

(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2021-526816

(P2021-526816A)

(43) 公表日 令和3年10月11日 (2021. 10. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 166 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-568407 (P2020-568407)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月7日 (2019. 6. 7)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月23日 (2020. 12. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/064942
 (87) 国際公開番号 W02019/234220
 (87) 国際公開日 令和1年12月12日 (2019. 12. 12)
 (31) 優先権主張番号 18176888.8
 (32) 優先日 平成30年6月9日 (2018. 6. 9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 18176889.6
 (32) 優先日 平成30年6月9日 (2018. 6. 9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503385923
 ベーリンガー インゲルハイム インター
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ
 シュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
 ハイム アム ライン ビンガー シュト
 ラーセ 1 7 3
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74) 代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫

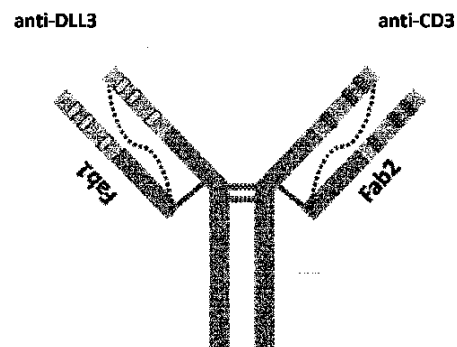
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 D L L 3 - C D 3 二重特異性抗体

(57) 【要約】

本開示は、D L L 3 - C D 3 二重特異性抗体であって、その配列を特徴とする、抗体に関する。本出願は、さらに、抗体およびその組成物の、特に、がん疾患の分野における治療目的での使用に関する。

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D L L 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ユニットと、C D 3 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ユニットとを含むタンパク質であって、D L L 3 に特異的に結合する前記第 1 の抗原結合ユニットが、i) ~ x v i i i) :

i) 配列番号 1 (C D R 1)、配列番号 2 (C D R 2)、および配列番号 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 4 (C D R 1)、配列番号 5 (C D R 2)、および配列番号 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 7 (C D R 1)、配列番号 8 (C D R 2)、および配列番号 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 10 (C D R 1)、配列番号 11 (C D R 2)、および配列番号 12 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i i i) 配列番号 13 (C D R 1)、配列番号 14 (C D R 2)、および配列番号 15 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 16 (C D R 1)、配列番号 17 (C D R 2)、および配列番号 18 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i v) 配列番号 19 (C D R 1)、配列番号 20 (C D R 2)、および配列番号 21 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 22 (C D R 1)、配列番号 23 (C D R 2)、および配列番号 24 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

v) 配列番号 25 (C D R 1)、配列番号 26 (C D R 2)、および配列番号 27 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 28 (C D R 1)、配列番号 29 (C D R 2)、および配列番号 30 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

v i) 配列番号 31 (C D R 1)、配列番号 32 (C D R 2)、および配列番号 33 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 34 (C D R 1)、配列番号 35 (C D R 2)、および配列番号 36 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

v i i) 配列番号 133 (C D R 1)、配列番号 134 (C D R 2)、および配列番号 135 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 136 (C D R 1)、配列番号 137 (C D R 2)、および配列番号 138 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

v i i i) 配列番号 139 (C D R 1)、配列番号 140 (C D R 2)、および配列番号 141 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 142 (C D R 1)、配列番号 143 (C D R 2)、および配列番号 144 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i x) 配列番号 145 (C D R 1)、配列番号 146 (C D R 2)、および配列番号 147 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 148 (C D R 1)、配列番号 149 (C D R 2)、および配列番号 150 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x) 配列番号 151 (C D R 1)、配列番号 152 (C D R 2)、および配列番号 153 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 154 (C D R 1)、配列番号 155 (C D R 2)、および配列番号 156 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i) 配列番号 157 (C D R 1)、配列番号 158 (C D R 2)、および配列番号 159 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 160 (C D R 1)、配列番号 161 (C D R 2)、および配列番号 162 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i i) 配列番号 163 (C D R 1)、配列番号 164 (C D R 2)、および配列番号 1

10

20

30

40

50

65 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 166 (CDR1)、配列番号 167 (CDR2)、および配列番号 168 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、

xiii) 配列番号 169 (CDR1)、配列番号 170 (CDR2)、および配列番号 171 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 172 (CDR1)、配列番号 173 (CDR2)、および配列番号 174 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、

xiv) 配列番号 175 (CDR1)、配列番号 176 (CDR2)、および配列番号 177 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 178 (CDR1)、配列番号 179 (CDR2)、および配列番号 180 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、

xv) 配列番号 181 (CDR1)、配列番号 182 (CDR2)、および配列番号 183 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 184 (CDR1)、配列番号 185 (CDR2)、および配列番号 186 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、

xvi) 配列番号 187 (CDR1)、配列番号 188 (CDR2)、および配列番号 189 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 190 (CDR1)、配列番号 191 (CDR2)、および配列番号 192 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、

xvii) 配列番号 193 (CDR1)、配列番号 194 (CDR2)、および配列番号 195 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 196 (CDR1)、配列番号 197 (CDR2)、および配列番号 198 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット、ならびに

xviii) 配列番号 199 (CDR1)、配列番号 200 (CDR2)、および配列番号 201 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 202 (CDR1)、配列番号 203 (CDR2)、および配列番号 204 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR を含む、抗原結合ユニット

からなる群から選択される、タンパク質。

【請求項 2】

DLL3 に特異的に結合する前記第 1 の抗原結合ユニットが、第 1 の軽鎖可変ドメインおよび第 1 の重鎖可変ドメインを含み、i) ~ xviii) :

i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

ii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

iii) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 42 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

iv) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

v) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

vi) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

vii) 配列番号 205 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 206 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

viii) 配列番号 207 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 208 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

ix) 配列番号 209 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 210 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x) 配列番号 211 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 212 のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i) 配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i i) 配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i i i) 配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i v) 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x v) 配列番号 2 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、 10

x v i) 配列番号 2 2 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x v i i) 配列番号 2 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、ならびに

x v i i i) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット

からなる群から選択される、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

C D 3 に特異的に結合する前記第 2 の抗原結合ユニットが、i) ~ i i i) :

i) 配列番号 5 5 (C D R 1)、配列番号 5 6 (C D R 2)、および配列番号 5 7 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 5 8 (C D R 1)、配列番号 5 9 (C D R 2)、および配列番号 6 0 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 6 1 (C D R 1)、配列番号 6 2 (C D R 2)、および配列番号 6 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 6 4 (C D R 1)、配列番号 6 5 (C D R 2)、および配列番号 6 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、ならびに

i i i) 配列番号 9 6 (C D R 1)、配列番号 9 7 (C D R 2)、および配列番号 9 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 9 9 (C D R 1)、配列番号 1 0 0 (C D R 2)、および配列番号 1 0 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット 30

からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

C D 3 に特異的に結合する前記第 2 の抗原結合ユニットが、i) ~ i i i) :

i) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、ならびに

i i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット 40

からなる群から選択される、第 2 の軽鎖可変ドメインおよび第 2 の重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 5】

i) D L L 3 に特異的に結合する前記第 1 の抗原結合ユニットが、その N から C 末端へ、第 1 の軽鎖可変ドメイン、第 1 の軽鎖定常ドメイン、第 1 のペプチドリinker、第 1 の重鎖可変ドメイン、および第 1 の重鎖定常 C H 1 ドメインを含み、

i i) C D 3 に特異的に結合する前記第 2 の抗原結合ユニットが、その N から C 末端へ、第 2 の軽鎖可変ドメイン、第 2 の軽鎖定常ドメイン、第 2 のペプチドリinker、第 2 の重鎖可変ドメイン、および第 2 の重鎖定常 C H 1 ドメインを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 50

1 項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記第 1 および / または第 2 のペプチドリinker が、26 ~ 42 個のアミノ酸、好ましくは 30 ~ 40 個のアミノ酸、34 ~ 40 個のアミノ酸、または 36 ~ 39 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、より好ましくは 38 個のアミノ酸を含む、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記第 1 のリンカーおよび / または第 2 のリンカーが、G l y - S e r リンカーであり、好ましくは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、前記第 1 および第 2 のペプチドリinker が、同じ配列を含む、請求項 5 または 6 に記載のタンパク質。

10

【請求項 8】

第 1 および第 2 の F c ドメインをさらに含み、前記第 1 の F c ドメインが、前記第 1 の抗原結合ユニットに共有結合により連結されており、前記第 2 の F c ドメインが、前記第 2 の抗原結合ユニットに共有結合により連結されている、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 9】

i) 前記第 1 の F c ドメインが、366 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、前記第 2 の F c ドメインが、407 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または
i i) 前記第 1 の F c ドメインが、366 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、前記第 2 の F c ドメインが、366 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、368 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 407 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含むか、または

20

i i i) 前記第 2 の F c ドメインが、366 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、前記第 1 の F c ドメインが、407 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または

i v) 前記第 2 の F c ドメインが、366 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、前記第 1 の F c ドメインが、366 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、368 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 407 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含み、好ましくは、前記第 1 または前記第 2 の F c ドメインが、435 位にアルギニン [H 4 3 5 R] および 436 位にフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] をさらに含む、請求項 8 に記載のタンパク質。

30

【請求項 10】

前記第 1 および / または前記第 2 の F c ドメインが、234 位にアラニン [L 2 3 4 A] および 235 位にアラニン [L 2 3 5 A] をさらに含む、請求項 9 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記第 1 の軽鎖定常ドメインおよび前記第 2 の軽鎖定常ドメインが、ヒトカップまたはラムダドメインを含む、請求項 5 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 12】

配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、および配列番号 252 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 79、配列番号 80、または配列番号 105 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む、タンパク質。

40

【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の前記第 1 の抗原結合ユニットおよび / または前記第 2 の抗原結合ユニットをコードし、第 1 および / または第 2 の F c ドメインをさらにコードしてもよい、単離された核酸分子。

50

【請求項 14】

請求項 12 に記載の第 1 および / または第 2 のポリペプチド鎖をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の発現ベクターがトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を製造する方法であって、

i) 請求項 16 に記載の宿主細胞を、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の発現を可能にする条件下において培養するステップと、 10

ii) 前記タンパク質を回収するステップと

を含み、

iii) さらに、前記タンパク質を精製および / または修飾および / または製剤化するステップ

を含んでもよい、方法。

【請求項 18】

D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む、タンパク質であって、前記第 1 のポリペプチド鎖が、第 1 の軽鎖、第 1 のリンカー、および第 1 の重鎖を含み、前記第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 の軽鎖、第 2 のリンカー、および第 2 の重鎖を含み、好ましくは、前記第 1 の軽鎖の C 末端が、前記第 1 のペプチドリリンカーを介して、前記第 1 の重鎖の N 末端に共有結合により連結されており、前記第 2 の軽鎖の C 末端が、前記第 2 のペプチドリリンカーを介して、前記第 2 の重鎖の N 末端に共有結合により連結されている、タンパク質。 20

【請求項 19】

D L L 3 に特異的に結合する前記第 1 のポリペプチド鎖が、i) ~ x v i i i) :

i) 配列番号 1 (C D R 1)、配列番号 2 (C D R 2)、および配列番号 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 4 (C D R 1)、配列番号 5 (C D R 2)、および配列番号 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

ii) 配列番号 7 (C D R 1)、配列番号 8 (C D R 2)、および配列番号 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 10 (C D R 1)、配列番号 11 (C D R 2)、および配列番号 12 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、 30

iii) 配列番号 13 (C D R 1)、配列番号 14 (C D R 2)、および配列番号 15 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 16 (C D R 1)、配列番号 17 (C D R 2)、および配列番号 18 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

iv) 配列番号 19 (C D R 1)、配列番号 20 (C D R 2)、および配列番号 21 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 22 (C D R 1)、配列番号 23 (C D R 2)、および配列番号 24 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、 40

v) 配列番号 25 (C D R 1)、配列番号 26 (C D R 2)、および配列番号 27 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 28 (C D R 1)、配列番号 29 (C D R 2)、および配列番号 30 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

vi) 配列番号 31 (C D R 1)、配列番号 32 (C D R 2)、および配列番号 33 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 34 (C D R 1)、配列番号 35 (C D R 2)、および配列番号 36 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

vii) 配列番号 133 (C D R 1)、配列番号 134 (C D R 2)、および配列番号 135 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 136 (C D R 50

1)、配列番号137(CDR2)、および配列番号138(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

viii) 配列番号139(CDR1)、配列番号140(CDR2)、および配列番号141(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号142(CDR1)、配列番号143(CDR2)、および配列番号144(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

ix) 配列番号145(CDR1)、配列番号146(CDR2)、および配列番号147(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号148(CDR1)、配列番号149(CDR2)、および配列番号150(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

x) 配列番号151(CDR1)、配列番号152(CDR2)、および配列番号153(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号154(CDR1)、配列番号155(CDR2)、および配列番号156(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xi) 配列番号157(CDR1)、配列番号158(CDR2)、および配列番号159(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号160(CDR1)、配列番号161(CDR2)、および配列番号162(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xii) 配列番号163(CDR1)、配列番号164(CDR2)、および配列番号165(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号166(CDR1)、配列番号167(CDR2)、および配列番号168(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xiii) 配列番号169(CDR1)、配列番号170(CDR2)、および配列番号171(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号172(CDR1)、配列番号173(CDR2)、および配列番号174(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

配列番号175(CDR1)、配列番号176(CDR2)、および配列番号177(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号178(CDR1)、配列番号179(CDR2)、および配列番号180(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xiv) 配列番号181(CDR1)、配列番号182(CDR2)、および配列番号183(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号184(CDR1)、配列番号185(CDR2)、および配列番号186(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xv) 配列番号187(CDR1)、配列番号188(CDR2)、および配列番号189(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号190(CDR1)、配列番号191(CDR2)、および配列番号192(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

xvi) 配列番号193(CDR1)、配列番号194(CDR2)、および配列番号195(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号196(CDR1)、配列番号197(CDR2)、および配列番号198(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、ならびに

xvii) 配列番号199(CDR1)、配列番号200(CDR2)、および配列番号201(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号202(CDR1)、配列番号203(CDR2)、および配列番号204(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR

からなる群から選択されるCDR配列を含む、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む、請求項18に記載のタンパク質。

【請求項20】

CD3に特異的に結合する前記第2のポリペプチド鎖が、i) ~ iii) :

10

20

30

40

50

i) 配列番号 55 (CDR1)、配列番号 56 (CDR2)、および配列番号 57 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 58 (CDR1)、配列番号 59 (CDR2)、および配列番号 60 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、

ii) 配列番号 61 (CDR1)、配列番号 62 (CDR2)、および配列番号 63 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 64 (CDR1)、配列番号 65 (CDR2)、および配列番号 66 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、ならびに

iii) 配列番号 96 (CDR1)、配列番号 97 (CDR2)、および配列番号 98 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 99 (CDR1)、配列番号 100 (CDR2)、および配列番号 101 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR

からなる群から選択される CDR 配列を含む、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む、請求項 18 または 19 に記載のタンパク質。

【請求項 21】

DLL3 に特異的に結合する前記第 1 のポリペプチド鎖が、i) ~ xvi) :

i) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

ii) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

iii) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 42 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

iv) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

v) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

vi) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

vii) 配列番号 205 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 206 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

viii) 配列番号 207 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 208 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

ix) 配列番号 209 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 210 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

x) 配列番号 211 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 212 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xi) 配列番号 213 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 214 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xii) 配列番号 215 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 216 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xiii) 配列番号 217 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 218 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xiv) 配列番号 219 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 220 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xv) 配列番号 221 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 222 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xvi) 配列番号 223 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 224 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

xvii) 配列番号 225 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 226 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに

x v i i i) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
 からなる群から選択される軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 2】

C D 3 に特異的に結合する前記第 2 のポリペプチド鎖が、i) ~ i i i) :

i) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

i i) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに

i i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン

からなる群から選択される軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 3】

前記第 1 および / または第 2 のペプチドリンカーが、2 6 ~ 4 2 個のアミノ酸、好ましくは 3 0 ~ 4 0 個のアミノ酸、3 4 ~ 4 0 個のアミノ酸、または 3 6 ~ 3 9 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、より好ましくは 3 8 個のアミノ酸を含む、請求項 1 8 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 4】

前記第 1 のリンカーおよび / または第 2 のリンカーが、G l y - S e r リンカーであり、好ましくは、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、前記第 1 および第 2 のペプチドリンカーが、同じ配列を含む、請求項 2 3 に記載のタンパク質。

【請求項 2 5】

i) 前記第 1 の重鎖が、3 6 6 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、前記第 2 の重鎖が、4 0 7 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または

i i) 前記第 1 の重鎖が、3 6 6 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、前記第 2 の重鎖が、3 6 6 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、3 6 8 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 4 0 7 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含むか、または

i i i) 前記第 2 の重鎖が、3 6 6 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、前記第 1 の重鎖が、4 0 7 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または

i v) 前記第 2 の重鎖が、3 6 6 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、前記第 1 の重鎖が、3 6 6 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、3 6 8 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 4 0 7 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含み、

好ましくは、前記第 1 または前記第 2 の重鎖が、4 3 5 位にアルギニン [H 4 3 5 R] および 4 3 6 位にフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] をさらに含む、請求項 1 8 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 6】

前記第 1 および / または前記第 2 の重鎖が、2 3 4 位にアラニン [L 2 3 4 A] および 2 3 5 位にアラニン [L 2 3 5 A] をさらに含む、請求項 2 5 に記載のタンパク質。

【請求項 2 7】

前記第 1 の軽鎖および前記第 2 の軽鎖が、ヒトカップまたはラムダドメインを含む、請求項 1 8 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 8】

医薬において使用するための、請求項 1 ~ 1 2 または 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 1 2 または 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 3 0】

10

20

30

40

50

がんを処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の、請求項 1 ~ 12 または 18 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を投与するステップを含む、方法。

【請求項 31】

がんを処置するための医薬組成物を調製するための、請求項 1 ~ 12 または 18 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の使用。

【請求項 32】

がんを処置する方法において使用するための、請求項 1 ~ 12 または 18 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 33】

前記がんが、DLL3 を発現する腫瘍であり、好ましくは、前記がんが、SCLC、神経膠芽腫、または DLL3 を発現する神経内分泌腫瘍である、請求項 30 に記載の方法、請求項 31 に記載の使用、または請求項 32 に記載の使用のためのタンパク質。

【請求項 34】

前記タンパク質が、化学療法剤、血管新生を阻害する治療的に活性な化合物、シグナル伝達経路阻害剤、EGFR 阻害剤、免疫調節剤、免疫チェックポイント阻害剤、またはホルモン療法剤と組み合わせて使用される、請求項 30 もしくは 33 に記載の方法、請求項 31 もしくは 33 に記載の使用、または請求項 32 もしくは 33 に記載の使用のためのタンパク質。

【請求項 35】

前記タンパク質が、免疫チェックポイント阻害剤、好ましくは、抗 PD - 1 抗体または抗 PD - L1 抗体と組み合わされる、請求項 34 に記載の方法、使用、または使用のためのタンパク質。

【請求項 36】

前記抗 PD - 1 抗体が、PD1 - 1、PD1 - 2、PD1 - 3、PD1 - 4、および PD1 - 5 からなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法、使用、または使用のためのタンパク質。

【請求項 37】

抗 DLL3 抗体分子であって、

i) 配列番号 1 (CDR1)、配列番号 2 (CDR2)、および配列番号 3 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 4 (CDR1)、配列番号 5 (CDR2)、および配列番号 6 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または
ii) 配列番号 7 (CDR1)、配列番号 8 (CDR2)、および配列番号 9 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 10 (CDR1)、配列番号 11 (CDR2)、および配列番号 12 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

iii) 配列番号 13 (CDR1)、配列番号 14 (CDR2)、および配列番号 15 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 16 (CDR1)、配列番号 17 (CDR2)、および配列番号 18 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

iv) 配列番号 19 (CDR1)、配列番号 20 (CDR2)、および配列番号 21 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 22 (CDR1)、配列番号 23 (CDR2)、および配列番号 24 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v) 配列番号 25 (CDR1)、配列番号 26 (CDR2)、および配列番号 27 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 28 (CDR1)、配列番号 29 (CDR2)、および配列番号 30 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

vi) 配列番号 31 (CDR1)、配列番号 32 (CDR2)、および配列番号 33 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 34 (CDR1)、配列

10

20

30

40

50

番号 35 (CDR2)、および配列番号 36 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v i i) 配列番号 133 (CDR1)、配列番号 134 (CDR2)、および配列番号 135 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 136 (CDR1)、配列番号 137 (CDR2)、および配列番号 138 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v i i i) 配列番号 139 (CDR1)、配列番号 140 (CDR2)、および配列番号 141 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 142 (CDR1)、配列番号 143 (CDR2)、および配列番号 144 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

i x) 配列番号 145 (CDR1)、配列番号 146 (CDR2)、および配列番号 147 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 148 (CDR1)、配列番号 149 (CDR2)、および配列番号 150 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x) 配列番号 151 (CDR1)、配列番号 152 (CDR2)、および配列番号 153 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 154 (CDR1)、配列番号 155 (CDR2)、および配列番号 156 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i) 配列番号 157 (CDR1)、配列番号 158 (CDR2)、および配列番号 159 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 160 (CDR1)、配列番号 161 (CDR2)、および配列番号 162 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i i) 配列番号 163 (CDR1)、配列番号 164 (CDR2)、および配列番号 165 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 166 (CDR1)、配列番号 167 (CDR2)、および配列番号 168 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i i i) 配列番号 169 (CDR1)、配列番号 170 (CDR2)、および配列番号 171 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 172 (CDR1)、配列番号 173 (CDR2)、および配列番号 174 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i v) 配列番号 175 (CDR1)、配列番号 176 (CDR2)、および配列番号 177 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 178 (CDR1)、配列番号 179 (CDR2)、および配列番号 180 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x v) 配列番号 181 (CDR1)、配列番号 182 (CDR2)、および配列番号 183 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 184 (CDR1)、配列番号 185 (CDR2)、および配列番号 186 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x v i) 配列番号 187 (CDR1)、配列番号 188 (CDR2)、および配列番号 189 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 190 (CDR1)、配列番号 191 (CDR2)、および配列番号 192 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x v i i) 配列番号 193 (CDR1)、配列番号 194 (CDR2)、および配列番号 195 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 196 (CDR1)、配列番号 197 (CDR2)、および配列番号 198 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x v i i i) 配列番号 199 (CDR1)、配列番号 200 (CDR2)、および配列番号 201 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 202 (CDR1)、配列番号 203 (CDR2)、および配列番号 204 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR

10

20

30

40

50

を含む、抗 D L L 3 抗体分子。

【請求項 38】

前記抗体分子が、モノクローナル、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体分子である、請求項 37 に記載の抗 D L L 3 抗体分子。

【請求項 39】

前記抗体分子が、F a b、F (a b ') 2、F a b '、F v、または s c F v である、請求項 37 または 38 に記載の抗 D L L 3 抗体分子。

【請求項 40】

前記重鎖定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、および I g E 定常領域からなる群から選択される、請求項 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の抗 D L L 3 抗体分子。

10

【請求項 41】

前記軽鎖定常領域が、カッパまたはラムダである、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の抗 D L L 3 抗体分子。

【請求項 42】

生物学的サンプル中の D L L 3 を検出する方法であって、

(a) 前記サンプルを、請求項 37 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の抗 D L L 3 抗体と接触させるステップと、

(b) 前記サンプル中で、抗体 - 抗原複合体を形成させるステップと、

(c) 前記抗 D L L 3 抗体を検出するステップと

20

を含む、方法。

【請求項 43】

前記抗 D L L 3 抗体が、検出可能なシグナルによって検出され、好ましくは、前記シグナルが、免疫細胞化学法 (I C C)、免疫組織化学法 (I H C)、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、および / または E L I S A によって検出される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記生物学的サンプルが、組織サンプル、好ましくは、固定組織サンプルであり、より好ましくは、ホルマリンで固定しパラフィン包埋処理した組織サンプルである、請求項 42 または 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 45】

前記抗 D L L 3 抗体が、I H C によって検出される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記組織サンプルが、腫瘍組織サンプルであり、より好ましくは、S C L C、L C N E C、神経膠腫、神経膠芽腫、黒色腫、または他の神経内分泌腫瘍からなる群から選択される腫瘍から単離された腫瘍組織サンプルである、請求項 42 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

D L L 3 を検出するためのキットであって、請求項 37 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の抗体と、使用のための説明書とを含む、キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、D L L 3 に特異的な第 1 の抗原結合ユニットと、C D 3 に特異的な第 2 の抗原結合ユニットとを含む、多重特異性結合タンパク質に関する。本発明はまた、そのような結合タンパク質をコードする核酸、そのような結合タンパク質を調製するための方法、そのような結合タンパク質を発現するかまたはそのような結合タンパク質を発現することができる宿主細胞、そのような結合タンパク質を含む組成物、ならびにそのような結合タンパク質または組成物の、特に、がん疾患の分野における治療目的での使用にも関する。

【背景技術】

50

【0002】

DLL3は、ノッチリガンドファミリーに属するI型膜貫通タンパク質である。DLL3は、主として、体節形成に関与し、主にゴルジ体に局在化され、他のDLLファミリーメンバーであり細胞表面に局在化されるDLL1およびDLL4とは対照的に、ノッチシグナル伝達の阻害剤として作用する。DLL3が過剰発現されるがん細胞においてのみ、一部のDLL3分子は、細胞表面へと逃避する(Dylla, Molecular & Cellular Oncology 2016, Vol. 3, No. 2)。DLL3は、いくつかの方法、たとえば、腫瘍組織のLC/MSS分析(国際公開第2014/125273号)、RNAシーケンシング(国際公開第2017/021349号)、および免疫組織化学法(Saunders et al., Sci Transl Med. 2015 Aug 26;7(302):302ra136、Saunders et al., AACR 2017、国際公開第2013/126746号)分析を使用して、腫瘍特異的標的として特定されている。 10

DLL3の発現は、神経内分泌腫瘍、たとえば、大細胞神経内分泌癌(LCNEC)、小細胞肺癌(SCLC)、小細胞膀胱がん、神経内分泌性前立腺がん、神経内分泌性膵臓がん、および神経膠芽腫において、説明されている(Saunders et al., Sci Transl Med. 2015 Aug 26;7(302):302ra136、Saunders et al., AACR 2017)。

【0003】

SCLCは、極めて高度な医療を必要とする適応症の代表である。SCLCは、肺癌診断のうちの13%を占め、NSCLCよりも予後が悪い。これらのがんの従来的な処置としては、主として、化学療法、放射線療法、外科手術、またはこれらの組合せが挙げられ、依然として標的化療法は存在しない。化学療法に対する初期応答率が高いが、多くの患者は、化学療法耐性疾患が急速に再発し、それに利用可能な処置選択肢は存在しない。過去数年間にわたり、これらのがんの処置には改善が見られているが、これらの腫瘍型の全生存率は、変わらないままであり、したがって、さらに標的化された強力な治療法に対し、満たされていない医療上の必要性が存在している。 20

標的化療法の1つのアプローチは、抗体薬物コンジュゲート(ADC)によって提供される。しかしながら、DLL3については、DLL3の細胞表面発現が低いことおよび化学療法に対する高い耐性率に起因して、この戦略は好ましくない。患者の大半が化学療法処置の後に再発するため、および細胞表面におけるDLL3の発現が低いことに起因して、ADCによるDLL3の標的化は、制限を有し得る。加えて、ADCのアプローチは、リンカーの不安定性または分解の結果として、遊離薬物によって引き起こされる標的外毒性を有することが多い。 30

【0004】

DLL3の標的化を、他のタンパク質の標的化と組み合わせる試みが行われている。たとえば、国際公開第2017/021349号は、標的細胞の表面上のヒトDLL3への結合と、T細胞の表面上のヒトCD3への結合を組み合わせ、二重特異性抗体コンストラクトについて記載している。しかしながら、そのようなアプローチが成功するかどうかは実証されておらず、現時点で、利用可能なSCLCおよび神経膠芽腫ならびに他のDLL3発現腫瘍のための標的化療法は存在しない。

【0005】

そのようながん患者の前途の悪さを踏まえると、より有効な治療法、特に、耐容性が改善された有効な治療法を特定する必要性が存在する。したがって、現在使用されているおよび/または当該技術分野において公知の薬剤、組成物、および/または方法と比較して、ある特定の利点を提供する、薬理学的に活性な薬剤、組成物、および/または処置の方法を提供することが、本発明の目的である。これらの利点としては、インビボでの有効性、改善された治療特性および薬理学的特性、増加した特異性、改善された安全性プロファイル、より少ない副作用、低減された免疫原性、ならびに他の有利な特性、たとえば、特に、すでに当該技術分野において公知の候補薬物と比較して、改善された調製の容易さもしくは低減された物品の費用、より高い安定性/より長い半減期、より低頻度な投与レジメンの必要性が挙げられる。 40

【発明の概要】

【 0 0 0 6 】

本発明は、T細胞上のCD3に対する結合アームと、腫瘍細胞の細胞表面上のDLL3に対する結合アームとを有する多重特異性結合タンパク質を利用した、二重特異性T細胞エンゲージアプローチに基づく。T細胞および腫瘍細胞に同時に結合することにより、T細胞エンゲージャーは、これらの2つの細胞間で細胞溶解性シナプスの形成を強制的に行い、そうして、T細胞活性を、標的とされる腫瘍細胞へと選択的に再指向させる。

【 0 0 0 7 】

一態様において、本発明は、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む、多重特異性結合タンパク質であって、DLL3に特異的に結合する前記第1の抗原結合ユニットが、i) ~ xvi) 10

i) 配列番号1 (CDR1)、配列番号2 (CDR2)、および配列番号3 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号4 (CDR1)、配列番号5 (CDR2)、および配列番号6 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

ii) 配列番号7 (CDR1)、配列番号8 (CDR2)、および配列番号9 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号10 (CDR1)、配列番号11 (CDR2)、および配列番号12 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

iii) 配列番号13 (CDR1)、配列番号14 (CDR2)、および配列番号15 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号16 (CDR1)、配列番号17 (CDR2)、および配列番号18 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、 20

iv) 配列番号19 (CDR1)、配列番号20 (CDR2)、および配列番号21 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号22 (CDR1)、配列番号23 (CDR2)、および配列番号24 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

v) 配列番号25 (CDR1)、配列番号26 (CDR2)、および配列番号27 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号28 (CDR1)、配列番号29 (CDR2)、および配列番号30 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、 30

vi) 配列番号31 (CDR1)、配列番号32 (CDR2)、および配列番号33 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号34 (CDR1)、配列番号35 (CDR2)、および配列番号36 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

vii) 配列番号133 (CDR1)、配列番号134 (CDR2)、および配列番号135 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号136 (CDR1)、配列番号137 (CDR2)、および配列番号138 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

viii) 配列番号139 (CDR1)、配列番号140 (CDR2)、および配列番号141 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号142 (CDR1)、配列番号143 (CDR2)、および配列番号144 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、 40

ix) 配列番号145 (CDR1)、配列番号146 (CDR2)、および配列番号147 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号148 (CDR1)、配列番号149 (CDR2)、および配列番号150 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、

x) 配列番号151 (CDR1)、配列番号152 (CDR2)、および配列番号153 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号154 (CDR1)、配列番号155 (CDR2)、および配列番号156 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット、 50

む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i) 配列番号 1 5 7 (C D R 1)、配列番号 1 5 8 (C D R 2)、および配列番号 1 5 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 6 0 (C D R 1)、配列番号 1 6 1 (C D R 2)、および配列番号 1 6 2 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i i) 配列番号 1 6 3 (C D R 1)、配列番号 1 6 4 (C D R 2)、および配列番号 1 6 5 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 6 6 (C D R 1)、配列番号 1 6 7 (C D R 2)、および配列番号 1 6 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i i i) 配列番号 1 6 9 (C D R 1)、配列番号 1 7 0 (C D R 2)、および配列番号 1 7 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 7 2 (C D R 1)、配列番号 1 7 3 (C D R 2)、および配列番号 1 7 4 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x i v) 配列番号 1 7 5 (C D R 1)、配列番号 1 7 6 (C D R 2)、および配列番号 1 7 7 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 7 8 (C D R 1)、配列番号 1 7 9 (C D R 2)、および配列番号 1 8 0 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x v) 配列番号 1 8 1 (C D R 1)、配列番号 1 8 2 (C D R 2)、および配列番号 1 8 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 8 4 (C D R 1)、配列番号 1 8 5 (C D R 2)、および配列番号 1 8 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x v i) 配列番号 1 8 7 (C D R 1)、配列番号 1 8 8 (C D R 2)、および配列番号 1 8 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 9 0 (C D R 1)、配列番号 1 9 1 (C D R 2)、および配列番号 1 9 2 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

x v i i) 配列番号 1 9 3 (C D R 1)、配列番号 1 9 4 (C D R 2)、および配列番号 1 9 5 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 9 6 (C D R 1)、配列番号 1 9 7 (C D R 2)、および配列番号 1 9 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、ならびに

x v i i i) 配列番号 1 9 9 (C D R 1)、配列番号 2 0 0 (C D R 2)、および配列番号 2 0 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 2 0 2 (C D R 1)、配列番号 2 0 3 (C D R 2)、および配列番号 2 0 4 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット

からなる群から選択される、多重特異性結合タンパク質を提供する。

【 0 0 0 8 】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、D L L 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ユニットは、第 1 の軽鎖可変ドメインおよび第 1 の重鎖可変ドメインを含み、i) ~ x v i i i) :

i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i i i) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i v) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

v) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

v i) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

10

20

30

40

50

v i i) 配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 0 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

v i i i) 配列番号 2 0 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 0 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i x) 配列番号 2 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x) 配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i) 配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i i) 配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i i i) 配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x i v) 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x v) 配列番号 2 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x v i) 配列番号 2 2 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

x v i i) 配列番号 2 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、ならびに

x v i i i) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット

からなる群から選択される。

10

20

30

40

【 0 0 0 9 】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、C D 3 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ユニットは、i) ~ i i i) :

i) 配列番号 5 5 (C D R 1)、配列番号 5 6 (C D R 2)、および配列番号 5 7 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 5 8 (C D R 1)、配列番号 5 9 (C D R 2)、および配列番号 6 0 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 6 1 (C D R 1)、配列番号 6 2 (C D R 2)、および配列番号 6 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 6 4 (C D R 1)、配列番号 6 5 (C D R 2)、および配列番号 6 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット、ならびに

i i i) 配列番号 9 6 (C D R 1)、配列番号 9 7 (C D R 2)、および配列番号 9 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 9 9 (C D R 1)、配列番号 1 0 0 (C D R 2)、および配列番号 1 0 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット

からなる群から選択される。

【 0 0 1 0 】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、C D 3 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ユニットは、第 2 の軽鎖可変ドメインおよび第 2 の重鎖可変ドメインを含み、

i) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、

i i) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット、ならびに

i i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、抗原結合ユニット

50

からなる群から選択される。

【 0 0 1 1 】

本発明の一部の実施形態において、D L L 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ユニットは、その N から C 末端へ、第 1 の軽鎖可変ドメイン、第 1 の軽鎖定常ドメイン、第 1 のペプチドリンカー、第 1 の重鎖可変ドメイン、および第 1 の重鎖定常 C H 1 ドメインを含み、C D 3 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ユニットは、その N 末端から C 末端へ、第 2 の軽鎖可変ドメイン、第 2 の軽鎖定常ドメイン、第 2 のペプチドリンカー、第 2 の重鎖可変ドメイン、および第 2 の重鎖定常 C H 1 ドメインを含む。本発明の一部の実施形態において、第 1 および / または第 2 のペプチドリンカーは、26 ~ 42 個のアミノ酸、好ましくは 30 ~ 40 個のアミノ酸、34 ~ 40 個のアミノ酸、または 36 ~ 39 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、より好ましくは 38 個のアミノ酸を含む。本発明の一部の実施形態において、第 1 のリンカーおよび / または第 2 のリンカーは、G l y - S e r リンカーであり、好ましくは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、前記第 1 および第 2 のペプチドリンカーは、同じ配列を含む。

10

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、第 1 および第 2 の F c ドメインをさらに含み、前記第 1 の F c ドメインは、前記第 1 の抗原結合ユニットに共有結合により連結されており、前記第 2 の F c ドメインは、前記第 2 の抗原結合ユニットに共有結合により連結されている。

【 0 0 1 2 】

本発明の一部の実施形態において、

20

i) 第 1 の F c ドメインが、366 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、第 2 の F c ドメインが、407 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または

i i) 第 1 の F c ドメインが、366 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、第 2 の F c ドメインが、366 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、368 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 407 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含むか、または

i i i) 第 2 の F c ドメインが、366 位にチロシン (Y) [T 3 6 6 Y] を含み、第 1 の F c ドメインが、407 位にスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] を含むか、または

i v) 第 2 の F c ドメインが、366 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W] を含み、第 1 の F c ドメインが、366 位にセリン (S) [T 3 6 6 S]、368 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 407 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含む、

30

好ましくは、第 1 または第 2 の F c ドメインが、435 位にアルギニン [H 4 3 5 R] および 436 位にフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] をさらに含む。一部の実施形態において、第 1 および / または第 2 の F c ドメインは、234 位にアラニン [L 2 3 4 A] および 235 位にアラニン [L 2 3 5 A] をさらに含む。一部の実施形態において、第 1 の軽鎖定常ドメインおよび第 2 の軽鎖定常ドメインは、ヒトカッパまたはラムダドメインを含む。

【 0 0 1 3 】

好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、および配列番号 252 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 79、配列番号 80、または配列番号 105 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

40

さらなる態様において、本発明は、i) 本発明のタンパク質の第 1 の抗原結合ユニットおよび / もしくは第 2 の抗原結合ユニットをコードし、第 1 および / もしくは第 2 の F c ドメインをさらにコードしてもよい、単離された核酸分子、または i i) 本発明のタンパク質の第 1 および / もしくは第 2 のポリペプチド鎖をコードする、単離された核酸分子を提供する。さらなる態様において、本発明の核酸分子を含む発現ベクター、そのような発現ベクターがトランスフェクトされた宿主細胞、および本発明のタンパク質を製造する方

50

法が、本明細書において提供される。

【0014】

本発明のさらなる態様において、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む、多重特異性結合タンパク質であって、第 1 のポリペプチド鎖が、第 1 の軽鎖、第 1 のリンカー、および第 1 の重鎖を含み、第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 の軽鎖、第 2 のリンカー、および第 2 の重鎖を含み、好ましくは、前記第 1 の軽鎖の C 末端が、前記第 1 のペプチドリリンカーを介して、前記第 1 の重鎖の N 末端に共有結合により連結されており、前記第 2 の軽鎖の C 末端が、前記第 2 のペプチドリリンカーを介して、前記第 2 の重鎖の N 末端に共有結合により連結されている、多重特異性結合タンパク質が、本明細書において提供される。

10

【0015】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖は、本明細書に記載される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、または D L L 3 # 18 の抗原結合ユニットについて定義される C D R 配列および / または V H / V L 配列を含む、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態において、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖は、本明細書に記載される C D 3 # 1、C D 3 # 2、または C D 3 # 3 の抗原結合ユニットについて定義される C D R 配列および / または V H / V L 配列を含む、軽鎖可変および重鎖可変ドメインを含む。

20

本発明の結合タンパク質に關与するさらなる態様、実施形態、使用、および方法は、以下の本発明の詳細な説明および添付の特許請求の範囲から、明らかとなる。

本発明は、D L L 3 を発現するがん、たとえば、S C L C、神経膠芽腫、または D L L 3 を発現する神経内分泌腫瘍のより効率的な処置を可能にする、新規な結合タンパク質を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】本発明の二重特異性結合タンパク質の概略図である。

【図 2】エピトープドメインマッピングのための H E K 2 9 3 細胞上に発現される、D L L 3 全長タンパク質および D L L 3 ドメインコンストラクトの概略図である。D L L 3 ドメインコンストラクトについては、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは、E p C A M に由来する。

30

【図 3 A】7 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の D L L 3 エピトープドメインマッピングを示す図である。D L L 3 の膜近傍ペプチド、E G F 4、E G F 1、および D S L ドメインを認識する例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、P E - A (フィコエリトリンシグナル領域)を示す。

【図 3 B】6 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の D L L 3 エピトープドメインマッピングを示す図である。D L L 3 の E G F 1、E G F 3、E G F 4、または E G F 6 を認識する例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、P E - A (フィコエリトリンシグナル)を示す。

40

【図 3 C】6 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の D L L 3 エピトープドメインマッピングを示す図である。D S L ドメインを認識するか、または D L L 3 の D S L も、E G F も、膜近傍ペプチドも認識しない、例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、P E - A (フィコエリトリンシグナル)を示す。

【図 4】7 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の、ヒトおよびカニクイザル D L L 3 を発現する細胞株への結合を示す図である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、P E - A (フィコエリトリンシグナル領域)を示す。

【図 5】7 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の、ヒト D L L 1 および D L L 4 を発現する細胞株への結合を示す図であり、ヒト D L L 1 および D L L 4 への結合は検

50

出されなかった。y 軸は、計数を示し、x 軸は、P E - A (フィコエリトリンシグナル領域) を示す。

【図 6 A】フローサイトメトリー分析による、7 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の、S C L C 細胞株およびヒト T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 B】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L でも E G F 1 ~ 6 でも膜近傍ペプチドでもないペプチドに指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 C】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 D】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 1 ドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 E】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 3 ドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 F】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 4 ドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 G】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 H】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (膜近傍ペプチドドメインに対して指向される) の、S H P 7 7 細胞への結合を示す図である。

【図 6 I】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L でも E G F 1 ~ 6 でも膜近傍ペプチドでもないペプチドに指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 J】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 K】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 1 ドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 L】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 3 ドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 M】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 4 ドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 N】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 O】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (膜近傍ペプチドドメインに対して指向される) の、N C I - H 8 2 細胞への結合を示す図である。

【図 6 P】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L でも E G F 1 ~ 6 でも膜近傍ペプチドでもないペプチドに指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 Q】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 R】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 1 ドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 S】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 3 ドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 T】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 4 ドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 U】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 6 ドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 6 V】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (膜近傍ペプチドドメインに対して指向される) の、T 細胞への結合を示す図である。

【図 7 A】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない P B M C をヒト S C L C 細胞株へと再指向させる 7 つの D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 7 B】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L でも E G F 1 ~ 6 でも膜近傍ペプチドでもないペプチドに指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 C】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 D】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 1 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 E】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 3 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 F】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 4 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 G】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 6 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 H】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (膜近傍ペプチドに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 I】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L でも E G F 1 ~ 6 でも膜近傍ペプチドでもないペプチドに指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 J】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (D S L ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 K】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 1 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 L】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 3 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 M】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 4 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 N】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (E G F 6 ドメインに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 7 O】細胞を溶解させることにおける刺激されていない T 細胞をヒト N C I - H 8 2 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (膜近傍ペプチドに対して指向される) の有効性を示す図である。

【図 8】2 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質を用いたインビトロ内部移行アッセイを示す図である。D L L 3 / C D 3 結合タンパク質を、D L L 3 陽性 S H P 7 7 細胞とともに、2 時間および 4 時間、ブレインキュベートした後に、ヒト P B M C とともに 4 8 時間共インキュベートした。

【図 9】2 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の薬物動態を示す図である。1 m g / k g の単回の静脈内投薬後の雄性 C 5 7 B L / 6 マウスにおける D L L 3 # 3 / C D 3 # 1 (白四角形) および D L L 3 # 3 / C D 3 # 2 (黒四角形) の平均薬物動態プロファイルである。

