QIAGEN, Netherlands)とともに4で30分間インキュベートした。その後、細胞を再び洗浄し、ヒツジ抗-マウスFITCコンジュゲート(SIGMA, Deisenhofen)とともに30分間インキュベートした。結合を、FACS Calibur (Becton-Dickinson)により検出した(図12)。bsc3B10xP4-3およびbsc3B10xP5-2によって一時的にトランスフェクトされたCHO-細胞の上清は、固定化組み換えNKG2D-抗原の陽性ELISAシグナルを示した(図13)。

NKG2Dの代わりとして、実施例4に記載されたDAP10-ペプチド-コンジュゲートをマウスを免疫するために用いることができる。そして、このマウスの脾臓細胞は、この実施例に記載されているようなコンビナトリアル抗体ライブラリー構築のための免疫グロブリンレパートリーの供給源となりうる。従って、二重特異性単鎖抗体の標的結合部位のC-末端に位置している場合でさえ、 $\text{CD}8^+$ Tリンパ球およびNK細胞のNKG2D-レセプター複合体を認識するDAP10反応性抗体結合部位は、固定化ペプチド-コンジュゲートおよび/またはNKG2D-レセプター複合体を発現している細胞のライブラリーパニングを通じて選択することができる。

【0125】

<実施例8:二重特異性単鎖抗体による標的結合部位のC-末端に位置するNKG2D-結合部位との $\text{CD}8^+$ TおよびNKエフェクター細胞のリクルート>

NKG2D-誘導の二重特異性抗体による細胞毒性リンパ球、即ち、 $\text{CD}8^+$ T細胞およびNK細胞のリクルートの検査のために、我々は、標的として胃癌細胞系Katoを、エフェクターとしてMelan-A特異的ヒト $\text{CD}8^+$ T細胞クローン(Melan-A細胞)、NKL細胞(Bauer (1999) Science 285: 727)または健康なドナーからの非刺激PBMCのいずれかを用いた ^5Cr 放出分析を行った。

EpCAM陽性Kato細胞に対して再誘導された細胞の細胞毒性を測定する ^5Cr 放出分析を、Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021に記載されているものにわずかな修正を加えて行った。丸底マイクロタイタープレートのウェル当たり $10,000$ の ^5Cr -ラベル化Kato細胞を、 $50,000$ のMelan-A、 $200,000$ のNKL細胞またはPBMCのいずれかと混合し、実施例8に記載の異なるEpCAM-特異的、NKG2D誘導の二重特異性単鎖抗体(3B10xP4-3, 3B10xP4-14, 3B10xP5-2および3B10xP5-23)によりトランスフェクトされたCHO細胞からの培地上清の1:2希釈物の存在下で、4時間(Melan-AおよびNKL細胞)または18時間(PBMC)インキュベートした。最大の ^5Cr 放出は、Malyバッファー(2%SDS/0.37%EDTA/0.53% Na_2CO_3)を用いた標的細胞の溶解により測定した。自然の ^5Cr 放出は、エフェクター細胞および二重特異性抗体の不存在下でインキュベートした標的細胞により測定した。抗体の不存在下でエフェクター細胞とともにインキュベートした標的細胞は、ネガティブコントロールとして用いた。特異的溶解は、 $[(\text{cpm, 実測放出量}) - (\text{cpm, 自然放出量})] / [(\text{cpm, 最大放出量}) - (\text{cpm, 自然放出量})]$ により算出した。細胞毒性分析は、3つのサンプルにより行った。図14に示すように、NKG2D-誘導の二重特異性単鎖抗体3B10xP4-3により一時的にトランスフェクトされたCHO-細胞の上清は、4回目の ^5Cr 放出試験でMelan-AおよびNKL細胞双方でEpCAM陽性Kato細胞の、弱い再現性があり滴定可能な細胞溶解を引き起こした。さらに、NKG2D誘導の二重特異性単鎖抗体3B10xP4-3、3B10xP4-14, 3B10xP5-2および3B10xP5-23によりそれ

ぞれ一時的にトランスフェクトされたCHO-細胞の上清は、18回目の⁵¹Cr放出分析でPBM Cで実質的な標的細胞の溶解を引き起こした(図15)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、C-末端ヒスチジン-標識を含む溶解性NK G 2 Dのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。クローニングに用いた制限部位は、ヌクレオチド配列の最初(E c o R I)および最後(S a l I)に示す。

【図2】

図2は、DNAレベル(パネルA)およびタンパク質レベル(パネルB)におけるNK G 2 D誘導の二重特異性単鎖抗体の分子設計を示す。二重特性抗体の機能の様式も、パネルBに示す。

10

【図3】

図3は、抗-NK G 2 D(8 R 2 3) × 抗-E p C A M(4 - 7)の二重特異性単鎖抗体のSDS-PAGEである(右レーン)。左レーンは、分子量マーカーを示す。

【図4】

図4は、遺伝子により免疫性を付与するのに用いられる分泌されたヒトNK G 2 - Dのカルボキシル基-末端フラグメントをエンコードする発現ベクターを示す。

図示されたベクターからのNK G 2 - Dフラグメントの発現は、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の即時早期プロモーターにより制御される。NK G 2 - Dフラグメントは、ヒトmycエピトープに続く、ネズミ免疫グロブリンカップ軽鎖由来のリーダーペプチドからなる。NK G 2 - Dのコード配列は、そのコグネート終止コドンにより終了する。BGHポリアデニル化部位は牛成長ホルモンポリアデニル化部位を、ampはアンピシリン耐性遺伝子を、ColE1 originは、ColE1複製起点を示す。

20

【図5】

図5は、NK G 2 - D陽性標的細胞に特異的に結合するハイブリドーマの選択を示す。CD8-陽性T細胞(A)またはCD56-陽性ナチュラルキラー細胞いずれかのハイブリドーマ上清6E5、8G7および11B2の3つの別個のモノクローナル抗体の結合が、FACS分析により示されている。6E5は6E5/A7の、8G7は8G7/C10の、11B2は11B2/D10の略号である。

10H9は、NK G 2 - D結合活性を欠いたハイブリドーマ上清のコントロールである。種々の検出抗体が図に示されている。

30

【図6】

図6は、ナイーブT細胞のプライミングにおけるNK G 2 - Dに対して誘導されるモノクローナル抗体の補強効果を示す。

マーカーCD45RA(A)を発現しているナイーブT細胞は、FACSスキャンの左上の区画に示される。ナイーブT細胞は、B7-1 × 抗-E p C A M融合タンパク質と単鎖二重特異性抗-E p C A M × 抗-CD3分子(B-E)の組み合わせにより、E p C A M-発現標的細胞系(E p C A M / 17-1A-トランスフェクトCHO細胞)の存在下でプライムされた。なお、BAT221と呼ばれるNK G 2 - Dに対するモノクローナル抗体の不存在下の場合をDおよびEに、存在下の場合をBおよびCに示す。マーカーCD45ROを発現したプライムされたT細胞は、右下の区画に現れている。数字は、先にナイーブT細胞であったものがプライムされた割合を示す。蛍光1は、FITC-ラベル化抗-CD45RO、蛍光2は、フィコエリトリン-コンジュゲート抗-CD45RAである。

40

【図7】

図7は、T細胞により産生されるTNFのNK G 2 - Dに対して誘導されるモノクローナル抗体の補強効果を示す。

ナイーブT細胞は、B7-1 × 抗-E p C A M融合タンパク質と単鎖二重特異性抗-E p C A M × 抗-CD3分子の(図示したように)濃度増加との組み合わせにより、E p C A M-発現標的細胞系(E p C A M / 17-1A-トランスフェクトCHO細胞)の存在下

50

でプライムされた。TNF産物は、BAT211と呼ばれるNKGD-Dに対するモノクローナル抗体の存在下(A)および不存在下(B)で、市販のTNF ELISAにより測定した。

【図8】

図8は、それぞれモノクローナル抗体CD16(5 μ g/ml)およびCD3(0.2 μ g/ml)を組み合わせてNKGDハイブリドーマBAT211の上清を数回希釈することによりP815に対して再誘導されたMelan A細胞およびNKL細胞の細胞毒性を示す。200,000のNKL細胞または50000のMelan A細胞は、希釈された抗体の存在下でクロム-51でラベル化された10,000のKatoIII細胞に総体積200 μ lとなるように加えられた。バックグラウンドコントロール(E+T)は、抗体希釈をしないエフェクター細胞と標的細胞を含む。マイクロタイプレートは、5%CO₂下、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。インキュベーションの後、50 μ lの上清をそれぞれのウェルから取り、ガンマ線カウンターにより放出された⁵¹Crを分析した。

10

【図9】

図9は、ヒトNKGD-Dの分泌されたC-末端フラグメントをエンコードする発現ベクターにより免疫されたマウスでの特異的な免疫反応の検出を示す。

ヒトCD8⁺Tリンパ球およびヒトNK細胞に対して免疫された5匹のマウスの1:30に希釈された血清の結合活性を、フローサイトメトリーにより分析した。健康なドナーの末梢血液から得た200,000の単核細胞を、5匹のマウスの希釈血清とともにインキュベートした。結合したネズミの抗体が、PBSで1:100に希釈されたフルオレセイン(FITC)-コンジュゲートヤギ-抗-ラットIg(IgG+IgM)抗体により検出された。3色蛍光分析を、CD8⁺(3色)に対してポジティブゲートおよびCD16⁺(PE)に対してネガティブゲートを適用することにより行い、CD8⁺-NK-細胞からのいなる汚染シグナルを受けることなく、CD8⁺Tリンパ球(表現型:CD8⁺、CD16⁻)にのみ排他的に帰属するFITC媒介の蛍光を検出することができた。同様に、3色蛍光分析を、CD56⁺(PE)に対してポジティブゲートおよびCD3⁺細胞(3色)に対してネガティブゲートを適用することにより行い、CD56⁺Tリンパ球からのいなる汚染シグナルを受けることなく、NK-細胞(表現型:CD56⁺、CD3⁻)にのみ排他的に帰属するFITC媒介の蛍光を検出することができた。ネガティブコントロールとして免疫されていないマウスの代表的な血清を用いた(免疫前血清)。細胞は、FACSスキャンを備えたフローサイトメーターにて分析した(Becton Dickinson)。

20

30

【図10】

図10は、E.coliのペリプラズムでのN-末端ブロック単鎖抗体の発現に用いたファージミドの設計を示す。

Pは細菌のプロモータ; ompAはペリプラズム輸送のためのリーダー配列; N2は代理N-末端ブロックドメイン; VHはscFvの可変重鎖ドメイン; VLはscFvの可変軽鎖ドメイン; p53は転写因子p53の4分裂ドメイン; Flag-標識はインフルエンザウイルスエピトープ標識を示す。種々の制限酵素部位の位置は、上方に示す。基本的なコード配列は、黒の箱として示す。

40

【図11】

図11は、NKGD-D特異的な、E.coliのペリプラズムで産生されるN-末端ブロック単鎖Fvフラグメントの検出を示す。

感度を増すために、単鎖Fv抗体の結合アビディティを、転写因子p53の4分裂ドメインとN-末端ブロックscFvsのカルボキシル末端とを融合することにより増加させた。4分裂化したscFvsは、捕捉のための溶解性の組み換えNKGD-Dと検出のためのペロオキシダーゼ-コンジュゲート抗-FLAG抗体を用いたELISAによりペリプラズム分画中で検出された。種々のクローンのELISAシグナルが描かれる。>0.05のシグナルを有するすべてのクローンは、さらに分析された。

50

【図12】

図12は、NKGDを標的とした4つの二重特性性分子へのEpCAMの一時的な発現と結合を示す。

CHO/dhfr⁻細胞は、4つの異なる単鎖二重特異性分子をエンコードする発現ベクターによって一時的にトランスフェクトされた。Aにおいて、ベータ-ガラクトシダーゼ遺伝子は、ネガティブコントロールとしてトランスフェクトした。種々の二重特異性分子は、Bが3B10xP4-3、Cが3B10xP4-14、Dが3B10xP5-2、Eが3B10xP5-23である。細胞培地上清は、5日後に採取し、ヒト胃癌腫細胞系KatoIIIへのEpCAM特異的結合のFACS分析により二重特異性抗体の発現を調べた。細胞に結合した二重特異性分子は、FITC-ラベル化ヤギ-抗-マウス抗体により検出した。FACSヒストグラムプロットを示す。

10

【図13】

図13は、ELISAによるNKGD特異的結合の2つの単鎖二重特異性抗体の特徴付けを示す。

2つの二重特異性抗体3B10xP4-3および3B10xP5-2は、CHO細胞培地上清で一時的に発現させた。被覆した溶解性のものに結合して、組み換えNKGDは、ヘキサヒスチジン-標識をつけた二重特性抗体の検出のためにペルオキシダーゼ-コンジュゲートx抗-ヘキサヒスチジン抗体を用いたELISAにより調べた。2つの異なる濃度で調べた。培地上清をAは1:1希釈、Bは1:2希釈とした。コントロールとして、EpCAM特異的3B10x抗-CD3二重特異性抗体の結合を用いた。この非特異的

20

【図14】

図14は、二重特異性3B10xP4-3抗体によりEpCAM-陽性Kato細胞に対して再誘導されたMelanA細胞(A)およびNKL細胞(B)の細胞毒性を示す。200,000のNKL細胞または50000のMelanA細胞は、数回希釈された二重特異性抗体の存在下でクロム-51でラベル化された10,000のKatoIII細胞に総体積200μlとなるように加えられた。バックグラウンドコントロール(E+T)は、抗体希釈をしないエフェクター細胞と標的細胞を含む。マイクロタイタープレートは、5%CO₂下、37°Cで4時間インキュベートした。インキュベーションの後、50μlの上清をそれぞれのウェルから取り、ガンマ線カウンターにより放出された⁵¹Crを分析した。

30

【図15】

図15は、NKGDを介して末梢血液単核細胞(PBMCs)をリクルートする4つの単鎖抗体による特異的標的細胞の溶解を示す。

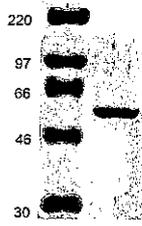
モノクローナル抗体3B10由来の単鎖Fvによりヒト胃癌腫細胞系KatoIIIのEpCAM標的を認識する4つの二重特異性抗体は、NK/CD8-特異的レセプターNKGDに特異的な4つの区別されたscFvsからすべて作製した。4つの二重特異性抗体をエンコードする発現ベクターを、CHO細胞に一時的な発現のためにトランスフェクトし、上清を集めた。示された希釈における分泌された二重特異性抗体を有する上清は、ヒト免疫エフェクター細胞(PBMCs)の存在下でKatoIII細胞の特異的溶解のための細胞毒性分析により調べた。CHO上清不存在下では、PBMCsの存在下でKatoIII細胞の標的細胞溶解は観察されなかった。示されたデータは、3回の測定

40

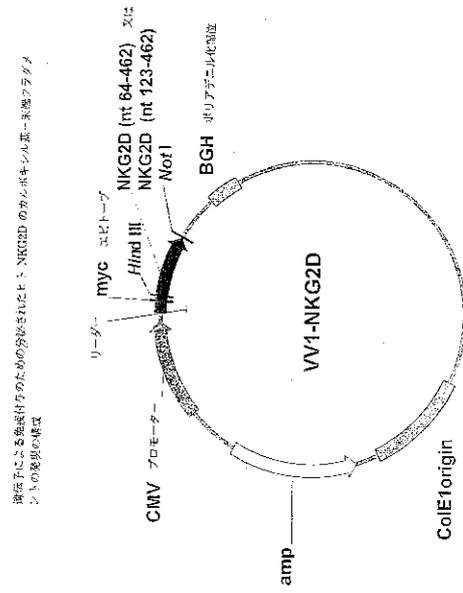
50

【 図 3 】

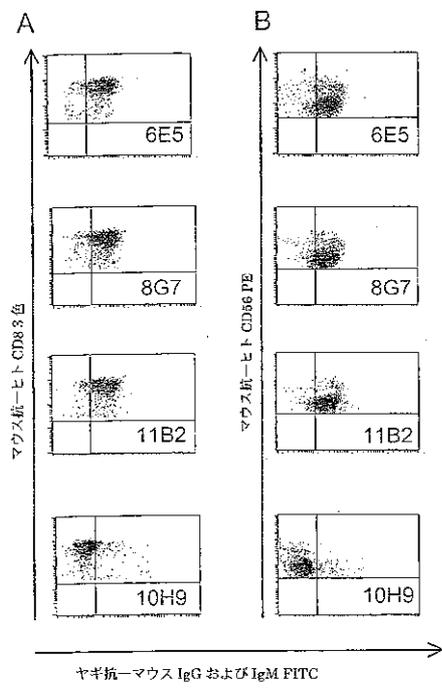
抗-NKG2D (8R23) × 抗-EpCAM (4-7)
・重特異性単鎖抗体の SDS-PAGE



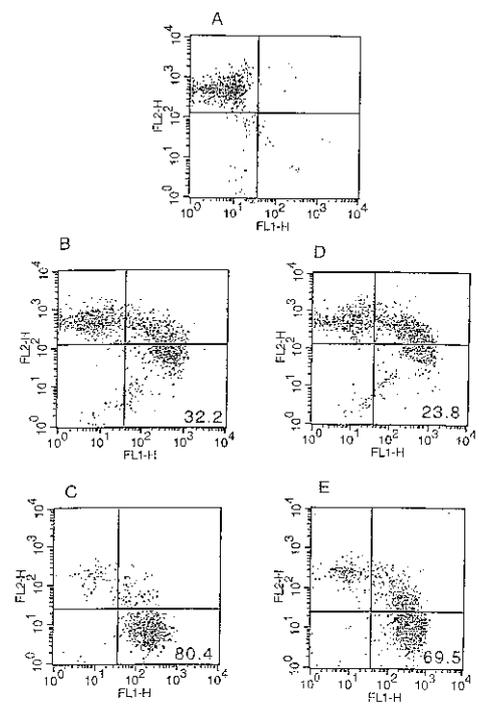
【 図 4 】



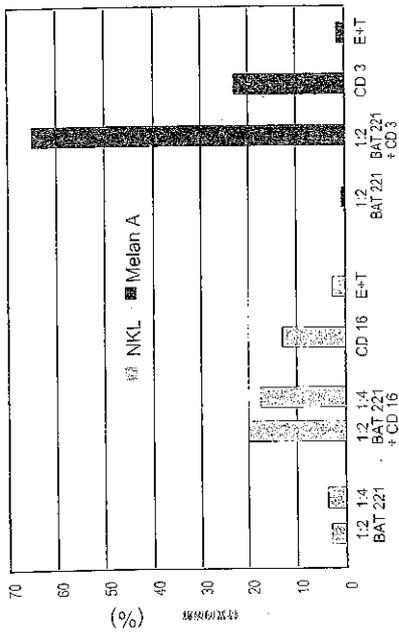
【 図 5 】



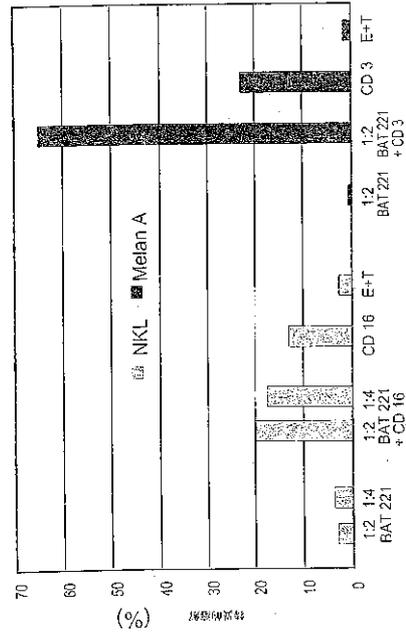
【 図 6 】



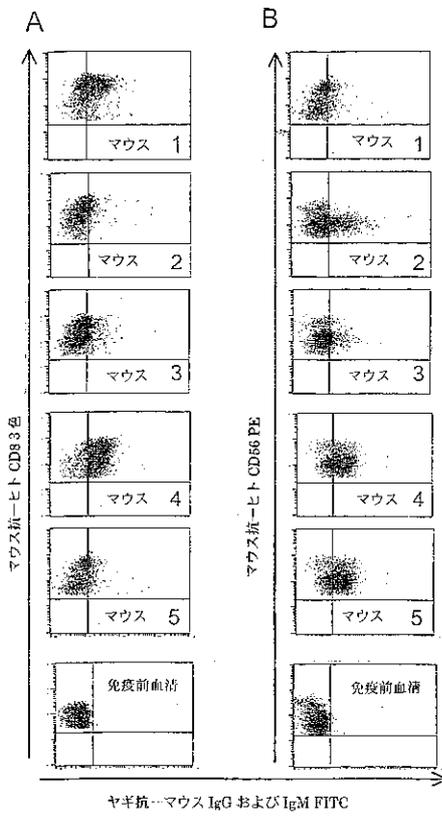
【 図 7 】



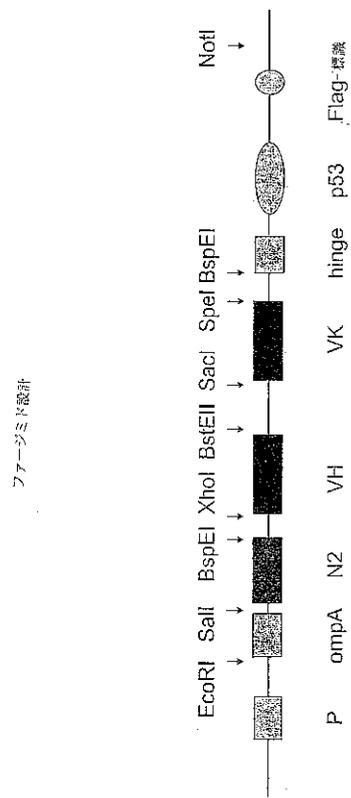
【 図 8 】



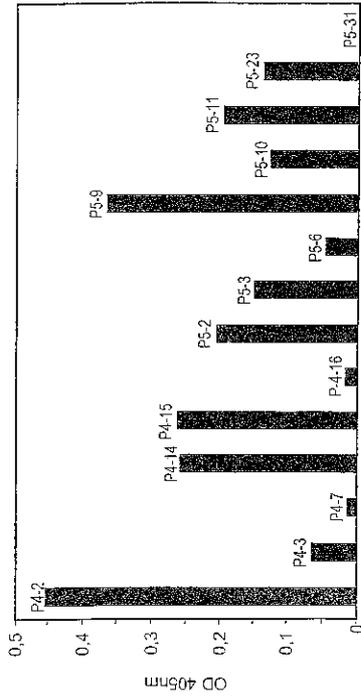
【 図 9 】



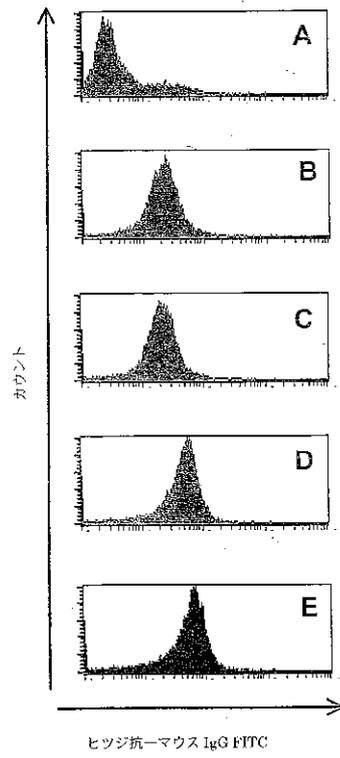
【 図 10 】



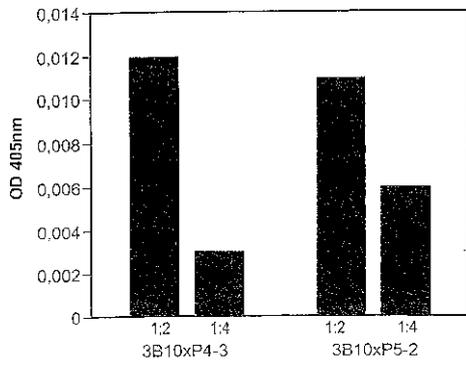
【 図 1 1 】



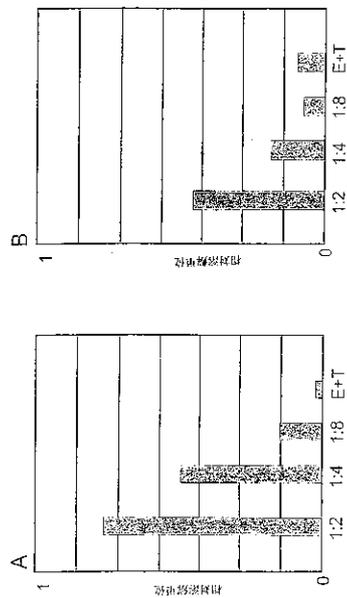
【 図 1 2 】



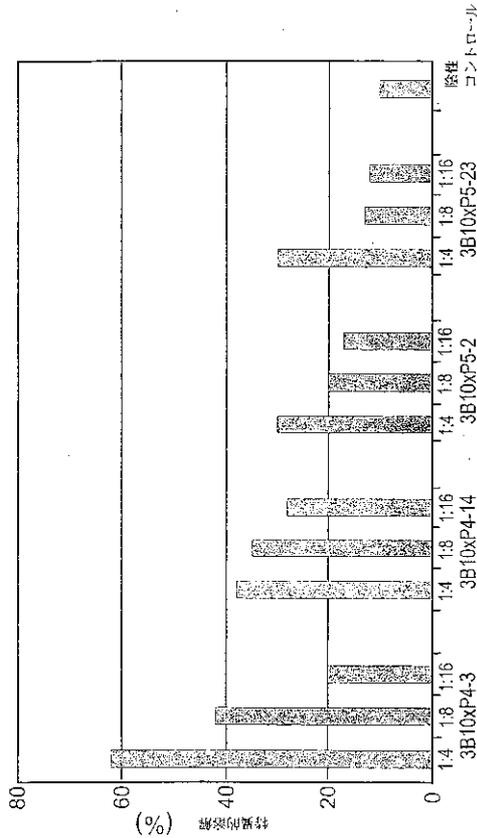
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 - 1 】

SEQ ID	内容	配列の型	配列
1	ヒト NKG2D 細胞外ドメイン	NN	IlatcaaccaagaagtcaaaIleccctgaccgaa gltactgtgcccagctccaaaaactgataIgtac aaaaataactctcaaatIlttgaagagaIleaaa ectgtatgagagccaggctgtgtatgctcaaat gccagcccttgaagatatacagaasaggacc aggallacttaactggtgagatcatatgtggatg ggactagIacacattccaaaatggatctggcag tgggaagatggtccactctccaccaactcaaa caaaatIgaatgaagaggagagactgtgcactc IstgcAcagctIlaaaggctataIagaaaaactgtc aaactcaaatcaaacatIgtatgcaaaaggactgt gtccggcatcaaccactcaat
2	ヒト NKG2D 細胞外ドメイン	AA	LFNQEVOIPLTESYCGPCPKNWICYK NICYQFDESKNWYEQASCMSON ASLLKVVYKEDQDLLKLVKSYHWMG LVHIPTNGSWQWEDGSLSPNLLTHE MKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTY. ICMQRITYSGHHHHH
3	ヒト NKG2D 細胞外フラグメント1 (nt 64-462)	AA	NQEVOIPLTESYCGPCPKNWICYKNN CYQFDESKNWYEQASCMSONAS LLKVVYKEDQDLLKLVKSYHWMLV HIPTNGSWQWEDGSLSPNLLTIEMQ KGCALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRIV
4	ヒト NKG2D 細胞外フラグメント2 (nt 123-462)	AA	WICYKNNICYQFDESKNWYEQASC MSQNASLLKVVYKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSLSPNLL TIEMQKGCALYASSFKGYIENCSTP NNTYICMQRIV
5	ヒト DAP10 細胞外ドメイン	AA	QITPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCG SLSLP
6	ヒト DAP10 細胞外フラグメント	AA	QITPGERSSLPAFYPGTSGSC

【 図 1 6 - 2 】

7	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域	NN	gacatcagctgaccagctctccagctccatctc cctcIgtgggagaactgIcaccatcacatgctcag caagIgggaatacaaatattagctgtgatcag cagaacacgggaaaatctccctcaggctcgtctat atgcgaaaaactgcagagtggtgIccatcag gltcagIggcaggtgacIcaggaacaaatctctc aaagcaaacagctcgcagctggaagattggggg IatIcIgcacacatIltgggtactcactgtgacgtc ggtggcgcaccacagctggatcaga
8	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域	AA	DIQLTQSPASLSASVGETVITICRASG NIHNYLAWYQQKQKSPQLVLYNAK TLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSL QPEDFGSYVQCFHWSTTWTFFGG GTKLEIK
9	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR1	AA	RASGNHNYLA
10	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR2	AA	NAKTLAD
11	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR3	AA	QHFWSITWT
12	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域	NN	cgglcacaactgcagcagctcgaactgagIggI gaggctcggcctcagIgaagctgIcctgcaagg ctctggctccscgtccacagctactgtagactg ggIcagcagaagcctgagcagaagcctIagIggc IggaaagatgactctcagatgIgaacactca caatcaaaagtcaagcagaagcactIatgactgt agcaaatccgccagcagaagcactcaactg agcagcctcactcagcagcactcgtgctctact gtgcaaaatgggtactcctctgactcagggg caaggIaccagIcaactctcckca
13	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域	AA	QVQLQSQGPELVRPQASVKLSCKAS GYTFTSYWMMWVQQRPEQGLEWIG RIDFVYDSETHYWKFKDKAILTVDKSA STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARMGD YSFDYWGQGITVTVSS