10

20

30

40

50

【図 10】2つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の抗腫瘍活性を示す図である。y 軸は、腫瘍体積中央値を示し、x 軸は、時間を示す。

【図 11】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない P B M C をヒト S H P 7 7 および R K O - E 6 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 12】S H P 7 7 細胞の存在下での、T 細胞活性化における例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 13】S H P 7 7 細胞の存在下での、T 細胞脱顆粒化における例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 14 A】S H P 7 7 細胞の存在下での、P B M C によるインターフェロンガンマの分泌における例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 14 B】S H P 7 7 細胞の存在下での、P B M C による M C P - 1 の分泌における例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 15】S H P 7 7 細胞の存在下での、T 細胞の増殖における例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 16】細胞を溶解させることにおける、刺激されていないパント細胞およびナイーブ T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 17】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない C D 4⁺および C D 4⁺セントラルメモリー T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 18】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない C D 4⁺および C D 4⁺エフェクターメモリー T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 19】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない C D 8⁺および C D 8⁺ C D 4 5 R A⁺エフェクターメモリー T 細胞をヒト S H P 7 7 細胞へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 20】細胞を溶解させることにおける、刺激されていない C D 8⁺および C D 8⁺メモリー T 細胞をヒト S H P 7 7 へと再指向させる例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性を示す図である。

【図 21】例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質による S H P 7 7 異種移植片腫瘍組織への T 細胞浸潤を示す図である。

【図 22】E L I S A アッセイにおける、3つの例示的な抗 D L L 3 抗体の組換え D L L 3 タンパク質への結合を示す図である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、D L L 3 タンパク質の濃度を示す。

【図 23】フローサイトメトリーによって判定される、6つの例示的な抗 D L L 3 抗体の D L L 3 陽性 S C L C 細胞株への結合を示す図である。y 軸は、計数を示し、x 軸は、抗 D L L 3 抗体の濃度を示す。

【図 24】5つの例示的な抗 D L L 3 抗体による S C L C 組織サンプルの代表的な染色を示す図である。抗 D L L 3 抗体 D L L 3 # 1 および D L L 3 # 5 は、腫瘍細胞が、点状および / または拡散した細胞質および / または膜状の D L L 3 染色を呈することを示す。画像は、L E I C A S C N 4 0 0 自動化スキャナーによって 10 倍の拡大率で電子的に生成された。

【図 25】異なる D L L 3 発現レベルを有する S C L C 細胞株に由来する細胞ペレットの代表的な染色を示す図である。抗 D L L 3 抗体は D L L 3 # 5 である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

使用される用語および定義

本発明の上記およびその他の態様および実施形態は、本明細書のさらなる説明から、明らかになる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

別途示されるか定義されない限り、使用されるすべての用語は、当該技術分野における通常の意味を有し、これは、当業者には明らかであろう。たとえば、標準的な教本、たとえば、Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990)、およびRoitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)、ならびに本明細書に引用される一般的な背景技術への参照がなされる。さらに、別途示されない限り、当業者には明らかなように、具体的に詳述されていないすべての方法、ステップ、技法、および操作は、本質的に公知の様式で実行することができ、またそのように実行されている。さらに、たとえば、標準的な教本、上記で言及されている一般的な背景技術、およびそこに引用されているさらなる参考文献への参照がなされる。

10

本明細書において使用される場合、「含む (comprising)」という用語およびその変形、たとえば、「含む (comprises)」および「含む (comprise)」は、「含む (containing)」または「含む (including)」または「有する (having)」で置き換えることができる。

【 0 0 1 9 】

本明細書において (たとえば、「重鎖 / 軽鎖配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「定常ドメイン配列」、または「タンパク質配列」などの用語において) 使用される「配列」という用語は、概して、文脈によってより限定的な解釈が必要とされない限り、関連するアミノ酸配列ならびにそれをコードする核酸配列またはヌクレオチド配列の両方を含むことが理解されるものとする。

20

本明細書において使用される「抗原結合ユニット」とは、その特定の標的または抗原に結合することができ、標的結合を可能にする抗体由来の (典型的に抗体に存在する) 最低限の構造要件を含む、ポリペプチドを指す。したがって、抗原結合ユニットは、少なくとも、3つの軽鎖および3つの重鎖 C D R 配列の存在、好ましくは、少なくとも軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 2 0 】

抗体または免疫グロブリンの一般化された構造は、当業者には周知である。これらの分子は、2つの同一な軽鎖 (L) および2つの同一な重鎖 (H) から構成される、典型的には約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、典型的に、全長抗体と称される。それぞれの軽鎖は、1つのジスルフィド結合によって重鎖に共有結合で連結されて、ヘテロ二量体を形成しており、ヘテロ四量体分子は、ヘテロ二量体の2つの同一な重鎖間での共有結合によるジスルフィド結合を通じて形成される。軽鎖および重鎖は、1つのジスルフィド結合によって一緒に連結されるが、2つの重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンアイソタイプによって変動する。それぞれの重鎖および軽鎖はまた、規則的に離間した鎖内ジスルフィド結合を有する。それぞれの重鎖は、N末端に、可変ドメイン (VH) を有し、続いて、3つまたは4つ (IgEの場合) の定常ドメイン (CH1、CH2、CH3、およびCH4)、ならびにCH1とCH2との間のヒンジ領域を有する。それぞれの軽鎖は、N末端側の可変ドメイン (VL) およびC末端側の定常ドメイン (CL) という2つのドメインを有する。VLドメインは、非共有結合によりVHドメインと会合し、一方で、CLドメインは、一般に、ジスルフィド結合を介してCH1ドメインに共有結合で連結される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の境界部を形成すると考えられている (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663)。可変ドメインは、本明細書において、可変領域またはFvとも称され、抗原結合部位を有することで、抗体に、抗原に対する特異性を付与する部分を指す。

30

40

【 0 0 2 1 】

本明細書において使用される「軽鎖可変ドメイン」(または「軽鎖可変領域」) および「重鎖可変ドメイン」(または「重鎖可変領域」) は、同じ一般構造を有し、それぞれのドメインは、配列が広く保存されており、当該技術分野および本明細書の下記においてそ

50

れぞれ「フレームワーク領域 1」または「F R 1」、「フレームワーク領域 2」または「F R 2」、「フレームワーク領域 3」または「F R 3」、および「フレームワーク領域 4」または「F R 4」と称される 4 つのフレームワーク (F R) 領域から本質的になり、これらのフレームワーク領域は、当該技術分野および本明細書の下記においてそれぞれ「相補性決定領域 1」または「C D R 1」、「相補性決定領域 2」または「C D R 2」、および「相補性決定領域 3」または「C D R 3」と称される 3 つの超可変領域、H V R (または C D R) で分断されている。したがって、免疫グロブリン可変ドメインの一般構造または配列は、以下のように示すことができる: F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4。フレームワーク領域は、ベータシート構造を採用し、C D R は、ベータシート構造を接続するループを形成し得る。それぞれの鎖における C D R は、フレームワーク領域によって 3 次元構造で保持され、他の鎖に由来する C D R と一緒に、抗原結合部位を形成している。

10

【 0 0 2 2 】

本発明の文脈内で、C D R への参照は、I M G T とも称される C C G の定義に基づく (Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." Dev Comp Immunol. 2003 Jan; 27(1):55-77、Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. "IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences". Cold Spring Harb Protoc. 2011;2011(6):695-715。当該技術分野において公知の C D R の別の定義は、K a b a t (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983)) とともに、C h o t h i a (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917) に基づく。

20

【 0 0 2 3 】

本出願内において使用される「定常ドメイン」または「定常領域」という用語は、可変領域以外の抗体のドメインの合計を指す。そのような定常ドメインおよび領域は、当該技術分野において周知であり、たとえば、K a b a t ら ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) によって記載されている。

30

【 0 0 2 4 】

抗体の「F c 部分」または「F c ドメイン」は、抗体の抗原への結合に直接関わらないが、様々なエフェクター機能を示す。「抗体の F c 部分 / ドメイン」は、当業者に周知の用語であり、抗体のパライン切断に基づいて定義される。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体または免疫グロブリンは、I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M のクラスに分割される。重鎖定常領域に応じて、免疫グロブリンの異なるクラスは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と称される。これらのうちのいくつかは、さらに、サブクラス (アイソタイプ)、たとえば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4、I g A 1、および I g A 2 に分割され得る。抗体の F c 部分は、補体活性化、C 1 q 結合、および F c 受容体結合に基づいて、A D C C (抗体依存性細胞媒介性細胞毒性) および C D C (補体依存性細胞毒性) に直接関与する。補体活性化 (C D C) は、補体因子 C 1 q の、ほとんどの I g G 抗体サブクラスの F c 部分への結合によって開始される。補体系に対する抗体の影響は、ある特定の条件に依存するが、C 1 q への結合は、F c 部分における定義された結合部位によって引き起こされる。そのような結合部位は、たとえば、L 2 3 4、L 2 3 5、D 2 7 0、N 2 9 7、E 3 1 8、K 3 2 0、K 3 2 2、P 3 3 1、および P 3 2 9 である (番号付けは、U E 番号付けに従う (Edelman et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85))。これらの残基のなかで、I g G 1 において C 1 q および F c ガンマ受容体結合を媒介するのに最も重要なものは、L 2 3 4 および L 2 3 5 である (Hezareh et al., J. Virology 75 (2001) 12161- 12168、Shields et al (2001) JBC, 276 (9): 6591-6604))。サブクラス I g G 1 および I g G 3 の抗体は

40

50

、通常、補体活性化ならびに C 1 q および C 3 結合を示し、一方で I g G 2 および I g G 4 は、補体系を活性化せず、C 1 q および C 3 に結合しない。

【 0 0 2 5 】

「抗体」または「抗体分子」（本明細書において同義に使用される）という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体（たとえば、二重特異性抗体）、抗体のフラグメント、特に、F v、F a b、F a b'、または F (a b') 2 フラグメント、一本鎖抗体、特に、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、一本鎖 F a b フラグメント (s c F a b)、小モジュラー免疫薬 (S M I P)、ドメイン抗体、ナノボディ、ダイアボディを包含する。抗体は、通常、抗体の F c 部分（抗体定常領域）によって媒介される、エフェクター機能、たとえば、A D C C もしくは C D C を有し得るか、または抗体は、たとえば、F c 部分が欠如しているかもしくはは遮断されマスクされた F c 部分、本質的に免疫細胞もしくは補体系などの免疫系構成要素によって認識されないかもしくはは不十分に認識される F c 部分、を有することによって、エフェクター機能を有さない場合がある。

10

【 0 0 2 6 】

モノクローナル抗体 (m A b) は、アミノ酸配列が同一である単一特異性抗体である。これらは、特定の抗体産生 B 細胞と骨髄腫 (B 細胞がん) 細胞との融合体のクローンを表すハイブリッド細胞株 (ハイブリドーマと称される) から、ハイブリドーマ技術によって產生させることができる (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7)。あるいは、モノクローナル抗体は、宿主細胞における組換え発現によって產生してもよい (Norder haug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." J Immunol Methods 204 (1): 77-87、以下もまた参照されたい)。「組換え抗体」または「組換え結合タンパク質」は、組換え操作された宿主細胞によって產生された、抗体または結合タンパク質である。これは、単離または精製されていてもよい。

20

全長抗体を、酵素、たとえば、パパインまたはペプシンで処理して、有用な抗体フラグメントを生成することができる。パパイン消化は、それぞれが単一の抗原結合部位を有する「F a b」フラグメントと称される 2 つの同一な抗原結合抗体フラグメント、ならびに残りの「F c」フラグメントを產生するために使用される。F a b フラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の C H 1 ドメインを含む。ペプシン処理により、2 つの抗原結合部位を有し、依然として抗原への架橋が可能な F (a b') 2 フラグメントが得られる。

30

【 0 0 2 7 】

F a b' フラグメントは、C H 1 ドメインの C 末端における抗体ヒンジ領域に由来する 1 つまたは複数のシステインを含む追加の残基の存在が、F a b フラグメントとは異なる。F (a b') 2 抗体フラグメントは、ヒンジ領域におけるシステイン残基によって連結された F a b' フラグメントの対である。抗体フラグメントの他の化学的カップリングもまた、公知である。

「F v」フラグメントは、1 つの重鎖可変ドメインおよび 1 つの軽鎖可変ドメインが緊密な非共有結合で会合した二量体からなる、完全な抗原認識および結合部位を含む。この構成では、それぞれの可変ドメインの 3 つの C D R が、相互作用して、V H - V L 二量体の表面上の抗原結合性部位を定めている。まとめると、6 つの C D R により、抗体には、抗原結合特異性が付与される。

40

【 0 0 2 8 】

「一本鎖 F v」または「s c F v」抗体フラグメントは、抗体の V H および V L ドメインを含む一本鎖 F v バリエーションであり、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在する。一本鎖 F v は、抗原を認識し、それに結合することができる。s c F v ポリペプチドはまた、s c F v による抗原結合に所望される三次元構造の形成を容易にするために、V H ドメインと V L ドメインとの間に配置されるポリペプチドリンカーを含ん

50

でもよい(たとえば、Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい)。

【0029】

「一本鎖 Fab」または「sc Fab」抗体フラグメントは、抗体の VL、CL、VH、および CH1 ドメインを含む一本鎖 Fab バリエーションであり、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一本鎖 Fab は、抗原を認識し、それに結合することができる。sc Fab ポリペプチドはまた、CL ドメインと VH ドメインとの間に配置されるポリペプチドリンカーを含んでもよい(Hust et al (2007) BMC Biotechnology)。

10

【0030】

人間における適用に関して、多くの場合、もともとマウスなどの他の種に由来する、治療用分子、たとえば、本明細書に記載される抗原結合ユニットを含む抗体または結合タンパク質の免疫原性を低減させることが望ましい。これは、キメラ抗体/結合タンパク質の構築によって、または「ヒト化」と称されるプロセスによって、行うことができる。この文脈において、「キメラ抗体」または「キメラ抗原結合ユニット」は、1つの種(たとえば、マウス)に由来する配列部分(たとえば、可変ドメイン)が、異なる種(たとえば、ヒト)に由来する配列部分(たとえば、定常ドメイン)に融合されたものを含む、抗体または抗原結合ユニットであると理解される。この文脈において、「ヒト化抗体」、「ヒト化結合タンパク質」、または「ヒト化抗原結合ユニット」は、もともと非ヒト種に由来する可変ドメインを含む抗体、タンパク質、または抗原結合ユニットであり、ある特定のアミノ酸が、その可変ドメインの全体的な配列をヒト可変ドメインの配列により近似するように突然変異されている。抗体のヒト化の方法は、当該技術分野において周知である(Billette R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". Int Rev Immunol. 1993;10(2-3):165-76, Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". Nature: 332:323)。

20

【0031】

「最適化された抗体」または「最適化された抗原結合ユニットもしくはタンパク質」は、所定の抗原に結合することができ、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する1つまたは複数のFRおよび実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する1つまたは複数のCDRを含む、免疫グロブリンアミノ酸配列バリエーションを含む、特定の種類のヒト化抗体またはヒト化抗原結合ユニット/タンパク質、またはそのフラグメントである。多くの場合「移入」配列と称される、この非ヒトアミノ酸配列は、典型的に、「移入」抗体ドメイン、特に、可変ドメインから取られる。一般に、最適化された抗体には、少なくとも、ヒト重鎖または軽鎖可変ドメインのFRの間に挿入された、非ヒト抗体のまたは非ヒト抗体に由来するCDR(またはHVL)が含まれる。ある特定のマウスFR残基が、最適化された抗体の機能に重要であり得、したがって、ヒト生殖細胞系配列の重鎖および軽鎖可変ドメイン残基のうちのある特定のものが、対応するマウス配列のものと同一になるように修飾されることが、理解されるであろう。このプロセスの間に、たとえば、脱アミド化、望ましくない電荷もしくは親油性、または非特異的結合を回避するために、望ましくないアミノ酸の除去または変更も行われ得る。「最適化された抗体」、「最適化された抗体フラグメント」、または「最適化された」は、しばしば、「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体フラグメント」、または「ヒト化」、または「配列最適化された」と称され得る。

30

40

【0032】

さらに、たとえば、ファージディスプレイまたはトランスジェニック動物の使用により、ヒトゲノムに由来する配列に基づいて、抗体またはVH/VLドメインを作成するための技術が、開発されている(WWW.Ablexis.com/technology-alivamab.php、国際公開第90/05144号、D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-

50

gene libraries displayed on phage." J.Mol.Biol., 222, 581-597、Knappik et al., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2):189-203、Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93.、Bruggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". Curr Opin Biotechnol. 1997 Aug;8(4):455-8.)。そのような抗体または抗原結合ユニットまたはVH/VLドメインは、本発明の文脈において、「ヒト抗体」、「ヒト抗原結合ユニット」、または「ヒトVH/VLドメイン」である。

【0033】

10

本明細書において使用される「ヒト抗体」、「ヒト抗原結合ユニット」、または「ヒトVH/VLドメイン」という用語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変（および該当する場合には定常）領域を有する抗体、抗原結合ユニット、またはVH/VLドメインを含むことが意図される。本技術のヒト抗体、抗原結合ユニット、タンパク質、またはVH/VLドメインは、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（たとえば、インピトロでランダムもしくは部位特異的突然変異生成によって、またはインピボで体細胞系突然変異によって導入される、突然変異）を含み得る。しかしながら、本明細書において使用される「ヒト抗体」、「ヒト抗原結合ユニット」、または「ヒトVH/VLドメイン」という用語は、マウス、ラット、またはウサギなどの別のもの（哺乳類種）の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含むようには意図されない。したがって、本明細書において使用される場合、「ヒト抗体」、「ヒト抗原結合ユニット」、または「ヒトVH/VLドメイン」という用語は、タンパク質の実質的にすべての部分（たとえば、CDR、フレームワーク、CL、CHドメイン（たとえば、CH1、CH2、CH3）、ヒンジ、VL、VH）が、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、配列変化または変動がわずかない、抗体、抗原結合ユニット、またはVH/VLドメインを指す。そのような変化または変動は、任意に、また好ましくは、修飾されていない抗体または抗原結合ユニットと比べて、ヒトまたは他の種において免疫原性を保持するかまたは低減させる。

20

したがって、ヒト抗体、ヒト抗原結合ユニット、またはヒトVH/VLドメインは、たとえば、キメラまたはヒト化抗体とは区別される。ヒト抗体、ヒト抗原結合ユニット、またはヒトVH/VLドメインは、機能的に再配列されたヒト免疫グロブリン（たとえば、重鎖および/または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核生物細胞もしくは真核生物細胞によって、産生させることができることが、指摘されている。

30

【0034】

「単量体」という用語は、本明細書に記載される抗体または多重特異性タンパク質の均質な形態を指す。たとえば、全長抗体について、単量体は、2つの同一な重鎖および2つの同一な軽鎖を有する単量体抗体を意味する。本発明の文脈において、単量体は、本明細書に記載される、DLL3に特異的な単一の抗原結合ユニットと、CD3に特異的な単一の抗原結合ユニットとを有する、本発明のタンパク質を意味する。たとえば、本明細書に記載される結合タンパク質の単量体は、2つの鎖を有し得、第1の鎖が、第1の抗原結合ユニットを有する一本鎖Fabと任意に第1のFcドメインとを含み、第2の鎖が、第2の抗原結合ユニットを有する一本鎖Fabと任意に第2のFcドメインとを含む。

40

エピトープは、抗体または抗原結合部分（たとえば、本明細書に記載されるタンパク質の抗原結合ユニット）によって結合される、抗原の領域である。「エピトープ」という用語には、抗体または抗原結合部分に特異的に結合することができる、任意のポリペプチド決定基が含まれる。ある特定の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、グリカン側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基（surface grouping）を含み、ある特定の実施形態においては、特定の三次元構造特徴および/または特定の電荷特徴を有し得る。立体構造および非立体構造エピトープは、立体構造エピトープへの結合が変性溶媒の存在下において消失するが、非立体構造エピトープへの結合は

50

消失しないという点で、区別される。

【0035】

ある特定のエピトープ、抗原、またはタンパク質（またはその少なくとも一部分、フラグメント、またはエピトープ）に「結合し」得る、それ「と結合し」得る、それ「に特異的に結合し」得る、それ「と特異的に結合し」得る、それ「に対する親和性を有する」、それ「に特異的な」、および／またはそれ「に対する特異性を有する」、抗原結合分子／タンパク質（たとえば、免疫グロブリン、抗体、抗原結合ユニット、またはそのような抗原結合分子／タンパク質のフラグメント）は、前記エピトープ、抗原、もしくはタンパク質「に対する」、もしくはそれ「に指向される」と称されるか、またはそのようなエピトープ、抗原、またはタンパク質に対して「結合する」分子／タンパク質である。

10

【0036】

本明細書において使用される場合、「結合」および「特異的結合」という用語は、精製された野生型抗原を用いたインビトロアッセイ、好ましくは、プラズモン共鳴アッセイ（Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.", Curr Opin Immunol. 1993 Apr;5(2):282-6.）における、抗体または抗原結合部分（たとえば、免疫グロブリン、抗体、抗原結合ユニット、またはそのような抗原結合分子／タンパク質のフラグメント）の、抗原のエピトープへの結合を指す。抗体親和性はまた、結合平衡除外法（kinetic exclusion assay、Kin ExA）技術（Darling, R.J., and Braut P-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions." ASSAY and Drug Development Technologies. 2004, Dec 2(6): 647-657）を使用して測定することができる。

20

【0037】

一般に、「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子／タンパク質（たとえば、免疫グロブリン、抗体、抗原結合ユニット、またはそのような抗原結合分子／タンパク質のフラグメント）が結合することができる、様々な種類の抗原またはエピトープの数を指す。抗原結合分子／タンパク質の特異性は、その親和性および／またはアビディティに基づいて判定することができる。抗原と抗原結合タンパク質との解離の平衡定数（ K_D ）によって表される親和性は、エピトープと、抗原結合分子／タンパク質上の抗原結合部位との間の結合強度の尺度であり、 K_D の値が小さいほど、エピトープと抗原結合分子／タンパク質との間の結合強度は強い（あるいは、親和性は、 $1/K_D$ である親和性定数（ K_A ）として表すこともできる）。当業者には明らかなように（たとえば、本明細書におけるさらなる開示に基づいて）、親和性は、目的とされる特定の抗原に応じて、本質的に公知の様式で判定することができる。アビディティは、抗原結合分子／タンパク質（たとえば、免疫グロブリン、抗体、抗原結合ユニット、またはそのような抗原結合分子／タンパク質のフラグメント）と、関連する抗原との間の結合の強度の尺度である。アビディティは、エピトープと、抗原結合分子／タンパク質上のその抗原結合部位との間の親和性、および抗原結合分子／タンパク質上に存在する関連する結合部位の数の両方に関する。

30

【0038】

「単離された」という用語は、本明細書において使用される場合、そのもともとのまたは本来の環境（たとえば、それが天然に存在する場合には天然の環境）から取り出された材料を指す。たとえば、生きている動物に存在している天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、ヒトの介入により、天然系とともに存在する材料のうちのいくつかまたはすべてから分離されたものは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であってもよく、かつ／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であってもよく、そのようなベクターまたは組成物が、それが本来見出される環境の一部ではないという点で、依然として単離されていると言える。たとえば、核酸、タンパク質／ポリペプチド分子は、それが得られたその本来の生物学的源および／または反応培地もしくは培養培地と比較して、それが前記源または培地において通常会合している少なくとも1つの他の成分、たとえば、別の核酸、別のタンパク質／ポリペプチド、別の生

40

50

物学的成分もしくは巨大分子、または少なくとも1つの混入物質、不純物、もしくは微量の成分から分離されている場合、「本質的に単離されている（形態にある）」と考えられる。具体的には、核酸またはタンパク質/ポリペプチド分子は、少なくとも2倍、具体的には、少なくとも10倍、より具体的には少なくとも100倍、および最大1000倍またはそれ以上精製されている場合、「本質的に単離されている」と考えられる。「本質的に単離された形態にある」核酸またはタンパク質/ポリペプチド分子は、好適な技法、たとえば、好適なクロマトグラフィー技法、たとえば、ポリアクリルアミド電気泳動を使用して判定される場合に、好ましくは、本質的に均質である。

【0039】

本明細書において使用される場合、2つまたはそれを上回る核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一」または「同一性パーセント」という用語は、2つまたはそれを上回る配列または部分配列が、最大の一致に関して比較およびアライメントした場合に、同一であること、または指定されたパーセンテージの同一であるヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有することを指す。同一性パーセントを判定するために、配列を、最適な比較の目的でアライメントする（たとえば、第1のアミノ酸または核酸配列の配列には、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアライメントのために、ギャップが導入されてもよい）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占有されている場合、分子は、その位置において同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列が共有している同一な位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一な位置の数 / 位置（たとえば、オーバーラップする位置）の総数 × 100）。一部の実施形態において、比較される2つの配列は、適宜、配列内にギャップを導入した後に、同じ長さである（たとえば、比較されている配列を越えて伸長する追加の配列は除外する）。たとえば、可変領域配列を比較する場合、リーダーおよび/または定常ドメイン配列は、考慮しない。2つの配列間の配列比較について、「対応する」CDRとは、両方の配列において同じ位置にあるCDRを指す（たとえば、それぞれの配列のCDR-H1）。

【0040】

2つの配列間の同一性パーセントまたは類似性パーセントの判定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムであり、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877のように改変される。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。目的のタンパク質をコードする核酸に相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12を用いて行うことができる。目的のタンパク質に相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて行うことができる。比較目的でギャップ付きアライメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようなギャップ付きBLASTを利用してもよい。あるいは、PSI-BLASTを使用して、分子間の離れた関係性を検出する、反復検索を行ってもよい（同上）。BLAST、ギャップ付きBLAST、およびPSI-BLASTプログラムを利用する場合には、それぞれのプログラム（たとえば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトのパラメーターを使用することができる。配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCGの配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するのにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120の加重残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用することができる。配列分析のためのさらなるアルゴリズム

10

20

30

40

50

ムは、当該技術分野において公知であり、これには、Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5に記載されるA D V A N C EおよびA D A M、ならびにPearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8に記載されるF A S T Aが挙げられる。F A S T A内で、k t u pは、検索の感度および速度を設定する制御選択肢である。k t u p = 2の場合には、比較されている2つの配列における類似の領域が、アライメントされた残基の対を検索することによって見出され、k t u p = 1の場合には、単一のアライメントされるアミノ酸が検索される。k t u pは、タンパク質配列については2もしくは1に設定することができ、またはD N A配列については1 ~ 6に設定することができる。k t u pが指定されない場合のデフォルトは、タンパク質については2であり、D N Aについては6である。あるいは、タンパク質配列アライメントは、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402によって記載されているC L U S T A L W アルゴリズムを使用して実行してもよい。

【0041】

本明細書において使用される「共有結合により連結された」という用語は、残基間の直接的な共有結合、または2つの残基が直接的に結合されるのではなく、両方の残基が中間分子もしくはドメイン、たとえば、免疫グロブリンの中間ドメインに共有結合により連結される間接的な会合のいずれも意味する。

【0042】

「競合する」または「交差競合する」という用語は、抗体分子、たとえば、本発明のD L L 3抗体分子の、標的、たとえば、ヒトD L L 3への結合を妨害する、抗体分子の能力を指して、本明細書において互換可能に使用される。結合の妨害は、直接的であっても間接的（たとえば、抗体分子もしくは標的のアロステリック調節を通じたもの）であってもよい。抗体分子が、別の抗体分子の標的への結合を妨害することができる程度、およびしたがってそれが競合すると称され得るかどうかは、競合的結合アッセイ、たとえば、F A C Sアッセイ、E L I S A、またはB I A C O R Eアッセイを使用して判定することができる。一部の実施形態において、競合結合アッセイは、定量的競合アッセイである。一部の実施形態において、第1の抗D L L 3抗体分子の標的への結合が、競合結合アッセイ（たとえば、本明細書に記載される競合アッセイ）において、10%またはそれ以上、たとえば、20%またはそれ以上、30%またはそれ以上、40%またはそれ以上、50%またはそれ以上、55%またはそれ以上、60%またはそれ以上、65%またはそれ以上、70%またはそれ以上、75%またはそれ以上、80%またはそれ以上、85%またはそれ以上、90%またはそれ以上、95%またはそれ以上、98%またはそれ以上、99%またはそれ以上低減される場合に、第1の抗D L L 3抗体分子は、標的への結合に関して、第2の抗D L L 3抗体分子と競合すると称される。

明示的な記述なしに、また別意図されない限り、本技術が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体に関する場合、そのようなものの同等物または生物学的同等物は、本技術の範囲内であることが意図されると推定される。

【0043】

本明細書において使用される場合、「その生物学的同等物」という用語は、参照タンパク質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または核酸に言及する場合、「その同等物」と同義であることが意図され、相同性は最小限であるが、依然として所望される構造または機能性を維持するものを意図する。本明細書において別途記述されない限り、本明細書において言及される任意の核酸、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、または抗体はまた、その同等物を含むことが企図される。たとえば、同等物は、少なくとも約80%の相同性または同一性を意図し、代替として少なくとも約85%、または代替として少なくとも約90%、または代替として少なくとも約95%、または代替として98%の相同性または同一性パーセントを意図し、参照タンパク質、ポリペプチド、抗体、または核酸と実質的に同等の生物学的活性を呈する。

【0044】

本明細書において使用される場合、「検出可能な標識」という用語は、検出可能なシグ

ナル、すなわち、比色、蛍光、電気、放射性、および化学発光性シグナルを含む、物理的または化学的シグナルを產生することができ、視覚的または機器を用いた方法によって測定することができ、サンプル中の標識の存在および／または量／濃度を示す、分子、化合物、または組成物を指す。

「検出可能なシグナル」は、光子（無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視光周波数、および紫外線周波数の光子を含む）の吸収、放出、および／または散乱を含む、様々な機序によって生成され得、これには、比色、蛍光、電気、放射性、および化学発光性シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本明細書において使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、および／または転写されたmRNAが、続いてペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドが、ゲノムDNAに由来する場合、発現には、真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれ得る。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織サンプル中のmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって判定することができる。

本明細書において使用される場合、「生物学的サンプル」という用語は、生細胞に由来するかまたはそれが接触したサンプル材料を意味する。この用語は、対象から単離された組織、細胞、および生物学的流体を含むことを意図する。本明細書において使用される場合、「組織サンプル」という用語は、細胞がサンプルを得た対象内に存在していたように、細胞間の横断面の空間的関係性を保存する細胞サンプルを指すものとする。生物学的サンプルはまた、内部器官の生検またはがんから得られてもよい。

【0046】

「組織化学法」および「細胞化学法」は、サンプルを、顕微鏡において視覚化することができる様式で、分子に特異的に結合する薬剤で標識することによって、インタクトな細胞の環境内の分子を特定するために使用される技法である。「免疫組織化学法」および「免疫細胞化学法」は、抗体を使用して分子を標識する種類の組織化学法および細胞化学法である。

【0047】

本発明の多重特異性結合タンパク質

本発明は、DLL3に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合ユニット（第1の抗原結合ユニット）と、CD3に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合ユニット（第2の抗原結合ユニット）とを含む、多重特異性結合タンパク質を提供する。そのような（多重特異性）結合タンパク質はまた、本明細書において、（多重特異性）結合分子またはDLL3/CD3結合タンパク質またはDLL3/CD3結合分子とも称される。

本発明者らは、驚くべきことに、本発明の多重特異性結合タンパク質が、T細胞の存在下において、DLL3陽性SCC細胞株の選択的溶解を誘導し、低いエフェクター対標的細胞比ですら活性であることを見出した。重要なことに、本発明の結合タンパク質は、DLL3陽性細胞の不在下におけるT細胞活性化、T細胞増殖、およびサイトカイン分泌を引き起こさず、DLL3陰性細胞の溶解も引き起こさない。

曖昧さを回避するために、本明細書において使用されるDLL3は、UniProt Q9NYJ7のヒトDLL3、およびそのタンパク質をコードする核酸配列を指す。本明細書において使用されるCD3は、ヒトCD3イプシロン（UniProt P07766）およびCD3ガンマ（UniProt: P09693）複合体（ヒトCD3εγ複合体）を指す。

【0048】

T細胞の再指向は、化学療法に対する耐性によって影響を受けず、細胞表面上の発現レベルが低いことは、この作用様式にあまり重要ではないため、二重特異性T細胞エンゲージアプローチを用いてDLL3を標的化することは、ADCアプローチに優る利点を提供することが期待される。T細胞エンゲージャーは、T細胞上のCD3に対する結合アームと、腫瘍細胞の細胞表面上の抗原に対する結合アームとを有する、多重特異性結合タンバ

ク質である。T細胞および腫瘍細胞に同時に結合することにより、T細胞エンゲージャーは、これらの2つの細胞間で細胞溶解性シナプスの形成を強制的に行い、そうして、T細胞活性を、標的とされる腫瘍細胞へと選択的に再指向させる。

【0049】

一態様において、本発明の多重特異性結合タンパク質は、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含み、ここで、前記第1の結合ユニットは、i) ~ x v i i i) :

i) 配列番号1 (CDR1)、配列番号2 (CDR2)、および配列番号3 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号4 (CDR1)、配列番号5 (CDR2)、および配列番号6 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 1)、

i i) 配列番号7 (CDR1)、配列番号8 (CDR2)、および配列番号9 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号10 (CDR1)、配列番号11 (CDR2)、および配列番号12 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 2)、

i i i) 配列番号13 (CDR1)、配列番号14 (CDR2)、および配列番号15 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号16 (CDR1)、配列番号17 (CDR2)、および配列番号18 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 3)、

i v) 配列番号19 (CDR1)、配列番号20 (CDR2)、および配列番号21 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号22 (CDR1)、配列番号23 (CDR2)、および配列番号24 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 4)、

v) 配列番号25 (CDR1)、配列番号26 (CDR2)、および配列番号27 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号28 (CDR1)、配列番号29 (CDR2)、および配列番号30 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 5)、

v i) 配列番号31 (CDR1)、配列番号32 (CDR2)、および配列番号33 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号34 (CDR1)、配列番号35 (CDR2)、および配列番号36 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 6)、

v i i) 配列番号133 (CDR1)、配列番号134 (CDR2)、および配列番号135 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号136 (CDR1)、配列番号137 (CDR2)、および配列番号138 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 7)、

v i i i) 配列番号139 (CDR1)、配列番号140 (CDR2)、および配列番号141 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号142 (CDR1)、配列番号143 (CDR2)、および配列番号144 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 8)、

i x) 配列番号145 (CDR1)、配列番号146 (CDR2)、および配列番号147 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号148 (CDR1)、配列番号149 (CDR2)、および配列番号150 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 9)、

【0050】

x) 配列番号151 (CDR1)、配列番号152 (CDR2)、および配列番号153 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号154 (CDR1)、配列番号155 (CDR2)、および配列番号156 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット (抗原結合ユニットDLL3 # 10)、

x i) 配列番号157 (CDR1)、配列番号158 (CDR2)、および配列番号159 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号160 (CDR1

10

20

30

40

50

)、配列番号161(CDR2)、および配列番号162(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#11)、
 xii)配列番号163(CDR1)、配列番号164(CDR2)、および配列番号165(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号166(CDR1)、配列番号167(CDR2)、および配列番号168(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#12)、
 xiii)配列番号169(CDR1)、配列番号170(CDR2)、および配列番号171(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号172(CDR1)、配列番号173(CDR2)、および配列番号174(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#13)、
 xiv)配列番号175(CDR1)、配列番号176(CDR2)、および配列番号177(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号178(CDR1)、配列番号179(CDR2)、および配列番号180(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#14)、
 xv)配列番号181(CDR1)、配列番号182(CDR2)、および配列番号183(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号184(CDR1)、配列番号185(CDR2)、および配列番号186(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#15)、
 xvi)配列番号187(CDR1)、配列番号188(CDR2)、および配列番号189(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号190(CDR1)、配列番号191(CDR2)、および配列番号192(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#16)、
 xvii)配列番号193(CDR1)、配列番号194(CDR2)、および配列番号195(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号196(CDR1)、配列番号197(CDR2)、および配列番号198(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#17)、
 ならびに
 xviii)配列番号199(CDR1)、配列番号200(CDR2)、および配列番号201(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号202(CDR1)、配列番号203(CDR2)、および配列番号204(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットDLL3#18)からなる群から選択される。

好ましくは、本発明の結合タンパク質の第1の抗原結合ユニットは、上述のCDR配列によって定義されるi)~iii)のうちのいずれか1つである。

曖昧さを回避するために、本明細書において列挙される特定の実施形態のそれぞれはまた、本発明の独立した態様と考えることができる。

【0051】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、CD3に特異的に結合する前記第2の抗原結合ユニットは、i)~iii):

i)配列番号55(CDR1)、配列番号56(CDR2)、および配列番号57(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号58(CDR1)、配列番号59(CDR2)、および配列番号60(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットCD3#1)、
 ii)配列番号61(CDR1)、配列番号62(CDR2)、および配列番号63(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号64(CDR1)、配列番号65(CDR2)、および配列番号66(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDRを含む、抗原結合ユニット(抗原結合ユニットCD3#2)、ならびに
 iii)配列番号96(CDR1)、配列番号97(CDR2)、および配列番号98(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号99(CDR1)、配列番号100(CDR2)、および配列番号101(CDR3)のアミノ酸配列を含む、

重鎖 C D R を含む、抗原結合ユニット（抗原結合ユニット C D 3 # 3）
からなる群から選択される。

【 0 0 5 2 】

上記に概説される第 1 の抗原結合ユニット i) ~ x v i i i) は、それぞれ、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、および D L L 3 # 18 と称され、上記に概説される第 2 の抗原結合ユニット i) ~ i i i) は、それぞれ、C D 3 # 1、C D 3 # 2、および C D 3 # 3 と称される。本発明の特定の抗原結合ユニットおよび全長結合タンパク質に対する個々のアミノ酸配列の特定を容易に可能にする配列表が、本明細書において提供される。概要は、実施例 2 の表 1 に提供されている。

10

【 0 0 5 3 】

概して抗原結合ユニットに関する「第 1」および「第 2」という用語は、本明細書において使用される場合、単純に、これらのユニットが、2 つの異なるユニットであることを示すことを意図する（これらは、異なる標的抗原に結合するため）。したがって、これらの用語は、本発明の結合タンパク質内におけるこれらのユニットの厳密な順序または順番を指すと理解されるものではない。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、および D L L 3 # 18 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される C D 3 # 1 の第 2 の抗原結合ユニットとを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、および D L L 3 # 3 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される C D 3 # 1 の第 2 の抗原結合ユニットとを含む。

20

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、および D L L 3 # 18 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される C D 3 # 2 の第 2 の抗原結合ユニットとを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、および D L L 3 # 3 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される C D 3 # 2 の第 2 の抗原結合ユニットとを含む。

30

40

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、および D L L 3 # 18 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される C D 3 # 3 の第 2 の抗原結合ユニットとを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、上記のそれぞれの C D R 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、および D L L 3 # 3 からなる群から選択される第 1 の抗原結合ユニットと、上記のそれぞれの C D

50

R配列によって定義されるCD3#3の第2の抗原結合ユニットとを含む。

【0057】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号1(CDR1)、配列番号2(CDR2)、および配列番号3(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号4(CDR1)、配列番号5(CDR2)、および配列番号6(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号55(CDR1)、配列番号56(CDR2)、および配列番号57(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号58(CDR1)、配列番号59(CDR2)、および配列番号60(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

10

【0058】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号7(CDR1)、配列番号8(CDR2)、および配列番号9(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号10(CDR1)、配列番号11(CDR2)、および配列番号12(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号55(CDR1)、配列番号56(CDR2)、および配列番号57(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号58(CDR1)、配列番号59(CDR2)、および配列番号60(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

20

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号13(CDR1)、配列番号14(CDR2)、および配列番号15(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号16(CDR1)、配列番号17(CDR2)、および配列番号18(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号55(CDR1)、配列番号56(CDR2)、および配列番号57(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号58(CDR1)、配列番号59(CDR2)、および配列番号60(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

30

【0059】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号1(CDR1)、配列番号2(CDR2)、および配列番号3(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号4(CDR1)、配列番号5(CDR2)、および配列番号6(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号61(CDR1)、配列番号62(CDR2)、および配列番号63(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号64(CDR1)、配列番号65(CDR2)、および配列番号66(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

40

【0060】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号7(CDR1)、配列番号8(CDR2)、および配列番号9(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号10(CDR1)、配列番号11(CDR2)、および配列番号12(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号61(CDR1)、配列番号62(CDR2)、および配列番号63(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号64(CDR1)、配列番号65(CDR2)、および配列番号66(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

50

【0061】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号13(CDR

1)、配列番号14(CDR2)、および配列番号15(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号16(CDR1)、配列番号17(CDR2)、および配列番号18(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、配列番号61(CDR1)、配列番号62(CDR2)、および配列番号63(CDR3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR、ならびに配列番号64(CDR1)、配列番号65(CDR2)、および配列番号66(CDR3)のアミノ酸配列を含む重鎖CDRを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

本明細書に記載されるCDR配列に加えて、本発明の結合タンパク質の抗原結合ユニットは、免疫グロブリンフレームワーク領域(FR)配列を含む。これらの配列は、好ましくは、ヒトにおいて免疫原性でなく、したがって、好ましくは、ヒトまたはヒト化FR配列である。好適なヒトまたはヒト化FR配列は、当該技術分野において公知である。特に好ましいFR配列は、完全な抗原結合ユニット、ならびにそれによってCDR配列およびFR配列を開示している、本明細書に示される実施形態から得ることができる。

【0062】

本発明の結合タンパク質の好ましい実施形態において、第1および第2の結合ユニットは、それぞれ、抗体分子に由来する軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含み、前記軽鎖/重鎖可変ドメインは、第1の抗原結合ユニットについてはDLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17、またはDLL3#18のうちのいずれか1つのCDR配列によって定義され、前記軽鎖/重鎖可変ドメインは、第2の抗原結合ユニットについては、CD3#1、CD3#2、またはCD3#3のうちのいずれか1つのCDR配列によって定義される。本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17、DLL3#18、CD3#1、CD3#2、またはCD3#3のうちのいずれか1つまたは複数の抗原結合ユニットのVHおよび/またはVLドメインは、ヒトまたはヒト化VHおよび/またはVLドメインである。

本発明の好ましい実施形態において、第1の抗原結合ユニットの軽鎖/重鎖可変ドメインは、さらに、以下の通り定義される。

i) 配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#1)、または

ii) 配列番号39のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号40のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#2)、または

【0063】

iii) 配列番号41のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号42のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#3)、または

iv) 配列番号43のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号44のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#4)、または

v) 配列番号45のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#5)、または

vi) 配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#6)、または

vii) 配列番号205のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号206のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#7)、または

viii) 配列番号207のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号208のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(抗原結合ユニットDLL3#8)、または

ix) 配列番号209のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号210の

アミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 9）、または
 x) 配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 2 のア
 ミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 0）、または
 x i) 配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 4 の
 アミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 1）、または
 x i i) 配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 6
 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 2）、または
 x i i i) 配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1
 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 3）、または
 x i v) 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 0
 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 4）、または
 x v) 配列番号 2 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 2 の
 アミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 5）、または
 x v i) 配列番号 2 2 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 4
 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 6）、または
 x v i i) 配列番号 2 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2
 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 7）、または
 x v i i i) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2
 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットD L L 3 # 1 8）。

10

好ましくは、本発明の結合タンパク質の第 1 の抗原結合ユニットは、上述の V L および
 V H 配列によって定義される i) ~ i i i) のうちのいずれか 1 つである。