【 図 1 6 - 3 】

14	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR1	AA	GYTFTSYWNN
15	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR2	AA	RIDFVYDSETHYWKFKD
16	抗-NKG2D ハイブリドーム 11B2D10 可変領域 CDR3	AA	MGDYSDFY
17	抗-NKG2D ハイブリドーム 6H7E7 可変領域	NN	gacatcagctgaccagctcaccagaactcctgtc cactccaggggagaagIcacaactgctcagcag gccagctcagIgaatIcatIgaactgtgaccag cagaagcagcagctcccccacaactcagatIat gccacatcaacagctcctggagcctcctgctgt IcagIggcagIggctgIggaccctIactctcacc IatcagcagIgtgaggtgagatgctgcaact IatcagcagcagcagIgtgIcagcagcagcagc IcagIggcagcagcagIgtgIcagcagcagcagc
18	抗-NKG2D ハイブリドーム 6H7E7 可変領域	AA	DIQLTQSPAILASPGKVTMTQRAS SSVYMWYQQKPGSSPKPWVATS NLASGVPAFSGSGSTYSLTHSRV EAEDAATYYCQWNSNPLTFGAGTK LEIK
19	抗-NKG2D ハイブリドーム 6H7E7 可変領域	AA	RASSSYVMH
20	CDRL1 抗-NKG2D ハイブリドーム 6H7E7 可変領域 CDR2	AA	ATSNLAS
21	抗-NKG2D ハイブリドーム 6H7E7 可変領域 CDR3	AA	QQWNSRPLT

【 図 1 6 - 4 】

22	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6H7E7 可変領域	NN	caaggcagctggaggagtcaggacotggccctgg ggccctccacagccctgctccacctgcaactg ctctgggttctcttaaccagctatggtgcaagggat tcgcccagctccaggaaggctctgagctgctg gaglatatggctgctggaagcaacaataataat cggcttcatctccagcagcagcaccagaagac aacccaagagcccaagtttctaaaatgaatagtc tgcaaatgctgacacagccatgactactgcca ggggggctgacagggggcgcctgtttggfac tgggccaaggcccaagctcaaccgctctccca
23	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6H7E7 可変領域	AA	QVQLQESGGPGLVAPSGQSLSITCTVSG FSLTYSYGVHWIRQPPGKGLWLVGI WAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKS QVFLKINSLCIDDTAMYYCARGGYVE GAAWFGYWGQGTITVTVSS
24	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6H7E7 可変領域 CDR1	AA	GFSLTYSYGVH
25	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6H7E7 可変領域 CDR2	AA	VIWAGGSTNYNSALMS
26	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6H7E7 可変領域 CDR3	AA	GGYEGAAWFGY
27	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域	NN	Gacallcagctgaccagctccagccactctgct gagctccagggagaaagctgctctccaggg gcccagcagccatggcacaagcattcactggtat cagcaagaacaaggttctccaagctctcata aagatgctctgagctctctctggatccctccag gtttatggcagggatcagggacagtttactctca gcactccagggtagagctgagatattgcagatt attactgcaacaagatactccgcccctccagtt cagtgctggcccaagctgagatctcaaa
28	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域	AA	DIQLTQSPAILSVSPGERVFSFCRAS QTSISIFWYQORTNNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGTDFTLISINGVE SEDIADYYCQNSNTWPLTFGA GTKLEIK

【 図 1 6 - 5 】

29	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR1	AA	RASQTIGTSH
30	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR2	AA	YASESIS
31	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR3	AA	QQSNTWPLT
32	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域	NN	caggctcagctgcaagcagcagccctggcctagt gacgcccctccagagcctgctccatccctgacag tctctggttctcttaactctatggtgcaagctg cgcagctccaggaaggctgagctgctggg agtgatagagctggcgaagcagacataaag cagcttcatccagctgagcactcagcaaggac aatccagcagcagctctctaaatgagcagct gcaapctatccacagccatattactgctccag aaagctccatggttactcagggataggactc ctggcccaaggaaccagctcagctctccca
33	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域	AA	QVQLQESGGPGLVOPFSLSITCTVVS GFSLTIYGVHWVRSQPKGLEWLVGI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRO VFFKMSSLQANDTAIYVCSRKSHDGY YGVMDYWGQGTITVTVSS
34	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR1	AA	GFSLTIYGVH
35	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR2	AA	VIWGGSTDYNAAFIS
36	抗-NKG2D ハイブリドーマ 8G7C10 可変領域 CDR3	AA	KSHDGYGVMDY

【 図 1 6 - 6 】

37	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域	NN	gacatcagctgaccagctccagccactctgctg tgagctccagggagaaagctgctctccaggg ccagcagagcattggcacaagcattcactggtat agcaagaacaaaggttcccaagctctcataa aglatgctctgagctctctctggatccctccag gtttatggcagggatcagggacagtttactctca gcactccagggtagagctgagatattgcagatt attactgcaacaagatactccgcccctccagtt cagtgctggcccaagctgagatctcaaa
38	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域	AA	DIQLTQSPAILSVSPGERVFSFCRAS QTSISIFWYQORTNNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGTDFTLISINGVE SEDIADYYCQNSNTWPLTFGAGTKLEIK
39	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR1	AA	RASQSIGTSH
40	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR2	AA	YASESIS
41	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR3	AA	QQSNTWPLT
42	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域	NN	caaggcagctggaggagtcaggacotggccctg gcccctccacagccctgctccacctgcaactg ctctggttctcttaaccagctatggtgcaagggat tcgcccagctccaggaaggctctgagctgctg aglatatggctgctggaagcaacaataataat cggcttcatctccagcagcaccagaagac aacccaagagcccaagtttctaaaatgaatagtc tgcaaatgctgacacagccatgactactgcca ggggggctgacagggggcgcctgtttggfac tgggccaaggcccaagctcaaccgctctccca
43	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域	AA	QVQLQESGGPGLVOPFSLSITCTVVS GFSLTIYGVHWVRSQPKGLEWLVGI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRO VFFKMSSLQANDTAIYVCSRKSHDGY YGVMDYWGQGTITVTVSS

【 図 1 6 - 7 】

44	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR1	AA	GFSLTIYGVH
45	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR2	AA	VIWGGSTDYNAAFIS
46	抗-NKG2D ハイブリドーマ 6E5A7 可変領域 CDR3	AA	KSHDGYGVMDY
47	11E2D10 47 二重特異性 単結 Fv		DIQLTQSPAILSVGETVITTCRASG NIHNLAWYQKQKSPQVLYVNAK TLADGVPSPRFSGSGGTQVSLKINSL QPEDFGSYVQCFHWSTTWTFGGGT KLEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG QSGPELVRFPGASVKLSCKASGYTF TSYWMWVQRPQEGLEWGRIDP YDSETHYNQKFKDKAILTVDKSASTA YMGLSLTSSEDSAVVYCAKMGQYSF DYWGGGTTVTVSSGGGGSEVQLLE QSGAELARPGASVKLSCKASGYTF NYGLSWYKQRFQVLEWIGEVYPR GNAYYNEKFKKATLTADKSSSTAS MELRSLTSEDSAVVYFCARRGSDTN YDWFYDVGQGTITVTVSSGGGGGG GGGGGGGGSELVMTQPLSLPVSLG DOASISCRSSOSLVHNSGNTYLHWY LQKPGSPKLLIKVSNRFGVDFR SGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SGSTHYVPTFGGGTKLEIKRTTSHHH HHHTS

【 図 16 - 8 】

48	6G7C10x 47 二重特異性 単鎖 Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRAS QTIGTSHWYQORTNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINGVIE SEDIADYYCQOSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GPGLVQPSQSLSTICTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLVGIWVSGGSDT YNAAFISRLSISKDNSKRVQVFFKMSSL QANDTAYYCSRKSHDGYVGMVWYD GGGTTVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARFGASVKLSCKASGYTFTNYGLS WVKORPQGVLEWIGEVYPRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASMLRSL TSEDVAVYFCARRGSYDNTYDWFYD VWGGGTTVTVSSGGGGGGGGGGGG GGGSELVMTQPLSLPVSLGDDOASIS CRSSQSLVHSGNTYLHWYLOKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGG TDFTLKISRVEADLVYFCQSTHVPY PYTFGGGKLEIKRTTSHHHHHHTS
49	6E5A7x 47 二重特異性 単鎖 Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRAS OSIGTSHWYQORTNGSPRLLIKAYAS ESISGIPSRFSGSGTDFTLINGVIE SEDIADYYCQOSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GPGLVQPSQSLSTICTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLVGIWVSGGSDT YNAAFISRLSISKDNSKRVQVFFKMSSL QANDTAYYCSRKSHDGYVGMVWYD GGGTTVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARFGASVKLSCKASGYTFTNYGLS WVKORPQGVLEWIGEVYPRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASMLRSL TSEDVAVYFCARRGSYDNTYDWFYD VWGGGTTVTVSSGGGGGGGGGGGG GGGSELVMTQPLSLPVSLGDDOASIS CRSSQSLVHSGNTYLHWYLOKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGG TDFTLKISRVEADLVYFCQSTHVPY PYTFGGGKLEIKRTTSHHHHHHTS
50	7: p53 ドメインの 4 分裂	NN	actagltcggaaaccocggggggaacaccca caoctctggaaaccocgagtgagaatattca cctcagaccggggcggtagcgtcagagatgc cgaagcctgaalgccgocllgaaactcaagatgc ccagcctgggaagagaccaggggggagcacta caaggtgacgatccatagtaagggggcgg

【 図 16 - 9 】

51	5: p53 ドメインの 4 分裂	AA	TSSGTPLDGTTHTSGKPLDGEYFTLG IRGRERFEMFRELEALELKDAAQAGK EPGGSQYKDDDDK
52	P4-2 単鎖 Fv	NN	gaggcgcagctcctcggagctcggaggcct ggagcagcctggggctcctgagactcctctgca actctgggctcaoctccctcctactacatgagc ggccggcagcctccaggaagcactgagctggt gggtttattagaacaagcactaagttaccacaac agagacagctgactggaaggctcctaccat ctccagagaatctcccaegcactcctactca rtgaacaccctgagcagcaggaagcctccacta ttcctgcaagagataagcaagcctcctgagctg ggccaaggacacagctcagcctcctcagctg gtgagctcctggggggcagcctcctgagctg gtctgagctcctgagcagcagctcctcctcctg ctctgacucagcaggaaggcactactagact gcaagctcagctcagctctgtaaacagtgcaaac aaaagaactcctgactgctgacagcagaaccc agggcagcctcctaacctgctgactcctggcact cactggaactcctgggctccctgactcactcagc cagggactcagcaacagatctcactcaccatcag cagctgagcctgcaagcctggcagttattactg cagaagattagatgactcagctcctgagctgg gcccagcctgagctcaagctgacagctgactcag ggcactcactcactcact
53	P4-2 単鎖 Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSLRLSCAT SGFTFIDYIMSWVRQAPGKLEWIG GFRINRANGVTVEYSASVKGRFTISR DNSOSILYLQMMNTRAEASPTTYCAR DKTDFDWWGGGTTVTVSSGGGGGG GGGGGGGGSELVMTQSPSSLTVAAG EYVMSCKSSCSLLNSGNKHYLTW YQQKPGQPPKLLIHWASTRESGVYD RFTGGSGCTDFLTISVQAEDELAVY YQANDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSS GHHHHHH

【 図 16 - 10 】

54	P4-3 単鎖 Fv	NN	gaggcgcagctcctcggagctcggaggcctg cagcctggagagcctcgaactcctcctgagcagc ctcagctcatttagtagatacagagctgagctg cggcagcctcaggaagcctgagatgagctg ggagaatattccagtagcagctcagataaactct aogcactctaaagataaactcactcctcaga gacacagcacaacacccctgactcctcaaatga ccaagctgagctcaggaacacagcctctattact gtcagaagggggcagtagctcctctgactact ggggccaagggcaacagctcactcctcagctg ggctggtctgctcggcggcctcctcctcctct ggtctgagctgctcagcagcagctcctcctct atcctcctcctgggaagagcagctcactcctg cgggcaagctcagcagctgtagctcctaacctg gcttcaagcaagcagctggaactataaaccc tgatcaagcacaacagcttagatctctgctcctc aaagctcagggcagctgagctggcagctatt ctctcctcagcagcagctgctcagatgctg gactattctctcaaatgctgctcctgacac gtcggggggggcaacagctgagatcaaacgt acagatgctcggcactcactcactcactcact
55	P4-3 単鎖 Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GDFSRYSYMSWVRQAPGKLEWIG EINPDSSTINYPQLKDFIISRDNAK NLTYLQMSKVRSEDTALYYCARFAYV APFDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG GGGGGGSELVMTQSPSSLSASLGER VSLTQFAKSCDYSKNSLNLQCFPDGTI KRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSD YSLTISSESEDFVYVYCLQYASSPYT FGGGKLEIKRTTSSGHHHHHH

【 図 16 - 11 】

56	P4-14 単鎖 Fv	NN	gaggcgcagctcctcggagctcggaggcctg cagcctggagagcctcgaactcctcctgagcagc ctcagctcatttagtagatacagagctgagctg cggcagcctcaggaagcctgagatgagctg ggagaatattccagtagcagctcagataaactc tccgactcctcaagataaactcactcactcaga gacaacggcaacaaactcctgctcctcacaatga ccaagctgagctcaggaacagcctctattact gtcagaagggggcagtagctcctctgactact ggggccaagggcaacagctcactcctcagctg ggctggtctgctcggcggcctcctcctcctct ggtctgagctgctcagcagcagctcctcctct atcctcctcctgggaagagcagctcactcctg cgggcaagctcagcagctgtagctcctaacctg gcttcaagcaagcagctggaactataaaccc tgatcaagcacaacagcttagatctctgctcctc aaagctcagggcagctgagctggcagctatt ctctcctcagcagcagctgctcagatgctg gactattctctcaaatgctgctcctgacac gtcggggggggcaacagctgagatcaaacgt acagatgctcggcactcactcactcactcact
57	P4-14 単鎖 Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GDFSRYSYMSWVRQAPGKLEWIG EINPDSSTINYPQLKDFIISRDNAK NLTYLQMSKVRSEDTALYYCARFAYV APFDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG GGGGGGSELVMTQSPSSLSASLGER VSLTQFAKSCDYSKNSLNLQCFPDGTI KRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSD YSLTISSESEDFVYVYCLQYASSPYT FGGGKLEIKRTTSSGHHHHHH

【 16 - 20 】

73	3B10xP4-3 三重特異性 抗原 P _v	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSHNGITLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVDFRFSSSGGSTDFLL RISRVEAEDVSVVYCAQNLLEPRTFG GGTKLEIKGSSGSGGGSGGGSSQ VQLQSGPELKKPGETVKIKCKASGY FTFNIGMNVWVQAPGKGFKWMGW NITYGTEPTYGDDPKGRFAFSLTSSAS TAYLQINLNKEDTATYFCARFTSPD YWGQTTVTYVSSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGDFFSRY WMSWVRQAPGKGLWIGEIFDSSST INYPFLKDKFIRSDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYCARGAVVAPFDYWG QGTVTYVSSGGGSGGGSGGGSSQ ELVMTQSPSSLSASLGERVSLTCRAS ODIGSSLNWLQEPDQIKRLIYATSS LDSGVPKRFSSRSRGGSDYLTSSSE SEDFVDYCYQYASSPYTFGGGTKL EIKRTSSGHHHHHH
----	---	----	--

【 16 - 21 】

74	3B10xP4-14 三重特異性 抗原 P _v	NN	gatattgtagcgcggcgttctccaalccag tcacltggaaacalcagctccatctcgaagtt aglaagagctccacatagtaagtcacttatt glatggatctcagaagccagcagctctca gctcctgattatcagatgccaccctgcaggag gtcccaagacaggtctcagtagcagggcaggaaac lgaatlcaactcagaaacagcagatgtagcgtg agbatggggttattactctgccaatcagaa ctctcctggccttggaggccaccaagctgga aalcaeaagctgggtgtctggcggggcctc cgggtgtgktgtctcagggtcaactgcagcagtc aggcctcagcagaaagcctggagagacagtc aagatctccgcaaggctctgggtatacctcaaa actatggaatgaacgtgggaagcaggtcagg aaaggttcaagtgatggctgataaacact aacctgagagcccaacataggtgactcaag ggaaggttgcctctcttggaaacctgcagcaac tgcctattgacagatcaaacctcaaacctgagg cagcgtacatattctgtgcaagatccctcctg actctgggccaagggaaacagctcaactctcc tccagaggtggatccagaggtcagctcga gtctggaggtggcctgtgcaagcctgagatccct gaaactctctgtgcaagcctgagatctgattga gaaactggatgggtggcctggcaggtccagg aaagggctgaaatgattggaataatcaacaga tagcagtagataaactatcagcctctcaaggga taaatcatcatccagagacaccccaaaaata cgtgtactcgcacaagagcaagtgagatcag gaaacagccttattactgcaagagcagcagctac ggtagtagaacagctgactcagatgtggggcc aaaggccaacagcagctctccacatgggtgt ggctcggcggcggcctcgggtggtgggtgtg agctcagatgaccagctccagcctctctctg cactgtgggaaagctcctccacatctcag caagtgagaataatcagattattagcatgatacag cagaacaagggaaactctcagctcgtctat aatgcaaaaacctagcaagaggtgctccacag gtcagtagcaggtgagcagcaacagattctctg aaatcaacagctgagcctgaaagattgggagt tattactgcaacatattggtactcagctcagctc ggctgggaaacagctggagctcaaacgtaacac tagctcgggcaacacacatcat
----	--	----	--

【 16 - 22 】

75	3B10xP4-14 三重特異性 抗原 P _v	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSHNGITLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVDFRFSSSGGSTDFLL RISRVEAEDVSVVYCAQNLLEPRTFG GGTKLEIKGSSGSGGGSGGGSSQ VQLQSGPELKKPGETVKIKCKASGY FTFNIGMNVWVQAPGKGFKWMGW NITYGTEPTYGDDPKGRFAFSLTSSAS TAYLQINLNKEDTATYFCARFTSPD YWGQTTVTYVSSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGDFFSRY WMSWVRQAPGKGLWIGEIFDSSST INYPFLKDKFIRSDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYCARRSYGSYDWFY DVMGQGTVTYVSSGGGSGGGSSQ GGGSELQMTDSPASLSASVGETVT TCRASEWYSLAWYQQKGGKSPQL LVYNAKTLAEGVSPFSSSGGQTFQF LKINSLQPEDFGSYCOHHYGTPLTF GAGTKLEKRTSSGHHHHHH
----	--	----	---

【 16 - 23 】

76	3B10xP5-2 三重特異性 抗原 P _v	NN	gatattgtagcgcggcgttctccaalccag tcacltggaaacalcagctccatctcgaagtt aglaagagctccacatagtaagtcacttatt glatggatctcagaagccagcagctctca gctcctgattatcagatgccaccctgcaggag gtcccaagacaggtctcagtagcagggcaggaaac lgaatlcaactcagaaacagcagatgtagcgtg agbatggggttattactctgccaatcagaa ctctcctggccttggaggccaccaagctgga aalcaeaagctgggtgtctggcggggcctc cgggtgtgktgtctcagggtcaactgcagcagtc aggcctcagcagaaagcctggagagacagtc aagatctccgcaaggctctgggtatacctcaaa actatggaatgaacgtggatgagcagcctcagg aaaggttcaagtgatggctgataaacact aacctgagggccaacatagggtgacttcaag ggaaggttctcttatttggaaactctgccaagc tgcctattgacagatcaaacctcaaacagaggga cagcgtcaatattctgtgcaagatcaactcctc actctgggccaagggccaagcctcagctctcc tcaggaggtgtggaatcagaaggtgcaagctcga ggaactggaagagcctgtgtgcaactgagagat cactgaaactctcgtgtgctcggatcaactca glaactcgtgaaacgtggctccagcagctccag agaagggcctgaggggtgcaaaatagattga aaactaataatagcaacatattgctggagctgt gaaaggtggttccatctcaagagatgallca aaagtagcttaccctgcaaatgaaactcaaa gtcgaagacagctgcaatattactgacaggtctcc ctaagcttctctctgcaactcagccaagggga ccaagctaccctcctcaggtggtgtgtctg cggcggcggctcgggtgtgtgtgtgtgtgtgt gctcaccagctcacaacacatgylgcatctcc cgggggaagatcaatctcagctcagtgcaagct caagtagaagccaactctgactggtatcagcag aaagcaggattctcccaaacctgattatagga caactcaactgctcggagctcacaagctgctcgt ggaaggtgtcagctcagctcactcaactcaactg gcaactgaggtgagatgagatggtgcaacttact gcaagcaggtgtagatcagcctcagctggtgt cttggccaagctttagatcaaacctcagctaggt cgggcaatcaacatcat
----	---	----	--

【 図 1 6 - 2 4 】

77	SR10415-2 二重特異性 阻鎖 Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSHNGITLYWYLQKPGQSPQLI IYQMSNLAGVPRDFSSSGSDFTFL RISRVEAEDVGYVYCAQNLLELPRFTG GGTKLEIKGGGGSGGGGGGGGSSQ VQLQOSGPPELKKPGETVKISCKASGY TFITNYGMNWVKQAPGKGFKWMGW NTYITGEPTYGDDFKGRFAFSLTSAS TAYLQINNLKNEDTATYFCARFTSPD YWGQGTITVYSSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRV WMSWVRQAPGKLEWIGENFDSSY WMMNWVRSPEKGLEWVAEIRLKN NYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVY LOMNNLRAEDGIYICTRLPYGFAM DYWGQGTITVYSSGGGGSGGGSSQ GGGGSELVLTQSPITMAASPGEKTI TCSASSISSNLYLHWYQKPGFSPKL LYRTSNLAGVPRDFSSSGSDFTFL LTIGTMEAEADVATYVYQDQSSIFLTF GAGTKLEIKRTTSSGHHHHHH
----	-----------------------------	----	--

【 図 1 6 - 2 5 】

78	SR10415-23 二重特異性 阻鎖 Fv	NN	gataatgtagcagcaggcagcattcccaatccag tcaclctggaaatcagcctccatctcgcagcct agaaagatctcctcaatagtaagcctcaattt gtattggtatctgcagaagccagcagcctccta gctcctgattatcagatgccaactgctcagga gtccagcagaggtcagtcagtcagtcaggaac tgatttccacagagatccagcagatggatgctg aggaatgggtgattatctggtcaaaaatcaga ctctcagcagcctcctcagcagcagcagcagc aatcaaggctggctgctcagcagcagcagc cggctgctgctgctcagcagcagcagcagc aggcctcagcagcagcagcagcagcagcagc aagatctcagcagcagcagcagcagcagcagc actatgcaatgcaagcagcagcagcagcagc aaaggttcaagcagcagcagcagcagcagc acaactgagcagcagcagcagcagcagcagc ggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc tgcctattgcaagcagcagcagcagcagcagc cagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc actcagcagcagcagcagcagcagcagcagc tccagcagcagcagcagcagcagcagcagc gtcagcagcagcagcagcagcagcagcagc gaactctcagcagcagcagcagcagcagcagc gatactgagcagcagcagcagcagcagcagc aaaggctcagcagcagcagcagcagcagcagc tagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc tagattcactcagcagcagcagcagcagcagc cgtgtaactcagcagcagcagcagcagcagc gacacagcagcagcagcagcagcagcagcagc ggggactcagcagcagcagcagcagcagcagc gtcagcagcagcagcagcagcagcagcagc gggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc acagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc ggggactcagcagcagcagcagcagcagcagc gttaaacagcagcagcagcagcagcagcagc ggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc gttactcagcagcagcagcagcagcagcagc cctgagcagcagcagcagcagcagcagcagc ttcactcagcagcagcagcagcagcagcagc cggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc tcaagcagcagcagcagcagcagcagcagc gtcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
----	------------------------------	----	---

【 図 1 6 - 2 6 】

79	SR10415-23 二重特異性 阻鎖 Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSHNGITLYWYLQKPGQSPQLI IYQMSNLAGVPRDFSSSGSDFTFL RISRVEAEDVGYVYCAQNLLELPRFTG GGTKLEIKGGGGSGGGGGGGGSSQ VQLQOSGPPELKKPGETVKISCKASGY TFITNYGMNWVKQAPGKGFKWMGW NTYITGEPTYGDDFKGRFAFSLTSAS TAYLQINNLKNEDTATYFCARFTSPD YWGQGTITVYSSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRV WMSWVRQAPGKLEWIGENFDSSY INYTPSLKRFISRDNAKNLTYLQMS KVRSEDTALYCARLQWGYFDYIW GGGTITVYSSGGGGSGGGGGGGG CSELVMTQSPSSLVTAGFRVMTSC KSSQSLLSGNQKNYLTWYQKPG QPPKLLYWASTRESGVPRDFSSSGS GTDFTLTSSVQAEADVATYVYQDQSS YPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHHHH
80	NKG2D short-1		atcaagcttgatagtaaaaaaataact
81	NKG2D-f		atcaactgaaacpaagaattcaatttc
82	NKG2D- stop-1		cggggtggcggccttacaagctcttgcag
83	5'VLBSRRV		agg tgl aca ctg cga tat cca gct gac cca gtc tcc a
84	3'VLGS15		gga gcc gcc gcc ggc aga acc acc acc acc ttg gat ctg cag ctg ggt ccc
85	5'VHGS15		ggc gcc gcc gcc tcc ggt ggt ggt tcc cag gl (ac) e (ag) ctg cag (gc) ag tc (at) gg
86	3'VHBSpEI		aat ccg gag gag acg gtg acc gtc gtc cct tgg ccc cag
87	NKG2D- 2.0-K		aggtgtacactcttaccaccaagaagttcaatt
88	NKG2D- 3.0-K		cc tcaaccggacacagccttgcagcagatg

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/71005 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/85, 5/10, A61K 39/395, 4748, 38/17, 48/00, A61P 31/00, 35/00, 37/00, G01N 33/53, C12Q 1/06, C12Q 14/705, 16/28, 16/46, 14/47

(74) Agents: VOSSHUS & PARTNER, Stubenstrasse 4, 81675 München (DE)

(21) International Application Number: PCT/EP01/03414

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 26 March 2001 (26.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(36) Priority Data: 00106467.4 24 March 2000 (24.03.2000) EP

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).

(71) Applicant and
(72) Inventor: KUFER, Peter (DE/DE); Am Kapellenacker 13, 85368 Moosburg (DE).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report; with (any) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

(73) Inventors and
(75) Inventors/Applicants (for US only): RIFTIMÜLLER, Gert (DE/DE); Finowstrasse 12, 80805 München (DE); LAUTERBUNSE, Ralf (DE/DE); Lammertstrasse 8, 81927 München (DE); BORSCHERT, Karin (DE/DE); Zaubersstrasse 14, 81677 München (DE); KISCHIEL, Konrad (DE/DE); Kurt Eisner Strasse 25, 81735 München (DE); MAVER, Monika (DE/DE); Am Brühl 17, 87724 Ottoberzen (DE); HOFMISTER, Robert (DE/DE); Jakob Huber Strasse 6, 82110 Gornwering (DE).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/71005 A2

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL POLYPEPTIDES COMPRISING A BINDING SITE TO AN EPITOPE OF THE NKG2D RECEPTOR COMPLEX

(57) Abstract: The present invention relates to a multifunctional polypeptide comprising a first domain comprising a binding site specifically recognizing an extracellular epitope of the NKG2D receptor complex and a second domain having receptor or ligand function. Furthermore, the present invention relates to polynucleotides encoding the multifunctional polypeptide, to vectors comprising said polypeptides and to cells comprising said polynucleotides or said vectors. The invention also relates to compositions comprising either of the above recited molecules, alone or in combination, as well as to specific medical uses of the multifunctional polypeptide of the invention.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

**Multifunctional polypeptides comprising a binding site to an epitope of the
NKG2D receptor complex**

The present invention relates to a multifunctional polypeptide comprising a first domain comprising a binding site specifically recognizing an extracellular epitope of the NKG2D receptor complex and a second domain having receptor or ligand function. Furthermore, the present invention relates to polynucleotides encoding the multifunctional polypeptide, to vectors comprising said polypeptides and to cells comprising said polynucleotides or said vectors. The invention also relates to compositions comprising either of the above recited molecules, alone or in combination, as well as to specific medical uses of the multifunctional polypeptide of the invention.

Several documents are cited throughout the text of this specification. The disclosure content of each of these documents (including any manufacturer's specifications, instructions etc.) is herewith incorporated by reference.

Many multifunctional polypeptide compounds described in the prior art are bispecific antibodies of varying molecular formats developed for retargeting immune effector cells against malignant or infected target cells, clearing pathogens or autoantibodies from blood circulation, enhancing drug therapy or as vaccines or as carriers e.g. of radioisotopes. Bispecific antibodies designed to redirect the cytotoxic activity of immune effector cells against target cells usually comprise a binding site recognizing a tumor-associated or a viral antigen on the target cells and a second binding site that interacts with a triggering molecule on the effector cells. Among the effector cells recruited in the prior art by bispecific antibody approaches were T-lymphocytes, NK-cells, monocytes and polymorphonuclear neutrophils. Triggering molecules for

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

2

bispecific antibodies were usually selected from a group of cell surface receptors consisting of CD64, CD16, the α/β -T cell receptor (TCR) and CD3, but also alternative triggering molecules like CD2, CD89, CD32, CD44, CD69 and the TCR-zeta chain were evaluated. Bispecific antibodies capable of redirecting cytotoxic T-lymphocytes (phenotype: CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺) to target cells either contain a binding site for the TCR, CD3, the zeta-chain or CD2. By engaging one of these triggering molecules, however, antigen specific signaling via the TCR-complex is disturbed since either epitopes of the TCR-complex itself are involved (the TCR, CD3 or the zeta-chain) or in case of CD2 a molecule that directly contributes to the TCR-signal by coaggregation of the src-related protein tyrosine kinase lck, associated with its cytoplasmic tail, with the TCR-complex.

Thus, the technical problem was to provide multifunctional polypeptides that enhance the specific activation of lymphocytes in the direct neighborhood of disease-related cells without interfering with the receptor specificity and/or function of those cytolytic lymphocytes.

The solution to said technical problem is achieved by providing the embodiments characterized in the claims.

Accordingly, the present invention relates to a multifunctional polypeptide comprising a first domain comprising a binding site specifically recognizing an extracellular epitope of the NKG2D receptor complex and a second domain having receptor or ligand function.