20

【 0 0 6 4 】

本発明の好ましい実施形態において、第 2 の抗原結合ユニットの軽鎖 / 重鎖可変ドメイ
 ンは、さらに、以下の通り定義される

i) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミ
 ノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットC D 3 # 1）、または
 i i) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミ
 ノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットC D 3 # 2）、または
 i i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 1 0 3
 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（抗原結合ユニットC D 3 # 3）。

30

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D
 L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 4 / C D 3 # 1、D L
 L 3 # 5 / C D 3 # 1、D L L 3 # 6 / C D 3 # 1、D L L 3 # 7 / C D 3 # 1、D L L
 3 # 8 / C D 3 # 1、D L L 3 # 9 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 1、D L L
 3 # 1 1 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 1、D
 L L 3 # 1 4 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 6 / C D 3 # 1
 、D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 / C D 3 #
 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 4 / C D 3 # 2
 、D L L 3 # 5 / C D 3 # 2、D L L 3 # 6 / C D 3 # 2、D L L 3 # 7 / C D 3 # 2、
 D L L 3 # 8 / C D 3 # 2、D L L 3 # 9 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 2、
 D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 3 / C D 3 #
 2、D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 6 / C D
 3 # 2、D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C
 D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3、D L L 3 # 4 / C D
 3 # 3、D L L 3 # 5 / C D 3 # 3、D L L 3 # 6 / C D 3 # 3、D L L 3 # 7 / C D 3
 # 3、D L L 3 # 8 / C D 3 # 3、D L L 3 # 9 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 0 / C D 3
 # 3、D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 3 / C
 D 3 # 3、D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 6
 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 3、D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 3 からなる群か

40

50

ら選択される第1および第2の抗原結合ユニットの組合せを含み、第1および第2の抗原結合ユニットは、上述の抗原結合ユニットのCDRならびに/またはVHおよびVL配列によって定義される。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、DLL3 #1 / CD3 #1、DLL3 #2 / CD3 #1、DLL3 #3 / CD3 #1、DLL3 #1 / CD3 #2、DLL3 #2 / CD3 #2、DLL3 #3 / CD3 #2、DLL3 #1 / CD3 #3、DLL3 #2 / CD3 #3、およびDLL3 #3 / CD3 #3 からなる群から選択される第1および第2の抗原結合ユニットの組合せを含み、第1および第2の抗原結合ユニットは、上述の抗原結合ユニットのCDRならびに/またはVHおよびVL配列によって定義される。

【0066】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号67のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

【0067】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号39のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号40のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号67のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

【0068】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号41のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号42のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号67のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号68のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号37のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号70のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

【0069】

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号39のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号40のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号70のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

1つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i)配列番号41のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号42のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、DLL3に特異的に結合する第1の抗原結合ユニットと、(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号70のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、CD3に特異的に結合する第2の抗原結合ユニットとを含む。

【0070】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、i) 直接的にもしくは第1のペプチドリンカーを用いて間接的にのいずれかで、第1の重鎖可変ドメインに共有結合により連結された第1の軽鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ユニット(たとえば、上述のそれぞれのC D R もしくはV H / V L 配列によって定義されるD L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくはD L L 3 # 18のうちのいずれか1つ)、ならびに/またはii) 直接的にもしくは第2のペプチドリンカーを用いて間接的にのいずれかで、第2の重鎖可変ドメインに共有結合により連結された第2の軽鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第2の抗原結合ユニット(たとえば、上述のそれぞれのC D R もしくはV H / V L 配列によって定義されるC D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくはC D 3 # 3)を含む。

10

【0071】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、第1および/または第2の抗原結合ユニットは、従来の抗体分子の軽鎖/重鎖F a b ドメインにあるようなC L およびC H 1 ドメインをさらに含み、したがって、前記第1の結合ユニットは、a) 第1のC L ドメインに共有結合により連結された(直接的もしくは間接的に結合した)、V L ドメイン(たとえば、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくはD L L 3 # 18のうちのいずれか1つの軽鎖C D R (L C C D R) もしくはV L 配列によって定義される)と、b) 第1のC H 1 ドメインに共有結合により連結された(直接的もしくは間接的に結合した)、V H ドメイン(たとえば、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくはD L L 3 # 18のうちのいずれか1つの重鎖C D R (H C C D R) もしくはV H 配列によって定義される)とを含み、かつ/または前記第2の抗原結合ユニットは、a) 第2のC L ドメインに共有結合により連結された(直接的もしくは間接的に結合した)、V L ドメイン(たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくはC D 3 # 3のうちのいずれか1つのL C C D R もしくはV L 配列によって定義される)と、b) 第2のC H 1 ドメインに共有結合により連結された(直接的もしくは間接的に結合された)、V H ドメイン(たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくはC D 3 # 3のうちのいずれか1つのH C C D R もしくはV H 配列によって定義される)とを含む。

20

30

【0072】

本発明の文脈において、C L ドメインは、抗体軽鎖、たとえば、カッパ(κ)またはラムダ(λ)軽鎖の定常ドメインである。カッパ軽鎖の定常領域の例は、配列番号87に示される。ラムダ軽鎖の定常領域の例は、配列番号88に示される。一部の実施形態において、第1および第2のC L ドメインは、同じであり、たとえば、第1および第2のC L ドメインは、いずれも、カッパ軽鎖定常ドメインであるか、または第1および第2のC L ドメインは、いずれも、ラムダ軽鎖定常ドメインである。一部の実施形態において、第1および第2のC L ドメインは、異なり、たとえば、第1のC L ドメインがカッパ定常ドメインであり、第2のC L ドメインがラムダ定常ドメインであるか、またはその逆も同様である。

40

本発明の文脈において、C H 1 ドメインは、抗体重鎖の第1の定常ドメインである。C H 1 定常ドメインの例は、配列番号253に示される。

【0073】

本発明の結合タンパク質の好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質の第1の抗原結合ユニット(たとえば、上記に概説されるC D R および/もしくはV H / V L 配

50

列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくは D L L 3 # 18 のうちのいずれか 1 つ) は、N から C 末端へ、第 1 の軽鎖可変ドメイン、第 1 の C L ドメイン、第 1 のリンカーペプチド、第 1 の V H ドメイン、および第 1 の C H 1 ドメインを含み、かつ / または本発明の結合タンパク質の第 2 の結合ユニット (たとえば、上記に概説される C D R および / もしくは V H / V L 配列によって定義される C D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくは C D 3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、N から C 末端へ、第 2 の軽鎖可変ドメイン、第 2 の C L ドメイン、第 2 のリンカーペプチド、第 2 の V H ドメイン、および第 2 の C H 1 ドメインを含む。この実施形態において、第 1 および / または第 2 の結合ユニットは、一本鎖 F a b の構造を有する。いずれについても、第 1 および / または第 2 の抗原結合ユニットは、一本鎖 F a b を形成する場合、抗原結合ユニットが、N から C 末端の方向に、V H - C H 1 - [リンカーペプチド] - V L - C L を含むように、順序は逆転してもよい。本発明のタンパク質の一部の実施形態において、第 1 および / または第 2 の抗原結合ユニットが、F a b または一本鎖 F a b を含む場合、定常ドメインは、同じ種類のものであってもよく (たとえば、両方の C L ドメインが、カッパもしくはラムダ軽鎖定常ドメインである)、または異なる種類のものであってもよい (第 1 の C L ドメインがカッパ軽鎖定常ドメインであり、第 2 の C L ドメインがラムダ軽鎖定常ドメインであるか、もしくはその逆も同様である)。

【0074】

一態様において、本発明の結合タンパク質において使用されるリンカーは、26 ~ 42 個のアミノ酸、たとえば、30 ~ 40 個のアミノ酸を含む。さらなる態様において、本発明のタンパク質において使用されるリンカーは、34 ~ 40 個のアミノ酸、たとえば、36 ~ 39 個のアミノ酸、たとえば、38 個のアミノ酸を含む。一部の実施形態において、リンカーは、配列番号 89、90、91、92、93、94、または 95 のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、配列番号 89 の配列を含む。

リンカー配列は、天然に存在する配列であってもよく、または非天然の配列であってもよい。治療目的で 사용되는場合、リンカーは、好ましくは、本発明の結合タンパク質が投与される対象において、非免疫原性である。

リンカー配列の 1 つの有用な群は、国際公開第 1996 / 34103 号および同第 1994 / 04678 号に記載される重鎖抗体のヒンジ領域に由来するリンカーである。他の例は、A l a - A l a - A l a などのポリ - アラニンリンカー配列である。

【0075】

リンカー配列のさらなる好ましい例は、異なる長さの G l y / S e r リンカー、たとえば、例として (g l y 4 s e r) 3、(g l y 4 s e r) 5、(g l y 4 s e r) 7、(g l y 3 s e r) 3、(g l y 3 s e r) 5、(g l y 3 s e r) 7、(g l y 3 s e r 2) 3、(g l y 3 s e r 2) 5、および (g l y 3 s e r 2) 7 を含む、(g l y x s e r y) z リンカー、または配列番号 89 ~ 95 のうちのいずれか 1 つのリンカーである。

【0076】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、第 1 の抗原結合ユニットの V L ドメイン (たとえば、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、または D L L 3 # 18 の軽鎖 C D R (L C C D R) または V L 配列によって定義される) は、第 1 の G l y / S e r リンカー (たとえば、26 ~ 42 個のアミノ酸、30 ~ 40 個のアミノ酸、34 ~ 40 個のアミノ酸、または 36 ~ 39 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、38 個のアミノ酸の G l y / S e r リンカー) を介して、第 1 の抗原結合ユニットの V H ドメイン (たとえば、D L L 3 #

1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、またはD L L 3 # 18の重鎖C D R (H C C D R) またはV H 配列によって定義される) に共有結合により連結されており(たとえば、直接的に結合しており)、第2の抗原結合ユニットのV L ドメイン(たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、またはC D 3 # 3の軽鎖C D R (L C C D R) またはV L 配列によって定義される) は、第2のG l y / S e r リンカー(たとえば、26~42個のアミノ酸、30~40個のアミノ酸、34~40個のアミノ酸、または36~39個のアミノ酸のうちのいずれか1つ、好ましくは、38個のアミノ酸のG l y / S e r リンカー) を介して、第2の抗原結合ユニットのV H ドメイン(たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、またはC D 3 # 3の重鎖C D R (H C C D R) またはV H 配列によって定義される) に共有結合により連結されている(たとえば、直接的に結合している)。より好ましくは、第1および第2のリンカーは、同じである。さらにより好ましくは、第1および第2のリンカーは、それぞれ、配列番号89のアミノ酸配列を含む。

【0077】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 に特異的な第1の抗原結合ユニットを形成する、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号234、配列番号235、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、および配列番号240からなる群から選択される配列を含む第1の一本鎖F a b と、C D 3 に特異的な第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号71の第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号49の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号71の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号50の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号71の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号51の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号71の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。

【0078】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 に特異的な第1の抗原結合ユニットを形成する、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号234、配列番号235、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、および配列番号240からなる群から選択される配列を含む第1の一本鎖F a b と、C D 3 に特異的な第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号72の第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号49の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号72の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号50の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号72の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号51の配列を含む、第1の抗原結合ユニットを形成する第1の一本鎖F a b と、第2の抗原結合ユニットを形成する、配列番号72の配列を含む第2の一本鎖F a b とを含む。

【0079】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 に特異的な第1の抗原結合ユニットを形成する、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、

配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 0、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 7、配列番号 2 3 8、配列番号 2 3 9、および配列番号 2 4 0 からなる群から選択される配列を含む第 1 の一本鎖 F a b と、C D 3 に特異的な第 2 の抗原結合ユニットを形成する、配列番号 1 0 4 の第 2 の一本鎖 F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号 4 9 の配列を含む、第 1 の抗原結合ユニットを形成する第 1 の一本鎖 F a b と、第 2 の抗原結合ユニットを形成する、配列番号 1 0 4 の配列を含む第 2 の一本鎖 F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号 5 0 の配列を含む、第 1 の抗原結合ユニットを形成する第 1 の一本鎖 F a b と、第 2 の抗原結合ユニットを形成する、配列番号 1 0 4 の配列を含む第 2 の一本鎖 F a b とを含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、配列番号 5 1 の配列を含む、第 1 の抗原結合ユニットを形成する第 1 の一本鎖 F a b と、第 2 の抗原結合ユニットを形成する、配列番号 1 0 4 の配列を含む第 2 の一本鎖 F a b とを含む。

10

20

30

40

50

【0080】

一部の実施形態において、第 1 の抗原結合ユニット（たとえば、上記に概説される C D R および / もしくは V H / V L 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくは D L L 3 # 18）ならびに / または第 2 の抗原結合ユニット（たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくは C D 3 # 3）は、C L ドメインに共有結合により連結された（たとえば、直接的に結合した）V L ドメインおよび C H 1 ドメインに連結された V H ドメインを含み（すなわち、一緒になって抗体に由来する F a b フラグメントを形成しており）、前記 C H 1 ドメインは、さらに、F c ドメインに共有結合により連結され（たとえば、直接的に結合し）、それによって、1 つの軽鎖および 1 つの重鎖を有する従来の Y 字型の抗体分子のアームが形成される。一部の実施形態において、第 1 および第 2 の抗原結合ユニットは、それぞれが、F a b フラグメント、すなわち、第 1 および第 2 の F a b フラグメントを形成し、これが、それぞれ、第 1 および第 2 の F c ドメインに共有結合により連結され（たとえば、直接的に結合し）、それによって、従来のヘテロ四量体二重特異性および二価抗体分子が形成される。

【0081】

好ましい実施形態において、第 1 の抗原結合ユニット（たとえば、上記に概説される C D R および / もしくは V H / V L 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、もしくは D L L 3 # 18 のうちのいずれか 1 つ）ならびに / または第 2 の抗原結合ユニット（たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、もしくは C D 3 # 3 のうちのいずれか 1 つ）は、一本鎖 F a b、すなわち、ペプチドリンカー（たとえば、2 6 ~ 4 2 個のアミノ酸、3 0 ~ 4 0 個のアミノ酸、3 4 ~ 4 0 個のアミノ酸、もしくは 3 6 ~ 3 9 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、3 8 個のアミノ酸の G l y / S e r リンカー、さらにより好ましくは、配列番号 8 9 のリンカー）を介して、重鎖の V H - C H 1 ドメインに共有結合により連結された、抗体軽鎖（V L - C L）を含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 に特異的に結合する第 1 の一本鎖 F a b（たとえば、上記のそれぞれの C D R または V H / V L 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、または D L L 3 # 18 のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、第 1 の抗原結合ユニットは、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3 である）および第 1 の F c ドメインを含む、第 1 のポリペプチド鎖

(このポリペプチド鎖は、本明細書において「D L L 3 鎖」とも称される)、ならびに C D 3 に特異的に結合する第 2 の一本鎖 F a b (たとえば、上記のそれぞれの C D R または V H / V L 配列によって定義される C D 3 # 1、C D 3 # 2、または C D 3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) および第 2 の F c ドメインを含む、第 2 のポリペプチド鎖(このポリペプチド鎖は、本明細書において「C D 3 鎖」とも称される)を含む。一部の実施形態において、第 1 および第 2 の F c ドメインは、同じである。好ましい実施形態において、第 1 および第 2 の F c ドメインは、異なる。本発明の結果として得られる結合タンパク質は、全長 F c を有し、D L L 3 に対する第 1 の結合ユニットおよび C D 3 に対する第 2 の結合ユニットという 2 つの独立した結合部位を有する。一部の実施形態において、第 1 の抗原結合ユニットは、単一のポリペプチド鎖(D L L 3 鎖)からなる。一部の実施形態において、第 2 の抗原結合ユニットは、単一のポリペプチド鎖(C D 3 鎖)からなる。一部の実施形態において、第 1 および第 2 の抗原結合ユニットはいずれも、それぞれ、単一のポリペプチド鎖からなる。

【0082】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質の第 1 の抗原結合ユニットは、第 1 のポリペプチド鎖(D L L 3 鎖)によって形成され、第 2 の抗原結合ユニットは、第 2 のポリペプチド鎖(C D 3 鎖)によって形成される。したがって、一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、それぞれが異なる特異性を有する抗原結合ユニットを含む、2 つの異なるポリペプチド鎖を含み、これらのポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合を介して、または可能性としてペプチドリンカーを介してのいずれかで、互いに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、一方のポリペプチド鎖(第 1 のポリペプチド鎖または D L L 3 鎖)が、D L L 3 に特異的に結合する抗原結合ユニット(たとえば、それぞれの C D R および / または V H / V L 配列によって定義される D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 10、D L L 3 # 11、D L L 3 # 12、D L L 3 # 13、D L L 3 # 14、D L L 3 # 15、D L L 3 # 16、D L L 3 # 17、または D L L 3 # 18 のうちのいずれか 1 つ)を含み、もう一方のポリペプチド鎖(第 2 のポリペプチド鎖または C D 3 鎖)が、C D 3 に特異的に結合する抗原結合ユニット(たとえば、C D 3 # 1、C D 3 # 2、または C D 3 # 3)を含む、2 つのポリペプチド鎖を含む二重特異性二価ヘテロ二量体タンパク質である。

【0083】

本発明の文脈において、F c ドメインは、I g G、たとえば、I g G₁、I g G₂、または I g G₄ の重鎖に由来する。たとえば、本発明の F c ドメインは、I g G₁ または I g G₄ の重鎖の F c ドメインであり、ヒンジ領域および 2 つの定常ドメイン(C_{H2} および C_{H3})を含む。F c ドメイン(ヒンジ領域を含む)の例は、配列番号 81 および 84 に示される。

【0084】

本発明のタンパク質のアミノ酸鎖におけるアミノ酸の番号付けは、別途示されない限り、E U 番号付けシステム(Edelman, Cunningham et al. 1969)に従う。これは、本明細書において示されるアミノ酸番号が、別途示されない限り、E U 番号付けに従って、対応するサブタイプ(たとえば、I g G₁ または I g G₄)の重鎖における位置に対応することを意味する。

【0085】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質における第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインは、それぞれ、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖のヘテロ二量体ではなく、第 1 または第 2 のポリペプチド鎖のホモ二量体の形成を低減させる、1 つまたは複数のアミノ酸変化を含む。これらの変化を通じて、重鎖のうちの一方の境界部に由来する 1 つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖が、より大きな側鎖(たとえば、チロシンまたはトリプトファン)と置き換わることによって、F c ドメインのうちの一方に、「突起」が生成される。他方の F c ドメインには、大きなアミノ酸側鎖が、より小さいもの(たとえば、ア

ラニンまたはスレオニン)と置き換わることによって、同一または類似のサイズの補完的「キャピティ」が形成される。これは、ヘテロ二量体の収率を、他の望ましくない最終産物、たとえば、ホモ二量体、特に、「突起」を有するFcドメインのホモ二量体よりも増加させるための機序を提供する(たとえば、Ridgway et al. Protein Eng, 1996. 9(7): p. 617-21、Atwell et al, JMB, 1997, 270, 26-35を参照されたい)。一部の実施形態において、そのようなアミノ酸変化は、第1のFcドメインの366位におけるチロシン(Y) [T 3 6 6 Y]、および第2のFcドメインの407位におけるスレオニン(T) [Y 4 0 7 T]である。一部の実施形態において、第1のFcドメインは、366位にセリン(S) [T 3 6 6 S]を含み、第2のFcドメインは、366位にトリプトファン(W) [T 3 6 6 W]、368位にアラニン(A) [L 3 6 8 A]、および407位にバリン(V) [Y 4 0 7 V]を含む。好ましい実施形態において、第1のFcドメインは、366位にトリプトファン(W) [T 3 6 6 W]を含み、第2のFcドメインは、366位にセリン(S) [T 3 6 6 S]、368位にアラニン(A) [L 3 6 8 A]、および407位にバリン(V) [Y 4 0 7 V]を含む。たとえば、配列番号81のヒトIgG1 Fc配列におけるアミノ酸146位に対応する、EU番号付けによるFcドメインの366位は、配列番号81における146位のTから、配列番号82における146位のWに変化しており、配列番号81におけるアミノ酸146位、148位、および187位にそれぞれ対応する、EU番号付けによる366位、368位、および407位は、配列番号81におけるこれらの位置のT、L、およびYから、配列番号83におけるこれらの位置のS、A、およびVに変化している。これらの実施形態のいずれにおいても、第1のFcドメインについて説明されたアミノ酸変化は、第2のFcドメインに位置してもよく、第2のFcドメインのそれぞれのアミノ酸変化は、第1のFcドメインに位置してもよい。換言すると、「第1」および「第2」という用語は、これらの実施形態において、交換されてもよい。一部の実施形態において、そのようなFcドメインは、IgG₁またはIgG₄の重鎖に由来するFcドメインである。

一部の実施形態において、第1のFcドメインは、366位におけるトリプトファン(W) [T 3 6 6 W]に加えて、354位にシステイン(C) [S 3 5 4 C]を含み、第2のFcドメインは、366位におけるセリン(S) [T 3 6 6 S]、368位におけるアラニン(A) [L 3 6 8 A]、および407位におけるバリン(V) [Y 4 0 7 V]に加えて、349位にシステイン(C) [Y 3 4 9 C]を含む。一態様において、そのようなFcドメインは、IgG₄の重鎖に由来するFcドメインである。

【0086】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質における第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、FcドメインのプロテインAへの結合を低減させる1つまたは複数のアミノ酸変化をさらに含む。一部の実施形態において、そのようなアミノ酸変化は、Fcドメインうちの一方の435位におけるアルギニン[H 4 3 5 R]および436位におけるフェニルアラニン[Y 4 3 6 F]である。いずれの変化も、ヒトIgG3の配列に由来する(IgG3は、プロテインAに結合しない)。これらの2つの突然変異は、CH3ドメインに位置し、プロテインAへの結合を低減させるために、Fcドメインのうちの一方に組み込まれる(たとえば、Jendeberg et al. J Immunol Methods, 1997. 201(1): p. 25-34を参照されたい)。これらの2つの変化は、タンパク質精製中に、これらの変化を含む重鎖のホモ二量体の除去を容易にする。