The term "multifunctional polypeptide" in connection with the present invention means a polypeptide that effects under suitable (also in vitro) conditions, such as physiological including pathological, such as in vivo or ex vivo conditions at least two, such as three, four, five or six different biological functions. Physiological in vitro conditions include buffered solutions, such as phosphate buffered solutions in the pH range of 5 to 9 and can be further derived from the appended examples. These functions are as specified further below. They include binding of the

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

3

specified domains with the molecules further specified herein. Binding may subsequently trigger a further biological function including the onset of a cascade, binding to receptors, modulation of signaling pathways or of gene expression and/or influence on apoptotic cell-death. At least two of these domains conferring differing biological functions and preferably the two domains specified herein above do not naturally occur together, i.e. do not naturally occur in this configuration or at all on the same polypeptide or protein or protein complex.

The term "receptor or ligand function" refers to a naturally occurring or non-naturally occurring binding function of a molecule such as a naturally occurring receptor that is preferably located on a cell surface with a fitting ligand; Examples of such receptor/ligand pairs are antibodies/antigens or other members of the Ig superfamily and their corresponding ligands or hormone receptors/hormones or carbohydrate/lectin interactions. Ligands in general, but not exclusively, refer to molecules that have a natural binding partner. In correspondence with the above, they may be antigens or hormones. However, they may also be of non-natural configuration or origin. Receptors/ligands as described above may be of natural origin, of recombinant or (semi) synthetic origin.

NKG2D is a C-type lectin-like NK cell receptor (Houchins (1991) J.Exp.Med. 172:1017) that forms the NKG2D receptor complex together with DAP10 (Wu (1999) Science 285: 730). DAP10 carries an activating sequence motif for PI3-kinase in its cytoplasmic domain and acts as signal transduction module for NKG2D that lacks signaling motifs in its cytoplasmic domain. Engagement of this receptor complex triggers a signaling cascade capable of inducing NK cell cytotoxicity. Like other NK cell receptors, the NKG2D receptor complex was also found to be expressed in certain T cell subsets, namely γ/δ -T cells, CD8⁺ α/β -T cells and in a diminishing minority of CD4⁺ α/β -T cells (Bauer (1999) Science 285: 727).

NK cells are dominant effectors of humoral immune responses, that gain antigen specificity through binding of IgG-antibodies to their surface Fc_γ-receptor CD16. Thus,

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

4

CD16 acts as specific antigen receptor enabling antibody-armed NK cells to destroy target cells in an antigen specific manner.

T-lymphocytes are the effectors of cellular immune responses, that carry the TCR-complex as specific antigen receptor. The TCR-complex is composed of several invariant chains including the CD3-complex and the zeta chain as well as two variable chains that confer the clonotypic antigen specificity. Depending on the type of variable chains found in the TCR-complex (either α - and β -chain or γ - and δ -chain), T-lymphocytes can be divided into $\alpha\beta$ - and $\gamma\delta$ -T cells. TCR-mediated recognition of target cells by cytotoxic T-lymphocytes i.e. CD8⁺ $\alpha\beta$ -T cells and $\gamma\delta$ -T cells usually leads to target cell lysis.

The majority of known lymphocyte-directed bispecific antibodies either recruit NK cells or T cells only. NK cells are usually recruited through engagement of CD16, forming the major extracellular part of the Fc_γ-receptor IIIA complex, while T cell recruitment is usually mediated through engagement of CD3, an invariant multi-chain component of the T cell receptor (TCR). Bispecific antibodies directed at the zeta chain associated with CD16 on NK cells as well as with the TCR on T cells, are capable of engaging both types of effector lymphocytes (WO00/03016). However, bispecific antibodies directed at the zeta chain, like those directed at CD3, also activate non-cytotoxic CD4⁺ T cells, that in vivo unlike CD8⁺ T cells contribute to undesired side effects e.g. due to systemic cytokine release without essentially contributing to the cytotoxic elimination of target cells.

The NKG2D-specific multifunctional molecules of the invention (which are in preferred embodiments bifunctional molecules comprising said first and second domain referred to above) in contrast to lymphocyte-directed bispecific antibodies known in the prior art are capable of recruiting with exceptional precision the entire range of lymphocytes that naturally carry a cytotoxic phenotype i.e. NK cell, CD8⁺ $\alpha\beta$ -T cells and $\gamma\delta$ -T cells without essentially touching other cell types like CD4⁺ $\alpha\beta$ -T cells that are usually not cytotoxic.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

5

The term "recruitment of cytotoxic lymphocytes" as used in the present invention is not limited to redirected lysis but also comprises enhancement of cytotoxicity and T-cell priming.

Thus, the NKG2D-directed molecules of the invention are unique due to their precision of exhaustively but also exclusively recruiting all relevant cytotoxic lymphocytes. In further contrast to lymphocyte-directed bispecific antibodies known in the prior art, the multifunctional molecules of the invention neither directly nor indirectly engage the specific antigen receptors of cytotoxic lymphocytes including the upstream cytoplasmic steps of the corresponding signaling cascades. In other words, function of the T-cell receptor complex is not impaired since the multifunctional polypeptide of the invention does not bind thereto. The signaling cascade downstream of the signal conferred by the T-cell receptor is therefore not affected by the interaction with the multifunctional polypeptide of the invention. As a result, activation and/or proliferation of cytotoxic lymphocytes is selectively supported, that due to their antigen receptor specificity are engaged in a specific immune response against those target cells recognized by the multifunctional molecules of the invention.

Said upstream signaling cascade in T- and NK-cells comprises ITAM polypeptides, Src kinases, ZAP-70/Syk and adaptor proteins such as LAT and SLP-76 responsible for the recruitment of effector molecules of the downstream signaling cascade. The downstream signaling cascade comprises molecules like the PI3-kinase as well as PLC γ , Grb2, Vav, Cbl and Nck.

By avoiding the engagement of specific antigen receptors and/or the upstream cytoplasmic steps of the corresponding signaling cascades the multifunctional molecules of the invention advantageously interfere to a smaller degree with specific antigen recognition than other lymphocyte-directed bispecific antibodies known in the prior art that e.g. bind to CD16 of the Fc γ -receptor complex on NK cells or to the CD3-component of the TCR-complex on T-lymphocytes. In particular, lymphocyte effector functions mediated by a target cell specific immune response may be overruled

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

6

through engagement of specific antigen receptors and/or the upstream cytoplasmic steps of the corresponding signaling cascades by bispecific antibodies of the prior art. In contrast, the multifunctional molecules of the invention by engaging the NKG2D receptor complex, which is neither directly associated with specific antigen receptors nor with the upstream steps of their cytoplasmic signaling cascades, are capable of enhancing the activation of those cytotoxic lymphocytes that recognize the same target cell through their specific antigen receptor.

This explains the surprising result described in the appended examples, that an NKG2D-mediated signal can accelerate priming of naive CD8⁺ T-cells even in the presence of

- (i) a strong primary signal mediated through engagement of the antigen specific T-cell receptor complex and
- (ii) maximum co-stimulation provided by B7-1, the dominant mediator of the second T-cell signal.

Furthermore, it was surprisingly found, that the cytotoxicity of CD8⁺ T-cells and NK-cells triggered by the engagement of the TCR-complex or CD16, respectively, can be enhanced through an NKG2D-mediated signal (Example 6).

Most surprisingly, however, NK- and T-cell cytotoxicity as well as T-cell priming could be even enhanced by NKG2D-directed antibody molecules, which by themselves did not induce any substantial redirected lysis (Examples 5 and 6).

Thus, multifunctional NKG2D-directed polypeptides of the invention with different properties of recruiting cytotoxic lymphocytes may be advantageously selected for different purposes. For example, if pure immunomodulation is required, NKG2D-directed molecules may be preferred, which do not induce re-directed lysis by themselves. However, target cell elimination may be more pronounced when multifunctional NKG2D-directed polypeptides are used that directly trigger lymphocyte cytotoxicity. Moreover, multifunctional NKG2D-directed polypeptides, which differentially recruit CD8⁺ T-cells and NK-cells, may be also preferable for certain applications.

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

7

In a preferred embodiment of the method of the present invention said binding site is the binding site of an immunoglobulin chain.

In another preferred embodiment of the method of the present invention said binding site is a natural NKG2D-ligand of said receptor complex.

In a particularly preferred embodiment of the method of the present invention said natural NKG2D-ligand is selected from the group consisting of MIC-A, MIC-B, ULBP1 and ULBP2.

In another preferred embodiment of the method of the present invention said binding site specifically recognizes an extracellular epitope of NKG2D or of DAP10.

Further, in a preferred embodiment of the method of the present invention said receptor or ligand function is an antigen binding site of antibodies or fragments or derivatives thereof against tumor associated antigens, antigens of infective agents or surface markers of sub-populations of cells such as differentiation antigens (CD antigens), natural ligands or receptors or fragments thereof or modifications thereof that interact with tumor associated antigens or surface markers, preferably heregulins, binding to the tumor associated antigens erbB-2, -3 and -4, CD4 that interacts with gp 120 of HIV infected cells or melanocyte stimulating hormon (MSH) that binds to the MSH receptor on melanocytes and tumors derived therefrom (maligne melanomes) or chemokines binding to corresponding chemokine receptors, or MHC molecules or fragments thereof complexed with peptides that bind to T-cell receptors of predefined specificity and thus recognize certain T-cell sub-populations or antigen binding sites of T-cell receptors that specifically interact with predefined MHC peptide complexes, or NKp46 which interacts with haemagglutinin (HA) of influenza virus.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

8

Previous reports indicated that haemagglutinin of Influenza virus can enhance lysis of virus-infected target cells by NK cells as well as activate NK cells directly (Trinchieri, *Adv. Immunol.* 47 (1989), 187-376 and Alsheikhly, *Scand J Immunol.* 17 (1983), 129-38 and Alsheikhly, *Scand J Immunol.* 22 (1985), 529-38). It was shown very recently that a fusionprotein consisting of the extracellular domain of NKp46 and the Fc portion of immunoglobulin (Ig) directly bound to haemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein expressed on the cell surface of transiently transfected 293 cells (Mandelboim, *Nature* 409 (2001), 1055-60). Addition of NK Gal cells, a NK line derived from healthy donor peripheral blood lymphocytes induced lysis of HN-transfected 293T cells at least four fold more efficiently than of non-transfected cells (Mandelboim, *Nature* 409 (2001), 1055-60). The same results were obtained for Influenza virus infected target cells. These data indicate that there is a direct interaction between NKp46 and haemagglutinin, and, further, demonstrate that the mechanism for elimination of Influenza virus infected cells by NK cells is due to the interaction of haemagglutinin (HA) exposed on virus infected cells and NKp46 expressed on the surface of NK cells.

Said receptor or ligand function which is capable of binding to haemagglutinin (HA) of influenza virus is for example derived from monoclonal antibodies like:

- a) monoclonal antibody IIB4 binding to residues 155, 159, 188, 189, 193, 198, 199, 201 of influenza A virus strains H3 (Kostolansky, *J Gen* 81 (2000), 1727-35).
- b) monoclonal antibody LMBH6 derived from mice sequentially immunized with bromelain-cleaved haemagglutinin (BHA) from influenza virus A/Aichi/2/68, A/Victoria/3/75 and A/Philippines/2/82 (all H3N2) which recognizes HA of H3N2 influenza A strains (Vanlandschoot, *J. Gen. Virol.* 79 (1998), 1781-91).
- c) monoclonal antibody (MoAb) C179 directed to the stem region of HA-H2 (Lipatov, *Acta Virol.* 41(1997), 337-40).

In this embodiment, said second domain represents in one preferred embodiment an antigen which is the extracellular part of a surface molecule on cells that are involved

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

9

in pathologic processes of human diseases like e.g. cancer, viral infections or autoimmune conditions. Elimination or functional silencing of such target cells may be facilitated by in vivo application of the bifunctional molecules of the invention, thus providing therapeutic benefit.

"Fragments" of said antibodies retain the binding specificity of the complete antibodies and include Fab, F(ab')₂ and Fv fragments. "Derivatives" of said antibodies also retain the binding specificity and include scFv fragments. For further information, see Marlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press, Cold Spring Harbor 1988

Human cancer diseases may be, for example, cancers like mamma carcinoma, breast cancer, colon carcinoma, pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, renal cell and cervix carcinoma, melanoma, small cell lung cancer (SCLC), head and neck cancer, gastric carcinoma, rhabdomyosarcoma, prostate carcinoma, follicular Non-Hodgkin lymphoma (NHL), B cell lymphoma, multiple myeloma, T and B cell leukemias and Hodgkin lymphoma.

Tumor associated antigens comprise pan-carcinoma antigens like CEA (Sundblad Hum. Pathol. 27, (1996) 297-301, Ilantzis Lab. Invest. 76(1997), 703-16), EGFR type I (Nouri, Int. J. Mol. Med. 6 (2000), 495-500) and EpCAM (17-1A/KSA/GA733-2, Balzar J. Mol. Med. 77 (1999), 699-712). EGFR type I is especially overexpressed in glioma and EpCAM in colon carcinoma, MRD (minimal residual disease) and colon carcinoma. EGFR type II (Her-2, ErbB2, Sugano Int. J. Cancer 89 (2000), 329-36) is upregulated in mamma carcinoma and TAG-72 glycoprotein (sTN antigen, Kathan Arch. Pathol. Lab. Med. 124 (2000), 234-9) was found to be expressed in breast cancer. EGFR deletion neopeptide might also play a role as tumor associated antigen (Sampson Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97 (2000), 7503-8). The antigens A33 (Ritter Biochem. Biophys. Res. Commun. 236 (1997), 682-6), Lewis-Y (DiCarlo Onco. Rep. 8 (2001), 387-92), Cora Antigen (CEA-related Cell Adhesion Molecule CEACAM 6, CD66c, NCA-90, Kirugasa Int. J. Cancer 76 (1998), 148-53) and MUC-1 (Mucin) are associated with colon carcinoma (Iida Oncol. Res. 10 (1998), 407-14). Thomsen-Friedenreich-antigen (TF, Gal1B-3GalNAc:1-O-Thr/Ser) is not only found in colon

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

10

carcinoma (Baldus *Cancer* 82 (1998), 1019-27) but also in breast cancer (Glinsky *Cancer Res.* 60 (2000), 2584-8). Overexpression of Ly-6 (Eshel *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 12833-40) and desmoglein 4 in head and neck cancer and of E-cadherin neopeptide in gastric carcinoma was described (Fukudome *Int. J. Cancer* 88 (2000), 579-83). Prostate-specific membrane antigen (PSMA, Lapidus *Prostate* 45 (2000), 350-4), prostate stem cell antigen (PSCA, Gu *Oncogene* 191 (2000) 288-96) and STEAP (Hubert, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), 14523-8) were associated with prostate cancer. The alpha and gamma subunit of the fetal type acetylcholine receptor (AChR) are specific immunohistochemical markers for rhabdomyosarcoma (RMS, Gattenlohner *Diagn. Mol. Pathol.* 3 (1998), 129-34).

Association of CD20 with follicular non-Hodgkin lymphoma (Yatabe *Blood* 95 (2000), 2253-61), Vose *Oncology (Huntingt)* 2 (2001) 141-7), of CD19 with B-cell lymphoma (Kroft *Am. J. Clin. Pathol.* 115 (2001), 385-95), of Wue-1 plasma cell antigen with multiple myeloma (Greiner *Virchows Arch* 437 (2000), 372-9), of CD22 with B cell leukemia (d'Árena *Am. J. Hematol.* 64 (2000), 275-81), of CD7 with T-cell leukemia (Porwit-MacDonald *Leukemia* 14 (2000), 816-25) and CD25 with certain T and B cell leukemias had been described (Wu *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124 (2000), 1710-3). CD30 was associated with Hodgkin-lymphoma (Mir *Blood* 96 (2000), 4307-12). Expression of melanoma chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP, Eisenmann *Nat. Cell. Biol.* 8 (1999), 507-13) and ganglioside GD3 was observed in melanoma (Welte *Exp Dermatol* 2 (1997), 64-9), while GD3 was also found in small lung cell cancer (SCLC, Brezicka *Lung Cancer* 1 (2000), 29-36). Expression of ganglioside GD2 was also upregulated in SCLC and in neuroblastoma (Cheresh et al. *Cancer Res.* 10 (1986), 5112-8). Ovarian carcinoma was associated with Mullerian Inhibitory Substance (MIS) receptor type II (Masiakos *Clin. Cancer Res.* 11 (1999), 3488-99) and renal as well as cervix carcinoma with expression of carbonhydrase 9 (MN/CAIX, Grabmaier *Int. J. Cancer* 85 (2000) 865-70). Elevated expression levels of CA 19-9 were found in pancreas carcinoma (Nazli *Hepatogastroenterology* 47 (2000), 1750-2).

In a most preferred embodiment of the method of the present invention said tumor-associated antigen is selected from the group consisting of Lewis Y, CEA, Muc-1, erbB-2, -3 and -4, Ep-CAM, E-cadherin neopeptide, EGF-receptor (e.g.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

11

EGFR type I or EGFR type II), EGFR deletion neopeptide, CA19-9, Muc-1, L α Y, TF-, Tn- and sTn-antigen, TAG-72, PSMA, STEAP, Cora antigen, CD7, CD19 and CD20, CD22, CD25, Ig- α and Ig- β , A33 and G250, CD30, MCSP and gp100, CD44-v6, MT-MMPs, (MIS) receptor type II, carbonhydrase 9, F19-antigen, Ly6, desmoglein 4, PSCA, Wue-1, GD2 and GD3 as well as TM4SF-antigens (CD63, L6, CO-29, SAS) or the alpha and gamma subunit of the fetal type acetylcholinreceptor (AChR).

Influenza A, B and C all have a segmented genome, but only certain influenza A subtypes and influenza B cause severe disease in humans. The two major proteins of influenza are the surface glycoproteins-haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Haemagglutinin (HA) is involved in the binding and membrane fusion of virus particles to host cells receptors and represents the major target for neutralizing antibodies. Infectivity of influenza depends on the cleavage of HA by specific host proteases, whereas NA is involved in the release of progeny virions from the cell. In birds, the natural hosts of influenza, the virus causes gastrointestinal infection and is transmitted via the faeco-oral route. In mammals, replication of influenza subtypes appears restricted to respiratory epithelial cells but systemic complications can occur.

Rubella virus (RV) is the causative agent of the disease known as measles. Rubella is predominantly a childhood disease and is endemic throughout the world. Natural infections of rubella occur only in humans and are generally mild but complications like polyarthralgia can occur in adults. RV infection of women during the first trimester of pregnancy can induce a spectrum of congenital defects in the newborn, known as congenital rubella syndrome (CRS). The pathway whereby RV infection leads to teratogenesis has not been elucidated. Cytopathology in infected fetal tissues suggests necrosis and/or apoptosis as well as inhibition of cell division of precursor cells involved in organogenesis. Rubella virus (RV) virions contain two glycosylated membrane proteins, E1 and E2, that exist as a heterodimer and form the viral spike complexes on the virion surface. Formation of an E1-E2 heterodimer is essential for intracellular transport and cell

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

12

surface expression of both E1 and E2 (Yang, J. Virol. 72 (1998), 8747-8755). Glycoproteins E1 and E2 expressed on rubella virus infected cells represent target molecules for binding of multifunctional polypeptides of the invention.

Rabies is an important disease in wildlife and dog rabies is still a major public health problem in many developing countries of the world. Rabies virus is transmitted in saliva by animal bites. Most recently bats were found to transmit rabies to humans, often without known exposures. In its classic form, rabies is well recognized, but in cases with a paralytic illness mimicking Landre's Guillain-Barre syndrome diagnosis remains problematically. After exposure rabies can be prevented in non-immunized patients by local wound cleansing and application of rabies vaccine and human rabies-specific immunoglobulins.

Rabies glycoprotein RGP is a 505 amino acid type I transmembrane glycoprotein which is important in the biology and pathogenesis of rabies virus infection. RGP also stimulates the development of neutralizing antibodies by the host. N-linked glycosylation is required for immunogenicity and cell surface expression of RGP (Wojczyk, Biochemistry 34 (1995), 2599-2609). RGP of rabies virus expressed on the surface of infected cells represents a target molecules for binding of multifunctional polypeptides of the invention.

in another most preferred embodiment of the method of the present invention said surface marker for an infected cell is selected from the group consisting of viral envelope antigens, e.g. of human retroviruses (HTLV I and II, HIV1 and 2) or human herpes viruses (HSV1 and 2, CMV, EBV), haemagglutinin e.g. of influenza virus (influenza A, B or C), glycoproteins E1 and E2 from rubella virus or RGP of rabies virus.

In another preferred embodiment of the method of the present invention said multifunctional polypeptide is a bi-specific molecule, preferably a bi-specific antibody. For further information about the construction and generation of bi-specific-antibodies, see WO/00/06605.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

13

In a particularly preferred embodiment of the method of the present invention said multifunctional polypeptide is selected from the group consisting of a synthetic, a chimeric and a humanized antibody.

In a further preferred embodiment of the method of the present invention said multifunctional polypeptide is a single-chain.

In an additional preferred embodiment of the method of the present invention said two domains are connected by a polypeptide linker.

In another preferred embodiment of the method of the present invention said first and/or second domain mimic or correspond to a V_H and V_L region of a natural antibody. Examples of such antibodies comprise human, murine, rat and camel antibodies; antibodies derived from immortalized B-cells (e.g. hybridoma cells), from in vitro selection of combinatorial antibody libraries (e.g. by phage display) or from Ig-transgenic mice.

In a further preferred embodiment of the method of the present invention at least one of said domains is a single-chain fragment of the variable region of said antibody.

In an additional preferred embodiment of the method of the present invention said domains are ranged in the order V_L NKG2D- V_H NKG2D- V_H TA- V_L -TA, or V_L -TA- V_H TA- V_H NKG2D- V_L NKG2D wherein the TA represents a target antigen.

In a particularly preferred embodiment of the method of the present invention said tumor-associated antigen is selected from the group consisting of Lewis Y, CEA, Muc-1, erbB-2, -3 and -4, Ep-CAM, E-cadherin neopeptide, EGF-receptor (e.g. EGFR type I or EGFR type II), EGFR deletion neopeptide, CA19-9, Muc-1, LeY, TF-, Tn- and sTn-antigen, TAG-72, PSMA, STEAP, Cora antigen, CD7, CD19 and CD20, CD22, CD25, Ig- α and Ig- β , A33 and G250, CD30, MCSP and gp100, CD44-v6, MT-MMPs, (MIS) receptor type II, carboanhydrase 9, F19-antigen, Ly6,

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

14

desmoglein 4, PSCA, Wue-1, GD2 and GD3 as well as TM4SF-antigens (CD63, L6, CO-29, SAS) or the alpha and gamma subunit of the fetal type acetylcholinreceptor (AChR).

In another particularly preferred embodiment of the method of the present invention said polypeptide linker comprises a plurality of glycine, serine and/or alanine residues.

In one further particularly preferred embodiment of the method of the present invention said polypeptide linker comprises a plurality of consecutive copies of an amino acid sequence.

Furthermore, in a particularly preferred embodiment of the method of the present invention said polypeptide linker comprises 1 to 5, 5 to 10 or 10 to 15 amino acid residues.

In a most preferred embodiment of the method of the present invention said polypeptide linker comprises the amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.

In a further preferred embodiment of the method of the present invention said multifunctional polypeptide comprises at least one further domain.

Target cell specific immune responses may be further supported by combining the bifunctional molecules of the invention with agents that confer costimulatory or coactivating properties on the target cells.

In one alternative of the combination with additional agents, the molecules of the invention may themselves be equipped with additional functional domains, that may be joined e.g. through another amino acid linker. These additional domains may e.g. mediate CD28- or CD137-engagement (see below). Furthermore, it is envisaged that derivatives of the bifunctional molecules of the invention may be constructed that contain more than one additional functional domain.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

15

Alternatively, the molecules of the invention may be combined with more than one additional agent in a composition e.g. with one of said molecules engaging CD28 and another one engaging CD137.

These agents referred to above may e.g. consist of a binding site specifically recognizing the target cells and the extracellular domain of B7-1 (CD80) or B7-2 (CD86) that interact with CD28 on T- and NK-cells. Alternatively, B7-1 or B7-2 may be replaced by the binding site of a CD28-specific antibody. On T-lymphocytes CD28 acts as costimulatory molecule, which is absolutely required in order to mediate the so-called second signal during primary T cell activation through antigen specific TCR-engagement (= first signal). On NK cells CD28 contributes to the induction of cytotoxicity against target cells expressing CD28 ligands (Chambers (1996) Immunity 5: 311). Other agents that may be advantageously combined with the bifunctional molecules of the invention may consist of a binding site specifically recognizing the target cells and the binding site of a CD137-specific antibody or the extracellular part of the CD137-ligand.

In a most preferred embodiment of the method of the present invention said further domain is linked by covalent or non-covalent bonds.

In another most preferred embodiment of the method of the present invention said at least one further domain comprises an effector molecule having a conformation suitable for biological activity, capable of sequestering an ion or selective binding to a solid support or to a preselected determinant.

In a further most preferred embodiment of the method of the present invention said further domain confers a co-stimulatory and/or a co-activating function.

In a particularly preferred embodiment of the method of the present invention said co-stimulatory function is mediated by a CD28-ligand or a CD137-ligand.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

16

In a further particularly preferred embodiment of the method of the present invention said CD28-ligand or CD137-ligand is B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), an aptamer or an antibody or a functional fragment or a functional derivative thereof.

The term "functional fragment" of an antibody is defined as a fragment of an antibody that retains the binding specificity of said antibody (see, for example, Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" LSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Examples of such fragments are Fab and F(ab)₂ fragment. "Functional derivatives" of said antibodies retain or essentially retain the binding specificity of said antibody. An example of said derivative is an scFv Fragment.

The invention also relates to a polynucleotide which upon expression encodes a multifunctional polypeptide and/or functional parts of a multifunctional polypeptide of the invention. The term "functional part" is defined in accordance with the invention as to the part that confers the specific function of the first, second or any further domain of a multifunctional polypeptide construct of the invention.

The polynucleotide may be DNA, RNA or a derivative thereof such as PNA. Preferably, said polynucleotide is DNA.

Furthermore, the invention relates to a vector comprising the polynucleotide of the present invention.

Many suitable vectors are known to those skilled in molecular biology, the choice of which would depend on the function desired and include plasmids, cosmids, viruses, bacteriophages and other vectors used conventionally in genetic engineering. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct various plasmids and vectors; see, for example, the techniques described in Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). The vectors of the invention can be reconstituted into liposomes for delivery to target cells.

The vector may be, for example, a phage, plasmid, viral, or retroviral vector. Retroviral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

Polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. Generally, a plasmid vector is introduced in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. If the vector is a virus, it may be packaged *in vitro* using an appropriate packaging cell line and then transduced into host cells.

The polynucleotide insert should be operatively linked to an appropriate promoter, such as the phage lambda PL promoter, the *E. coli* lac, trp, phoA and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs, to name a few. Other suitable promoters will be known to the skilled artisan. The expression constructs will further contain sites for transcription initiation, termination, and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the transcripts expressed by the constructs will preferably include a translation initiating codon at the beginning and a termination codon (UAA, UGA or UAG) appropriately positioned at the end of the polypeptide to be translated.

As indicated, the expression vectors will preferably include at least one selectable marker. Such markers include dihydrofolate reductase, G418 or neomycin resistance for eukaryotic cell culture and tetracycline, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing in *E. coli* and other bacteria. Representative examples of appropriate hosts include, but are not limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera Sf9* cells; animal cells such as CHO, COS, 293, and Bowes melanoma cells; and plant cells. Appropriate culture mediums and conditions for the above-described host cells are known in the art.

Among vectors preferred for use in bacteria include pQE70, pQE60 and pQE-9, available from QIAGEN, Inc.; pBluescript vectors, Phagescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene Cloning Systems, Inc.; and ptc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia Biotech, Inc.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

18

Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia. In general, typical cloning vectors include pBscpt sk, pGEM, pUC9, pBR322 and pGBT9. Typical expression vectors include pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT. Other suitable vectors will be readily apparent to the skilled artisan.

Furthermore, one could use, e.g., a mammalian cell that already comprises in its genome a nucleic acid molecule encoding a polypeptide as described above, but does not express the same or not in an appropriate manner due to, e.g., a weak promoter, and introduce into the mammalian cell a regulatory sequence such as a strong promoter in close proximity to the endogenous nucleic acid molecule encoding said polypeptide so as to induce expression of the same.

In this context the term "regulatory sequence" denotes a nucleic acid molecule that can be used to increase the expression of the polypeptide, due to its integration into the genome of a cell in close proximity to the encoding gene. Such regulatory sequences comprise promoters, enhancers, inactivated silencer/intron sequences, 3'UTR and/or 5'UTR coding regions, protein and/or RNA stabilizing elements, nucleic acid molecules encoding a regulatory protein, e.g., a transcription factor, capable of inducing or triggering the expression of the gene or other gene expression control elements which are known to activate gene expression and/or increase the amount of the gene product. The introduction of said regulatory sequence leads to increase and/or induction of expression of polypeptides, resulting in the end in an increased amount of polypeptides in the cell. Thus, the present invention is aiming at providing de novo and/or increased expression of polypeptides.

The invention further relates to a cell transfected with the polynucleotide of the present invention.

The cell of the invention may be a eukaryotic (e.g. yeast, insect or mammalian) or prokaryotic cell. Most preferably, the cell of the invention is a mammalian such as a human cell which may be a member of a cell line e.g. CHO-cells, COS, 293, or Bowes melanoma cells.

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

19

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, infection, or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis, Basic Methods In Molecular Biology (1986). It is specifically contemplated that polypeptides may in fact be expressed by a host cell lacking a recombinant vector.