【0087】

一部の実施形態では、本発明の結合タンパク質において、407位にスレオニン(T) [Y 4 0 7 T]を含むFcドメインは、435位にアルギニン[H 4 3 5 R]および436位にフェニルアラニン[Y 4 3 6 F]をさらに含む。この事例において、他方の重鎖は、366位にチロシン(Y) [T 3 6 6 Y]を含むが、435位および436位における2つの変化を含まない。あるいは、一部の実施形態では、本発明のタンパク質において、366位にセリン(S) [T 3 6 6 S]、368位にアラニン(A) [L 3 6 8 A]、および407位にバリン(V) [Y 4 0 7 V]を含むFcドメインは、435位にアルギニ

ン[H 4 3 5 R] および 4 3 6 位にフェニルアラニン[Y 4 3 6 F] をさらに含む。この事例において、他方の F c ドメインは、3 6 6 位にトリプトファン(W) [T 3 6 6 W] を含むが、4 3 5 位および 4 3 6 位における 2 つの変化を含まない。したがって、上述のように「キャピティ」をもたらすアミノ酸変化を含む F c ドメインはまた、プロテイン A への結合を低減させるアミノ酸変化も含む。この F c ドメインを含むホモ二量体は、低減されたプロテイン A への結合により、除去される。「突起」を含む他方の F c ドメインのホモ二量体の産生は、「突起」の存在によって低減される。

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質の F c ドメインは、Y T E 突然変異(M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E 、 E U 番号付け(Dall'Acqua, Kiener et al. 2006)) をさらに含む場合も含まない場合もある。これらの突然変異は、p H 6 . 0 における新生児 F c R n 受容体に対する結合親和性の優先的な増強を通じて、F c ドメインの薬物動態特性を改善することが示されている。

一部の実施形態において、I g G 1 に由来する本発明の第 1 および / または第 2 の F c ドメインはまた、「K O」突然変異(L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A) も含む。さらなる態様において、I g G 4 に由来する本発明の第 1 および / または第 2 の F c ドメインはまた、P r o ヒンジ突然変異(S 2 2 8 P) も含む。

【 0 0 8 9 】

本発明の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、i) 配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 / C D 3 # 1) 、または i i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 2 / C D 3 # 1) 、または i i i) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 3 / C D 3 # 1) 、または i v) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 4 / C D 3 # 1) 、または v) 配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 5 / C D 3 # 1) 、または v i) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 6 / C D 3 # 1) 、または v i i) 配列番号 2 4 1 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 7 / C D 3 # 1) 、または v i i i) 配列番号 2 4 2 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 8 / C D 3 # 1) 、または i x) 配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 9 / C D 3 # 1) 、または x) 配列番号 2 4 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 1) 、または x i) 配列番号 2 4 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 1) 、または x i i) 配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 1) 、または x i i i) 配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 1) 、または x i v) 配列番号 2 4 8 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 1) 、または x v) 配列番号 2 4 9 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 1) 、または x v i) 配列番号 2 5 0 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖(D L L 3 # 1 6 / C D 3 # 1) 、または x v i i) 配列番号 2 5 1 のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号79のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#17/CD3#1)、またはxviii)配列番号252のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号79のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#18/CD3#1)を含む。好ましくは、第1および第2のポリペプチド鎖は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して連結され、従来のY字型の抗体分子に類似する抗体様構造(図1)を形成する。

【0090】

別の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号73、配列番号74、および配列番号75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、DLL3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号79のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

10

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号73のアミノ酸配列を含む、DLL3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号79のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号74のアミノ酸配列を含む、DLL3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号79のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号75のアミノ酸配列を含む、DLL3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号79のアミノ酸配列を含む、CD3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

20

【0091】

本発明の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、i)配列番号73のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#1/CD3#2)、またはii)配列番号74のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#2/CD3#2)、またはiii)配列番号75のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#3/CD3#2)、またはiv)配列番号76のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#4/CD3#2)、またはv)配列番号77のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#5/CD3#2)、またはvi)配列番号78のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#6/CD3#2)、またはvii)配列番号241のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#7/CD3#2)、またはviii)配列番号242のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#8/CD3#2)、またはix)配列番号243のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#9/CD3#2)、またはx)配列番号244のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#10/CD3#2)、またはxi)配列番号245のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#11/CD3#2)、またはxii)配列番号246のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#12/CD3#2)、またはxiii)配列番号247のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#13/CD3#2)、またはxiv)配列番号248のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(DLL3#14/CD3#2)、またはxv)配列番号249のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号80のアミノ酸配列を含む第2

30

40

50

のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 2)、または x v i) 配列番号 2 5 0 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 6 / C D 3 # 2)、または x v i i) 配列番号 2 5 1 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 2)、または x v i i i) 配列番号 2 5 2 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 2) を含む。好ましくは、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖は、1 つまたは複数のジスルフィド結合を介して連結され、従来の Y 字型の抗体分子に類似する抗体様構造 (図 1) を形成する。

【0092】

別の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 3、配列番号 7 4、および配列番号 7 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

1 つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

1 つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

1 つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 8 0 のアミノ酸配列を含む、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0093】

本発明の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、i) 配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 / C D 3 # 3)、または i i) 配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 2 / C D 3 # 3)、または i i i) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 3 / C D 3 # 3)、または i v) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 4 / C D 3 # 3)、または v) 配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 5 / C D 3 # 3)、または v i) 配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 6 / C D 3 # 3)、または v i i) 配列番号 2 4 1 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 7 / C D 3 # 3)、または v i i i) 配列番号 2 4 2 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 8 / C D 3 # 3)、または i x) 配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 9 / C D 3 # 3)、または x) 配列番号 2 4 4 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 3)、または x i) 配列番号 2 4 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 3)、または x i i) 配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 3)、または x i i i) 配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖および配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖 (D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 3)、

10

20

30

40

50

またはx i v) 配列番号248のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号105のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(D L L 3 # 14 / C D 3 # 3)、またはx v) 配列番号249のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号105のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(D L L 3 # 15 / C D 3 # 3)、またはx v i) 配列番号250のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号105のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(D L L 3 # 16 / C D 3 # 3)、またはx v i i) 配列番号251のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号105のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(D L L 3 # 17 / C D 3 # 3)、またはx v i i i) 配列番号252のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および配列番号105のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖(D L L 3 # 18 / C D 3 # 3)を含む。好ましくは、第1および第2のポリペプチド鎖は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して連結され、従来のY字型の抗体分子に類似する抗体様構造(図1)を形成する。

10

【0094】

別の好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号73、配列番号74、および配列番号75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、D L L 3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号105のアミノ酸配列を含む、C D 3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号73のアミノ酸配列を含む、D L L 3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号105のアミノ酸配列を含む、C D 3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

20

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号74のアミノ酸配列を含む、D L L 3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号105のアミノ酸配列を含む、C D 3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

1つの好ましい実施形態において、結合タンパク質は、配列番号75のアミノ酸配列を含む、D L L 3に特異的な第1のポリペプチド鎖と、配列番号105のアミノ酸配列を含む、C D 3に特異的な第2のポリペプチド鎖とを含む。

上述の実施形態のすべてについて、「含む」という用語を使用することにより、それぞれのドメインまたは分子が、示されるアミノ酸配列「からなる」実施形態も含むよう意図することを、理解されたい。

30

【0095】

さらなる態様において、本発明は、D L L 3に特異的に結合する第1のポリペプチド鎖と、C D 3に特異的に結合する第2のポリペプチド鎖とを含む、タンパク質であって、第1の鎖が、第1のリンカーに共有結合により連結された(たとえば、直接的に結合した)第1の軽鎖を含み、第1のリンカー自体が、第1の重鎖に共有結合により連結されており(たとえば、直接的に結合しており)、C D 3に特異的に結合する第2の鎖が、第2のリンカーに共有結合により連結された(たとえば、直接的に結合した)第2の軽鎖を含み、第2のリンカー自体が、第2の重鎖に共有結合により連結されている(たとえば、直接結合している)、タンパク質を提供する。

40

【0096】

一部の実施形態において、そのN末端から開始し、第1のポリペプチド鎖は、D L L 3に特異的に結合する第1の軽鎖可変領域、第1の軽鎖定常領域、第1のリンカー、D L L 3に特異的な第1の重鎖可変領域、および第1の重鎖定常領域を含む。一部の実施形態において、そのN末端から開始し、第2のポリペプチド鎖は、C D 3に特異的に結合する第2の軽鎖可変領域、第2の軽鎖定常領域、第2のリンカー、C D 3に特異的な第2の重鎖可変領域、および第2の重鎖定常領域を含む。

【0097】

結果として得られるタンパク質は、全長F cを有し、これは、I g Gよりもわずかに大きく、D L L 3に対する第1の結合部位およびC D 3に対する第2の結合部位である2つの独立した結合部位を有する(たとえば、それぞれの結合部位は、それぞれの抗原に対し

50

て一価である)。好ましくは、第1および第2のポリペプチド鎖は、1つまたは複数のジスルフィド結合を介して連結されている。そのため、本発明のタンパク質は、従来の全長抗体のY字型の構造を有する、抗体様構造体である(図1を参照されたい)。この二重特異性形式により、発現および精製後の不均質性が大幅に低減され(たとえば、異なる結合特異性を有する軽鎖および重鎖可変ドメインの誤った対合を回避することにより)、同時に、構造体内の結合部分の機能的特性が、望ましくない免疫原性反応を生成する可能性が低くなるように維持される。これはまた、たとえば、哺乳動物細胞において、ヘテロ二量体タンパク質の良好な発現も可能にする。

【0098】

本発明のタンパク質の一部の実施形態において、DLL3に特異的に結合する第1のポリペプチド鎖は、第1の軽鎖可変ドメインおよび第1の重鎖可変ドメインを含み、これらは、i) ~ xvi i i) :

i) 配列番号1(CDR1)、配列番号2(CDR2)、および配列番号3(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号4(CDR1)、配列番号5(CDR2)、および配列番号6(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

ii) 配列番号7(CDR1)、配列番号8(CDR2)、および配列番号9(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号10(CDR1)、配列番号11(CDR2)、および配列番号12(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

iii) 配列番号13(CDR1)、配列番号14(CDR2)、および配列番号15(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号16(CDR1)、配列番号17(CDR2)、および配列番号18(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

iv) 配列番号19(CDR1)、配列番号20(CDR2)、および配列番号21(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号22(CDR1)、配列番号23(CDR2)、および配列番号24(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

v) 配列番号25(CDR1)、配列番号26(CDR2)、および配列番号27(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号28(CDR1)、配列番号29(CDR2)、および配列番号30(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

vi) 配列番号31(CDR1)、配列番号32(CDR2)、および配列番号33(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号34(CDR1)、配列番号35(CDR2)、および配列番号36(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

vii) 配列番号133(CDR1)、配列番号134(CDR2)、および配列番号135(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号136(CDR1)、配列番号137(CDR2)、および配列番号138(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

【0099】

viii) 配列番号139(CDR1)、配列番号140(CDR2)、および配列番号141(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号142(CDR1)、配列番号143(CDR2)、および配列番号144(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

ix) 配列番号145(CDR1)、配列番号146(CDR2)、および配列番号147(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号148(CDR1)、配列番号149(CDR2)、および配列番号150(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

x) 配列番号151(CDR1)、配列番号152(CDR2)、および配列番号153(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号154(CDR1)、配列番号155(CDR2)、および配列番号156(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、

10

20

30

40

50

む、重鎖 C D R、

x i) 配列番号 1 5 7 (C D R 1)、配列番号 1 5 8 (C D R 2)、および配列番号 1 5 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 6 0 (C D R 1)、配列番号 1 6 1 (C D R 2)、および配列番号 1 6 2 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x i i) 配列番号 1 6 3 (C D R 1)、配列番号 1 6 4 (C D R 2)、および配列番号 1 6 5 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 6 6 (C D R 1)、配列番号 1 6 7 (C D R 2)、および配列番号 1 6 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x i i i) 配列番号 1 6 9 (C D R 1)、配列番号 1 7 0 (C D R 2)、および配列番号 1 7 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 7 2 (C D R 1)、配列番号 1 7 3 (C D R 2)、および配列番号 1 7 4 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x i v) 配列番号 1 7 5 (C D R 1)、配列番号 1 7 6 (C D R 2)、および配列番号 1 7 7 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 7 8 (C D R 1)、配列番号 1 7 9 (C D R 2)、および配列番号 1 8 0 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x v) 配列番号 1 8 1 (C D R 1)、配列番号 1 8 2 (C D R 2)、および配列番号 1 8 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 8 4 (C D R 1)、配列番号 1 8 5 (C D R 2)、および配列番号 1 8 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x v i) 配列番号 1 8 7 (C D R 1)、配列番号 1 8 8 (C D R 2)、および配列番号 1 8 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 9 0 (C D R 1)、配列番号 1 9 1 (C D R 2)、および配列番号 1 9 2 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

x v i i) 配列番号 1 9 3 (C D R 1)、配列番号 1 9 4 (C D R 2)、および配列番号 1 9 5 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 1 9 6 (C D R 1)、配列番号 1 9 7 (C D R 2)、および配列番号 1 9 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、ならびに

x v i i i) 配列番号 1 9 9 (C D R 1)、配列番号 2 0 0 (C D R 2)、および配列番号 2 0 1 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 2 0 2 (C D R 1)、配列番号 2 0 3 (C D R 2)、および配列番号 2 0 4 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R

からなる群から選択される C D R 配列を含む。

【 0 1 0 0 】

これらの C D R 配列によって定義されるそれぞれの軽鎖 / 重鎖可変ドメインは、それぞれ、D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 1 0、D L L 3 # 1 1、D L L 3 # 1 2、D L L 3 # 1 3、D L L 3 # 1 4、D L L 3 # 1 5、D L L 3 # 1 6、D L L 3 # 1 7、および D L L 3 # 1 8 と称される。好ましくは、C D R 配列は、上記に定義される i) ~ i i i) (D L L 3 # 1、D L L 3 # 2、D L L 3 # 3) からなる群から選択される。

【 0 1 0 1 】

本発明の結合タンパク質の好ましい実施形態において、C D 3 に特異的に結合する前記第 2 のポリペプチド鎖は、第 2 の軽鎖可変ドメインおよび第 2 の重鎖可変ドメインを含み、これらは、

i) 配列番号 5 5 (C D R 1)、配列番号 5 6 (C D R 2)、および配列番号 5 7 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 C D R、ならびに配列番号 5 8 (C D R 1)、配列番号 5 9 (C D R 2)、および配列番号 6 0 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 C D R、

10

20

30

40

50

i i) 配列番号 61 (CDR1)、配列番号 62 (CDR2)、および配列番号 63 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 64 (CDR1)、配列番号 65 (CDR2)、および配列番号 66 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、ならびに

i i i) 配列番号 96 (CDR1)、配列番号 97 (CDR2)、および配列番号 98 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 99 (CDR1)、配列番号 100 (CDR2)、および配列番号 101 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR

からなる群から選択される CDR 配列を含む。

これらの CDR 配列によって定義されるそれぞれの軽鎖 / 重鎖可変ドメインは、それぞれ、CD3 # 1、CD3 # 2、および CD3 # 3 と称される。

【0102】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 1 (CDR1)、配列番号 2 (CDR2)、および配列番号 3 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 4 (CDR1)、配列番号 5 (CDR2)、および配列番号 6 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、DLL3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 55 (CDR1)、配列番号 56 (CDR2)、および配列番号 57 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 58 (CDR1)、配列番号 59 (CDR2)、および配列番号 60 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、CD3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0103】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 7 (CDR1)、配列番号 8 (CDR2)、および配列番号 9 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 10 (CDR1)、配列番号 11 (CDR2)、および配列番号 12 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、DLL3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 55 (CDR1)、配列番号 56 (CDR2)、および配列番号 57 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 58 (CDR1)、配列番号 59 (CDR2)、および配列番号 60 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、CD3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0104】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 13 (CDR1)、配列番号 14 (CDR2)、および配列番号 15 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 16 (CDR1)、配列番号 17 (CDR2)、および配列番号 18 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、DLL3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 55 (CDR1)、配列番号 56 (CDR2)、および配列番号 57 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 58 (CDR1)、配列番号 59 (CDR2)、および配列番号 60 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、CD3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0105】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 1 (CDR1)、配列番号 2 (CDR2)、および配列番号 3 (CDR3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 4 (CDR1)、配列番号 5 (CDR2)、および配列番号 6 (CDR3) のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、DLL3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド

10

20

30

40

50

鎖と、(i i) 配列番号 6 1 (C D R 1)、配列番号 6 2 (C D R 2)、および配列番号 6 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 6 4 (C D R 1)、配列番号 6 5 (C D R 2)、および配列番号 6 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【 0 1 0 6 】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 7 (C D R 1)、配列番号 8 (C D R 2)、および配列番号 9 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 1 0 (C D R 1)、配列番号 1 1 (C D R 2)、および配列番号 1 2 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 6 1 (C D R 1)、配列番号 6 2 (C D R 2)、および配列番号 6 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 6 4 (C D R 1)、配列番号 6 5 (C D R 2)、および配列番号 6 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

10

【 0 1 0 7 】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 1 3 (C D R 1)、配列番号 1 4 (C D R 2)、および配列番号 1 5 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 1 6 (C D R 1)、配列番号 1 7 (C D R 2)、および配列番号 1 8 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を有する第 1 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 6 1 (C D R 1)、配列番号 6 2 (C D R 2)、および配列番号 6 3 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 6 4 (C D R 1)、配列番号 6 5 (C D R 2)、および配列番号 6 6 (C D R 3) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R を有する第 2 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

20

【 0 1 0 8 】

本発明のタンパク質の好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的に結合する前記第 1 のポリペプチド鎖は、i) ~ x v i i i) :

30

i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1)、

i i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 2)、

i i i) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 3)、

i v) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 4)、

v) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 5)、

40

v i) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 6)、

v i i) 配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 0 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 7)、

v i i i) 配列番号 2 0 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 0 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 8)、

i x) 配列番号 2 0 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 9)、

x) 配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 0)、

50

x i) 配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 1) 、
 x i i) 配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 2) 、
 x i i i) 配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 1 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 3) 、
 x i v) 配列番号 2 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 4) 、
 x v) 配列番号 2 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 5) 、
 x v i) 配列番号 2 2 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 6) 、
 x v i i) 配列番号 2 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 7) 、ならびに
 x v i i i) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1 8)
 からなる群から選択される、軽鎖可変ドメイン (第 1 の軽鎖可変ドメイン) および重鎖可変ドメイン (第 1 の重鎖可変ドメイン) を含む。

10

好ましくは、軽鎖可変および重鎖可変ドメインの配列は、上記に定義される i) ~ i i i) (D L L 3 # 1 、 D L L 3 # 2 、 D L L 3 # 3) からなる群から選択される。

20

【 0 1 0 9 】

本発明のタンパク質の好ましい実施形態において、C D 3 に特異的に結合する前記第 2 のポリペプチド鎖は、

i) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (C D 3 # 1) 、
 i i) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (C D 3 # 2) 、ならびに
 i i i) 配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (C D 3 # 3)
 からなる群から選択される、軽鎖可変ドメイン (第 2 の軽鎖可変ドメイン) および重鎖可変ドメイン (第 2 の重鎖可変ドメイン) を含む。

30

【 0 1 1 0 】

一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 4 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 5 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 6 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 7 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 8 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 9 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 6 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 1 、D L L 3 # 1 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 4 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 5 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 6 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 7 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 8 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 9 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 6 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 7 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 8 / C D 3 # 2 、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 4 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 5 / C D 3 # 3 および D L L 3 # 6 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 7 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 8 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 9 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 0 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 1 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 2 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 3 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 4 / C D 3 # 3 、D L L 3 # 1 5 / C D 3 # 3 、D L L 3 #

40

50

16 / C D 3 # 3、D L L 3 # 17 / C D 3 # 3、D L L 3 # 18 / C D 3 # 3 からなるリストから選択される軽鎖 / 重鎖可変ドメインの C D R ならびに / または V H および V L 配列を含む、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖を含む。好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、および D L L 3 # 3 / C D 3 # 3 からなるリストから選択される軽鎖 / 重鎖可変ドメインの C D R ならびに / または V H および V L 配列を含む、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖を含む。

【0111】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 37 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 38 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 67 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 68 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

10

【0112】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 39 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 40 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 67 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 68 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

20

【0113】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 41 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 42 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 67 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 68 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0114】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 37 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 38 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 69 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 70 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

30

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 39 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 40 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 69 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 70 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

1 つの好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質は、(i) 配列番号 41 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 42 の重鎖可変ドメインを含む、D L L 3 に特異的に結合する第 1 のポリペプチド鎖と、(i i) 配列番号 69 の軽鎖可変ドメインおよび配列番号 70 の重鎖可変ドメインを含む、C D 3 に特異的に結合する第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

40

【0115】

本発明の一部の実施形態において、第 1 および / または第 2 のリンカーペプチドは、上述のリンカー、たとえば、ヒンジ領域に由来するリンカー、ポリ - アラニンリンカー、または G l y / S e r リンカーを含み、ここで、リンカーは、26 ~ 42 個のアミノ酸、たとえば、30 ~ 40 個のアミノ酸、34 ~ 40 個のアミノ酸、または 36 ~ 39 個のアミノ酸のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、38 個のアミノ酸を含む。

好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番

50

号 2 2 9、配列番号 2 3 0、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 7、配列番号 2 3 8、配列番号 2 3 9、または配列番号 2 4 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 1 6 】

一部の実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 0、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 7、配列番号 2 3 8、配列番号 2 3 9、または配列番号 2 4 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む。

10

【 0 1 1 7 】

一部の実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 0、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 7、配列番号 2 3 8、配列番号 2 3 9、または配列番号 2 4 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む。