The present invention further provides nucleic acid molecules comprising a polynucleotide encoding upon expression a multifunctional polypeptide and/or functional parts of a multifunctional polypeptide of the invention as described herein and in the appended examples. The nucleic acid sequence of two different fragments of human NKG2D from nucleotides (nt) 64 to 462 and from (nt) 123 to 462 corresponding to amino acid sequences SEQ ID 3 and 4 were PCR-amplified from the cDNA-template shown in Figure 1. The resulting plasmids VV1-NKG2-D (nt 64-462) and VV1-NKG2-D (nt 123-462) were used to immunize three 6 to 8 weeks old BALB/c mice as mentioned in the appended examples. Resulting lymphocytes were fused with SP2/0 mouse myeloma cells (American Tissue Type Collection, USA) in order to perform hybridoma selection as indicated in the appended examples. Three hybridomas designated 11B2, 8G7 and 6E5 were shown to produce monoclonal antibodies reactive with native NKG2D on the surface of both human CD8⁺ T-lymphocytes and NK-cells (for further information see appended examples). Supernatants of the subclones 11B2D10, 8G7C10 and 6E5A7 were shown to react with NKG2-D on CD56⁺ NK- and CD8⁺ T cells (as demonstrated in the appended examples). These subclones were deposited, at the DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany on March 23, 2001, in accordance with the provisions of the Budapest Treaty and given accession number DSM_____, DSM_____ and DSM_____, respectively.

Additionally, the invention relates to a method for the preparation of the multifunctional polypeptide and/or parts of the multifunctional polypeptide of the invention comprising culturing a cell of the present invention and isolating said multifunctional polypeptide or

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

20

functional parts thereof from the culture as described for example by Mack, 1995, PNAS, 92, 7021.

Polypeptides can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification.

Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides may also include an initial (modified) methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes. Thus, it is well known in the art that the N-terminal methionine encoded by the translation initiation codon generally is removed with high efficiency from any protein after translation in all eukaryotic cells. While the N-terminal methionine on most proteins also is efficiently removed in most prokaryotes, for some proteins, this prokaryotic removal process is inefficient, depending on the nature of the amino acid to which the N-terminal methionine is covalently linked.

It is also to be understood that the proteins can be expressed in a cell free system using for example in vitro translation assays known in the art.

The term "expression" means the production of a protein or nucleotide sequence in the cell. However, said term also includes expression of the protein in a cell-free system. It includes transcription into an RNA product, post-transcriptional modification and/or translation to a protein product or polypeptide from a DNA encoding that product, as well as possible post-translational modifications; see also supra. Depending on the specific constructs and conditions used, the protein may be recovered from the cells, from the culture medium or from both. The terms "protein" and "polypeptide" used in this application are interchangeable. "Polypeptide" refers to a polymer of amino acids (amino acid sequence) and does not refer to a specific

length of the molecule. Thus peptides and oligopeptides are included within the definition of polypeptide. This term does also refer to or include post-translational modifications of the polypeptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations and the like; see also supra. Included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), polypeptides with substituted linkages, as well as other modifications known in the art, both naturally occurring and non-naturally occurring. For example, it is well known by the person skilled in the art that it is not only possible to express a native protein but also to express the protein as fusion polypeptides or to add signal sequences directing the protein to specific compartments of the host cell, e.g., ensuring secretion of the protein into the culture medium, etc. The protein of the invention may also be expressed as a recombinant protein with one (polypeptide) or more additional polypeptide domains added to facilitate protein purification. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp, Seattle WA). The inclusion of a cleavable linker sequences such as Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego CA) between the purification domain and the protein of interest is useful to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein comprising a cell cycle interacting protein and contains nucleic acid encoding 6 histidine residues followed by thioredoxin and an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography as described in Porath, Protein Expression and Purification 3 (1992), 263-281) while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the protein from the fusion protein. In addition to recombinant production, fragments of the protein of the invention may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (cf Stewart et al (1969) Solid Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154). *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin

Elmer, Foster City CA) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Various fragments of the polypeptide of the invention may be chemically synthesized and/or modified separately and combined using chemical methods to produce the full length molecule. Once expressed or synthesized, the protein of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). Substantially pure proteins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity are most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the proteins may then be used therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures.

The invention also relates to a composition comprising the polypeptide of the present invention, the polynucleotide of the invention or the vector of the present invention.

In a preferred embodiment of the composition of the present invention said composition further comprises a molecule conferring a co-stimulatory and/or co-activating function.

In this embodiment, the composition may comprise a multifunctional polypeptide that comprises or does not comprise said further domain as defined herein above. If the multifunctional polypeptide comprises a further domain that confers co-stimulatory and/or co-activating function, then said further molecule comprised in the composition of the invention may have the same or a different co-stimulatory and/or co-activating function.

In said composition, the comprised ingredients are packaged together as separately in one or more containers such as vials, preferably under sterile conditions, optionally in buffers or aqueous solutions, some of which are further specified herein below.

In a particularly preferred embodiment of the composition of the present invention said co-stimulatory function is mediated by a CD28-ligand or a CD137-ligand.

In another particularly preferred embodiment of the composition of the present invention said CD28-ligand or CD137-ligand is B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), an aptamer or an antibody or a functional fragment or a functional derivative thereof.

In a further preferred embodiment of the composition of the present invention said composition is a pharmaceutical composition optionally further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

The compositions can also include, depending on the formulation desired, pharmaceutically acceptable, usually sterile, non-toxic carriers or diluents, which are defined as vehicles commonly used to formulate pharmaceutical compositions for animal or human administration. The diluent is selected so as not to affect the biological activity of the combination. Examples of such diluents are distilled water, physiological saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution. In addition, the pharmaceutical composition or formulation may also include other carriers, adjuvants, or nontoxic, nontherapeutic, nonimmunogenic stabilizers and the like. A therapeutically effective dose refers to that amount of protein or its antibodies, antagonists, or inhibitors which ameliorate the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED50 (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD50 (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD50/ED50.

Further examples of suitable pharmaceutical carriers are well known in the art and include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions etc. Compositions comprising such carriers can be formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, e.g., by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical or intradermal administration. The dosage regimen will be determined by the attending

physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. A typical dose can be, for example, in the range of 0.001 to 1000 μg (or of nucleic acid for expression or for inhibition of expression in this range); however, doses below or above this exemplary range are envisioned, especially considering the aforementioned factors. Generally, the regimen as a regular administration of the pharmaceutical composition should be in the range of 1 μg to 10 mg units per day. If the regimen is a continuous infusion, it should also be in the range of 0.1 μg to 10 mg units per kilogram of body weight per minute, respectively.

The daily oral dosage regimen will preferably be from about 0.1 to about 80 mg/kg of total body weight, preferably from about 0.2 to 30 mg/kg, more preferably from about 0.5 mg to 15 mg. The daily parenteral dosage regimen about 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 100 mg/kg of total body weight, preferably from about 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 10 mg/kg, and more preferably from about 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1 mg/kg. The daily topical dosage regimen will preferably be from 0.1 mg to 150 mg, administered one to four, preferably two to three times daily. The daily inhalation dosage regimen will preferably be from about 0.01 mg/kg to about 1 mg/kg per day.

Progress can be monitored by periodic assessment. Dosages will vary but a preferred dosage for intravenous administration of DNA is from approximately 10^6 to 10^{12} copies of the DNA molecule. DNA may also be administered directly to the target site, e.g., by biolistic delivery to an internal or external target site or by catheter to a site in an artery. The compositions comprising, e.g., the polynucleotide, nucleic acid molecule, polypeptide, antibody, compound drug, pro-drug or pharmaceutically acceptable salts thereof may conveniently be administered by any of the routes conventionally used for drug administration, for instance, orally, topically, parenterally or by inhalation. Acceptable salts comprise acetate, methylester, HCl, sulfate, chloride and the like. The drugs may be administered in conventional dosage forms prepared by combining the drugs with standard pharmaceutical carriers according to conventional procedures. The drugs and pro-drugs identified and obtained in accordance with the present invention may also be administered in conventional

dosages in combination with a known, second therapeutically active compound. Such therapeutically active compounds comprise, for example, those mentioned above. These procedures may involve mixing, granulating and compressing or dissolving the ingredients as appropriate to the desired preparation. It will be appreciated that the form and character of the pharmaceutically acceptable character or diluent is dictated by the amount of active ingredient with which it is to be combined, the route of administration and other well-known variables. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient thereof. The pharmaceutical carrier employed may be, for example, either a solid or liquid. Exemplary of solid carriers are lactose, terra alba, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate, stearic acid and the like. Exemplary of liquid carriers are phosphate buffered saline solution, syrup, oil such as peanut oil and olive oil, water, emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions and the like. Similarly, the carrier or diluent may include time delay material well known to the art, such as glyceryl mono-stearate or glyceryl distearate alone or with a wax.

A wide variety of pharmaceutical forms can be employed. Thus, if a solid carrier is used, the preparation can be tableted, placed in a hard gelatin capsule in powder or pellet form or in the form of a troche or lozenge. The amount of solid carrier will vary widely but preferably will be from about 25 mg to about 1 g. When a liquid carrier is used, the preparation will be in the form of a syrup, emulsion, soft gelatin capsule, sterile injectable liquid such as an ampule or nonaqueous liquid suspension.

The composition may be administered topically, that is by non-systemic administration. This includes the application externally to the epidermis or the buccal cavity and the instillation of such a compound into the ear, eye and nose, such that compound does not significantly enter the blood stream. In contrast, systemic administration refers to oral, intravenous, intraperitoneal and intramuscular administration.

Formulations suitable for topical administration include liquid or semi-liquid preparations suitable for penetration through the skin to the site of inflammation such as liniments, lotions, creams, ointments or pastes, and drops suitable for administration to the eye, ear or nose. The active ingredient may comprise, for topical administration, from 0.001% to 10% w/w, for instance from 1% to 2% by weight of the

formulation. It may however comprise as much as 10% w/w but preferably will comprise less than 5% w/w, more preferably from 0.1% to 1% w/w of the formulation.

Lotions according to the present invention include those suitable for application to the skin or eye which are suitable, for example, for use in UV protection. An eye lotion may comprise a sterile aqueous solution optionally containing a bactericide and may be prepared by methods similar to those for the preparation of drops. Lotions or liniments for application to the skin may also include an agent to hasten drying and to cool the skin, such as an alcohol or acetone, and/or a moisturizer such as glycerol or an oil such as castor oil or arachis oil.

Creams, ointments or pastes according to the present invention are semi-solid formulations of the active ingredient for external application. They may be made by mixing the active ingredient in finely-divided or powdered form, alone or in solution or emulsion in an aqueous or non-aqueous fluid, with the aid of suitable machinery, with a greasy or non-greasy base. The base may comprise hydrocarbons such as hard, soft or liquid paraffin, glycerol, beeswax, a metallic soap; a mucilage; an oil of natural origin such as almond, corn, arachis, castor or olive oil; wool fat or its derivatives or a fatty acid such as steric or oleic acid together with an alcohol such as propylene glycol or a macrogel. The formulation may incorporate any suitable surface active agent such as an anionic, cationic or non-ionic surfactant such as a sorbitan ester or a polyoxyethylene derivative thereof. Suspending agents such as natural gums, cellulose derivatives or inorganic materials such as siliceous silicas, and other ingredients such as lanolin, may also be included.

Drops according to the present invention may comprise sterile aqueous or oily solutions or suspensions and may be prepared by dissolving the active ingredient in a suitable aqueous solution of a bactericidal and/or fungicidal agent and/or any other suitable preservative, and preferably including a surface active agent. The resulting solution may then be clarified by filtration, transferred to a suitable container which is then sealed and sterilized by autoclaving or maintaining at 98-100°C for half an hour. Alternatively, the solution may be sterilized by filtration and transferred to the container by an aseptic technique. Examples of bactericidal and fungicidal agents suitable for inclusion in the drops are phenylmercuric nitrate or acetate (0.002%), benzalkonium

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

27

chloride (0.01%) and chlorhexidine acetate (0.01%). Suitable solvents for the preparation of an oily solution include glycerol, diluted alcohol and propylene glycol. The composition in accordance with the present invention may be administered parenterally, that is by intravenous, intramuscular, subcutaneous intranasal, intrarectal, intravaginal or intraperitoneal administration. The subcutaneous and intramuscular forms of parenteral administration are generally preferred. Appropriate dosage forms for such administration may be prepared by conventional techniques. The composition may also be administered by inhalation, that is by intranasal and oral inhalation administration. Appropriate dosage forms for such administration, such as an aerosol formulation or a metered dose inhaler, may be prepared by conventional techniques.

In a different preferred embodiment of the composition of the present invention said composition is a diagnostic composition optionally further comprising suitable means for detections.

Said means for detection comprise, for example, (a) chromophore(s), (a) fluorescent dye(s), (a) radionucleotide(s), biotin or DIG. These labeling means may be coupled to nucleotide analogues. Labeling of amplified cDNA can be performed as described in the appended examples or as described, inter alia, in Spirin (1999), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 3108-3115.

The present invention also relates to a use of the multifunctional polypeptide of the present invention, the polynucleotide of the present invention or the vector of the present invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of cancer, infections and/or autoimmune conditions, cancer, i.e. maligne (solide) tumors and hematopoietic cancer forms (leukemias and lymphomas), benign tumors such as benign hyperplasia of the prostate gland (BPH), autonomous adenomas of the thyroid gland or of other endocrine glands or adenomas of the colon; initial stages of the malignancies, infectious diseases, caused by viruses, bacteria, fungi, protozoa or helminths, auto immune diseases wherein the elimination of the subpopulation of

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

28

immune cells is desired that causes the disease; prevention of transplant rejection or allergies.

In a preferred embodiment of the use of the present invention said infection is said infection is a viral, a bacterial or a fungal infection, wherein said cancer is a head and neck cancer, gastric cancer, oesophagus cancer, stomach cancer, colorectal cancer, coloncarcinoma, cancer of liver and intrahepatic bile ducts, pancreatic cancer, lung cancer, small cell lung cancer, cancer of the larynx, breast cancer, mamma carcinoma, malignant melanoma, multiple myeloma, sarcomas, rhabdomyosarcoma, lymphomas, follicular non-Hodgkin-lymphoma, leukemias, T- and B-cell-leukemias, Hodgkin-lymphoma, B-cell lymphoma, ovarian cancer, cancer of the uterus, cervical cancer, prostate cancer, genital cancer, renal cancer, cancer of the testis, thyroid cancer, bladder cancer, plasmacytoma or brain cancer or wherein said autoimmune condition is ankylosing spondylitis, acute anterior uveitis, Goodpasture's syndrome, Multiple sclerosis, Graves' disease, Myasthenia gravis, Systemic lupus erythematosus, Insulin-dependent diabetes mellitus, Rheumatoid arthritis, Pemphigus vulgaris, Hashimoto's thyroiditis or autoimmune Hepatitis

The present invention also relates to a use of the polynucleotide of the present invention or the vector of the present invention for the preparation of a composition for gene therapy.

It is envisaged by the present invention that the various polynucleotides and vectors encoding the above described phosphonin peptides or polypeptides are administered either alone or in any combination using standard vectors and/or gene delivery systems, and optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. For example, the polynucleotide of the invention can be used alone or as part of a vector to express the (poly)peptide of the invention in cells, for, e.g., gene therapy or diagnostics of diseases related to disorders referred to above. The polynucleotides or vectors of the invention are introduced into the cells which in turn produce the (poly)peptide. Subsequent to administration, said polynucleotides or vectors may be stably integrated into the genome of the subject. On the other hand, viral vectors may be used which are specific for

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

29

certain cells or tissues and persist in said cells. Suitable pharmaceutical carriers and excipients are well known in the art. The polynucleotides or vectors prepared according to the invention can be used for the prevention or treatment or delaying of different kinds of the diseases referred to above.

In the above-described embodiments, the vector of the present invention may preferably be a gene transfer or targeting vector. Gene therapy, which is based on introducing therapeutic genes, for example for vaccination into cells by ex-vivo or in-vivo techniques is one of the most important applications of gene transfer. Suitable vectors, methods or gene-delivering systems for in-vitro or in-vivo gene therapy are described in the literature and are known to the person skilled in the art; see, e.g., Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onocdua, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-2251; Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242; Anderson, *Nature* 392 (Supp. 1998), 25-30; Wang, *Gene Therapy* 4 (1997), 393-400; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00857; US-A-5,580,859; US-A-5,589,466; US-A-4,394,448 or Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, and references cited therein.

The polynucleotides and vectors of the invention may be designed for direct introduction or for introduction via liposomes, or viral vectors (e.g. adenoviral, retroviral) into the cell. Preferably, said cell is a germ line cell, embryonic cell, or egg cell or derived therefrom, most preferably said cell used for introduction is a stem cell. As mentioned above, suitable gene delivery systems may include liposomes, receptor-mediated delivery systems, naked DNA, and viral vectors such as herpes viruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses, among others. Delivery of nucleic acids to a specific site in the body for gene therapy may also be accomplished using a ballistic delivery system, such as that described by Williams (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 2726-2729).

It is to be understood that the introduced polynucleotides and vectors express the gene product after introduction into said cell and preferably remain in this status during

the lifetime of said cell. For example, cell lines which stably express the polynucleotide under the control of appropriate regulatory sequences may be engineered according to methods well known to those skilled in the art. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with the polynucleotide of the invention and a selectable marker, either on the same or separate plasmids. Following the introduction of foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows for the selection of cells having stably integrated the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. Such engineered cell lines are also particularly useful in screening methods for the detection of compounds involved in, e.g., activation or stimulation of phosphate uptake.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, *Cell* 11(1977), 223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1962), 2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, *Cell* 22 (1980), 817) in tk, hgprt or aprt cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 3567; O'Hare, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527), gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, *J. Mol. Biol.* 150 (1981), 1); hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre, *Gene* 30 (1984), 147); or puromycin (pat, puromycin N-acetyl transferase). Additional selectable genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan; hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hariman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 8047); and ODC (ornithine decarboxylase) which confers resistance to the ornithine decarboxylase inhibitor, 2-(difluoromethyl)-DL-ornithine, DFMO (McConlogue, 1987, In: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

31

The invention further relates to a method for the treatment of cancer, infections or autoimmune conditions comprising introducing the polypeptide of the present invention, the polynucleotide of the present invention or the vector of the present invention or the composition of the present invention into a mammal affected by said malignancies or diseases.

Suitable routes and doses of administration etc. have been discussed in connection with the pharmaceutical composition of the invention herein above.

Furthermore, the present invention relates to a method for delaying a pathological condition comprising introducing the polypeptide of the present invention, the polynucleotide of the invention or the vector of the present invention or the composition of the present invention into a mammal affected by said pathological condition.

In a preferred embodiment of one method of the present invention said mammal is a human.

Finally, the invention relates to a kit comprising the multifunctional polypeptide of the invention, the polynucleotide of the present invention, the vector of the present invention, the cell of the invention or the composition of the present invention.

The components of the kit or the diagnostic composition of the present invention may be packaged in containers such as vials, optionally in buffers and/or solutions. If appropriate, one or more of said components may be packaged in one and the same container. Additionally or alternatively, one or more of said components may be absorbed to a solid support such as, e.g., a nitrocellulose filter or nylon membrane, or to the well of a microtitre-plate.

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

32

The figures show:

Fig. 1 shows the nucleotide and amino acid sequence of soluble NKG2D containing a C-terminal histidine-tag. Restriction sites used for cloning are shown at the beginning (EcoRI) and the end (SalI) of the nucleotide sequence.

Fig. 2 shows the molecular design of an NKG2D-directed bispecific single-chain antibody at the DNA level (panel A) and the protein level (panel B). The mode of function of the bispecific antibody is also shown in panel B.

Fig. 3: SDS-PAGE of bispecific single-chain antibody anti-NKG2D (8R23) x anti-EpCAM (4-7) (right lane); the left lane shows a molecular weight marker.

Fig. 4: Expression vector encoding a secreted carboxy-terminal fragment of human NKG2-D used for genetic immunization.

The expression of the NKG2-D fragment from the vector shown is controlled by the immediate-early promoter of the human cytomegalovirus (CMV). The NKG2-D fragment consists of a leader peptide which is derived from the murine immunoglobulin kappa light chain, followed by a human myc epitope. The coding sequence of NKG2-D is terminated by its cognate stop codon. BGH polyadenylation site, bovine growth hormone polyadenylation site; amp, ampicillin resistance gene; ColE1 origin, ColE1 origin of replication.

Fig. 5: Selection of hybridomas specifically binding to NKG2-D-positive target cells.

The binding of three distinct monoclonal antibodies in hybridoma supernatants 6E5, 8G7 and 11B2 to either CD8-positive T cells (A) or to CD56-positive natural killer cells is shown by FACS analysis. Abbreviations are 6E5: 6E5/A7, 8G7: 8G7/C10 and 11B2: 11B2/D10

10H9 is a control with a hybridoma supernatant lacking NKG2-D binding activity. The various detection antibodies are indicated in the Figure.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

33

Fig. 6: Enhancing effect of a monoclonal antibody directed against NKG2-D on priming of naïve T cells.

Naïve T cells expressing the marker CD45RA (A) are found in FACS scans in the upper left gate. Naïve T cells were primed in the presence of an EpCAM-expressing target cell line (EpCAM/17-1A-transfected CHO cells) by a combination of a B7-1 x anti-EpCAM fusion protein and a single chain bispecific anti-EpCAM x anti-CD3 molecule (B-E) in the absence (D and E) or presence (B and C) of a monoclonal antibody against NKG2-D called BAT221. Primed T cells expressing the marker CD45RO appear in the lower right gate. Numbers give the percentage of primed, previously naïve T cells. Fluorescence 1: FITC-labeled anti-CD45RO; fluorescence 2: phycoerythrin-conjugated anti-CD45RA.

Fig. 7: Enhancing effect of a monoclonal antibody directed against NKG2-D on TNF production by T cells.

Naïve T cells were primed in the presence of an EpCAM-expressing target cell line (EpCAM/17-1A-transfected CHO cells) by a combination of a B7-1 x anti-EpCAM fusion protein and increasing concentrations, as indicated, of a single chain bispecific anti-EpCAM x anti-CD3 molecule. TNF production was measured by a commercial TNF- α ELISA in the presence (A) and absence (B) of a monoclonal antibody against NKG2-D, called BAT221.

Fig. 8: Cytotoxic activity of Melan A cells and NKL cells redirected against P815 cells by several dilutions of the supernatant of the NKG2D hybridoma BAT 221 in combination with the monoclonal antibodies CD16 (5 μ g/ml) and CD3 (0,2 μ g/ml) respectively. 200.000 NKL cells or 50000 Melan A cells were added to 10.000 Chromium-51 labeled Kato III cells in the presence of the diluted antibody in a total volume of 200 μ l. The background control (E+T) contains effector cells and target cells without an antibody dilution. The microtiterplates were incubated for 4 h at 37°C, 5 % CO₂. After the incubation period 50 μ l supernatant were removed from each well and assayed for released ⁵¹Cr in a gamma counter.:

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

34

Fig. 9: Detection of a specific immune response in mice immunized with an expression vector encoding a secreted C-terminal fragment of human NKG2-D. Flowcytometric analysis of the binding activity of a 1:30 serum dilution of five immunized mice to human CD8⁺ T lymphocytes and human NK cells. 200,000 mononucleated cells from peripheral blood of a healthy donors were incubated with diluted serum of the five mice. Bound murine antibody was detected by a fluoresceine (FITC)-conjugated goat-anti-rat Ig (IgG + IgM) antibody diluted 1:100 in PBS. Triple color fluorescence analysis was carried out by applying a positive gate for CD8⁺ (Tricolor) and a negative gate for CD16⁺ (PE) cells thus allowing the detection of FITC-mediated fluorescence exclusively attributed to CD8⁺-T-lymphocytes (phenotype: CD8⁺, CD16⁻) without any contaminating signals from CD8⁺-NK-cells. Similarly, triple color fluorescence analysis was carried out by applying a positive gate for CD56⁺ (PE) and a negative gate for CD3⁺-cells (tricolor) thus allowing the detection of FITC-mediated fluorescence exclusively attributed to NK-cells (phenotype: CD56⁺, CD3⁻) without any contaminating signals from CD56⁺-T-lymphocytes. As negative control a representative serum of an unimmunized mouse was used (preimmune serum). Cells were analyzed by flowcytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

Fig. 10: Design of the phagemid used for expression of N-terminally blocked single chain antibodies in the periplasm of *E. coli*.

P, bacterial promoter; ompA, leader sequence for periplasmic transport; N2, surrogate N-terminal blocking domain; VH, variable heavy chain domain of scFv; VL, variable light chain domain of scFv; p53, tetramerization domain of transcription factor p53; Flag-tag; influenza virus epitope tag. The positions of various restriction enzyme sites are indicated on top. Essential coding sequences are shown as black boxes.

Fig. 11: Detection of NKG2-D-specific, N-terminally blocked single chain Fv fragments produced in the periplasm of *E. coli*.

In order to increase sensitivity, the binding avidity of single chain Fv antibodies was increased by fusing the tetramerization domain of the transcription factor p53 to the carboxy terminus of N-terminally blocked scFvs. Tetramerized scFvs were detected in periplasmic fractions by ELISA with soluble, recombinant NKG2-D as capture and

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

35

peroxidase-conjugated anti-FLAG antibody for detection. ELISA signals of various clones are depicted. All clones with signals >0.05 were analyzed further.

Fig. 12: Transient expression and EpCAM binding of four bispecific molecules targeting NKG2-D.

CHO/dhfr- cells were transiently transfected with expression vectors encoding four different single chain bispecific molecules. In A, a beta-galactosidase gene was transfected as negative control. The various bispecific molecules are B, 3B10xP4-3; C, 3B10xP4-14, D, 3B10xP5-2 and E, 3B10xP5-23. Cell culture supernatants were harvested after 5 days and tested for the expression of bispecific antibodies by FACS analysis for EpCAM-specific binding to the human gastric carcinoma cell line Kato III. Cell-bound bispecific molecules were detected by an FITC-labeled sheep-anti-mouse antibody. FACS histogram blots are shown.

Fig. 13: Characterization of two single chain bispecific antibodies for NKG2-D specific binding in an ELISA.

The two bispecific antibodies 3B10 x P4-3 and 3B10 x P5-2 were transiently expressed in CHO cell culture supernatants. Binding to coated soluble, recombinant NKG2-D was tested by an ELISA using a peroxidase-conjugated anti-hexahistidine antibody for detection of the hexahistidine-tagged bispecific antibodies. Two different concentrations were tested. A, 1:1 dilution; B, 1:2 dilution of culture supernatants. As a control, binding of an EpCAM-specific 3B10 x anti-CD3 bispecific antibody was used. Values obtained for this non-specific control were subtracted from the readings shown.

Fig. 14: Cytotoxic activity of Melan A cells (A) and NKL cells (B) redirected against EpCAM-positive Kato cells by the bispecific 3B10xP4-3 antibody. 200,000 NKL cells or 50000 Melan A cells were added to 10,000 Chromium-51 labeled Kato III cells in the presence of several dilutions of the bispecific antibody in a total volume of 200 μ l. The background control (E+T) contains effector cells and target cells without an antibody dilution. The microtiterplates were incubated for 4 h at 37°C, 5 % CO₂. After

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

36

the incubation period 50 μ l supernatant were removed from each well and assayed for released ^{51}Cr in a gamma counter.

Fig. 15: Specific target cell lysis by four single chain antibodies recruiting peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) via NKG2-D.

Four bispecific antibodies all recognizing the EpCAM target on the human gastric carcinoma cell line Kato III by a single chain Fv derived from monoclonal antibody 3B10 were constructed from four distinct scFvs specific for the NK/CD8-specific receptor NKG2-D. Expression vectors encoding the four bispecific antibodies were transfected for transient expression into CHO cells and supernatants collected. Supernatants with secreted bispecific antibodies at the indicated dilutions were tested in cytotoxic assays for specific lysis of Kato III cells in the presence of human immune effector cells (PBMCs). In the absence of CHO supernatants, no target cell lysis of Kato III cells was observed in the presence of PBMCs. Data shown are the means of triplicate determinations. Cytotoxic activity of PBMC redirected against EpCAM-positive Kato cells by the bispecific antibodies 3B10xP4-3; 3B10xP4-14; 3B10xP5-2 and 3B10xP5-23 in several dilutions. 200,000 PBMCs were added to 10,000 Chromium-51 labeled Kato III cells in the presence of the diluted bispecific antibodies in a total volume of 200 μ l. The negative control contains PBMCs and target cells without an antibody dilution. The microtiterplates were incubated for 4 h at 37°C, 5 % CO_2 . After the incubation period 50 μ l supernatant were removed from each well and assayed for released ^{51}Cr in a gamma counter.

Fig 16: Compilation of sequences as depicted in the appended examples.

The nucleotide sequences are shown in the common 5' \rightarrow 3' orientation.

The examples illustrate the invention.

Example 1: Production of recombinant NKG2D

To obtain the coding DNA-sequence of the extracellular portion of the NKG2D-antigen, cDNA derived from the RNA of peripheral blood mononuclear cells by reverse transcription was used as template for a polymerase chain reaction (PCR).

Total RNA was prepared from peripheral blood mononuclear cells which were separated from a whole-blood sample by ficoll-density centrifugation following standard protocols (J. E. Coligan, Wiley Interscience 1991).

The RNA preparation was performed using a commercially available preparation kit (Quiagen) according to the instructions of the manufacturer.

The cDNA-synthesis was carried out according to standard protocols (Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, second edition)

For the PCR, a pair of primers with the following sequences was used:

Forward primer: 5'-AGGTGTACAGTCCTTATTCAACCAAGAAGTTCAAATTCC-3'
(SEQ ID 87)

Reverse primer: 5'-TCATCCGGACACAGTCCTTTGCATGCAGATG-3' (SEQ ID 88)

In addition to the sequence hybridizing to the NKG2D cDNA-template, the forward primer contains a BsrGI-site and the reverse primer a BspEI-site to allow the cloning of the PCR amplification product.

The product of the PCR-reaction was isolated by means of an agarose-gel electrophoresis, purified using a commercially available kit (Quiagen) according to the instructions of the manufacturer, and then incubated with the restriction enzymes BsrGI and BspEI using standard protocols (Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, second edition). Afterwards a final purification step was performed.

As shown in Fig. 1, the coding sequence of the NKG2D extracellular domain was fused via BsrGI to a murine Ig-heavy chain leader sequence; the BspEI-site was fused with an XmaI-site thus joining the coding sequence of a poly-histidine tag followed by a stop codon (SEQ ID 1 and 2).

The EcoRI/SalI-DNA fragment shown in Fig. 1 consisting of the coding sequences of an N-terminal leader peptide, the NKG2D extracellular domain and a C-terminal

histidine-tag, was cloned into the plasmid vector pFastBac1 also prepared by digestion with the restriction enzymes EcoRI and Sall. This plasmid is part of the Bac-to-Bac® Baculovirus expression system (Gibco BRL, instructions of the manufacturer are available at the internet site: <http://www2.lifetech.com/catalog/techline/molecularbiology/Manuals PPS/bac.pdf>. Unless stated otherwise, all procedures related to the Bac-to-Bac® Baculovirus expression system, were carried out according to these instructions).

1 ng DNA of a correct plasmid clone was then transformed into DH10Bac competent cells (Bac-to-Bac® expression system). This *Escherichia coli* strain already carries two other plasmids, (i) a helper plasmid (pMON7124) providing Tn7 transposition functions and (ii) a so-called bacmid (pMON 14272) which is a baculovirus shuttle vector. After transformation of the third plasmid into these cells the coding sequence inserted into pFastBac1 is transferred by transposition into the bacmid which contains specific target sites for this transposition. That leads to the destruction of a LacZ-coding sequence which offers the possibility to select colonies with the recombinant bacmid by means of a blue white selection on agar plates containing Blue-gal, IPTG and a combination of antibiotics according to the instructions of the manufacturer

White colonies containing the recombinant bacmid with the soluble NKG2D sequence were selected and cultured over night. A specific protocol provided by the manufacturer was used for the preparation of bacmid-DNA from these overnight cultures.

The bacmid-DNA was then used to transfect SF9-insect cells using CellFectin Reagent (Bac-to-Bac® expression system) according to the instructions of the manufacturer. Three days after transfection recombinant baculovirus in the culture supernatant of the transfected cells was harvested. This supernatant is a low titer (approximately 2×10^7 plaque forming units (pfu) per millilitre) low scale (2ml) virus stock. (Instructions for insect cell culture, propagation of baculoviruses and protein expression in the baculovirus expression system are available at the internet site: <http://www.invitrogen.com/manuals.html>. Unless stated otherwise, all procedures related to insect cell culture and protein expression were carried out according to these instructions). For protein expression a high titer and high scale virus stock was required. To obtain such a virus stock the following steps were performed:

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

39

Two 25cm² tissue culture flasks each seeded with 2x10⁸ SF9-cells were infected with 30µl of the initial virus stock, respectively. After ten days the culture supernatants were harvested as a low scale – high titer viral stock. Then a 500ml suspension culture of SF9-cells at a density of 2,0x10⁶ cells per milliliter was infected with 5ml of the second virus stock. Progression of the infection was monitored by determination of the cell viability using the trypan-blue exclusion method. At a cell viability below 10% the viral stock was harvested and virus supernatant separated from cells by centrifugation. The viral titer of this large scale stock had to be determined. For this purpose SF-9 cells were seeded in a 96-well tissue culture plate at a density of 1x10⁴ cells per well. A total of 24 wells was each infected with one of the following dilutions of the high titer stock: 10µl of a 1:10⁵ dilution per well, 10µl of a 1:10⁶ dilution per well and 10µl of a 1:10⁷ dilution per well. The volume had to be adjusted to 120µl per well. After 14 days viability of the cells was determined by the trypan-blue exclusion assay. That dilution with a balanced relation of wells with viable and non-viable cells allows a sufficiently precise estimation of the viral titer which is expected to be 1x10⁸ to 1x10⁹ pfu/ml.

The time course of protein expression was determined at MOIs (multiplicity of infection) of 5 pfu and 10 pfu per cell in an infection experiment with two suspension cultures of SF9 cells at 2,3x10⁶ cells/ml. Samples of the infected cultures were drawn at 24, 48, 72 and 96 hours post infection. These samples were analysed by western blot according to standard protocols. Soluble NKG2D was detected with a peroxidase-conjugated anti-histidine-tag antibody.

Thus, the optimal MOI and the optimal incubation time after infection were used for large scale protein expression in multiple suspension cultures of 500ml culture volume.

Soluble NKG2D was purified from culture supernatants via its C-terminal histidine tag by affinity chromatography using a Ni-NTA-column as described by Mack (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7021.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

40

Example 2: Generation of monoclonal antibodies against native NKG2D on human lymphocytes

Ten weeks old F1 mice from balb/c x C57black crossings were immunized with the soluble extracellular domain of the antigen NKG2D. The antigen was dissolved in 0.9% NaCl at a concentration of 100 µg/ml. The solution was subsequently emulsified 1:2 with complete Freund's adjuvants and 50 µl were injected per mouse intraperitoneally. Mice received booster immunizations after 4, 8, and 12 weeks in the same way, except that complete Freund's adjuvants was replaced by incomplete Freund's adjuvants. Ten days after the first booster immunization, blood samples were taken and antibody serum titer against NKG2D antigen was tested by ELISA. Serum titer was more than 1000 times higher in immunized than in not immunized animals. Three days after the second boost, spleen cells were fused with P3X63Ag8.653 cells (ATCC CRL-1580) to generate hybridoma cell lines following standard protocols as described in Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 1992). After PEG-fusion, cells were seeded at 100.000 cells per well in microtiterplates and grown in 200 µl RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 300 units/ml recombinant human interleukin 6 and HAT-additive for selection. Culture supernatants from densely grown wells were tested by the following ELISA:

The wells of a 96 U-bottom plate (Nunc, maxisorb) were coated overnight at 4°C with recombinant NKG2D-antigen at a concentration of 5 µg/ml. Coated wells were washed three times with washing buffer (0.1M NaCl, 0.05M Na₂HPO₄ pH 7.3, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃) and subsequently blocked through incubation for one hour at room temperature with 200 µl/well of 2% skimmed milk powder suspended in washing buffer. In the next step, the hybridoma supernatant was incubated undiluted and at several dilutions for two hours at room temperature. After three additional washing steps bound monoclonal antibody was detected with a horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibody against mouse immunoglobulin. After 5 times of washing, the ELISA was finally developed by addition of TMB-substrate solution (Tetramethylbenzidine, Roche Mannheim).

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

41

The colored precipitate was measured after 15 min. at 405 nm using an ELISA-reader.

Supernatants from 10 clones exhibiting strong ELISA-signals were selected for further analysis. In order to identify those hybridoma clones, that produce monoclonal antibodies reactive with native NKG2D-antigen on intact NK-cells and T-lymphocytes, the following flowcytometric analysis was performed:

1×10^6 PBMC were incubated for 30 min. on ice with 50 μ l undiluted hybridoma supernatant and bound monoclonal antibody was detected subsequently detected with fluorescein (FITC) conjugated F(ab')₂ fragment of a rabbit anti-mouse Ig antibody (Dako Hamburg, Code No. F0313) diluted 1:100 in PBS. In the next step, the free valences of cell-bound FITC-conjugated antibody were blocked through incubation of the cells for 30 minutes with 50 μ l mouse serum (Sigma immunochemicals, Deisenhofen, M-5905) diluted 1:10. To distinguish between NK- and T-cells, labeled PBMC were split at this point. One half was stained with a T-cell specific tricolor conjugated anti-CD8 antibody (Caltac Laboratories; Burlingame; USA, Code No. MHCD0306) diluted 1:100; the other half was stained with an NK-cell specific phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD56 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat. No. 347747) diluted 1:25. Unlabeled anti-CD16 and anti-CD6 antibodies specifically staining NK-cells or T-lymphocytes, respectively, were used as positive controls of the primary labeling step; a murine monoclonal antibody with irrelevant specificity instead of hybridoma supernatants reactive with recombinant NKG2D served as negative control.

Cells were analyzed by flowcytometry on a FACS-scan (Becton Dickinson, Heidelberg). FACS-staining and measuring of the fluorescence intensity were performed as described in Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 1992)

Two-color fluorescence analysis was carried out by applying a positive gate for CD8⁺- and CD56⁺-cells, respectively, thus allowing the detection of FITC-mediated fluorescence separately on CD8⁺-T-lymphocytes and NK-cells. Compared with the distinct staining of CD8⁺-T-lymphocytes and NK-cells with the respective control antibodies, the supernatant of hybridoma cell line 8R23 showed strong reactivity with

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

42

both NK- and T-cells, whereas two further supernatants were only weakly reactive with both lymphocyte subsets.

Alternatively, monoclonal antibodies against human NKG2D were generated by genetic immunization of mice. For this purpose, two different fragments of human NKG2D from nucleotides (nt) 64 to 462 and from nt 123 to 462 corresponding to amino acid sequences SEQ ID 3 and 4 were PCR-amplified from the cDNA-template shown in Figure 1, that encode extracellular NKG2D-segments flanked by asparagine (N) and valine (V) or by tryptophan (W) and valine (V), respectively. As PCR-primers the following oligonucleotides were used:

NKG2D-short-f (5'- ATCAAGCTTGTGGATATGTTACAAAATAACT-3') (SEQ ID 80) and NKG2D-stop-r (5'-CGCGGTGGCGGCCGCTTACACAGTCCTTGCATG-3') (SEQ ID 82) for the amplification of the NKG2D-fragment: nt 123-462

as well as NKG2D-f (5'-ATCAAGCTTGAACCAAGAAGTTCAAATTCC-3') (SEQ ID 81) and NKG2D-stop-r (5'-CGCGGTGGCGGCCGCTTACACAGTCCTTGCATG-3') (SEQ ID 82) for the amplification of the NKG2D-fragment: nt 64-462.

Plasmids for genetic immunization were constructed by cloning each of these PCR-products in-frame into the restriction endonuclease sites Hind III and Not I of the vector VV1 (GENOVAC AG, Germany) as shown in Figure 4.

The resulting plasmids VV1-NKG2-D (nt 64-462) and VV1-NKG2-D (nt 123-462) allowed the secretion of soluble extracellular NKG2-D fragments tagged by a myc epitope at the N-terminus. The myc epitope was utilized to confirm expression of the soluble NKG2-D fragments. To this end the constructs were expressed by transient transfection into BOSC-23 cells (Onishi (1996) Exp Hematol 24: 324), perforated by addition of Cytoperm/Cytofix (Becton Dickinson); myc-tagged NKG2-D fragments were stained intracellularly by FACScan analysis after reaction with a murine anti-myc monoclonal antibody (9E10, ATCC, CRL-1729) followed by a polyclonal phycoerythrin-labeled rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody.

Three to 8 weeks old BALB/c mice were immunized six times with VV1-NKG2-D (nt 64-462) and two mice were immunized three times with VV1-NKG2-D (nt 64-462) followed by three immunizations with VV1-NKG2-D (nt 123-462) using a Helios gene gun (Bio-Rad, Germany) according to a published procedure (Kilpatrick (1998)

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

43

Hybridoma 17: 569). One week after the last application of the immunization plasmids each mouse was boosted by intradermal injection of 300 μ l of recombinant human NKG2-D protein (see Example 1) concentrated 50 μ g/ml in phosphate buffered saline without Mg^{2+} and Ca^{2+} ions at the DNA application sites.

Four days later, the mice were killed and their lymphocytes were fused with SP2/0 mouse myeloma cells (American Tissue Type Collection, USA) using polyethylene glycol (HybriMax; Sigma-Aldrich, Germany), seeded at 100,000 cells per well in 96-well microtiter plates and grown in 200 μ l DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and HAT additive for hybridoma selection (Kilpatrick (1998) Hybridoma 17: 569).

Culture supernatants from densely grown wells were tested by ELISA on immobilized recombinant NKG2D as described above. Supernatants from 122 clones exhibiting positive ELISA-signals were selected for further analysis. In order to identify those hybridoma clones, that produce monoclonal antibodies reactive with native NKG2D-antigen on intact NK-cells and $CD8^+$ T-lymphocytes, cells were analysed by flowcytometry on a FACS-scan (Becton Dickinson, Heidelberg):

Mononucleated cells from the peripheral blood (PBMC) of a healthy donor were isolated by Ficoll-density gradient centrifugation. In each well of a microtiter plate 200.000 PBMC were incubated with undiluted hybridoma supernatant. After 30 minutes of incubation on ice cells were washed twice with PBS and subsequently stained with fluorescein (FITC)-conjugated $F(ab')_2$ fragment of a goat anti-mouse IgG and IgM antibody (Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, USA, Code 115-096-066; 1:100) for 30 minutes on ice. The cells were washed twice with PBS and subsequently stained with two different antibody labeling mixtures. For staining of $CD8^+$ T cells, 100.000 PBMC were further incubated for 30 minutes with a phycoerythrin (PE) conjugated CD16 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Code No. 347617) and a tricolor conjugated CD8 antibody (Caltac Laboratories, Burlingame, USA, Code No. MHCD0806). For staining of NK-cells, the other half of the PBMC was further incubated for 30 minutes with a phycoerythrin (PE) conjugated CD56 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Code No. 347747) and a tricolor conjugated CD3 antibody (Caltac Laboratories, Burlingame, USA, Code No. MHCD0306.). In order to

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

44

avoid cross-reactions between the different antibodies within the labeling mixtures mouse serum (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, Cat. No. 054H-8958) was added at a final dilution of 1:10.

Triple color fluorescence analysis was carried out by applying a positive gate for CD8⁺ (Tricolor) and a negative gate for CD16⁺ (PE) cells, thus allowing the detection of FITC-mediated fluorescence exclusively attributed to CD8⁺ T-lymphocytes (phenotype: CD8⁺, CD16⁻) without any contaminating signals from CD8⁺ NK-cells. Similarly, triple color fluorescence analysis was carried out by applying a positive gate for CD56⁺ (PE) and a negative gate for CD3⁺-cells (tricolor) thus allowing the detection of FITC-mediated fluorescence exclusively attributed to NK-cells (phenotype: CD56⁺, CD3⁻) without any contaminating signals from CD56⁺-T lymphocytes. As shown in Figure 5, the supernatants of the hybridomas designated 11B2, 8G7 and 6E5 contained monoclonal antibodies reactive with native NKG2D on the surface of both human CD8⁺ T-lymphocytes and NK-cells. Staining with supernatant of the hybridoma 10H9 is shown as a representative example of many monoclonal antibodies reactive with immobilized recombinant NKG2D, that were, however, not capable of binding the native NKG2D-receptor complex on intact cells. FACS staining and measuring of the fluorescence intensity were performed as described in Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 1992).

The hybridomas producing antibodies reacting with NKG2D on CD56⁺ NK- and CD8⁺ T cells were subcloned once by limited dilution on 96-well microtiter plates. Positive subclones were identified by flowcytometry on NKG2D-positive NK-cells (Bauer (1999) Science 285: 727) incubated with supernatants harvested from wells showing cell growth. Cell-bound monoclonal antibody was detected with the fluorescein (FITC) conjugated F(ab)₂-fragment of a rabbit anti-mouse Ig antibody (Dako, Hamburg, Code No. F0313). The subclones 11B2D10, 8G7C10 and 6E5A7 were further used for the construction of NKG2D-directed bispecific antibodies (see Example 3).

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

45

Example 3: Construction of bispecific single-chain antibodies anti-NKG2D x anti-EpCAM

The bispecific antibodies were constructed as depicted in Figure 2. The variable regions VL and VH of those antibodies binding to native NKG2D on intact cells were cloned from total RNA of the corresponding hybridoma cell lines as described by Orlandi (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 3833, except that the PCR-fragments of variable regions amplified from hybridomas 11B2D10 (SEQ ID 7-16), 8G7C10 (SEQ ID 27-36), 6E5A7 (SEQ ID 37-46) and 6H7E7 (SEQ ID 17-26) were directly cloned into the TA-cloning vector GEM-T Easy (Promega, Cat. No. A1360). Subsequently, cloned VL- and VH-regions served as templates for a two-step fusions-PCR resulting in the corresponding scFv-fragments with the domain arrangement VL/VH. The VL-specific primer pair used for this purpose consists of oligonucleotides 5'VLB5RRV (5'AGG TGT ACA CTC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GTC TCC A 3' (SEQ ID 83)) and 3'VLGS15 (5'GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC3' (SEQ ID 84)), the VH-primer pair of oligonucleotides 5'VHGS15 (5'GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT TCT CAG GT(GC)(AC)A(AG) CTG CAG (GC)AG TC(AT) GG 3' (SEQ ID 85)) and 3'VHBspEI (5'AAT CCG GAG GAG ACG GTG ACC GTG GTC CCT TGG OCC CAG 3' (SEQ ID 86)). In the first PCR step VH- and VL-amplification products were obtained with the following PCR-programm: denaturation at 94 °C for 5 min, annealing at 37°C for 2 min, elongation at 72°C for 1 min for the first cycle; denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 37°C for 2 min, elongation at 72°C for 1 min for 6 cycles; denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72°C for 45 sec and 18 cycles; terminal extension at 72°C for 2 min. For the second step of the fusion PCR VH- and VL-PCR fragments were purified from agarose gel, mixed with oligonucleotide primers 5'VLB5RRV and 3'VH BspEI, and subjected to the following PCR-programm: denaturation at 94°C for 5 min once; denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72°C for 1,5 min and 8 cycles; terminal extension at 72°C for 2 min. VL/VH-fusion products encoding anti-NKG2D scFv-fragments were purified from agarose gels, and digested with the restriction enzymes BsrGI/BspEI. The mammalian expression vector pEF-DHFR (Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021)

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

46

containing an EcoRI/SalI-cloned DNA-fragment described in WO0003016, Fig 10 was also digested with the restriction enzymes BsrGI/BspEI releasing a 750bp-fragment, the remaining vector-fragment was gel purified and used for cloning of the anti-NKG2D scFv-fragments.

Thus, the resulting derivatives of mammalian expression vector pEF-DHFR contain EcoRI/SalI-DNA inserts encoding bispecific single-chain antibodies as described by Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021, that are directed against NKG2D and EpCAM. EpCAM is expressed by many epithelial tumors and already used as target antigen for the adjuvant treatment of resected colorectal cancer with a murine monoclonal antibody.

The expression plasmids for anti-NKG2D x anti-EpCAM bispecific single-chain antibodies (SEQ ID 47-49) were transfected into DHFR-deficient CHO-cells by electroporation; selection for stable transfectants, gene amplification and protein production were performed as described (Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021). Bispecific antibody was purified from culture supernatant via the C-terminal histidine tag by using Ni-NTA-column as described (Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021, see also Fig. 3).

Example 4: Antibodies directed to the extracellular domain of DAP-10

Antibodies reactive with the extracellular domain of the NKG2D-receptor complex can be also be obtained with the following protocol:

6 to 8 weeks old BALB/c mice may be immunized with a peptide corresponding to the complete extracellular domain of human DAP-10 comprising 30 amino acids (SEQ ID 5, QTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGGSLSLP) or a part thereof (Wu (1999) Science 285: 730), conjugated with a carrier protein, respectively. For example, a peptide comprising the 21 N-terminal amino acids of the extracellular domain of DAP10 (SEQ ID 6, QTTPGERSLPAFYPGTSGSC) may be coupled to maleinimide activated KLH in a directed manner via the mercapto-group of its C-terminal cystein. The conjugate may be dissolved in 0,9% NaCl at a concentration of 100 µg/ml, the solution subsequently emulsified 1:2 with complete Freund's adjuvants and 50µl per mouse injected intraperitoneally. Mice may receive booster immunizations

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

47

resembling the primary immunization after 4, 8 and 12 weeks, except that complete Freund's adjuvants can be replaced by incomplete Freund's adjuvants. Ten days after the first booster immunization, blood samples may be taken and antibody serum titer tested by ELISA on immobilized BSA conjugated with the 21-mer DAP-10 peptide as described above for KLH.

Three days after the second boost, spleen cells from mice with positive serum titer may be fused with P3X63Ag8.653 cells (ATCC CRL-1580) to generate hybridoma cell lines following standard protocols as described in Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 1992). After PEG-fusion, cells may be seeded at 100,000 cells per well in microtiterplates and grown in 200 μ l RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 300 units/ml recombinant human interleukin 6 and HAT-additive for selection. Culture supernatants from densely grown wells may be tested for reactivity with DAP10-peptide by the following ELISA:

The wells of a 96 U-bottom plate (Nunc, maxisorb) are coated overnight at 4°C with peptide-BSA-conjugate at a concentration of 5 μ g/ml. Coated wells are washed three times with washing buffer (0.1M NaCl, 0.05M Na₂HPO₄ pH 7.3, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃) and subsequently blocked through incubation for one hour at room temperature with 200 μ l/well of 2% skimmed milk powder suspended in washing buffer. In the next step, hybridoma supernatant is incubated undiluted and at several dilutions for two hours at room temperature. After three additional washing steps bound monoclonal antibody can be detected with a horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibody against mouse immunoglobulin. After 5 times of washing, the ELISA can be finally developed by addition of TMB-substrate solution (Tetramethylbenzidine, Roche). The colored precipitate is measured after 15 min. at 405 nm using an ELISA-reader.

In order to identify those peptide-reactive hybridoma clones, that produce monoclonal antibodies capable of binding to DAP-10 within the NKG2D-receptor complex on intact NK-cells and CD8⁺ T-lymphocytes, the triple color fluorescence analysis on PBMC may be performed that is described in Example 2.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

48

The variable regions of monoclonal antibodies staining intact NK-cells and CD8⁺ T-lymphocytes may be cloned from the corresponding hybridoma cell lines and used for construction of bispecific single-chain antibodies as described in Example 3.

Example 5: Enhanced priming of naive CD8⁺ T cells by NKG2D-directed antibodies

For in vitro priming experiments naive human CD8⁺ T cells were isolated as follows: Mononuclear cells (PBMC) were prepared by Ficoll density centrifugation from 500ml peripheral blood obtained from a healthy donor. CD8⁺-T cells were isolated by negative selection using a commercially available cell separation kit (R&D Systems, HCD8C-1000). The CD8⁺-T cell column was loaded with 2×10^9 PBMC, which had been preincubated with the manufacture's antibody cocktail supplemented with 1 μ g of a monoclonal anti-CD11b antibody (Coulter 0190) per column. Since primed non-proliferating cytotoxic CD8⁺ T cells share the CD45RA⁺/RO⁻ phenotype with naive CD8⁺ T lymphocytes, CD11b was introduced as additional cell purification marker in order to get rid of the former T cell subset. Thus, only CD11b⁻/CD8⁺ T cells entered the purification procedure based on CD45-isoforms finally resulting in naive CD8⁺-T lymphocytes, that like naive CD4⁺-T cells carry the CD45RA⁺/RO⁻ phenotype. Successful purification of CD8⁺-T cells was controlled by flowcytometry after single staining with an anti-CD8 antibody. Absence of CD11b⁺-cells from CD8⁺-T cell preparations was confirmed by single staining with an anti-CD28 antibody, since CD11b-positive CD8⁺-T cells are always CD28-negative and vice versa. CD45RO⁺-cells were removed from purified CD8⁺-T cells through incubation with a murine monoclonal anti-CD45RO antibody (PharMingen, UCHL-1, 31301) followed by magnetic beads conjugated with a polyclonal sheep anti-mouse Ig antibody (Dyna, 110.01). The purity of the remaining naive CD8⁺-T cells proved to be >95% as determined by flowcytometry after double staining with anti-CD45RA/anti-CD45RO. The average yield of naive CD8⁺ T cells per 500ml peripheral blood was 5×10^6 (CD8).

The in vitro priming experiment with naive CD8⁺ T cells was carried out as follows: 25.000 EpCAM-transfected CHO-cells per well were incubated in a 96-well flat-bottom culture plate for 2 hours, that had been coated overnight with a polyclonal rabbit anti-mouse IgG1 antibody (Dako, Z0019) diluted 1:1000 in PBS. After the cells had adhered to the plastic, they were irradiated with 14.000 rad. Subsequently, 50.000 purified naive CD8⁺ T cells per well were added in RPMI 1640 medium supplemented with 10% human AB serum, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 2mM glutamin, 1mM sodium pyruvat, 10mM HEPES-buffer, 1x non-essential amino acids (Gibco) and 50µM β-mercaptoethanol. The EpCAM-specific B7-1/4-7 single-chain construct described in WO9926818 (Example 7) was added at 500ng/ml together with 1 µg/ml of a murine IgG1 isotype control (Sigma, M-7894) and either 250 ng/ml, 50ng/ml or no bispecific single-chain antibody (bsc) EpCAM x CD3 (Mack (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 7021). 500 ng/ml of the B7-1/4-7 single-chain construct was the maximum concentration that did not yet by itself affect CD45-isoform expression on CD8⁺-T cells. In a parallel experiment, the same concentrations and combinations of bsc EpCAM x CD3 and B7-1/4-7 single-chain construct were used except that the IgG1 isotype control was replaced by diluted hybridoma supernatant kindly provided by Dr. Moretta, Genova, Italy containing the murine NKG2D-specific IgG1 antibody BAT221 at a final concentration of 1 µg/ml. Alternatively the NKG2D-specific monoclonal antibody can be exchanged for a bispecific antibody binding to NKG2D and EpCAM like SEQ ID 47-49 and 72-79. In contrast to the monoclonal antibody no bispecific antibody is immobilized on the solid support. All experiments were carried out with triplicates of identical wells. Furthermore, a set of two identical 96-well plates was prepared in order to make sure, that enough cells were available for flowcytometry on days 3 and 6. On day 3, supernatant was harvested from one 96-well plate and TNF-α concentration determined by using a commercially available ELISA-kit (PharMingen, 2600KK). The cells were also harvested and subjected to flowcytometric analysis of CD45-isoform expression. Moreover, half of the supernatant was removed from each well of the second 96-well plate and replaced by fresh medium adjusted to the corresponding concentrations of B7-1/4-7 single-chain construct, bsc EpCAM x CD3, BAT221 and/or isotype control. On day 6, the cells of this 96-well plate were harvested and their CD45-isoform

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

50

expression pattern was analyzed by flowcytometry. In general, cells and supernatants from three identical wells (triplicates) were pooled for flowcytometry and cytokine analysis, respectively.

Flowcytometry was performed on a FACScan (Becton Dickinson). Flowcytometric analysis of CD45-isoform expression was carried out by double staining of 1×10^5 cells with a PE-conjugated monoclonal anti-CD45RA antibody (Coulter, 2H4, 6603904) and a FITC-conjugated monoclonal anti-CD45RO antibody (DAKO, UCHL-1, F 0800) for 30 minutes on ice. Flowcytometric monitoring of T cell purification was equally carried out by single stainings with a Tricolor-conjugated monoclonal anti-CD8 antibody (Medac, MHC0806) and a FITC-conjugated monoclonal anti-CD28 antibody (Medac, MHCD2801).

In these priming experiments, the primary signal was mediated by the bispecific single-chain antibody (bscAb) EpCAM x CD3 thus imitating specific antigen recognition through the T-cell receptor (TCR); the second or costimulatory signal was mediated by the EpCAM-specific B7-1/4-7 single-chain construct through engagement of CD28 on the T-cells. Thus the effect of an NKG2D-directed antibody on the priming of naive CD8⁺ T cells could be determined, that were activated through the TCR-like and the costimulatory signal. Non-human stimulator cells armed with EpCAM-specific constructs were used in order to avoid background signals, that may arise with human stimulator cells incidently expressing costimulatory receptors. The kinetics of T cell priming was monitored by flowcytometry on days 3 and 6 simultaneously measuring the expression of CD45RA and CD45RO. As shown in Figure 6, almost the entire population of naive T cells changed the CD45-phenotype to that of primed T cells, i.e. CD45RA⁻/RO⁺, within 6 days in the presence of B7-1/4-7 single-chain construct (500 ng/ml) and bscAb EpCAM x CD3 (250 ng/ml). Accordingly, an intermediate state could be observed on day 3. Surprisingly, the additional presence of the NKG2D-directed antibody further accelerated proliferation and priming of naive CD8⁺ T cells. This could be concluded from the higher percentage of CD8⁺ T-cells located on day 3 in the lower right quadrant in Figure 6B, if the cells had received the additional NKG2D-signal compared to a smaller percentage when the naive T-cells were stimulated through the TCR-like and costimulatory signal alone. Since TNF- α is

typically produced by primed CD8⁺-T cells but not by their naive counterparts, the effect of enhanced T-cell priming could be confirmed by higher concentrations of TNF- α measured on day 3 in the supernatant of CD8⁺ T-cells receiving the NKG2D-signal compared to those primed in the absence of the NKG2D-directed antibody (Figure 7).

Even the flowcytometric results on day 6 (Figure 6 C and E), when the priming process was almost completed, showed the NKG2D-mediated support of T cell priming: The loss of CD45RA-expression within 6 days proved to be more profound in the presence than in the absence of an NKG2D-mediated signal as measured by the higher percentage of CD8⁺ T cells located within the lower right field in Figure 6C.

Example 6: NKG2D-directed antibodies enhance the cytotoxicity of CD8⁺ T-cells and NK-cells triggered through engagement of the TCR- or the Fc γ RIII-complex, respectively

In order to test the recruitment of cytotoxic lymphocytes i.e. CD8⁺ T cells and NK cells by NKG2D-directed antibodies, we performed ⁵¹Cr-release assays using the murine Fc γ R-positive P815 cell line as target and either a Melan-A specific human CD8⁺ T cell clone (Melan-A cells) or NKL cells (Bauer (1999) Science 285: 727) as effectors.