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む。

20

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む。

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む。

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む。

30

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む。

1 つの好ましい実施形態において、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含み、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 1 8 】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖は、I g G、たとえば、I g G 1、I g G 2、または I g G 4 の重鎖に由来する F c ドメインを含む。たとえば、本発明の F c ドメインは、I g G 1 または I g G 4 の重鎖の F c ドメインであり、ヒンジ領域および 2 つの定常ドメイン (C H 2 および C H 3) を含む。ヒト I g G の F c ドメインの例は、配列番号 8 1 および 8 4 に示される。

40

【 0 1 1 9 】

本発明の結合タンパク質の一部の実施形態において、重鎖は、1 つまたは複数のアミノ酸変化を含む。たとえば、そのようなアミノ酸変化は、第 1 の重鎖の 3 6 6 位におけるチロシン (Y) [T 3 6 6 Y]、および第 2 の重鎖の 4 0 7 位におけるスレオニン (T) [Y 4 0 7 T] である。一部の実施形態において、第 1 の重鎖は、3 6 6 位にセリン (S) [T 3 6 6 S] を含み、第 2 の重鎖は、3 6 6 位にトリプトファン (W) [T 3 6 6 W]、3 6 8 位にアラニン (A) [L 3 6 8 A]、および 4 0 7 位にバリン (V) [Y 4 0 7 V] を含む。好ましい実施形態において、第 1 の重鎖は、3 6 6 位にトリプトファン (W

50

）[T 3 6 6 W] を含み、第 2 の重鎖は、3 6 6 位にセリン（ S ）[T 3 6 6 S]、3 6 8 位にアラニン（ A ）[L 3 6 8 A]、および 4 0 7 位にバリン（ V ）[Y 4 0 7 V] を含む。たとえば、配列番号 8 1 のヒト I g G 1 F c 配列におけるアミノ酸 1 4 6 位に対応する、E U 番号付けによる F c ドメインの 3 6 6 位は、配列番号 8 1 における 1 4 6 位の T から、配列番号 8 2 における 1 4 6 位の W に変化しており、配列番号 8 1 におけるアミノ酸 1 4 6 位、1 4 8 位、および 1 8 7 位にそれぞれ対応する、E U 番号付けによる 3 6 6 位、3 6 8 位、および 4 0 7 位は、配列番号 8 1 におけるこれらの位置の T、L、および Y から、配列番号 8 3 におけるこれらの位置の S、A、および V に変化している。これらの実施形態のいずれにおいても、第 1 の重鎖について説明されたアミノ酸変化は、第 2 の重鎖に位置してもよく、第 2 の重鎖のそれぞれのアミノ酸変化は、第 1 の重鎖に位置してもよい。換言すると、「第 1」および「第 2」という用語は、これらの実施形態において、交換されてもよい。一部の実施形態において、重鎖は、I g G₁ または I g G₄ の重鎖に由来する。

10

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質における第 1 の重鎖および第 2 の重鎖は、重鎖のプロテイン A への結合を低減させる 1 つまたは複数のアミノ酸変化をさらに含む。一部の実施形態において、そのようなアミノ酸変化は、重鎖うちの一方の 4 3 5 位におけるアルギニン [H 4 3 5 R] および 4 3 6 位におけるフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] である。

20

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質において、4 0 7 位にスレオニン（ T ）[Y 4 0 7 T] を含む重鎖は、4 3 5 位にアルギニン [H 4 3 5 R] および 4 3 6 位にフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] をさらに含む。この事例において、他方の重鎖は、3 6 6 位にチロシン（ Y ）[T 3 6 6 Y] を含むが、4 3 5 位および 4 3 6 位における 2 つの変化を含まない。あるいは、一部の実施形態では、本発明のタンパク質において、3 6 6 位にセリン（ S ）[T 3 6 6 S]、3 6 8 位にアラニン（ A ）[L 3 6 8 A]、および 4 0 7 位にバリン（ V ）[Y 4 0 7 V] を含む重鎖は、4 3 5 位にアルギニン [H 4 3 5 R] および 4 3 6 位にフェニルアラニン [Y 4 3 6 F] をさらに含む。この事例において、他方の重鎖は、3 6 6 位にトリプトファン（ W ）[T 3 6 6 W] を含むが、4 3 5 位および 4 3 6 位における 2 つの変化を含まない。したがって、上述のように「キャビティ」をもたらすアミノ酸変化を含む重鎖はまた、プロテイン A への結合を低減させるアミノ酸変化も含む。これらの重鎖を含むホモ二量体は、低減されたプロテイン A への結合により、除去される。「突起」を含む他方の重鎖のホモ二量体の産生は、「突起」の存在によって低減される。

30

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質の重鎖は、Y T E 突然変異（ M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E、E U 番号付け（Dall'Acqua, Kiener et al. 2006））をさらに含む場合も含まない場合もある。これらの突然変異は、p H 6 . 0 における新生児 F c R n 受容体に対する結合親和性の優先的な増強を通じて、重鎖の薬物動態特性を改善することが示されている。

40

一部の実施形態において、I g G 1 に由来する本発明の第 1 および / または第 2 の重鎖はまた、「K O」突然変異（ L 2 3 4 A、L 2 3 5 A ）も含む。さらなる態様において、I g G 4 に由来する本発明の第 1 および / または第 2 の重鎖はまた、P r o ヒンジ突然変異（ S 2 2 8 P ）も含む。

【 0 1 2 3 】

さらなる態様において、本発明のタンパク質は、ヒトおよびカニクイザル D L L 3 に対して、好ましくは 1 0 n M 以下、より好ましくは 1 n M 以下、さらにより好ましくは 0 . 1 n M 以下、さらにより好ましくは 0 . 0 1 n M 以下の親和性を有する、D L L 3 に特異的な第 1 の抗原結合ユニットまたはポリペプチド鎖を含む。親和性は、たとえば実施例に記載されている、組換え D L L 3 タンパク質を使用した S P R（B I A c o r e）アッセ

50

イにおいて、または当業者に周知の他の方法において測定することができる。タンパク質は、ヒトおよびカニクイザルCD3 ϵ γ 複合体に対して、好ましくは500nM以下、より好ましくは100nM以下、さらにより好ましくは10nM以下の親和性を有する、第2の抗原結合ユニットまたはポリペプチド鎖を含む。

さらなる態様において、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、実施例5において示されるように、DLL3陰性細胞には結合せず、ヒトおよびDLL3パラログDLL1およびDLL4と交差反応しない。

【0124】

さらなる態様において、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、DLL3タンパク質の膜近傍ペプチドに特異的に結合する第1の抗原結合ユニットまたは第1のポリペプチド鎖を含む。さらなる態様において、本発明のタンパク質は、DLL3タンパク質を発現する細胞への弱い結合を示し、たとえば、最大100nMの濃度まで、細胞表面へのタンパク質結合の飽和は達成されない(たとえば、図6を参照されたい)。

さらなる態様において、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、T細胞活性を標的とされる腫瘍細胞に選択的に再指向させ、腫瘍細胞の溶解をもたらすために、DLL3を発現する腫瘍細胞とT細胞との間の細胞溶解性シナプスの形成に最適な立体条件を提供することによって、腫瘍細胞に対する細胞毒性を媒介することができる。

【0125】

様々な方法を使用して、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質によって媒介される細胞毒性を測定することができる。たとえば、細胞毒性は、実施例10に記載される方法を使用して測定することができる。エフェクター細胞は、たとえば、刺激されたかもしくは刺激されていない(ヒトもしくはカニクイザル)T細胞もしくはそのサブセット(たとえば、CD4、CD8)、または刺激されていない(ヒトもしくはカニクイザル)末梢血単核細胞(PBMC)であり得る。標的細胞は、少なくとも、(ヒトまたはカニクイザル)DLL3の細胞外ドメインを発現している必要があり、内因性(天然の)DLL3発現を有する細胞、たとえば、ヒト小細胞肺癌細胞株SHP77、NCI-H82であり得るか、あるいは、全長DLL3またはDLL3の細胞外ドメインのいずれかを発現する組換え細胞であり得る。エフェクター対標的細胞の比(E:T)は、通常、約10:1であるが、変動し得る。DLL3/CD3結合分子の細胞毒性活性は、たとえば、インキュベーションの48または72時間後に、LDH放出アッセイにおいて判定することができる。細胞毒性の判定に使用されるインキュベーション時間および読取りの改変が可能であり、当業者に公知である。細胞毒性の読取りシステムは、MTT/MTSアッセイ、ATPベースのアッセイ、FACSベースのアッセイ、51-クロム放出アッセイ、スルホローダミンB(SRB)アッセイ、比色分析(WST)アッセイ、クロン原性アッセイ、ECIS技術、および生物発光アッセイを含み得る。

【0126】

本発明のDLL3/CD3結合タンパク質によって媒介される細胞毒性活性は、好ましくは、細胞ベースの細胞毒性アッセイにおいて測定される。細胞毒性は、細胞毒性アッセイにおいて測定されるEC₅₀値によって表される。当業者であれば、精製されたT細胞をエフェクター細胞として使用する場合には、EC₅₀が、PBMCと比較して低くなることが予測され得ることを認識しており、また、当業者であれば、刺激されたT細胞を使用する場合には、EC₅₀が、さらに低くなり得ることを認識している。さらに、標的細胞が、細胞表面上に多数のDLL3を発現する場合には、細胞表面上に少数のDLL3分子を発現する細胞と比較して、EC₅₀が低くなると予測することができる。DLL3/CD3結合タンパク質のEC₅₀は、好ましくは10nM以下、より好ましくは5nM以下、およびさらにより好ましくは1nM以下である。

【0127】

好ましくは、本発明の多重特異性結合タンパク質は、DLL3陰性細胞の溶解を誘導/媒介しない。DLL3陰性細胞の「溶解を誘導/媒介しない」という用語は、DLL3/CD3結合分子が、DLL3陰性細胞の30%を上回る溶解を誘導することも媒介するこ

10

20

30

40

50

ともなく、好ましくは20%を上回って、より好ましくは10%を上回って、または5%を上回って誘導することも媒介することもないことを意味し、一方でDLL3陽性肺癌細胞株の溶解は、100%に設定される。これは、通常、最大1000nMまでの結合タンパク質濃度に適用される。

【0128】

好ましくは、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、標的とされる細胞によって内部移行されない。内部移行の割合は、たとえば、実施例11に記載されるようにアッセイすることができる。好ましくは、内部移行の割合（たとえば、細胞毒性の減少として測定される）は、DLL3/CD3結合タンパク質を標的細胞とともに4時間ブレインキュベーションした後に、50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらにより好ましくは30%以下である。

10

【0129】

さらに、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、95%を上回る（たとえば、少なくとも98%、実施例14を参照されたい）の単量体含量で、安定であることが示されており、好ましい薬物動態特性および良好な下流製造性を有し、さらに、良好な生体分布を有することが予測される（たとえば、実施例12を参照されたい）。本発明のタンパク質は、さらに、好ましい免疫原性プロファイルを有し（実施例16を参照されたい）、インビトロおよびインビボにおいて良好な安定性を有する（たとえば、実施例12および15を参照されたい）。さらに、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質（たとえば、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2）は、ヒト化インビボ異種移植片マウスモデルにおいて、好ましい有効性を示す。DLL3/CD3結合タンパク質は、DLL3/CD3結合タンパク質の初回投薬後にすでに開始される、強力な腫瘍退縮を誘導した。さらに、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、1週間に1回（q7d）の0.25mg/kgという非常に低い用量の投与で、腫瘍退縮を誘導し、その治療適用性をさらに裏付けている。具体的には、本発明のDLL3/CD3結合タンパク質は、DLL3陽性標的細胞の存在下においてのみ、選択的なT細胞増殖、T細胞活性化、T細胞脱顆粒化、およびサイトカイン分泌を誘導し（実施例18を参照されたい）、DLL3陰性標的細胞の存在下においては誘導せず、さらに、腫瘍組織へのT細胞浸潤を有意に増加させる（実施例20を参照されたい）。さらに、実施例19は、DLL3/CD3結合タンパク質が、CD4+ならびにCD8+T細胞再指向型溶解を媒介する。具体的には、ナイーブT細胞、ならびにCD4+エフェクターメモリー、CD4+セントラルメモリー、CD8+CD45RA+エフェクター、およびCD8+メモリー細胞が、DLL3発現腫瘍細胞のT細胞再指向型溶解に寄与する。

20

30

【0130】

本発明のさらなる態様は、本発明の多重特異性結合タンパク質の第一および/または第2の抗原結合ユニットをコードする単離された核酸分子を提供する。一部の実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載される第1および/または第2のFcドメインをさらにコードし、第1および/または第2のFcドメインは、それぞれ、第1および/または第2の抗原結合ユニットをコードする核酸分子の3'末端に連結されている。一部の実施形態において、核酸分子は、i) DLL3に特異的な第1の一本鎖Fab（たとえば、DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17、およびDLL3#18のうちのいずれか1つ）を含み、第1のFcドメインを含んでもよい、第1のポリペプチド鎖、ならびに/またはii) CD3に特異的な第2の一本鎖Fab（たとえば、CD3#1、CD3#2、およびCD3#3のうちのいずれか1つ）を含み、第2のFcドメインを含んでもよい、第2のポリペプチド鎖をコードする。

40

【0131】

好ましくは、核酸分子は、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52

50

、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 238、配列番号 239、もしくは配列番号 240 のうちのいずれか 1 つの第 1 の一本鎖 F a b、ならびに / または配列番号 71、配列番号 72、もしくは配列番号 104 の第 2 の一本鎖 F a b をコードする、ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態において、核酸分子は、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、もしくは配列番号 252 のうちのいずれか 1 つの第 1 のポリペプチド鎖、ならびに / または配列番号 79、配列番号 80、もしくは配列番号 105 のアミノ酸配列を含む C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

10

【0132】

本発明のさらなる態様は、第 1 および / または第 2 の抗原結合ドメイン（たとえば、本発明の第 1 および / または第 2 の一本鎖 F a b）をコードするヌクレオチド配列を含む D N A 分子を含む、発現ベクターを提供する。好ましくは、発現ベクターは、さらに、第 1 および / または第 2 の抗原結合ドメイン（たとえば、それぞれ、第 1 および / または第 2 の一本鎖 F a b）をコードする核酸分子、好ましくは、D N A 分子に連結された、第 1 および / または第 2 の F c ドメインをコードする核酸分子、好ましくは、D N A 分子を含む。そのため、発現ベクターは、第 1 の F c ドメインに連結された第 1 の一本鎖 F a b を含むポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列、および / または第 2 の F c ドメインに連結された第 2 の一本鎖 F a b を含むポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0133】

好ましい実施形態において、発現ベクターは、本発明の第 1 および / または第 2 のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、D N A 分子を含む。好ましい実施形態において、発現ベクターは、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、もしくは配列番号 252 のうちのいずれか 1 つの第 1 のポリペプチド鎖、および / または配列番号 79 を含む第 2 のポリペプチド鎖をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

30

さらに好ましい実施形態において、発現ベクターは、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、もしくは配列番号 252 のうちのいずれか 1 つの第 1 のポリペプチド鎖、および / または配列番号 80 を含む第 2 のポリペプチド鎖をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

【0134】

さらに好ましい実施形態において、発現ベクターは、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、もしくは配列番号 252 のうちのいずれか 1 つの第 1 のポリペプチド鎖、および / または配列番号 105 を含む第 2 のポリペプチド鎖をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

40

【0135】

特に好ましい実施形態において、2 つの発現ベクターを使用してもよく、そのうちの一方は、D L L 3 に特異的な第 1 のポリペプチド鎖の発現のためのものであり、他方は、C D 3 に特異的な第 2 のポリペプチド鎖の発現のためのものであり、2 つの発現ベクターは、そのため、いずれも、組換えタンパク質発現のために宿主細胞にトランスフェクトされ

50

得る。

好ましくは、発現ベクターは、少なくとも1つの制御配列に作動可能に連結された、前記核酸分子を含むベクターであり、ここで、そのような制御配列は、プロモーター、エンハンサー、またはターミネーター配列であり得、最も好ましくは、異種プロモーター、エンハンサー、またはターミネーター配列であり得る。

別の態様において、本発明は、本発明のD L L 3に特異的な第1のポリペプチド鎖をコードする発現ベクターと、本発明のC D 3に特異的な第2のポリペプチド鎖をコードする発現ベクターとを有する、宿主細胞に関する。

特に好ましい実施形態によると、前記宿主細胞は、真核生物細胞、たとえば、哺乳動物細胞である。別の実施形態において、そのような宿主細胞は、細菌細胞である。他の有用な細胞は、酵母細胞または他の真菌細胞である。

好適な哺乳動物細胞としては、たとえば、C H O細胞、B H K細胞、H e L a細胞、C O S細胞などが挙げられる。しかしながら、当該技術分野において異種タンパク質の発現に使用される、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞、および任意の他の細胞を、同様に使用することができる。

【0136】

抗D L L 3抗体

D L L 3は、通常、胎児(foetal)の脳におけるゴルジ体のものを含め、細胞内膜に発現され、傍軸中胚葉における体節形成に重要な役割を果たす(Geffers et al., J Cell Biol. 2007;178:465, Chapman et al., Hum. Mol. Genet. 2011;20:905-916)。S C L C、L C N E C、および神経膠芽腫を含む一部の腫瘍型におけるD L L 3発現の著しい誘導は、細胞表面への局在化をもたらし、これが、非悪性細胞には検出可能な細胞表面D L L 3が存在しないことと合わさって、腫瘍細胞特異的治療法ならびに診断および予後診断ツールとしての抗D L L 3抗体の使用の新たな絶好の機会をもたらした。

【0137】

いくつかの抗D L L 3抗体(たとえば、L S - c 1 6 7 4 4 0、L i f e s p a n ; A P 2 1 7 3 9 P U - N、A c r i s ; L S - C 1 4 8 7 0 0、L S B i o)が、市販入手可能である。しかしながら、これらの抗体は、免疫組織化学(I H C)、F A C S、およびE L I S Aアッセイにおいて性能が良好ではなく、細胞、特に腫瘍細胞上に発現されるD L L 3タンパク質に特異的に結合することができない。抗D L L 3抗体はまた、たとえば、国際公開第2 0 0 7 1 1 1 7 3 3号においても報告されており、神経膠腫患者における診断的使用が提案されているが、I H Cアッセイのデータは示されていない。したがって、患者、たとえば、腫瘍細胞/組織におけるD L L 3発現を正確に測定するため、ならびに/またはD L L 3標的化療法の有効性を評価するための信頼できる診断ツールとしての抗D L L 3抗体の使用には、課題が残る。

【0138】

したがって、様々なアッセイ、たとえば、F A C S、E L I S A、免疫沈降、ウエスタンブロッティング、E L I S A、放射免疫測定、フローサイトメトリー、I H C、および免疫測定アッセイにおいて、あらゆる種類の生物学的サンプル中のD L L 3タンパク質発現の正確かつ特異的な検出に使用することができ、信頼できる診断用試薬として使用することができる、代替的な抗D L L 3抗体を特定する必要性がある。

【0139】

したがって、本発明のさらなる態様は、

i) 配列番号1(C D R 1)、配列番号2(C D R 2)、および配列番号3(C D R 3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖C D R、ならびに配列番号4(C D R 1)、配列番号5(C D R 2)、および配列番号6(C D R 3)のアミノ酸配列を含む、重鎖C D R、または
i i) 配列番号7(C D R 1)、配列番号8(C D R 2)、および配列番号9(C D R 3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖C D R、ならびに配列番号10(C D R 1)、配列番号11(C D R 2)、および配列番号12(C D R 3)のアミノ酸配列を含む、重鎖C D R、または

10

20

30

40

50

i i i) 配列番号 13 (CDR1)、配列番号 14 (CDR2)、および配列番号 15 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 16 (CDR1)、配列番号 17 (CDR2)、および配列番号 18 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

i v) 配列番号 19 (CDR1)、配列番号 20 (CDR2)、および配列番号 21 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 22 (CDR1)、配列番号 23 (CDR2)、および配列番号 24 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v) 配列番号 25 (CDR1)、配列番号 26 (CDR2)、および配列番号 27 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 28 (CDR1)、配列番号 29 (CDR2)、および配列番号 30 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v i) 配列番号 31 (CDR1)、配列番号 32 (CDR2)、および配列番号 33 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 34 (CDR1)、配列番号 35 (CDR2)、および配列番号 36 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v i i) 配列番号 133 (CDR1)、配列番号 134 (CDR2)、および配列番号 135 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 136 (CDR1)、配列番号 137 (CDR2)、および配列番号 138 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

v i i i) 配列番号 139 (CDR1)、配列番号 140 (CDR2)、および配列番号 141 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 142 (CDR1)、配列番号 143 (CDR2)、および配列番号 144 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

i x) 配列番号 145 (CDR1)、配列番号 146 (CDR2)、および配列番号 147 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 148 (CDR1)、配列番号 149 (CDR2)、および配列番号 150 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x) 配列番号 151 (CDR1)、配列番号 152 (CDR2)、および配列番号 153 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 154 (CDR1)、配列番号 155 (CDR2)、および配列番号 156 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i) 配列番号 157 (CDR1)、配列番号 158 (CDR2)、および配列番号 159 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 160 (CDR1)、配列番号 161 (CDR2)、および配列番号 162 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i i) 配列番号 163 (CDR1)、配列番号 164 (CDR2)、および配列番号 165 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 166 (CDR1)、配列番号 167 (CDR2)、および配列番号 168 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i i i) 配列番号 169 (CDR1)、配列番号 170 (CDR2)、および配列番号 171 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 172 (CDR1)、配列番号 173 (CDR2)、および配列番号 174 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x i v) 配列番号 175 (CDR1)、配列番号 176 (CDR2)、および配列番号 177 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 178 (CDR1)、配列番号 179 (CDR2)、および配列番号 180 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、重鎖 CDR、または

x v) 配列番号 181 (CDR1)、配列番号 182 (CDR2)、および配列番号 183 (CDR3) のアミノ酸配列を含む、軽鎖 CDR、ならびに配列番号 184 (CDR1