The ⁵¹Cr-release assay measuring cellular cytotoxicity was carried out as described by Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021 with minor modifications. 10.000 ⁵¹Cr-labeled P815-cells were either mixed with 50.000 Melan-A cells or with 200.000 NKL cells per well of a round-bottomed microtiter plate. NKL cells were incubated for 4h in the presence of 5 μ g/ml CD16 antibody (3G8) and/or diluted hybridoma supernatant containing the murine NKG2D-specific monoclonal antibody BAT221. Melan A cells were incubated for 4h in the presence of 0,2 μ g/ml CD3 antibody (OKT3) and/or diluted BAT221-supernatant. Maximum ⁵¹Cr-release was determined by lysis of target cells with May buffer (2% SDS/ 0,37% EDTA/ 0,53% Na₂CO₃). The spontaneous ⁵¹Cr-release was determined with target cells incubated in the absence of effector cells and antibodies. Target cells incubated with effector cells in the absence of antibodies served as negative control. Specific lysis was calculated as [(cpm, experimental

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

52

release) - (cpm, spontaneous release)] / [(cpm, maximal release) - (cpm, spontaneous release)]. The cytotoxicity assay was carried out with triplicate samples. As shown in Figure 8, BAT221 did not induce any substantial target cell lysis by itself in contrast to published NKG2D-antibodies (Bauer (1999) Science 285: 727). As expected the CD16- and the CD3-antibody induced redirected target cell lysis with NKL-cells and Melan A-cells, respectively. However, although not cytotoxic by itself, BAT221 surprisingly enhanced target cell cytotoxicity triggered by engagement of the TCR-complex on Melan A-cells and of the FcγRIII-complex on NKL-cells. Alternatively, PB15-cells can be replaced e.g. by EpCAM-positive Kato-cells and the NKG2D-specific monoclonal antibody exchanged for a bispecific antibody binding to NKG2D and EpCAM like SEQ ID 47-49 and 72-79. The TCR-complex on CD8⁺ T-cells may be engaged by a bispecific antibody binding to CD3 and to a surface antigen on the target cells or by specific TCR-recognition of processed MHC I-complexed target cell antigen. The FcγRIII-complex on NK-cells may be engaged by a bispecific antibody binding to CD16 and to a surface antigen on the target cells or by a target cell specific monoclonal antibody like e.g. a human EpCAM antibody bound to FcγRIII via its Fc-part.

Example 7: Bispecific single-chain antibodies with an NKG2D-binding site located C-terminally of the target binding site

Five Balb/c mice were genetically immunized with human NKG2D as described in Example 2. In order to identify mice with a serum antibody reactivity on the surface of human lymphocytes resembling the expression pattern of the NKG2D-receptor complex, a triple fluorescence analysis on PBMC as described in Example 2 was carried out with mouse serum diluted 1:10, 1:20 and 1:40. As shown in Figure 9, only one mouse serum (No. 4) exhibited strong staining of both CD8⁺ T-lymphocytes and NK-cells. The spleen cells of this mouse were used as an immunoglobulin repertoire for the construction of a combinatorial antibody library as described in WO9925818 (Example 6). The cloned antibody repertoire was displayed on filamentous phage as an N2-VH-VL-fusion protein, imitating the C-terminal position of the corresponding

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

53

antigen binding site within a bispecific single-chain antibody. Selection of NKG2D-reactive scFv-fragments was carried out through two rounds of library panning on immobilized recombinant NKG2D-protein as described in WO9925818 for the 17-1A- or EpCAM-antigen followed by three rounds of panning on NKG2D-positive NKL-cells. Cell panning was carried out in PBS/10%FCS by resuspending 2.5×10^6 NKL-cells in 500 μ l phage suspension followed by 45 minutes of moderate shaking at 4°C. Then cells plus bound phage particles were centrifuged in a desk centrifuge at 2500 rpm for 2 minutes. Then the resulting pellet was washed twice by resuspension in 1 ml of PBS/10%FCS followed by recentrifugation (third round of panning). During the fourth round of panning 3 washing steps were applied as well as 5 washing steps during the fifth round of panning. Specifically bound phage particles were eluted from the NKL-cells by resuspension and incubation in 500 μ l HCl-Glycin for 10 minutes followed by neutralisation with 30 μ l 2M Tris-base (pH 12). The eluates were used for infection of a new uninfected E.coli XL1 Blue culture. After five rounds of phage-production and subsequent selection for antigen-binding scFv-displaying phages, plasmid DNAs from E.coli cultures were isolated corresponding to the fourth and fifth round of panning. For the production of soluble scFv-antibody fragments that carry the N2-domain at their N-terminus, the DNA fragment encoding the CT-domain of the geneIII-product was excised with *SpeI*/*NotI* and replaced by the tetramerization domain of human p53 (Rheinhecker (1996) *J Immunol.* 157: 2989) flanked by an N-terminal Ig-hinge-region and a C-terminal Flag-epitope (Figure 10, SEQ ID 50 and 51). After ligation, the resulting pool of plasmid DNA was transformed into 100 μ l of heat shock competent E.coli XL1 Blue cells and plated on Carbenicilline LB-agar. Single colonies were checked by screening-PCR for integrity of the cloned VH- and VL-regions and those with intact variable regions subjected to periplasmic expression of soluble antibody fragments as described in WO9925818 (Example 6). The periplasma preparations were tested by ELISA on immobilized recombinant NKG2D and specifically binding N2-scFv-p53-fusion proteins detected with the peroxidase-conjugated anti-Flag M2 antibody (Sigma, A-8592). As shown in Figure 11 many NKG2D-reactive clones from the fourth and fifth round of panning could be identified. The scFv-encoding fragments of the positive clones were excised with *BspEI* from the phage display vector and subcloned into the plasmid vector BS-CTI (see WO 00-06605, Figure 2) prepared by digestion

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

54

with BspEI and XmaI followed by dephosphorylation with calf intestinal phosphatase. The correct orientation of the scFv-fragments was checked by analytic digestion with the restriction enzymes BspEI and SpeI. By insertion into BS-CTI the scFv-encoding fragments were fused in-frame to a His₆-tag (SEQ ID 52-71). In the next step, the scFv-fragments were excised with BspEI and Sall from BS-CTI and subcloned BspEI/Sall into the mammalian expression vector pEF-DHFR that contained an EpCAM-specific, CD3-directed bispecific single-chain antibody as described by Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021 except that the scFv-fragment of the EpCAM-specific monoclonal antibody M79 had been replaced by that of the monoclonal antibody 3B10, that binds to EpCAM with high affinity (= bsc 3B10 x CD3). Thus, the CD3-specific scFv-fragment was replaced by NKG2D-reactive scFv-fragments resulting in EpCAM-specific, NKG2D-directed bispecific single-chain antibodies (SEQ ID 72-79).

CHO/dhfr⁻ cells were chosen for the transient expression of the antibody-like molecules. The transfection of the cells was performed with the TransFast transfection reagent (Promega, Heidelberg) according to the manufacture's protocol. Briefly, 2.5×10^6 cells were seeded per well in six-well plates 20 hrs prior to transfection. The transfection mix was prepared by adding 6 µg of plasmid DNA harboring the antibody sequences or the β-galactosidase gene to 1 ml MEM alpha media without supplements. After mixing 30 µl of TransFast reagent were added. The mix was vortexed and incubated for 15 minutes at room temperature. Then, the media was removed from the cells and replaced by the transfection mix. After 1 hour incubation period at 37 °C the transfection mix was aspirated and fresh complete MEM alpha was added to the cells. Protein production was analyzed 4 to 5 days post transfection by FACS analysis. The supernatants were harvested after 4 to 5 days. To remove cell debris the supernatants were centrifuged. The function of the antibodies was analyzed in binding studies of the anti-EpCAM specific part on Kato III cells. Per sample, 4×10^5 cells were incubated in 75 µl transfected cell supernatant diluted with 25 µl FACS buffer (1 % heat-inactivated FBS, 0.05 % Na₃N in PBS). The samples were incubated for 30 minutes at 4°C. After washing the cells twice with 200 µl FACS buffer the cells were incubated with 2 µg/ml anti-Penta.His antibody (QIAGEN, Netherlands) for 30 minutes at 4°C. Subsequently, the cells were washed again and incubated for 30

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

55

minutes with a sheep anti-mouse FITC conjugate (SIGMA, Daisenhofen. Binding was detected with a FACS Calibur (Becton-Dickinson) (Figure 12). Supernatants of CHO-cells transiently transfected with bsc 3B10 x P4-3 and bsc 3B10 x P5-2 showed positive ELISA-signals on immobilized recombinant NKG2D-antigen (Figure 13).

As an alternative to NKG2D, DAP10-peptide-conjugates as described in Example 4 may be used for immunizing mice, whose spleen cells may be the source of an immunoglobulin repertoire for the construction of a combinatorial antibody library like that described in this Example. Thus, DAP10 reactive antibody binding sites recognizing the NKG2D-receptor complex on CD8⁺ T-lymphocytes and NK-cells even when located C-terminally of the target binding site within a bispecific single-chain antibody may be selected through library panning on immobilized peptide-conjugate and/or cells expressing the NKG2D-receptor complex.

Example 8: Recruitment of CD8⁺ T and NK effector cells by bispecific single-chain antibodies with an NKG2D-binding site located C-terminally of the target binding site

In order to test the recruitment of cytotoxic lymphocytes i.e. CD8⁺ T cells and NK cells by NKG2D-directed bispecific antibodies, we performed ⁵¹Cr-release assays using the gastric cancer cell line Kato as target and either a Melan-A specific human CD8⁺ T cell clone (Melan-A cells), NKL cells (Bauer (1999) Science 285: 727) or unstimulated PBMC from a healthy donor as effectors.

The ⁵¹Cr-release assay measuring cellular cytotoxicity redirected against EpCAM-positiv Kato-cells was carried out as described by Mack (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92: 7021 with minor modifications. 10.000 ⁵¹Cr-labeled Kato cells were either mixed with 50.000 Melan-A cells or with 200.000 NKL cells or PBMC per well of a round-bottomed microtiter plate and incubated for 4h (Melan A- and NKL-cells) or 18h (PBMC) in the presence of culture supernatant from CHO cells diluted 1:2 that had been transfected with different EpCAM-specific, NKG2D-directed bispecific single-chain antibodies (3B10 x P4-3, 3B10 x P4-14, 3B10 x P5-2 and 3B10 x P5-23) described in Example 8. Maximum ⁵¹Cr-release was determined by lysis of target cells

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

56

with Maly buffer (2% SDS/ 0,37% EDTA/ 0,53% Na_2CO_3). The spontaneous ^{51}Cr -release was determined with target cells incubated in the absence of effector cells and bispecific antibody. Target cells incubated with effector cells in the absence of antibodies served as negative control. Specific lysis was calculated as $[(\text{cpm, experimental release}) - (\text{cpm, spontaneous release})] / [(\text{cpm, maximal release}) - (\text{cpm, spontaneous release})]$. The cytotoxicity assay was carried out with triplicate samples. As shown in Figure 14, the supernatant of CHO-cells transiently transfected with the NKG2D-directed bispecific single-chain antibody 3B10 x P4-3 induced weak but reproducible and titratable cytotoxicity of EpCAM-positive Kato-cells with both Melan-A- and NKL-cells in the 4h- ^{51}Cr release test. Moreover, the supernatants of CHO-cells transiently transfected with the NKG2D-directed bispecific single-chain antibodies 3B10 x P4-3, 3B10 x P4-14, 3B10 x P5-2 and 3B10 x P5-23, respectively induced substantial target cell lysis with PBMC in the 18h ^{51}Cr -release assay (Figure 15).

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

57

CLAIMS

1. A multifunctional polypeptide comprising
 - (a) a first domain comprising a binding site specifically recognizing an extracellular epitope of the NKG2D receptor complex; and
 - (b) a second domain having receptor or ligand function.
2. The multifunctional polypeptide of claim 1 wherein said binding site is the binding site of an immunoglobulin chain.
3. The multifunctional polypeptide of claim 1 wherein said binding site is a natural NKG2D-ligand of said receptor complex.
4. The multifunctional polypeptide of claim 3 wherein said natural NKG2D-ligand is selected from the group consisting of MIC-A, MIC-B, ULBP-1 and ULBP-2.
5. The multifunctional polypeptide of claims 1 to 4 wherein said binding site specifically recognizes an extracellular epitope of NKG2D or of DAP10.
6. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 5 wherein said receptor or ligand function is an antigen binding site of antibodies or fragments or derivatives thereof against (i) tumor associated antigens, (ii) antigens of infective agents or (iii) surface markers of sub-populations of cells such as differentiation antigens (CD antigens), natural ligands or receptors or fragments thereof or modifications thereof that interact with said tumor associated antigens or surface markers, preferably (i) heregulins, binding to the tumor associated antigens erbB-2, -3 and -4, (ii) CD4 that interacts with gp 120 of HIV infected cells or (iii) melanocyte stimulating hormone (MSH) that binds to the MSH receptor on melanocytes and tumors derived therefrom (maligne melanomes) or chemokines binding to corresponding chemokine receptors, or MHC molecules or fragments

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

58

- thereof complexed with peptides that bind to T-cell receptors of predefined specificity and thus recognize certain T-cell sub-populations or antigen binding sites of T-cell receptors that specifically interact with predefined MHC peptide complexes or NKp46 which interacts with haemagglutinin (HA) of influenza virus.
7. The multifunctional polypeptide of claim 6 wherein said tumor-associated antigen is selected from the group consisting of Lewis Y, Muc-1, erbB-2, -3 and -4, Ep-CAM, EGF-receptor (e.g. EGFR type I or EGFR type II), EGFR deletion neopeptide, CA19-9, Muc-1, LeY, TF-, Tn- and sTn-antigen, TAG-72, PSMA, STEAP, Cora antigen, CD7, CD19 and CD20, CD22, CD25, Ig- α and Ig- β , A33 and G250, CD30, MCSP and gp100, CD44-v6, MT-MMPs, (MIS) receptor type II, carboanhydrase 9, F19-antigen, Ly6, desmoglein 4, PSCA, Wue-1, GD2 and GD3 as well as TM4SF-antigens (CD63, L6, CO-29, SAS) or the alpha and gamma subunit of the fetal type acetylcholinreceptor (AChR).
 8. The multifunctional polypeptide of claim 6 wherein said surface marker for an infected cell is selected from the group consisting of viral envelope antigens, e.g. of human retroviruses (HTLV I and II, HIV1 and 2) or human herpes viruses (HSV1 and 2, CMV, EBV), haemagglutinin e.g. of influenza virus A, B or C, glycoprotein E1 and E2 of rubella virus or RGP of rabies virus.
 9. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 8 which is a bi-specific antibody.
 10. The multifunctional polypeptide of claim 9 wherein said multifunctional polypeptide is selected from the group consisting of a synthetic, a chimeric and a humanized antibody.

11. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 10 which is a single-chain.
12. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 10 wherein said two domains are connected by a polypeptide linker.
13. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 12 wherein said first and/or second domain mimic or correspond to a V_H and V_L region of a natural antibody.
14. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 13 wherein at least one of said domains is a single-chain fragment of the variable region of the antibody.
15. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 14 wherein said domains are ranged in the order V_LNKG2D-V_HNKG2D-V_HTA-V_L-TA or V_L-TA-V_HTA-V_HNKG2D-V_LNKG2D, wherein the TA represents a target antigen.
16. The multifunctional polypeptide of claim 15 wherein said target antigen is selected from the group consisting of Lewis Y, Muc-1, erbB-2, -3 and -4, Ep-CAM, EGF-receptor (e.g. EGFR type I or EGFR type II), EGFR deletion neopeptide, CA19-9, Muc-1, LeY, TF-, Tr- and sTr-antigen, TAG-72, PSMA, STEAP, Cora antigen, CD7, CD19 and CD20, CD22, CD25, Ig- α and Ig- β , A33 and G250, CD30, MCSP and gp100, CD44-v6, MT-MMPs, (MIS) receptor type II, carboanhydrase 9, F19-antigen, Ly6, desmoglein 4, PSCA, Wue-1, GD2 and GD3 as well as TM4SF-antigens (CD63, L6, CO-29, SAS) or the alpha and gamma subunit of the fetal type acetylcholinreceptor (AChR).

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

60

17. The multifunctional polypeptide of any one of claims 12 to 16 wherein said polypeptide linker comprises a plurality of glycine, serine and/or alanine residues
18. The multifunctional polypeptide of any one of claims 12 to 17 wherein said polypeptide linker comprises a plurality of consecutive copies of an amino acid sequence.
19. The polypeptide of any one of claims 12 to 18 wherein said polypeptide linker comprises 1 to 5, 5 to 10 or 10 to 15 amino acid residues.
20. The multifunctional polypeptide of any one of claims 4 to 19 wherein said polypeptide linker comprises the amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.
21. The multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 20 comprising at least one further domain.
22. The multifunctional polypeptide of claim 21 wherein said further domain is linked by covalent or non-covalent bonds.
23. The multifunctional polypeptide of claims 21 or 22, wherein said at least one further domain comprises an effector molecule having a conformation suitable for biological activity, capable of sequestering an ion or selective binding to a solid support or to a preselected determinant.
24. The multifunctional polypeptide of any one of claims 21 to 23 wherein said further domain confers a co-stimulatory and/or a co-activating function.
25. The multifunctional polypeptide of claim 24 wherein said co-stimulatory function is mediated by a CD28-ligand or a CD137-ligand.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

61

26. The multifunctional polypeptide of claim 25 wherein said CD28-ligand or CD137-ligand is B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), an aptamer or an antibody or a functional fragment or a functional derivative thereof.
27. A polynucleotide which upon expression encodes a multifunctional polypeptide and/or functional parts of a multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 26.
28. A vector comprising the polynucleotide of claim 27.
29. A cell transfected with the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28.
30. A method for the preparation of the multifunctional polypeptide and/or parts of the multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 26 comprising culturing a cell of claim 29 and isolating said multifunctional polypeptide or functional parts thereof from the culture.
31. A composition comprising the polypeptide of any one of claims 1 to 26, the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28.
32. The composition of claim 31 further comprising a molecule conferring a co-stimulatory and/or co-activating function.
33. The composition of claim 31 wherein said co-stimulatory function is mediated by a CD28-ligand or a CD137-ligand.
34. The composition of claim 31 wherein said CD28-ligand or CD137-ligand is B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), an aptamer or an antibody or a functional fragment or a functional derivative thereof.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

62

35. The composition of any one of claims 31 to 34 which is a pharmaceutical composition optionally further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.
36. The composition of any one of claims 31 to 35 which is a diagnostic composition optionally further comprising suitable means for detections.
37. Use of the multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 26, the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of cancer, infections and/or autoimmune conditions, cancer, i.e. maligne (solide) tumors and hematopoietic cancer forms (leukemias and lymphomas), benign tumors such as benign hyperplasia of the prostate gland (BPH), autonomous adenomas of the thyroid gland or of other endocrine glands or adenomas of the colon; initial stages of the malignancies, infectious diseases, caused by viruses, bacteria, fungi, protozoa or helminths, auto immune diseases wherein the elimination of the subpopulation of immune cells is desired that causes the disease; prevention of transplant rejection or allergies.
38. The use of claim 37 wherein said infection is a viral, a bacterial or a fungal infection, wherein said cancer is a head and neck cancer, gastric cancer, oesophagus cancer, stomach cancer, colorectal cancer, coloncarcinoma, cancer of liver and intrahepatic bile ducts, pancreatic cancer, lung cancer, small cell lung cancer, cancer of the larynx, breast cancer, mamma carcinoma, malignant melanoma, multiple myeloma, sarcomas, rhabdomyosarcoma, lymphomas, follicular non-Hodgkin-lymphoma, leukemias, T- and B-cell-leukemias, Hodgkin-lymphom, B-cell lymphoma, ovarian cancer, cancer of the uterus, cervical cancer, prostate cancer, genital cancer, renal cancer, cancer of the testis, thyroid cancer, bladder cancer, plasmacytoma or brain cancer or wherein said autoimmune condition is ankylosing spondylitis, acute anterior uveitis, Goodpasture's syndrome, Multiple sclerosis, Graves' disease, Myasthenia gravis, Systemic lupus erythematosus, Insulin-dependent diabetes

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

63

mellitus, Rheumatoid arthritis, Pemphigus vulgaris, Hashimoto's thyroiditis or autoimmune Hepatitis.

39. Use of the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28 for the preparation of a composition for gene therapy.
40. A method for the treatment of cancer, infections or autoimmune conditions comprising introducing the polypeptide of any one of claims 1 to 26, the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28 or the composition of claim 35 into a mammal affected by said malignancies or diseases.
41. A method for delaying a pathological condition comprising introducing the polypeptide of any one of claims 1 to 26, the polynucleotide of claim 27 or the vector of claim 28 or the composition of claim 35 into a mammal affected by said pathological condition.
42. The method of claim 40 or 41 wherein said mammal is a human.
43. A kit comprising the multifunctional polypeptide of any one of claims 1 to 26, the polynucleotide of claim 27, the vector of claim 28, the cell of claim 29 or the composition of any one of claims 31 to 36.

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

1/41
 Fig. 1 Nucleotide- and amino acid sequence of soluble NKG2D

```

                                     -9      -1
                                     GAA TTC ACC
1   9      18      27      36      45      54
ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GGT ACA GGT GTA CAC
-----
M G W S C I I L F L V A T A T G V R

63      72      81      90      99      108
TCC TTA TTC AAC CAA GAA GTT CAA ATT CCC TTG ACC GAA AGT TAC TGT GGC CCA
-----
S L F N Q E V Q I F L T R S Y C G P

117      126      135      144      153      162
TGT CCT AAA AAC TGG ATA TGT TAC AAA AAT AAC TGC TAC CAA TTT TTT GAT GAG
-----
C P K N W I C Y K N N C Y Q F F D E

171      180      189      198      207      216
AGT AAA AAC TGG TAT GAG AGC CAG GCT TCT TGT ATG TCT CAA AAT CCC AGC CPT
-----
S E N W Y E S Q A S C M S Q N A S L

225      234      243      252      261      270
CTG AAA GTA TAC AGC AAA GAG GAC CAG GAT TTA CTT AAA CTG GTG AAG TCA TAT
-----
L K V Y S K E D Q D L L K L V K S Y

279      288      297      306      315      324
CAT TGG ATG GGA CTA GTA CAC AAT CCA ACA AAT GGA TCT TGG CAG TGG CAA GAT
-----
E W M G L V H I P F N G S W Q W E D

333      342      351      360      369      378
GGC TCC ATT CTC TCA CCC AAC CTA CTA ACA ATA ATT GAA ATG CAG AAG GGA GAC
-----
G S I L S P N L L T I I R M Q K G D

387      396      405      414      423      432
TGT GCA CTC TAT GCC TCG AGC TTT AAA GGC TAT ATA GAA AAC TGT TCA ACT DCA
-----
C A L Y A S S F K G Y I E N C S T P

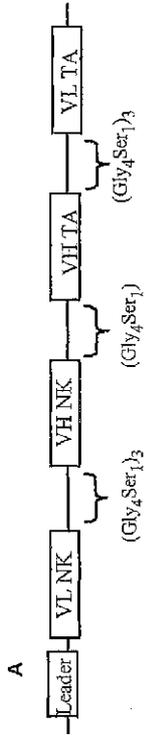
441      450      459      468      477      486
AAT ACA TAC TCC ATG CAA GGG ACT GCG TCC GGG CAT CAT CAC CAT CAT CAT
-----
N P Y I C M Q R T V S G H K H H H H

495
TGA GTC GAC 3'
-----
*
```

WO 01/71005

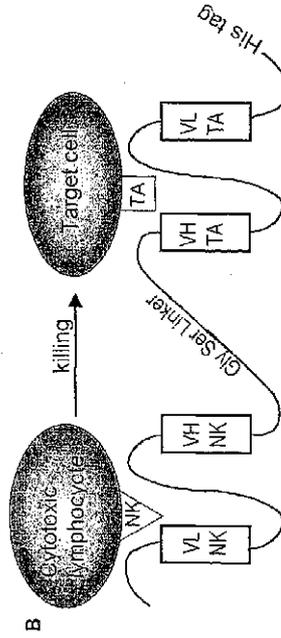
PCT/EP01/03414

NGK2D-directed bispecific single-chain antibody:
Molecular design and mode of function



NK = NKG2D-complex

TA = target antigen



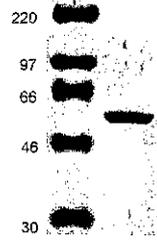
2/41
Fig. 2

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

3/41

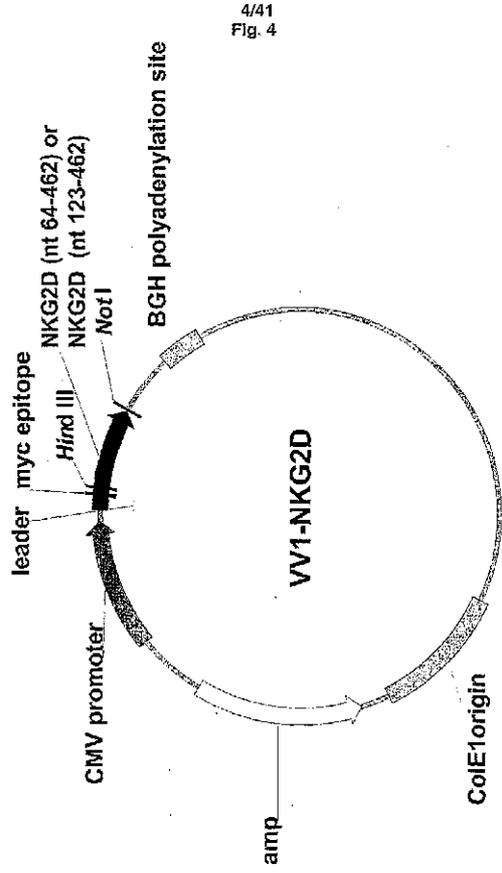
Fig. 3 SDS-PAGE of bispecific single-chain antibody anti-NKG2D (8R23) x anti-EpCAM (4-7)



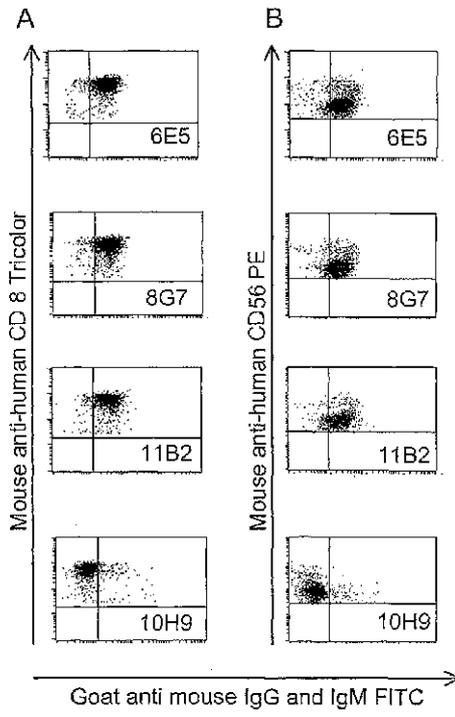
WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Construct for the expression of a secreted carboxy-terminal fragment of human NKG2-D for genetic immunization



5/41
Fig. 5

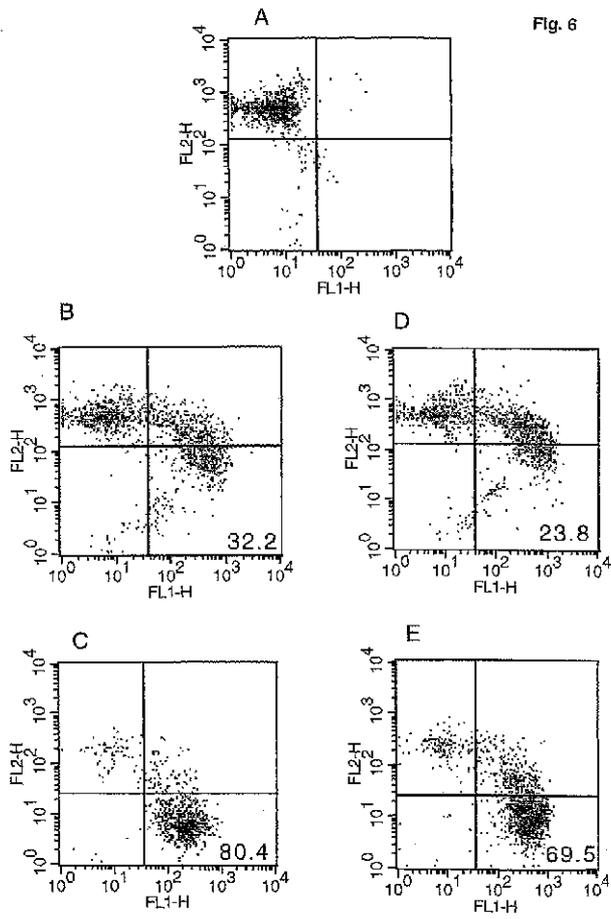


WO 01/71005

PCT/EP01/03414

6/41

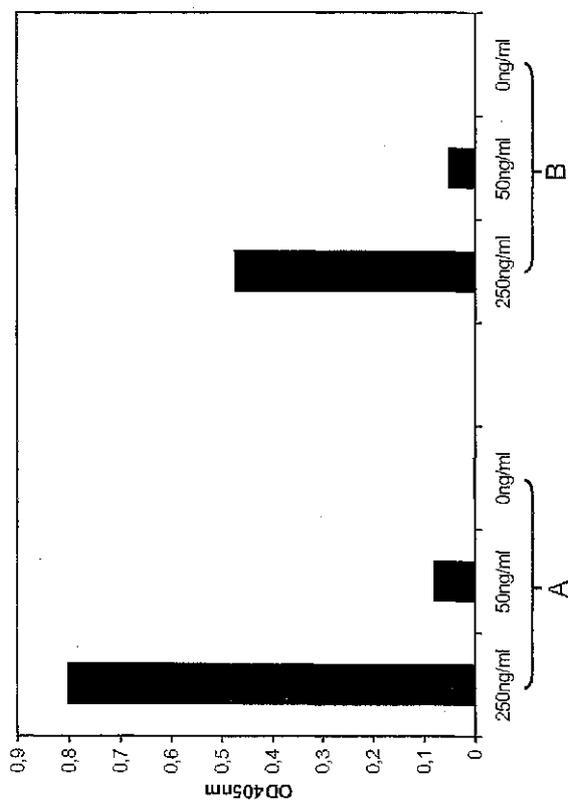
Fig. 6



WO 01/71005

PCT/EP01/03414

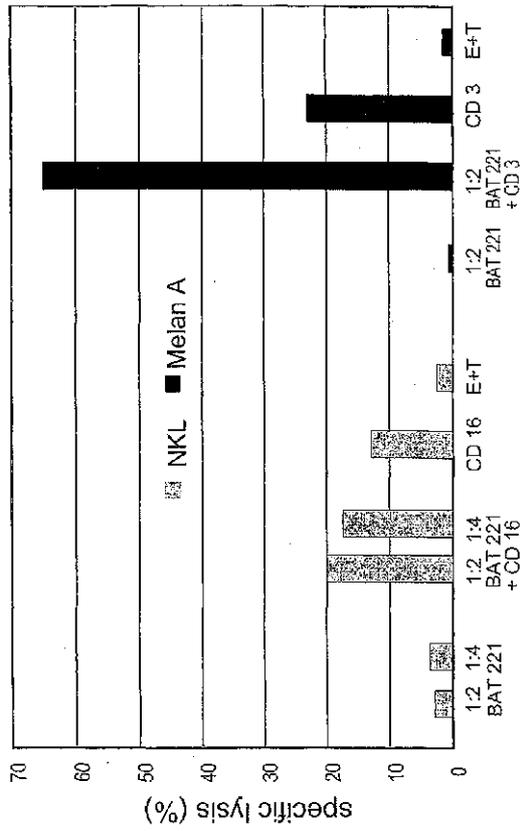
7/41
Fig. 7



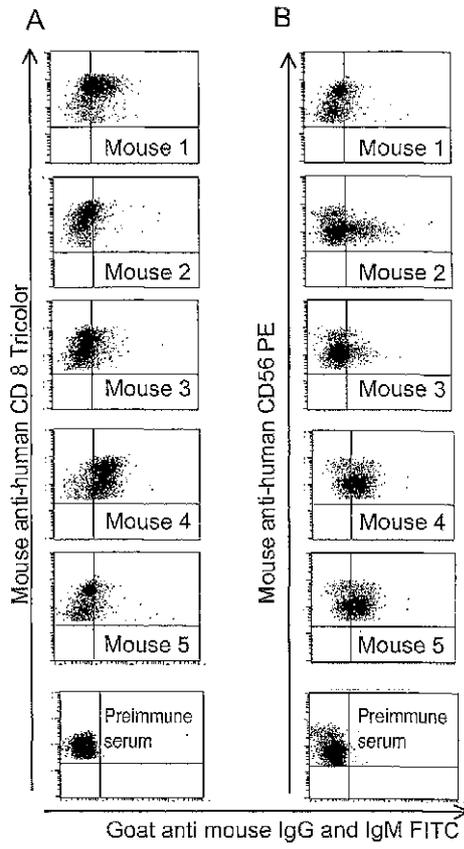
WO 01/71005

PCT/EP01/03414

8/41
Fig. 8



9/41
Fig. 9



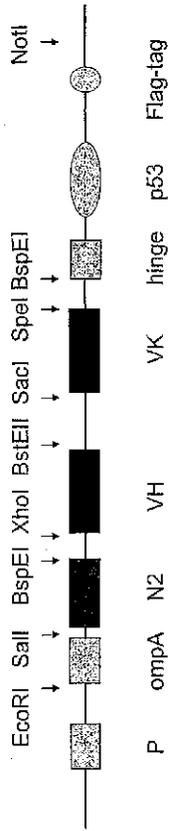
WO 01/71005

PCT/EP01/03414

10/41

Fig. 10

Phagemid design



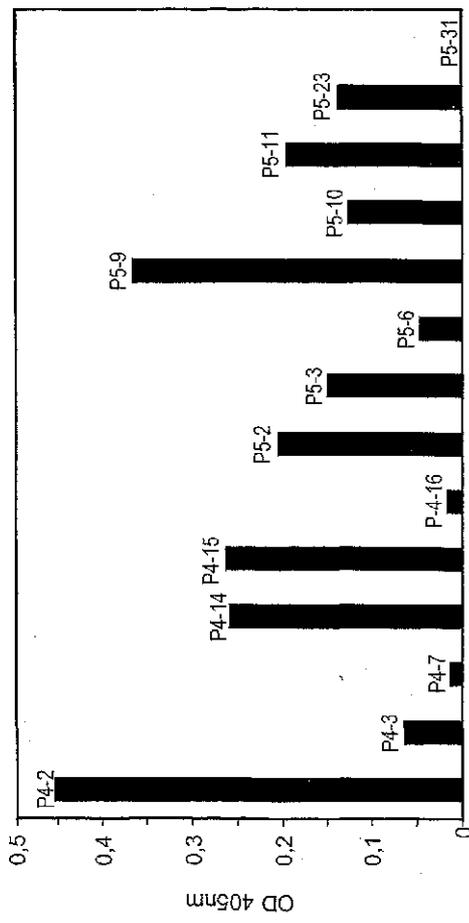
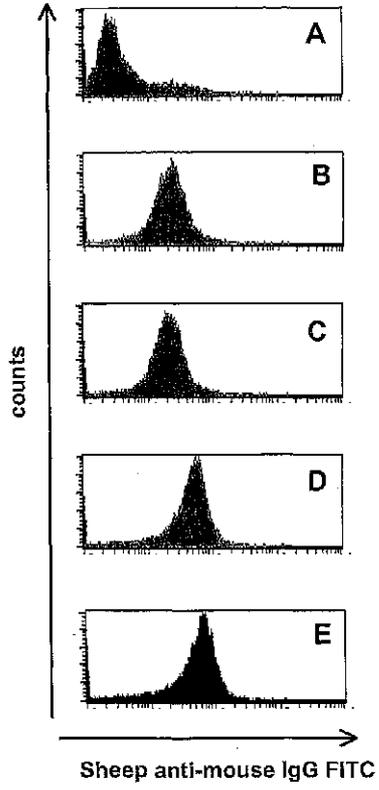


Fig. 11

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

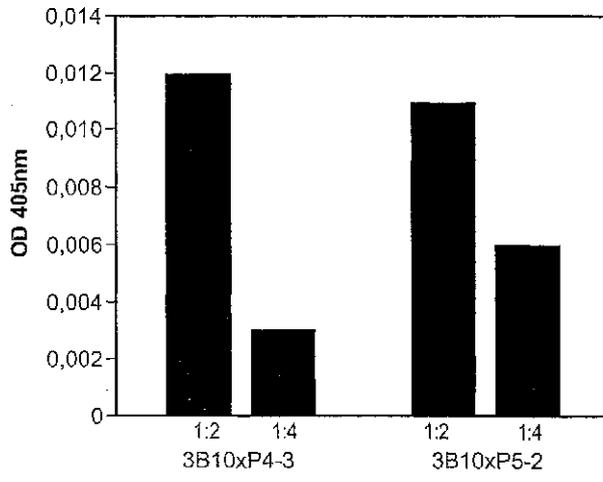
12/41
Fig. 12



WO 01/71005

PCT/EP01/03414

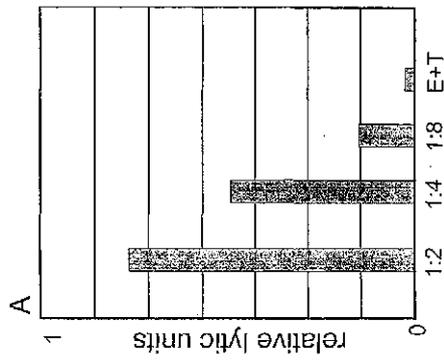
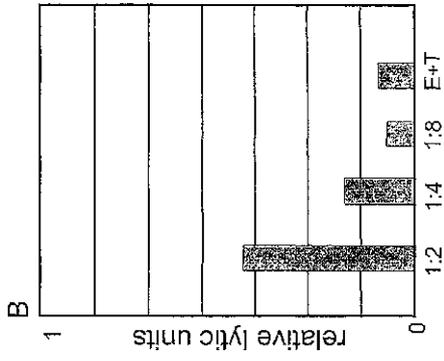
13/41
Fig. 13



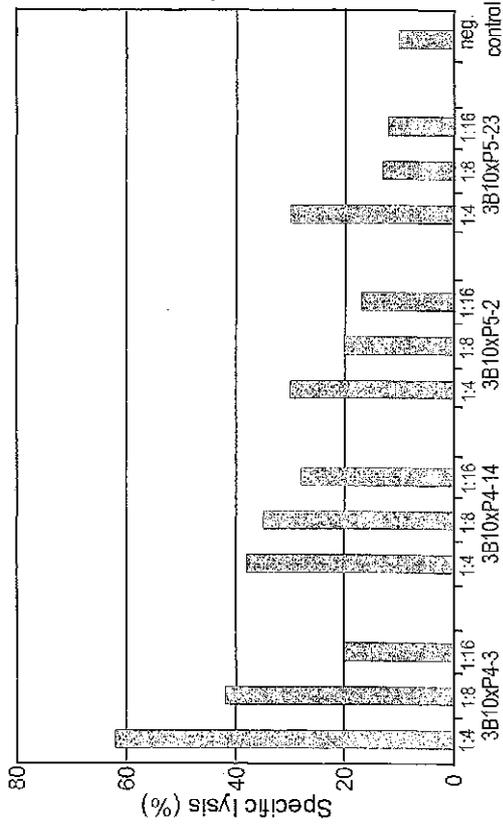
WO 01/71005

PCT/EP01/03414

14/41
Fig. 14



15/41
Fig. 15



WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16

16/41

SEQ ID	Description	Type of Sequence	Sequence
1	Human NKG2D extracellular domain	NN	ttatcaaccaagaagtcaaaticcctgaccgaaa gttactgtggccatgtcciaaaaactggatgtitac aaaaataactgctaccaattttgatgagagtaaaa actggatgagagccaggctctgtatgltcaaaat gccagcctctgaaagtatacagcaaaaggacc aggattactaaactggigaagtcatactggatg ggactagtacacattccaacaaatggatctggcag tgggaagatggctccattctcaccacaactactaa caataattgaaatgcagaaggagactgtccactc tatgcctcagacttaaggctataagaaaactgtc aactccaaatacatacatctgcatgcaaaaggactg gtccggcatcatcaccatcatcat
2	Human NKG2D extracellular domain	AA	LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYK NNCYQFFDESKNWIYESQASCMSQ ASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMG LVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIE MQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTY ICMQRTVSGHHHHH
3	Human NKG2D extracellular fragment 1 (nt 64-462)	AA	NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNN CYQFFDESKNWIYESQASCMSQNAS LLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLV HIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEIQ KGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYIC MQRTV
4	Human NKG2D extracellular fragment 2 (nt 123-462)	AA	WICYKNNCYQFFDESKNWIYESQASC MSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNL LTIEIQKGDICALYASSFKGYIENCST PNTYICMQRTV
5	Human DAP10 extracellular domain	AA	QTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCG SLSLP
6	Human DAP10 extracellular fragment	AA	QTTPGERSLPAFYPGTSGSC

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

17/41

7	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable light chain	NN	gacattcagetgaccagctccagcctccctatctg catctgtgggagaactgtccatcacatgtcag caagtggaatitocaaattattagcttgatcag cagaaacagggaaatctcctcaggtcctgctat aattgcaaaaaccttagcagatgggtgccatcaag gttcagtgccagtggtcaggaacaatattctc aagatcaacagcctgcagcctgaagatttgggagt tattactgtcaacatttggagtaactcgtggagctc ggtggaggaccaagctggagatcaaa
8	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable light chain	AA	DIQLTQSPASLSASVGETVTTTCRASG NIHNYLAWYQQKQKSPQVLVYNAK TLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSL QPEDFGSYVYQHFWSSTTWTFGG GTKLEIK
9	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable light chain CDR1	AA	RASGNIHNYLA
10	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable light chain CDR2	AA	NAKTLAD
11	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable light chain CDR3	AA	QHFWSSTWT
12	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable heavy chain	NN	cagglocaactgcagcagctcggacctgagctggt gagccctgggctcagtgaaactgtcctgcaagg ctctggctacacgtcaccagctactggatgaactg ggctcagcagagcctgagcaaggcctgagtgga ttggaaggattgactccttaogalagaaactcacta caicaaaaagltcaaggacaaggccatattgactgt agacaatccgccagcacagcctcatgcaacac agcagcctgacatctgaggactctgoggtctattact gtcaaaaaatgggtgattactccttgactactgggg ccaagggaaccaggtcaactctccica
13	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable heavy chain	AA	QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKAS GYFTSYWMNWVQQRPEQGLEWIG RIDPYSSETHYNQKFKDKAILTVDKSA STAYMQLSSLTSEDSAVVYCAKMGD YSPDYWGQGTITVTVSS

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

18/41

14	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable heavy chain CDR1	AA	GYTFTSYWMN
15	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable heavy chain CDR2	AA	RIDPYDSETHYNQKFKD
16	Anti-NKG2D hybridoma 11B2D10 variable heavy chain CDR3	AA	MGDYSFDY
17	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable light chain	NN	gacattcagctgaccagctccagcaatcctgctg catcaccaggggagaaggtcaaatgactgcagg gccagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccag cagaagccaggatctccccaaacccctggattat gccacatccaacctggctctggagtcctgctcgt tcagtgccagtggtctgggacctctactctcac aatcagcagctggaggctgaagatgctgccact attactgccagcaglggaatagtaaccgctcact tcggctgggaccaagctggagatcaaa
18	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable light chain	AA	DIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRAS SSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATS NLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISR EAEDAATYYCQWNSNPLTFGAGTK LEIK
19	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable light chain CDR1	AA	RASSSVSYMH
20	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable light chain CDR2	AA	ATSNLAS
21	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable light chain CDR3	AA	QWNSNPLT

WG 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

19/41

22	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable heavy chain	NN	cagggtcagctgcaggagtcaggacctggcctggt ggcgccctcacagagccctgtccatcaactgcaactgt ctctgggtttcattaccagctatgggtacactggat tggccagcctccaggaaaggctctggagtggtgg gagtaatatggcctggggaagcacaataataati oggtctcatgtccagactgagcatcagcaagac aaactcaagagccaagtttcttaaaaaigaatagtc tgcataatgatgacacagccatgtactactgtgcca gaggggggtacgagggggcggcctgggttggttac tggggccaaggaccagggtcaccgtctctca
23	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable heavy chain	AA	QVQLQESGPGLVAPSSQSLISITCTVSG FSLTSYGVHWIRQPPGKLEWLVGI WAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKS QVFLKMNSLQIDDTAMYYCARGGYE GAAWFGYWGQGTITVTVSS
24	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable heavy chain CDR1	AA	GFSLTSYGVH
25	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable heavy chain CDR2	AA	VIWAGGSTNYNSALMS
26	Anti-NKG2D hybridoma 6H7E7 variable heavy chain CDR3	AA	GGYEGAAWFGY
27	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable light chain	NN	Gacattcagctgaccagctccagcatcctgtct gtgagtcaggagaagagtcagtttctctgcagg gccagtcagaccattggcaacagcattcactggat cagcaaaagaacaaagggttccaggctctcata aagtatgctctgagctctctctggatccctccag gtttatggcagtgatcagggaacagatttactcta gcatacaagggtggagctgaagatattgcagatt atctctcaacaaagtaatacctggccactcaggt cggctctgggccaaggctggatcaaaa
28	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable light chain	AA	DIQLTQSPAILSVPGERVSVFSCRAS QTIGTSIHWYQQRITNGSPRLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSDFTLSINGVE SEDIADYYCQGSNTWPLTFGA GTKLEIK

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

20/41

29	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable light chain CDR1	AA	RASQTIGTSH
30	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable light chain CDR2	AA	YASESIS
31	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable light chain CDR3	AA	QQSNTWPLT
32	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable heavy chain	NN	caggcagcctgcagcagtcaggacotggcctagt gcagccctcacagagccctglccatcacctgcacag totctggfctcatfaactatctatgggtacaotgggt cgccagctccaggaaaggctcggagtgccggg agtgataggagggcggagcagcagactataatg cagcttcatalccagactgagcatcagcaaggac aatccaagcgccaaglitcittaaaatgagcagct gcaagctaatgacacagccatataattactgtccag aaagcccatgatggttactacggagtaatggacta ctgggccaaggaccacggcaccgtctcctca
33	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable heavy chain	AA	QVQLQSGPGLVQPSQSLITCTVS GFSLTIYGVHWRQSPGKGLEWLGVI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRQ VFFKMSSLQANDTAIYYCSRKSHDGY YGVMDYWGQGTITVTVSS
34	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable heavy chain CDR1	AA	GFSLTIYGVH
35	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable heavy chain CDR2	AA	VIWSGGSTDYNAAFIS
36	Anti-NKG2D hybridoma 8G7C10 variable heavy chain CDR3	AA	KSHDGYGVMDY

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

21/41

37	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable light chain	NN	gacaltcagctgaccocagctcaccagccatcctgtctg tgagtcaggagaagagtcagttctcctgcaggg ccagtcagagcattggcacaagcattcactgggtac agcaagaacaatggfctccaaggcttcataa agtagctctgagctctctcctgggatccctcagggt ttagtggcagtgatcaggacagatttactcttag catcaacgggtggagctgaagatattgcagattat tactgtcaacaagtaatacctggccactcagcttc ggctctggaccaggctggagatcaaa
38	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable light chain	AA	DIQLTQSPAILSVPGERVFSFCRAS QSIGTSIHWHYQRTNGSPFLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IK
39	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable light chain CDR1	AA	RASQSIGTSIH
40	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable light chain CDR2	AA	YASESIS
41	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable light chain CDR3	AA	QQSNTWPLT
42	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable heavy chain	NN	caggigcagctgcagcagtcaggacctggcctagt gcagccctcacagagcctgtccatcacctgcacag tctctggttctcattaactatctatggtgtacactgggt cgccagctccaggaagggtctggagtgctggg agtgatatggagtgccggaagcacagactataaig cagctttcatatccagactgagcatcagcaaggac aatccaagcgccaagtttcttaaaatgagcagct gcaagciaatgacacagccatatactgtccag aaagtccatgaggtactacggagtaaggacta ctggggccaagggaaccaaggtcacgctcctca
43	Anti-NKG2D hybridoma 6E5A7 variable heavy chain	AA	QVQLQQSGPGLVQPSQSLISITCTVS GFSLTIYGVHWVRQSPGKLEWLVGI WSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKRQ VFFKMSSLQANDTAYYCSPKSHDGY YGVMDYWGQGTITVTVSS

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

23/41

48	8G7C10x4-7 bispecific single chain Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRAS QTIGTSIHWYQORTNGSPRLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQQS GPGLVQPSQSLSTICTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTD YNAAFISRLSISKDNSKRQVFFKMSSL QANDTAIYYCSRKSHDGYGVM DYW GQGT TVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARPGASVKLSCKASGYFTNYGLS WVKQRPGQVLEWIGEVYFRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASMELRSL TSEDSAVYFCARRGSDTNYDWFYD VWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSELVMTQTPLSLPVSLGDAQSIS CRSSQSLVHSGNTYLHWY LQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHV PYTFGGG TKLEIKRT TSHHHHHHTS
49	6E5A7x4-7 bispecific single chain Fv		DIQLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRAS QSIGTSIHWYQORTNGSPRLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVE SEDIADYYCQQSNTWPLTFGAGTKLE IKGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQQS GPGLVQPSQSLSTICTVSGFSLTIYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTD YNAAFISRLSISKDNSKRQVFFKMSSL QANDTAIYYCSRKSHDGYGVM DYW GQGT TVTVSSGGGGSEVQLLEQSGA ELARPGASVKLSCKASGYFTNYGLS WVKQRPGQVLEWIGEVYFRIGNAYY NEKFKGKATLTADKSSSTASMELRSL TSEDSAVYFCARRGSDTNYDWFYD VWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSELVMTQTPLSLPVSLGDAQSIS CRSSQSLVHSGNTYLHWY LQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHV PYTFGGG TKLEIKRT TSHHHHHHTS
50	Human p53 tetramerizat on domain	NN	actagttccggaaccccgctgggtgacaccacca caccctcggaaaaccacaggatggagaatftcac ccttcagatccgtggcgtgagcgttcgagatgto cgagagctgaaaggccttggaaactcaagatgc ccaggctggaaaggagccaggggggagcgacta caaggatgacgatgacaagtaagcggccgc

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

24/41

51	Human p53 tetramerization domain	AA	TSSGTP LGDTHHTSGKPLDGEYFTLQ IRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGK EPGGSDYKDDDDK
52	P4-2 single chain Fv	NN	gagggtcagctgctcaggaggctcggaggccct ggtacagcctgggggtctctgagacictctgtgca acitctgggtcaccctcaactgattactacatgagctg ggctccagcactccaggaaggcactgagtggt tgggtitlltagaaacaaagctaatggttacacaac agagtlacagtgcatctgtgagggtcgggtccatc ctccagagataatcccaagcaicctctatctcaa atgaacacctgagagctgaggacagctccactta tactgtgcaagagataagacagactctgatgctg gggccaaggaccacggctcaccgtctctcagggtg gtggtgctctggcggcggctccgggtgggtggtg gtctgagctctgtgacacagctctccatctccctg actgtgacagcaggagagaaggctactatgagct gcaagtcagtcagagctctgtaaacagtggaatc aaaagaactacttgacctggtlaccagcagaaacc aggcagcctctaaactgtgatctactgggcatc cactaggaatctgggtccctgatctcagcagg cagtgatctggaacagattcactctcaccatcag cagtgtagcagctgaagacctggcagtttactgt cagaatgattatagttatccctcagctcgggtctgg gaccaagcttgagatacaaacglacgaclagtlccg ggcatcatcaccatcatcat
53	P4-2 single chain Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSLRLSCAT SGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWL GFRNKANGYTTTEYSASVKGRFTISR DNSQSILYLQMNTLRAEDSPTYYCAR DKTDFVWVGQGTTVTVSSGGGSG GGGSGGGSELVMTQSPSSLTVTAG EKVTMSCKSSQLLNSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFLTLSVVAEDLAVY YQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSS GHHHHHH

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 18 cont.

25/41

54	P4-3 single chain Fv	NN	<p>gaggcagctctcagctcggaggctggctggg cagcctggaggatccctgaaactcctctgagcc ctggattcgaatttagtagatactggagtggtg cggcaggctccagggaaggctagaatggattg gagaaallaatccagatagcagtagataaactai acgccaatctctaaaggataaattcatctccaga gacaacgocaaaaatacgcctglacctgcaaatga gcaaatgagatctgaggacacagoccttattact gtgcaagagggggttagtagctccctttagactact ggggccaagggaaccaggtcaccgtctcctcaggt gggtgtgtctggcggcggcctccgggtgggt ggttctgagctgctgacaccagctccatcctcct atctgcctctcgggagaagagtcagctcaactgt cgggcaagtcaggacattgtagtagcttaaacg gctcagcaggaaaccagatggaactatlaaacgcc tgaatcagccacatccagtttagctctggtgcccc aaaaggtcagtggcagtaggtctggctcagattatt ctcaccatcagcagccttgagctgaagatttga gactattactgctacaatagtagctccgtaaac gttcggagggggaccaagctgagatcaaacgt acgactgttccggcctatcaccatcatca</p>
55	P4-3 single chain Fv	AA	<p>EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIG EINPDSSTINYPSTLKDFFISRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARGAVV APFDYWGQGTITVTVSSGGGGGGGG GSGGGGSELVMTQSPSSLSASLGER VSLTCRASQDIGSSLNWLQEPDGTI KRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSD YSLTISSESEDFVYYCLQYASSPYT FGGGTKLEIKRTTSSGHHHHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

26/41

56	P4-14 single chain Fv	NN	<p>gagggtcagctgctcagctcggaggtggcctggig cagcctggaggatccctgaaactcctctgcagcc tcaggaticgatttagtagatactggatgattgggt coggcaggctccaggaaaggctagaatggatt gggaaataatccagatagcagtagataaacta tacgccatctctaaaggataaattcatctccaga gacaacgcaaaaatacgcctglacctgcaaatga gcaaatgagatctgaggacacagcccttact gtgcaagcagcagctacggtagtagctcagactgg tacttcgatgtctgggccaaggaccacggctcac cgtctcctcaggtgggtggtctggcgcgggcgg ctccgggtgggtggtctgagctccagatgacca gtctccagcctccctatctgcatctgggagaaact gtaccatcacatgtcagcaagtgaatatttac agtlattagcatggtatcagcagaacagggaaa atctctcagctcctggtatataatgcaaaaacctta gcagaagggtgcccataaaggctcagtagcagttg atcaggcacacagtttctctgaagatcaacagcct gcagcctgaagatttgggagttactgtcaacatc attatggactccgctcaggtcgggtctgggacca gottgagatcaaacgtagactagttccggcatca tcaccatcatcat</p>
57	P4-14 single chain Fv	AA	<p>EYQLLESGLVQPGGSLKLSQAAS GFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIG EINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARRSYG SSYDWYFDVWGGTTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSELQMTQSPASLSA SVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSS SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQH HYGTPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHH HHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

27/41

58	P4-15 single chain Fv	NN	<p>gaggtgcagctgctcgagcagctggagctgagct gatgaagcctgggacctcagfgaagatcctgca aggctactggctacacattcagiagctctggatag agtgggtaaagcagagccctggacatggcctga gtggattggagagattttacctggaagtgtagtact aactacaatgagaagttcaaggccaaggccacatt cactgcagatacatctccaacacagctacatgc aactcagcagcctgacatctgaggactctgctgct attactgtcaagaggattacgactgttgctctac tggggccaaggaccacgggtcaccgtctctcagg tgggtgtgtctggcggcggtctcgggtgggt ggfctgagctctgtgatgacacagctccatctccct gactgtgacagcaggagagaaaggtcactatgagc tgaagtcagctcagagctgtgtaaacagtggaat caaaagaactctgacctggtaaccagcagaaac cagggcagcctctaaactgtgatctactggcaat ccactagggaaatctgggtccctgatctcactcag gcagtgatctggaaacagattcactcaccatca gcagtgctcaggctgaagacctggcagtttactg tcagaatgattatagttatccgctcacgtctcgtctg ggaccaagcttgagatcaaacgtacgactagtcc ggcactcaaccatcat</p>
59	P4-15 single chain Fv	AA	<p>EVQLLEQSGAELMKPGASVKISCKAT GYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEI LPGGSTNYNEKFKGKATFTADTSSN TAYMQLSLLTSEDSAVYYCARGLR WFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGEK VTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLEIKRTSSGHH HHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

28/41

60	P5-2 single chain Fv	NN	<p>gaggtgcagctgctcgaggagctcggaggagcct gggcaacctggaggatccatgaaactcctgtgtt gcctcggatcacttcaglaactactggatgaaatg ggccgccagctccagagaagggtcggatggg ttctgaaattagattgaaatctaataattgcaaca cattatcggagctcgtgaaaggaggctcaccatct caagagatgattccaaaagtgtgtctacctgcaaa tgaacaactaagagctgaagacactggcaatit actgtaccaggctccctacggcttctgtatggacta ctggggccaaggaccacggctaccgtctcctcag gtgggtggtgtcgggggggggtcgggtgtgt gtggctgagctcgtctcaccagctccaaccac catggctgcactcoccggggagaagatcaactca cctgcagtcaccagctcaagtataagllccaattact gcattgglatcagcagaagccaggattctccctaa actctgattataggacatcaactctggctctggagt cccagctcgtctcagtcagtcagtcgggtctggacctct tactctcacaatggccaccatggaggctgaagat gttcccacttactctccagcagggtgtagatatac cgctcactgtcgggtcgggaccaagctlgagatca aacgtaagactgttcgggcatcaccatcaccatc at</p>
61	P5-2 single chain Fv	AA	<p>EVQLLEESGGGLVQPGGSMKLSVA SGFTFSNYWMNWVRSPEKGLEWV AEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISR DSKSSVYLQMNLR AEDTGIYYCTRL PYGFAMDYWGQGTITVTVSSGGGGS GGGGSGGGSELVLTQSPPTMAASP GEKITITCSASSISNLYHWYQQKP GFSPKLLIYRTSNLAGVPARFSGSG SGTSYSLTIGTMEAEVATYYCQQGS SIPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

29/41

62	P5-3 single chain Fv	NN	<p>gagggtcagctgctcaggagctcaggacctggcc ggggcgccctcacagagccctccatcactgca tctctgggtttcaitaaccagctatgggtacactg ggttccagccctccaggaagggtctggagtggc tgggagfaataatggctgggtggagcacaattata atcggctctcactcagactgagcactcagcaag acaactccaagagccaagtttcttaaaaalgaaca gtctgcaactgatgacacagccaactgactactg ccagagatcggtaactacgtgggtgatggactact ggggccaagggaaccaggtcaccgtctcctcagg gggtgggtctctggcgccggctcgggtgggt ggttctgagctcagatgaccagctccagcatcc ctgccaatggctataggagaaaaagtcaccatcag atgcataaccagcaactgatattgatgatgatgaa ctggtaccagcagaagccaggggaacctcctaag ctccttaftcagaaggcaatactctcctggagt ccatccgattcaccagcagtgctatgtaacagat titgttttacaatgaaaacatgctcagagaagatt gcagattactactggttcaaaagtataactgcccga cacgttgggggggggaccaagcttgagatcaaaa cgtacgactagttccgggcatcatcaccatcatcar</p>
63	P5-3 single chain Fv	AA	<p>EVQLLEESGPGLVAPSSQSLISITCTVS GFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLG VIWAGGSTNYNSALMSRLSISKDnsk SQVFLKMNSLQTDdTAMYCARDHY YVGAMDYWGQTTTVSSGGGGSSG GGGSGGGGSELQMTQSPASLSMAIG EKVTIRCTSTDIDDMNWFYQKPGE PPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSYG TDFVFTIENMLSEVDVADYYCLQSDNL PYTFGGGTKLEIKRTSSGHHHHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

30/41

64	P5-9 single chain Fv	NN	<p>gagggtcagctcgcagctcgtggagggtggcctgggtg cagcctggaggatccctgaaactctcctgtgcagcc icaggatcgaatttagtagatacggatgattgggt ccggcaggctccaggaaagggtcgaatggatt gggaaatlaatccagatagcagtagataaacta tacgccatctctaaaggataaaltcaltcaccaga gacaacgccaaaatacgcctgtacctgcaaatga gcaaatgagatctgaggacacagoccttact gtgcaagggaaactgggacggattgactactgg ggccaagggaccacgggtaccgtctcctcaggtgg gggtggtctggcggcggcgtcoggtgggtgggt ctgagctcgtgatgaccagactccatctccatgt atgcatcgtgggagagagagtcactatcactgca aggcagtcaggacaitaaagctattaaagctgg accagcagaaccatggaaatctcctaagacct gatctattatgcaacaagctggcagatgggtccc atcaagatcagtggcagtggtcgggcaagatta ttctctaacctcagcagcctggagctgacgatac agcaacttattactctcagcagatggtagagccc gtacacgttcggagggggaccaagcttgagatca aacgtacgactgttcgggcatcaccatcacc at</p>
65	P5-9 single chain Fv	AA	<p>EVQLLESQGGLVQPGGSLKLSCAAS GFDFSRYWMSWVRQAPGKLEWIG EINPDSSTINYTPSLKDKFIIRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARETGTE FDYWGGGTTVTVSQGGGSGGGGS GGGGSELVMTQTPSSMYASLGERVT ITCKASQDIKSYLSWYQKPKWPKPKT LIYYATSLADGVPSRFRFSGSGQDYS LTISSLESDDTATYYCLQHGESPYTF GGGKLEIKRTTSSGHHHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

31/41

66	P5-10 single chain Fv	NN	<p>gaggtgcagctgctcgagcagcctggagctgagct gtgagccaggggcctgcaagttgctgcaaa gcttcggctcaacattaaagactatatagcactg ggtaagcagagggcctgaacagggcctggagtg gattggatggattgactctgagaatggtaataciat atgaccgaagtccaggccaagggcagataaac agcagacacatctccaacacagcctactgcag ctcagcagcctgacatctgaggacactgcccctat tactgctctcttttactacggtagtagctacaggt acttcgatgctggggccaaggaccacggcacc gtctcctcaggctgggtggtctgggcccggcgt ccgggtgggtggtctgagctgtagtaccaga ciccatctctctatctgctctctgggagaagagtc agctcacttgctgggcaaglcaggacatggtagta gcttaactggctcagcaggaaccagatggaact ataaacctctgactacgccacatccagttagatt ctgggtccccaaaggctcagtgccagtaggctg ggtcagattatctcaccatcagcagcctgagct gaagattttgtagacttactgtctacaatalgctagt tctccglacacgttggagggggccaagctgga gatcaaacgtacgactgctccggcactatcacc atcact</p>
67	P5-10 single chain Fv	AA	<p>EVQLLEQSGAELVIRPGALVKLSCKAS GFNIKDYVMHWVKRPEQGLEWIG WIDPENNTIYDPKFQGKASITADTS SNTAYLQLSSLTSEDTAAYYCASFYY YGSSYRYFDVWGQTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGSELVMTQTPSSLS ASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQ QEPDGTIKRLIYATSSLDGVPKRFQ GSRSGSDYSLTSSLESEDFVDYYCL QYASSPYTFGGGTKLEIKRTTSSGHH HHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

32/41

68	P5-11 single chain Fv	NN	gaggtgcagctgctcgaggagctggaggagcct gggtcaacctggaggatccatgaaactctctgatt gctctggattcacttcaglaattcctggatgaactg ggctcgccagctcaccagagaaggggctgagtggg tgggtgaaattagattgaaatctaataatgcaaca cattatcggagctctgaaaggagggtcaccatcl caagagatgattcaaaaagtagtctacclacaaa tgaacaaactaagagltgaaagacclggcattlata ctgtacgaagggtgactctggggccaagggacc acggtaaccgtctcctcagggtgggtctctggcg gctggcgctcgggtggtgggtctgagctctggtat gacacagttccatctcctggtatgctagtagga cagaaggctactatgagctgcaagtcacagtcagag ccttttaaatgtagcaatcaaaagaactctgacc tggtaaccagcagaaccagggcagcctctaaac tgttatctactgggca'ccactaggaaatctggggl cctgatcgtccacaggcagtgatctggaacag attcaactcaccatcagcagtgctgaggctgaag accctggcagttattactgcaaatgattatagttac cgtcaccgttgggtgctgggaccaagcttgagatca aacgtacgactagttcgggcacatcaccatc at
69	P5-11 single chain Fv	AA	EVQLLEESGGGLVQPGGSMKLSCIA SGFTFSNSWMNWVRQSPKLEWV GEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISR DDSKSSVYLQMNLRVEDTGIIYCTK VDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSELVMTQSPSSLAMSVGQKVT MSCKSSQSLNNSNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPRFTGS GSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQND YSYPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHH HH

WO 01/71005

PC/T/EP01/03414

Fig. 16 cont.

33/41

70	P5-23 single chain Fv	NN	<p>gaggtgcagctgctcagctcggagctggcctggtg cagcctggaggatocctgaaectcctctgcagcc tcaggattcgattfiagtagatactggatgagttgggt ccggcaggctccaggaaaagggtgagaatggatt ggagaaattaatccagatagcagtaagataaacta tacgccatctctaaaggatagattcatcaccaga gacaaogccaaaatcagctgtacctgcaaatga gcaaagtigaggtctgaggacacagcccttfaiaact gtgcaagattggggcaatgggggactttgactact ggggccaagggaccacggctaccgtctcctcagggt gggtgtggtctcggggcggcggctccggtggtggt ggtctgagctcgtgatgacacagctccatccctcct gactgtgacagcaggagagagggtcactatgagc tgcaagtcacagtcagagctgttaaacagtggaat caaaagaactactgacctggtaccagcagaaac cagggcagcctctaaactgtgatctactgggcat ccactagggaaatcgggtccctgatcgtccacag gcagtgatctggaacagatitcactcaccatca gcagtgtcaggctgaagacctggcagittatfactg tcagaatgattatgattatcctcctcagttcgggtcgtg gaccaagcttgatcaaacgtaogactagttccg ggcatcaccatcatcat</p>
71	P5-23 single chain Fv	AA	<p>EVQLLESQGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFDFSRVWMSWVRQAPGKLEWIG EINPDSSTINYPSTLDRFIIRDNAKN TLYLQMSKVRSEDTALYYCARLGGW GYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGER VTMSCKSSQSLLSGNQKNTLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFT GSGSGTDFLTISIVQAEFLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHH HHHH</p>

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

34/41

72	3B10xP4-3 bispecific single chain Fv	NN	<pre> gatatgtgatgacgcaggctgatttccaatccag icaactcttggaaacatcagcttccatctctgcaggctc aglaagagctcctacatagtaatggcaicactaattt gtatgggtatctgcagaagccaggccagctcctca gctcctgattatcagatgtccaacctgctcaggga gtccacagcaggtcagtagcagctggctcagganc tgattcacactgagaalcaagcagagtgaggctg aggatgagggtttattactgtctcaaaaictagaa cttctcggacgttccgttgaggccaagctcggga aatcaagggtggtggttctggcggcggcggctc cgg'gg'gg'gg'gtctcaggtgcaactgcaagcagtc aggccctgagctgaaagccctggagagcagtc aagatctctgcaaggcttctggataacctcaaaa actatgggaatgaactgggtgaagcaggctccagg aaagggttcaagtggtggctggatlaaacacct aacctgagagcccaacatattggtgatgactcaag ggacggttgcctctcttggaaacctctgcccagc tgctatttgcagatcaacaacciaaaaatgagga caccgctacalattctgtgcaagttcaacctccctg actctggggccaaggaccacggcaccctctcc tccggagggtggtggtatccaggtgagctgctcga gtctggagggtgctggtgagcctggagatccct gaaactctctgtgcagcctcggattgatittagia gatactggtgattgggtccggcaggctccaggg aaagggtggaatggattggagaatlaaaccaga tagcagtagataaactatacgcctctctaaaggga taaattcaicctcagagacaacgccaazaaia cgtctacctgcaaatgagcaaatgagatctgag gacacagoccttattactgtgcaagggggcggla gtagctccctttagactcaggggccaaggaccac ggcaccgtctctcaggtggtggtctgctggcgc ggcggctccgggtggtggtctgagctgcicagta cccagctccactctctatctgctctctgggagaa agagtcagctcactgtggcagtcaggacait ggtagtagcttaactgctcagcaggaaccagat ggaaactataaacctgatctacgccacatccagt ttagattctggttcccaaaagggtcagtggaagta ggctgggtcagattattctctcaccatcagcagcct gagctgaagattttagactattactctcaaatat gctagttccgtacaggtcggaggggggacc.aa gctlgagatcaaacgtacgactagttccggcactca tcaccatcatcat </pre>
----	---	----	---

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

35/41

73	3B10xP4-3 bispecific single chain Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KLLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVPDFRFSSTGGTDFL RISRVEAEDVGVYCAQNLLELPRTFG GGTKLEIKGGGGGGGGGGGGSSQ VQLQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWKQAPGKGFKWMGWII NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKNEDTATYFCARFTSPD YWGQGTIVTVSSGGGGSEVQLLES GGGLVOPGGSLKLSCAASGFDFSRV WMSWVROAPGKGLEWIGEINPDSST INYPKSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARGAVVAPFDYWG QGTIVTVSSGGGGGGGGGGGGSS ELVMTQSPSSLASLGERVSLTCRAS QDIGSSLNWLQEPDGTIKRLIYATSS LDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISLE SEDFVDYYCLQYASSPYTFGGGKTL EIKRTTSSGHHHHHH
----	---	----	---

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

36/41

74	3B10xP4-14 bispecific single chain Fv	NN	<pre> gaiaattgtgatgacgcaggctgatttccaatccag tcactcttggaaacatcagctccatctcgcaggctc agfaagagctcctacatagtaatggcaatcaactattt gtattggatctgcagaagocaggccagctcctca gtcctgattatcagatgtcacaacctgctcaggga gtccagacagggticagcagtggtgicaggaaac tgattcacactgagaatcagcagagtgaggcag aggatgtgggtglttactgtgctcaaaatcagaa ctcctcggacgttcggaggcaccacaagctgga aatcaaaaggtgggtggtctcggcgccggcctc cgggtgggtggtctcagggtgcaactgcagctc agggcctgagctgaaagcctggagagacagtc aagatcctcgaaggctctggatccctcaca actatggaaatgaactggggaagcaggctccagg aaagggttcaagtggtggatgggataaaacacct acactggagagccaacataiggtgatctcaag ggacggttgctctcttggaaacctcgcagcaac tgctatttgcagatcaacaacctcaaaaatgagga cacggctacatattctgtgcaagatccctccctg actactggggccaaggaccacggctaccgctcc tccggagggtggatccgaggtgcaagctgctga gtctggagggtgctgctgagcctggaggatccct gaaactcctctgcaagcctcaggattcatttagta gatactggaatgagtggtggcggcaggctccagg aaagggtagaaatggatgggaaatcaatccaga tagcagtaacgataaactatacgcctctcaaggga faaattcatctccagagacaacgccaataata cgtctgacctgcaaatgagcaaatgagatctgag gcacacagccctttactgtgcaagcagcagctac ggfagtagctacgactgtactcagatgtctggggcc aagggaacacggctaccgtctcctcagggtgggt ggltcggcggcggcggctccgggtgggtgtctg agctccagatgaccagctccagcctccctatctg catctgtgggagaaactgacacatcagatctgag caagtggaaatattacagttatttagcaggtatcag cagaacaggggaaaatctcctcagctcctggtctat aatgcaaaaacctagcagaagggtgccaacaag gtcagtagcagtggtcaggcacacagtttctctg aagaicacagcctgcaagcctgaagatttgggagt tattactgcaacatattatgtactccgctcagctc gggtctgggaccaagcttggatcaaacgacagac tagtccgggcatcatcac catcatcat </pre>
----	--	----	--

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

37/41

75	3B10xP4-14 bispecific single chain Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KLLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVPDFRFSSTGGTDFTL RISRVEAEDVGVYCAQNLELPRTFG GGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSSQ VQLQSQGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWKQAPCKGFKWMGW! NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKNEDTATYFCARFTSPD YWGQGTITVSSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRV WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST INYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARRSYGSSYDWYF DVWGQGTITVSSGGGSGGGGSS GGGGSELQMTQSPASLSASVGETVT ITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQL LVYNAKTLAEGVPSRFSSSGGTQFS LKINSLQPEDFGSYCCQHHYGTPLTF GAGTKLEIKRTTSSGHHHHH
----	--	----	---

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

38/41

76	3B10xP5-2 bispecific single chain Fv	NM	gatattgtgatgacgcaggctgcafttccaatccag tactcttggaaatcagcttccatctccgaggctc agtaagagctcctacatagtaatggcaicactlalt gtattggtatctgcagaagccaggccagctctcca gtctctgatttaccagatgccaaacctgctcaggga gtcccagacaggttcagtagcagtggtcagggaac tgatttcaactgagaatcagcagagtgaggctg aggatgigggtgltitactcigtctcaaaatctagaa cttctcgggacgttcgggtggagcccaagctggga aatcaaaagggtgggtggtctgctggcggcggctc cgggtgggtggtctcagggtgcaactgcagcagtc agggctgagctgaaagaagcctggagagacagtc aagatctctgcaaggctctgggtataacctcaca actatggaaatgaactgggtgaaagcaggtccagg aaagggttcaagtggtgggtggtggtggtggtggt acactggagagccaacatattggtgatctcaag ggcgggttgcctctcttggaaacctctgcccagca tgcctatttgcagatcaacaacctcaaaaatgagga caaggctacatattctgtgcaagatcaccctccctg actctggggccaaggaccacgggtaccctctcc tccggagggtggatccgaggtgcagctgctcga ggagctggagaggctgtggaacctggaggat ccaatgaactctctgtgtgctctgggtcacttca gtaactactggatgaactgggtccgagctccag agaagggtggtgagtggtgctgaaatagattga aatctaaataattatgcaacacatattggggatctgt gaaaggagggttaccatcacaagagatgattcca aaagtagtctaccctgcaaatgaacaactaaaga gctgaagacactggcatttactgtaccaggctcc cctacggcttctctatggaactctggggccaaggga ccacggtaaccctctcagggtgggtggtggtctgg cggcggcggctcgggtggtggtggtctgagctctg gtcaccagctcacaaccacatgggtgcatctcc cggggagaagatcactatcactcagctgccagct caagataaagtccaatctctgcttgggtcagcag aagccaggatctcccctaaactctgattatagga catccaatctggctctggagtcacaagctgctcag ggcagtggtctggaccttactctcacaatlg gcacctggaggctgaagatgttgcactactact gcccagggtagtataaccctcaagttcgggtg ctgggaccaagctgagataaacctgaagctagtt ccgggcatcaccatcat
----	---	----	--

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

39/41

77	3B10xP5-2 bispecific single chain Fv	AA	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSS KLLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLASGVPDFRFSSSGSDFTL RISRVEAEDVGVYCAQNLLELPRTFG GGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGQ VQLQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWKQAPCKGFKWMGW NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKNETATYFCARFTSPD YWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLLEES GGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNY WMNWRQSFPEKGLEWVAEIRLKSN NYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVY LQMNNLRAEDTGIIYCTRLPYGFAM DYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSG GGGGSELVLTQSPPTMAASPFGEKTI TCSASSISSNYLHWYQQKPGFSPKL LIYRTSNLASGVPARFSGSGSSTYS LTIGTMEAEDVATYYCQQGSSPLTF GAGTKLEIKRTTSSGHHH HHH
----	---	----	--

WO 01/71005

PC/T/EP01/03414

Fig. 16 cont.

40/41

78	3B10xP5-23 bispecific single chain Fv	NN	gatattgatgacgcaggctgcatcctccaatccag tcactctggacaatcagctccatcctcagggct agfaagagctcctcatagtaatggcaicactiatt gtattgfatctcagaagccaggccagctcctca gcctcgtattatcagatgtccaacctcagcagga gtccacagcaggctcagtagcagtggtcaggaac tgattcacactgagaatcagcagaglyggagctg aggatgggggtttattactgtcctcaaatctagaa cttctcggagctcggggaggccaccaagctgga aatcaagggtgggtgttctcggcggcggctc cgggtgggtgtctcaggtcgaactgcagcagtc agggcctgagctgaagaagcctggagagcagtc aagatctcctcaaggctctcgggtatcctcaca actatggaaatgaactgggtgaagcaggtccagg aaagggttcaagtggatgggtggaataaacct aacctggagagccaacalatgtgatgactcaag ggaaggttgctctcttggaacctctcagcagc tgcciatggcagatcaaacctcaaaaatggagg cacggctacalattctgtcaagatcaacctccctg actactgggccaaggaccaggtcaccgtctcc tcggaggtgtggtatccgaggtgcagctgctga gtctggaggtggcctgtcagcctggaggatccct gaaactctctgtgcagcctcaggattcttagla gatactggatgagttgggtccggcaggtccagg aaagggtatgaatggatgggaaatcaatccaga tagcagtagataaactatacgcactctcaaggga tagattcatcctcagagacaacgcaaaaata cgtgtaccctgcaaatgagcaaatgagggtctgag gacacagcccttattactgtcaagatggggcaat gggggtacttgactactgggccaagggaaccag gtcaccgtctcctcaggtgtgtgtctcggcgg gctcctcgggtgtgtgtctcagctctgatgac acagctccatctccctgactgtgacagcaggaga gagggtcactatgagctcaagctcagagctct gtaaacagtggaatcaaaagaactcctgacct ggtaccagcagaaccagggtcctcctaaact gtgatcactgggcatcactagggaatctgggtc ctgatcctcaccagcagtgatctggaacagat ttactctcaccctcagcagtgtaggctgaagac ctggcagtttactgtcagaatgattatgatactc tcaggtcgtgtcgggccaagcttgagatcaaac gtacgactagtcgggcatcaccatcatcat
----	--	----	--

WO 01/71005

PCT/EP01/03414

Fig. 16 cont.

41/41

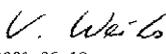
79	3B10xP5-23 bispecific single chain Fv	AA	DIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSS KSLLSHNSGITLYWYLQKPGQSPQLL IYQMSNLAGVDPDRFSSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGVYYCAQNELPRTFG GGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSSQ VQLQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTNYGMNWWKQAPGKGFKWMGWI NTYTGEPTYGDDFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKNEATATYFCARFTSPD YWGQGTITVTVSSGGGSGSEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGDFDSRY WMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSST INYPSTKDRFIIRDNAKNTLYLQMS KVRSEDTALYYCARLGQWGYFDYW GQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGG GSELVMTQSPSSLTVTAGERVTMSC KSSQSLLSGNQKNYLTWYQKPG QPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGS GTDFTLTSSVQAEDLAVYYCQNDYS YPLTFGAGTKLEIKRTTSSGHHHHHH
80	NKG2D short-f		atcaagctgtggalatgtacaaaaataact
81	NKG2D-f		atcaagctgaaccaagaagttcaaatcc
82	NKG2D- stop-r		cgoggtggcgccgcttacacagtcctttgcatg
83	5'VLB5RRV		agg tgt aca ctc oga tat cca got gac cca gtc tcc a
84	3'VLGS15		gga gcc gcc gcc gcc aga acc acc acc acc tt gat ctc gag ctt ggt ccc
85	5'VHGS15		ggc ggc ggc ggc tcc ggt ggt ggt tct cag gt(gc) (ac)a(ag) ctg cag (gc)ag tc(at) gg
86	3'VHBspEI		aat ccg gag gag acg gtg acc gtg gtc cct tgg ccc cag
87	NKG2D- forward		agggtacactccttatcaaccaagaagttcaaat cc
88	NKG2D- reverse		tcatcgggacacagtcctttgcatgcagatg

PCT/EP01/03414

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 11 B2/D10	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2496
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2001-03-23 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2001-06-12

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

PCT/EP01/03414

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: MICRONET AG Am Klopferwitz 19 Address: 82152 Martinsried	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2496 Date of the deposit or the transfer: 2001-03-23
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2001-05-14 ² . On that date, the said microorganism was (X) viable () no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ³	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2001-05-12

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

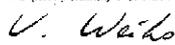
PCT/EP01/03414

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: BG7/C 10	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM ACC2497
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2001-03-23 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weiz</i> Date: 2001-06-12

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, each date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

Form DSMZ-BP/A (sole page) C196

PCT/EP01/03414

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Micromet AG Am Klopferspitz 19 Address: 82152 Martinsried		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM ACC2497 Date of the deposit or the transfer: 2001-02-23	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2001-05-14 ¹ . On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED²			
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Maschenoder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2001-06-12	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the result of the test were negative.

PCT/EP01/03414

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: GES/A7	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM ACC2498
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2001-03-23 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Marchweg-Weg 16 D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weiko</i> Date: 2001-06-12

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

Form DSMZ-BP4 (sole page) 0196

PCT/EP01/03414

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Micromet AG Am Klopferspitz 19 Address: 62152 Martinsried		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2498 Date of the deposit or the transfer: 2001-03-23	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on: 2001-05-14 ¹ . On that date, the said microorganism was: (X) ² viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MICROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weis</i> Date: 2001-06-12	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

PCT/EP01/03414

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

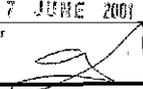
(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>19</u> , line <u>22-28</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depository institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depository institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b 38124 BRAUNSCHWEIG DE	
Date of deposit 23-03-2001 (23 March 2001)	Accession Number DSM ACC2498
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicants make use of Rule 28(4) EPC.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EP	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application.	<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on <u>27 JUNE 2001</u>
Authorized officer	Authorized officer 

PCT/EP01/03414

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>18</u> , line <u>22-28</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depository institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depository institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b 38124 BRAUNSCHWEIG DE	
Date of deposit <u>23-03-2001 (23 March 2001)</u>	Accession Number DSM ACC2497
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/> Applicants make use of Rule 28(4) EPC.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) EP	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
<input type="checkbox"/> For receiving Office use only This sheet was received with the international application Authorized officer	<input checked="" type="checkbox"/> For International Bureau use only This sheet was received by the International Bureau on: 27 JUNE 2001 Authorized officer 

PCT/EP01/03414

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>19</u> , line <u>22-28</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b 38124 BRAUNSCHWEIG DE	
Date of deposit <u>23.03.2004 (23 March 2004)</u>	Accession Number <u>DSM ACC2496</u>
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicants make use of Rule 28(4) EPC.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EP	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
<input type="checkbox"/> For receiving Office use only This sheet was received with the international application	<input checked="" type="checkbox"/> For International Bureau use only This sheet was received by the International Bureau on: <u>27.03.2004</u>
Authorized officer	Authorized officer 

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/71005 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/85, 5/10, A61K 39/395, 47/46, 38/17, 48/00, A61P 31/04, 35/00, 37/00, 39/1N, 39/53, C12Q 1/68 // C07K 14/705, 16/28, 16/46, 14/47
- (74) Agent: VOSSHUS & PARTNER, Siedenstrasse 4, 81675 München (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AJ, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MH, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); GAPI patent (BF, DJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/03414
- (22) International Filing Date: 26 March 2001 (26.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00109467.4 24 March 2000 (24.03.2000) EP
- (71) Applicant and
(72) Inventor: KUFER, Peter [DE/DE]; Am Kapellbäcker 13, 85368 Moosburg (DE).
- (73) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): RIETHMÜLLER, Gert [DE/DE]; Finauerstrasse 12, 80805 München (DE); LUTTERBÜSE, Ralf [DE/DE]; Taimerhofstrasse 8, 81927 München (DE); BORSCHERT, Katrin [DE/DE]; Zaubstrasse 14, 81677 München (DE); KINSCHLE, Roman [DE/DE]; Kurt-Eisner-Strasse 25, 81735 München (DE); MAYER, Monika [DE/DE]; Am Brühl 17, 87724 Ottobrunn (DE); HOPFMEISTER, Robert [DE/DE]; Jakob-Huber-Strasse 6, 82110 Germering (DE).
- Published:
— with international search report
— with two indications in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description
- (86) Date of publication of the international search report: 3 January 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide to Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/71005 A3

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL POLYPEPTIDES COMPRISING A BINDING SITE TO AN EPITOPE OF THE NKGD2 RECEPTOR COMPLEX

(57) Abstract: The present invention relates to a multifunctional polypeptide comprising a first domain comprising a binding site specifically recognizing an extracellular epitope of the NKGD2 receptor complex and a second domain having receptor or ligand function. Furthermore, the present invention relates to polynucleotides encoding the multifunctional polypeptide, to vectors comprising said polypeptides and to cells comprising said polynucleotides or said vectors. The invention also relates to compositions comprising at least one of the above recited molecules, alone or in combination, as well as to specific medical uses of the multifunctional polypeptide of the invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/03414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/46, C07K14/47 According to International Patent Classification (IPC), or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched, classification system followed by class/section symbols: Documentation searched other than in the field of classification to the extent that such documents are included in the fields searched Technical fields have been searched during the international search (name of field here and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category: Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No
A M. MACK ET AL.: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 92, no. 15, 18 July 1995 (1995-07-18), pages 7021-7025, XP000566333 Washington, DC, USA cited in the application abstract figure 1 --- -/--	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> In cited documents are listed in the continuation of box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex	
* Special categories of cited documents	
"A" document defining the general idea of the invention not considered to be of basic relevance "E" patent document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of an earlier edition or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but after the priority date claimed	"1" base document passages and the international search date of priority date and not in conflict with the prior art (as 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 considered with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search:	Date of mailing of the international search report
17 September 2001	
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P. O. Box 5516, Palisade 2 NL 2260 HV Rijswijk Tel: +31-70 340-2040, Telex: 31 051 epo nl, Fax: +31-70 340-0510	Authorized officer: Nooij, F

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/03414

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant abstract	Relevant to claim no.
A	S. BAUER ET AL.: "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MIC6." SCIENCE, vol. 285, no. 5428, 30 July 1999 (1999-07-30), pages 727-729, XP002177592 Washington, DC, USA cited in the application the whole document -----	1-43

1

Form PCT/ISA/210 (Continuation of Form PCT/ISA/210)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/03414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9217198	A	15-10-1992	EP 0585257 A1 09-03-1994
			JP 6506358 T 21-07-1994
			WO 9217198 A1 15-10-1992
			US 6262244 B1 17-07-2001
WO 9925818	A	27-05-1999	AU 1873199 A 07-06-1999
			WO 9925818 A1 27-05-1999
			EP 1032660 A1 06-09-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/14	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 33/02	A 6 1 P 33/10	
A 6 1 P 33/10	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 クーファ, ペーター

ドイツ連邦共和国 8 5 3 6 8 モーズブルグ アム カペレンアッカー 1 3

(72) 発明者 リースミュラー, ゲルト

ドイツ連邦共和国 8 0 8 0 5 ミュンヘン, フィナオエルシュトラッセ 1 2

(72) 発明者 ルッテルビューセ, ラルフ

ドイツ連邦共和国 8 1 9 2 7 ミュンヘン, タイメルホフシュトラッセ 8

(72) 発明者 ボルシェルト, カトリン

ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 7 ミュンヘン, ツァウブツェルシュトラッセ 1 4

(72) 発明者 キッシェル, ロマン

ドイツ連邦共和国 8 1 7 3 5 ミュンヘン, クルト - アインスナー - シュトラッセ 2 5

(72)発明者 マイア, モニカ

ドイツ連邦共和国 8 7 7 2 4 オットボイレン, アム ブリュール 1 7

(72)発明者 ホフマイスター, ロベルト

ドイツ連邦共和国 8 2 1 1 0 ゲルメリング, ヤコブ - フーバ - シュトラーセ 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA36 BA54 BA63 CA04 CA07 CA10 DA02 DA05 DA06

DA11 DA12 EA02 EA04 GA11

4B064 AG01 AG20 AG26 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24

DA01 DA05

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA20

BA21 BA22 BA23 CA17 CA59 MA16 MA21 MA28 MA52 MA55

MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA012 ZA022

ZA332 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB052 ZB082 ZB132 ZB152

ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZB382 ZB392 ZC062 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA33

ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26

ZB27 ZB33 ZB35 ZB38 ZB39 ZC06 ZC35

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA01 ZA02 ZA33 ZA75 ZA81

ZA89 ZA94 ZA96 ZB05 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33

ZB35 ZB38 ZB39 ZC06 ZC35

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA50 DA75 DA86

EA22 EA28 EA29 FA72 FA74

专利名称(译)	一种多功能多肽，包含与NKG2D受体复合物表位的结合位点		
公开(公告)号	JP2004500108A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001569387	申请日	2001-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	微气象AG		
申请(专利权)人(译)	微气象AG		
[标]发明人	クーファペーター リースミュラーゲルト ルッテルビューセラルフ ボルシエルトカトリン キッシェルロマン マイアモニカ ホフマイスターロベルト		
发明人	クーファ,ペーター リースミュラー,ゲルト ルッテルビューセ,ラルフ ボルシエルト,カトリン キッシェル,ロマン マイア,モニカ ホフマイスター,ロベルト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P33 /10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/62 C12N15/85 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/53 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21 /04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/2851 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/02 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37 /08 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/BA54 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA10 4B024 /DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065 /CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084 /CA59 4C084/MA16 4C084/MA21 4C084/MA28 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084 /ZA022 4C084/ZA332 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084 /ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084 /ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZB392 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086		

/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086 /ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB38 4C086/ZB39 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087 /ZA01 4C087/ZA02 4C087/ZA33 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZB05 4C087/ZB08 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB33 4C087 /ZB35 4C087/ZB38 4C087/ZB39 4C087/ZC06 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045 /EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA72 4H045/FA74

代理人(译) 森田浩二
田中玲子
北野 健

優先権 2000106467 2000-03-24 EP

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明涉及多功能多肽，其包含第一结构域和第二结构域，所述第一结构域包含特异性识别NKG2D受体复合物的细胞外表位的结合位点，所述第二结构域具有受体或配体功能。此外，本发明涉及编码多功能多肽的多核苷酸，包含所述多核苷酸的载体，所述多核苷酸或包含所述载体的细胞。本发明还涉及包含任何上述分子单独或组合的组合物，以及本发明多功能多肽的特定药物用途。

(P2004-
(43) 公表日 平成16年1月8日(改)

(51) Int. Cl. 7	F I	テームコード (参)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 171 頁) 最終

(21) 出願番号	特願2001-569387 (P2001-569387)	(71) 出願人	502343861
(86) (22) 出願日	平成13年3月26日 (2001. 3. 26)		マイクロメット アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月20日 (2002. 9. 20)		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/003414		7 7 シュタッフエルゼーシュトラ
(87) 国際公開番号	W02001/071005		2
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001. 9. 27)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	00106467. 4		弁理士 大野 聖二
(32) 優先日	平成12年3月24日 (2000. 3. 24)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健

最終頁