10

20

30

40

50

)、配列番号185(CDR2)、および配列番号186(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、または

xvii) 配列番号187(CDR1)、配列番号188(CDR2)、および配列番号189(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号190(CDR1)、配列番号191(CDR2)、および配列番号192(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、または

xviii) 配列番号193(CDR1)、配列番号194(CDR2)、および配列番号195(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号196(CDR1)、配列番号197(CDR2)、および配列番号198(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR、または

xviii) 配列番号199(CDR1)、配列番号200(CDR2)、および配列番号201(CDR3)のアミノ酸配列を含む、軽鎖CDR、ならびに配列番号202(CDR1)、配列番号203(CDR2)、および配列番号204(CDR3)のアミノ酸配列を含む、重鎖CDR

を含む、抗DLL3抗体分子を提供する。

【0140】

上記のi)~xviii)に概説される抗体は、それぞれ、DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17、またはDLL3#18と称される。本発明の特定の抗体に対する個々のアミノ酸配列の特定を容易に可能にする配列表が、本明細書において提供される。

本発明の好ましい実施形態において、抗体分子は、DLL3#1またはDLL3#5に対応する上記のi)またはv)に定義されるCDR配列を含む。

【0141】

一部の実施形態において、本発明の抗DLL3抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体分子である。一部の実施形態において、抗体分子は、モノクローナル抗体Fab、F(ab)2、Fv、またはscFvである。一部の実施形態において、本発明の抗DLL3抗体分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgE定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。一部の実施形態において、本発明の抗DLL3抗体分子の軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダである。

【0142】

一部の実施形態において、本発明の抗DLL3抗体は、配列番号38、40、42、44、46、48、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、および228のうちのいずれか1つに少なくとも85%同一なアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインを有する。好ましくは、抗体分子は、配列番号38、40、42、44、46、48、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、または228のアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインを有する。

【0143】

一部の実施形態において、抗DLL3抗体分子は、配列番号37、39、41、43、45、47、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、および227のうちのいずれか1つに少なくとも85%同一なアミノ酸配列を含む、軽鎖可変ドメインを有する。好ましくは、抗体分子は、配列番号37、39、41、43、45、47、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、または227のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変ドメインを有する。

アミノ酸配列同一性を計算する方法は、当該技術分野において周知であり、本明細書では本明細書の定義の節においてさらに考察されている。

【0144】

一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体分子は、i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 1)、または i i) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 2)、または i i i) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 41 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 3)、または i v) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 4)、または v) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 5)、または v i) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (D L L 3 # 6)、または v i i) 配列番号 205 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 206 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 7)、または v i i i) 配列番号 207 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 208 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 8)、または i x) 配列番号 209 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 210 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 9)、または x) 配列番号 211 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 212 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 10)、または x i) 配列番号 213 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 214 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 11)、または x i i) 配列番号 215 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 216 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 12)、または x i i i) 配列番号 217 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 218 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 13)、または x i v) 配列番号 219 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 220 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 14)、または x v) 配列番号 221 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 222 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 15)、または x v i) 配列番号 223 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 224 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 16)、または x v i i) 配列番号 225 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 226 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 17)、または x v i i i) 配列番号 227 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインおよび配列番号 228 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (D L L 3 # 18) を有する。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態において、本発明の抗 D L L 3 抗体は、マウスモノクローナル抗体である。本発明の文脈において、マウスモノクローナル抗体には、V H および V L が、ヒト D L L 3 タンパク質をマウスに免疫付与し、続いて、ヒト D L L 3 にある特定の親和性で結合する好適な V H および V L 配列を選択し、次いで、さらにそのような V H および V L 配列を、組換え技法によりマウス (たとえば、マウス I g G 2 a) に由来する定常ドメインに結合させることによって得られ、宿主細胞における組換え発現によって産生される、抗体が含まれる。キメラ抗体、たとえば、異なる種に由来する可変および定常領域を含むものが、本発明によってさらに包含される。一部の実施形態において、本発明の抗体分子は、上述のマウスに由来する V H および V L ドメインを含み、さらに、別の種、たとえば、ヒト、ウサギ、ラット、ヤギ、ロバに由来する定常ドメインを含む、キメラ抗体である。一部の実施形態において、キメラ抗体は、マウスに由来し、さらに上記に定義されるようにヒト化または配列最適化された、V H および V L ドメインを含み、別の種に由来する定常ドメインをさらに含む。一部の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト I g G 配列を含むトランスジェニック動物 (たとえば、マウス) に由来する V H および V L ドメインを含み、したがって、ヒト V H および V L 配列を含み、別の種に由来する定常ドメインをさらに含む。上記に概説されたキメラ抗体の実施形態のうちのいずれかにおいて、重鎖定常領域は、マウス、ヒト、ウサギ、ラット、ヤギ、またはロバ重鎖領域である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態において、本発明の抗 D L L 3 抗体分子は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、および I g E 定常ドメインからなる群から選択される定常ドメインを有する。好ましい実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、好ましくは配列番号 2 5 4 の配列を含む、I g G 2 a の定常ドメインを有する。一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体分子は、カッパまたはラムダである軽鎖定常ドメインを有し、好ましくは、軽鎖定常ドメインは、好ましくは配列番号 2 5 5 の配列を含む、カッパ軽鎖定常ドメインである。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体分子は、好ましくは 1 0 n M 以下、より好ましくは 1 n M 以下、さらにより好ましくは 0 . 1 n M 以下、なおもより好ましくは 0 . 0 1 n M 以下の解離定数 (K D) で、ヒトおよびカニクイザル D L L 3 に結合することができる。親和性 (K D 値) は、たとえば実施例に記載されている、組換え D L L 3 タンパク質を使用した S P R (B I A c o r e) アッセイにおいて、または当業者に周知の他の方法において測定することができる。

10

一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体分子は、マウス D L L 3 には結合しない。

【 0 1 4 8 】

一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体分子は、組織サンプル (たとえば、パラフィン包埋 / ホルマリン固定組織サンプル)、たとえば、腫瘍組織サンプルまたは培養細胞株における D L L 3 発現 (たとえば、細胞質および表面タンパク質発現) を検出することができる。パラフィン包埋 / ホルマリン固定細胞培養物または組織サンプルは、プロテイナーゼ K などのエピトープ賦活剤 (epitope retriever) でさらに処理してもよい。

20

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態において、本発明の抗 D L L 3 抗体分子は、D L L 3 # 1、D L L 2 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 1 0、D L L 3 # 1 1、D L L 3 # 1 2、D L L 3 # 1 3、D L L 3 # 1 4、D L L 3 # 1 5、D L L 3 # 1 6、D L L 3 # 1 7、または D L L 3 # 1 8 抗体のうちのいずれか 1 つと同じエピトープに結合する。一部の実施形態において、本発明の抗 D L L 3 抗体分子は、ヒト D L L 3 への結合に関して、D L L 3 # 1、D L L 2 # 2、D L L 3 # 3、D L L 3 # 4、D L L 3 # 5、D L L 3 # 6、D L L 3 # 7、D L L 3 # 8、D L L 3 # 9、D L L 3 # 1 0、D L L 3 # 1 1、D L L 3 # 1 2、D L L 3 # 1 3、D L L 3 # 1 4、D L L 3 # 1 5、D L L 3 # 1 6、D L L 3 # 1 7、または D L L 3 # 1 8 抗体分子のうちのいずれか 1 つと交差競合する。

30

本発明の別の態様は、本発明の抗 D L L 3 抗体分子の重鎖可変ドメインおよび / または軽鎖可変ドメインをコードする、単離された核酸分子を提供する。

【 0 1 5 0 】

好ましくは、核酸分子は、配列番号 3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、2 0 6、2 0 8、2 1 0、2 1 2、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 2 0、2 2 2、2 2 4、2 2 6、または 2 2 8 のうちのいずれか 1 つの重鎖可変ドメインをコードする、ヌクレオチド配列を含む。好ましくは、核酸分子は、配列番号 3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、2 0 5、2 0 7、2 0 9、2 1 1、2 1 3、2 1 5、2 1 7、2 1 9、2 2 1、2 2 3、2 2 5、または 2 2 7 のうちのいずれか 1 つの軽鎖可変ドメインをコードする、ヌクレオチド配列を含む。

40

本発明のさらなる態様は、本発明の抗 D L L 3 抗体分子の重鎖可変ドメインおよび / または軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む D N A 分子を含む、発現ベクターを提供する。

好ましくは、発現ベクターは、さらに、核酸分子、好ましくは、核酸分子に連結された重鎖の定常ドメインおよび / または軽鎖の定常ドメインそれぞれをコードする D N A 分子、好ましくは、重鎖可変ドメインおよび / または軽鎖可変ドメインそれぞれをコードする D N A 分子を含む。

50

【 0 1 5 1 】

特に好ましい実施形態において、2つの発現ベクターを使用してもよく、それらのうちの一方は、重鎖の発現のためのものであり、他方は、軽鎖の発現のためのものであり、これら2つの発現ベクターは、そのため、両方が、組換えタンパク質発現のために宿主細胞にトランスフェクトされ得る。

好ましくは、発現ベクターは、少なくとも1つの制御配列に作動可能に連結された、前記核酸分子を含むベクターであり、ここで、そのような制御配列は、プロモーター、エンハンサー、またはターミネーター配列であり得、もっとも好ましくは、異種プロモーター、エンハンサー、またはターミネーター配列であり得る。

別の態様において、本発明は、本発明の抗D L L 3抗体分子の重鎖をコードする発現ベクターと、本発明の抗D L L 3抗体分子の軽鎖をコードする発現ベクターとを有する、宿主細胞に関する。

特に好ましい実施形態によると、前記宿主細胞は、真核生物細胞、たとえば、哺乳動物細胞である。別の実施形態において、そのような宿主細胞は、細菌細胞である。他の有用な細胞は、酵母細胞または他の真菌細胞である。

【 0 1 5 2 】

好適な哺乳動物細胞としては、たとえば、C H O細胞、B H K細胞、H e L a細胞、C O S細胞などが挙げられる。しかしながら、当該技術分野において異種タンパク質の発現に使用される、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞、および任意の他の細胞を、同様に使用することができる。

【 0 1 5 3 】

製造および精製の方法

本発明は、本発明の多重特異性結合タンパク質を製造する方法であって、概して、

- 本発明の結合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、本発明の結合タンパク質の形成を可能にする条件下において培養するステップと、
- 宿主細胞によって発現された結合タンパク質を、培養物から回収するステップとを含み、
- さらに、本発明の結合タンパク質を精製および/または修飾および/または製剤化するステップを含んでもよい、方法をさらに提供する。

本発明は、本発明の抗D L L 3抗体を製造する方法であって、概して、

- 本発明の抗体分子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、抗体分子の形成を可能にする条件下において培養するステップと、
- 宿主細胞によって発現された抗体分子を、培養物から回収するステップとを含み、
- さらに、本発明の抗体分子を精製および/または修飾および/または製剤化するステップを含んでもよい、方法をさらに提供する。

【 0 1 5 4 】

本発明の核酸は、たとえば、コーディング配列、ならびに制御配列を含み、天然もしくは人工のイントロンを含んでもよい、DNA分子であってもよく、またはcDNA分子であってもよい。それは、そのもともとのコドンを含んでもよく、または意図される宿主細胞もしくは宿主生物における発現のために特別に適合された、最適化されたコドン使用頻度を有してもよい。本発明の一実施形態によると、本発明の核酸は、上記に定義されるように、本質的に単離された形態である。

本発明の核酸は、本明細書に提供される本発明のタンパク質のアミノ酸配列上の情報に基づいて、本質的に公知の様式で（たとえば、自動化されたDNA合成および/または組換えDNA技術によって）調製または獲得することができる。

本発明の核酸は、典型的に、発現ベクター、すなわち、好適な宿主細胞または他の発現系にトランスフェクトされるとタンパク質の発現をもたらすことができるベクターに、組み込まれるであろう。

本発明の結合タンパク質または抗体を製造するために、当業者であれば、当該技術分野において周知の様々な発現系、たとえば、Kipriyanow and Le Gall, 2004によって考察さ

10

20

30

40

50

れているものから、選択することができる。

【0155】

発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、EBV由来のエピソームなどが含まれる。発現ベクターおよび発現制御配列は、宿主細胞と適合するように選択される。DLL3 / CD3 結合タンパク質の第1の抗原結合ユニット（たとえば、本発明の結合タンパク質のDLL3 特異的一本鎖Fabもしくは全長DLL3 鎖）をコードするヌクレオチド配列、および第2の抗原結合ユニット（たとえば、本発明の結合タンパク質のCD3 特異的一本鎖Fabもしくは全長CD3 鎖）をコードするヌクレオチド配列を、別個のベクターに挿入してもよい。ある特定の実施形態において、両方のDNA配列は、同じ発現ベクターに挿入される。DLL3 抗体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列およびDLL3 抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列を、別個のベクターに挿入してもよい。ある特定の実施形態において、両方のDNA配列は、同じ発現ベクターに挿入される。

10

【0156】

便宜的なベクターは、機能的に完全なヒトCH（重鎖定常）免疫グロブリン配列をコードし、任意の抗原結合ユニット、たとえば、一本鎖Fab配列または任意の重鎖／軽鎖可変ドメインが、上述のように、容易に挿入および発現され得るように、操作された適切な制限部位を有するものである。抗体重鎖については、これは、限定することなく、任意のIgGアイソタイプ（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、または対立遺伝子バリエーションを含む他の免疫グロブリンであり得る。

組換え発現ベクターはまた、宿主細胞からの全長CD3もしくはDLL3 鎖、または抗DLL3 抗体の軽鎖／重鎖の分泌を促進する、シグナルペプチドもコードし得る。タンパク質鎖をコードするDNAは、シグナルペプチドが、成熟した全長鎖DNAのアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドであってもよく、または非免疫グロブリンタンパク質由来の異種ペプチドであってもよい。あるいは、本発明のタンパク質の全長鎖をコードするDNA配列が、シグナルペプチド配列をすでに含んでいてもよい。

20

【0157】

DLL3 / CD3 鎖をコードするDNA配列またはDLL3 抗体の重鎖／軽鎖をコードするDNA配列に加えて、組換え発現ベクターは、典型的に、プロモーター、エンハンサー、終止およびポリアデニル化シグナル、ならびに宿主細胞におけるタンパク質鎖の発現を制御する他の発現制御エレメントを含む、異種制御配列であってもよい制御配列を有する。プロモーター配列の例（哺乳動物細胞における発現に関して例示）は、CMV（たとえば、CMVシミアンウイルス40（SV40）プロモーター／エンハンサー）、アデノウイルス（たとえば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））、ポリオマに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサー、ならびに強力な哺乳動物プロモーター、たとえば、天然の免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターがある。ポリアデニル化シグナルの例は、BGHポリA、SV40後期または初期ポリAであり、代替的に、免疫グロブリン遺伝子の3' UTRなどを使用してもよい。

30

【0158】

組換え発現ベクターはまた、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（たとえば、複製起点）および選択的なマーカー遺伝子も有し得る。第1の抗原結合ユニット（一本鎖FabおよびFcドメイン）もしくはその抗原結合部分を有する全長鎖、および／または第2の抗原結合ユニット（一本鎖FabおよびFcドメイン）もしくはその抗原結合部分を有する全長鎖をコードする核酸分子、ならびにこれらのDNA分子を含むベクターは、リボソームに媒介されるトランスフェクション、ポリカチオンに媒介されるトランスフェクション、プロトプラスト融合、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム沈降、エレクトロポレーション、またはウイルスベクターによる移入を含む、当該技術分野において周知のトランスフェクション方法に従って、宿主細胞、たとえば、細菌細胞またはより高次の真核生物細胞、たとえば、哺乳動物細胞に導入することができる。

40

好ましくは、本発明のタンパク質のDLL3およびCD3 鎖をコードするDNA分子は

50

、2つの発現ベクターに存在し、これらは、宿主細胞、好ましくは哺乳動物細胞に、コトランスフェクトされる。

【0159】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該技術分野において周知であり、これには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NS0、SP2/0細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト癌腫細胞（たとえば、Hep G2およびA-549細胞）、3T3細胞、または任意のこのような細胞株の誘導体/子孫が挙げられる。ヒト、マウス、ラット、サル、およびげっ歯動物細胞株を含むがこれらに限定されない他の哺乳動物細胞、または酵母、昆虫、および植物細胞を含むがこれらに限定されない他の真核生物細胞、または細菌などの原核生物細胞を、使用することができる。

10

【0160】

本発明のタンパク質は、宿主細胞におけるタンパク質の発現を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって産生される。タンパク質分子は、好ましくは、分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるか、またはそれは、たとえば、分泌シグナルなしで発現される場合、宿主細胞ライセートから回収することができる。タンパク質の実質的に均質な調製物が得られる様式で、組換えタンパク質および宿主細胞タンパク質に使用される標準的なタンパク質精製方法を使用して、タンパク質分子を精製することが必要である。例として、本発明のタンパク質分子を得るのに有用な最新の精製方法には、第1のステップとして、細胞および粒子細胞残屑を培養培地またはライセートから除去することが含まれる。タンパク質は、次いで、混入可溶性タンパク質、ポリペプチド、および核酸から、たとえば、免疫親和性もしくはイオン交換カラムにおける分画、エタノール沈降、逆相HPLC、Sephadexクロマトグラフィー、シリカまたはカチオン交換樹脂におけるクロマトグラフィーによって、精製される。タンパク質分子調製物を得るためのプロセスにおける最終ステップとして、精製されたタンパク質分子を、治療適用のために、後述されるように乾燥、たとえば、凍結乾燥させてもよい。

20

【0161】

本発明は、少なくとも2つの異なる標的に対する結合特異性を有する結合タンパク質に関する。本発明に関して、結合分子は、抗体に由来する。結合分子を作製するための技法としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン鎖の組換え共発現（Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)）、国際公開第93/08829号、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい）、ならびに「ノブインホール（knob-in-hole）」操作（たとえば、米国特許第5,731,168号、Atwell et al., JMB, 1997, 270, 26-35を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の結合タンパク質はまた、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング作用の操作（国際公開第2009/089004号）、2つまたはそれを上回る抗体またはフラグメントの架橋（たとえば、米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性タンパク質を産生すること（たとえば、Kostelny et al., Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)を参照されたい）、二重特異性抗体フラグメントを作製するための「ダイアボディ」技術の使用（たとえば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい）、ならびに一本鎖Fv（sFv）二量体の使用（たとえば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい）、ならびにたとえばTut t et al. / J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載される三重特異性抗体の調製によっても、作製することができる。

30

40

【0162】

本明細書に開示される組成物（たとえば、多重特異性結合タンパク質および抗DLL3抗体）ならびに方法は、指定される配列、またはそれに実質的に同一もしくは類似である配列、たとえば、指定される配列に少なくとも85%、90%、95%同一であるかもしくはそれを上回って同一である配列を有する、ポリペプチドおよび核酸を包含する。アミ

50

ノ酸配列の文脈において、「実質的に同一である」という用語は、第1および第2のアミノ酸配列が、共通の構造ドメインおよび/または共通の機能的活性を有し得るように、第1のアミノ酸配列が、第2のアミノ酸配列におけるアライメントしたアミノ酸残基と、i) 同一であるか、またはii) その保存的置換である、十分な数または最小限の数のアミノ酸残基を含むことを指して、本明細書に使用される。たとえば、共通の構造ドメインを含むアミノ酸配列は、参照配列、たとえば、本明細書に提供される配列に対して、少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。ヌクレオチド配列の文脈において、「実質的に同一である」という用語は、第1および第2のヌクレオチド配列が、共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造ポリペプチドドメインもしくは共通の機能的ポリペプチド活性をコードするように、第1の核酸配列が、第2の核酸配列におけるアライメントしたヌクレオチドに同一である十分な数または最小限の数のヌクレオチド、たとえば、参照配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むことを指して、本明細書に使用される。

10

20

30

40

50

【0163】

本発明の核酸分子としては、配列表に示されるポリペプチド配列をコードするDNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。また、本発明は、国際公開第2007/042309号に定義されるように、高ストリンジェンシーの結合および洗浄条件下において配列表に示されるポリペプチド配列をコードするDNA分子にハイブリダイズする核酸分子にも関する。好ましい分子(mRNAの観点から)は、本明細書に記載されるDNA分子のうち1つと少なくとも75%または80%(好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、およびもっとも好ましくは少なくとも95%)の相同性または配列同一性を有するものである。例として、真核生物細胞における抗体の発現を考慮して、配列表に示されるDNA配列は、真核生物細胞におけるコドン使用頻度に一致するように設計されている。抗体を大腸菌において発現させることが所望される場合には、これらの配列は、大腸菌のコドン使用頻度に一致するように変更することができる。本発明のDNA分子のパリアントを、国際公開第2007/042309号に記載されるように、いくつかの異なる様式において、構築することができる。

【0164】

本発明のタンパク質は、ある特定の発現系(たとえば、特定のベクターもしくは宿主細胞)を使用した発現のため、または封入体としてもしくは可溶性形態で発現させるため、または培地もしくは細胞膜周辺腔へ分泌させるためもしくは細胞内に含めるため、またはより均質な産物を得るために、分子を最適化するように、修飾されたN末端配列、たとえば、N末端アミノ酸のうちの1つもしくは複数の欠失、またはたとえば第1のN末端アミノ酸の交換(たとえば、グルタミン酸からアラニンへ)を有してもよい。本発明のポリペプチドは、たとえば、さらに、そのようなポリペプチドの安定性を増強させるかまたは免疫原性を低減させるために、たとえば、国際公開第2012/175741号、同第2011/075861号、または同第2013/024059号において説明されているように、修飾されたC末端配列、たとえば、追加のアラニン、および/またはC末端部分もしくはフレームワーク領域のうちのいずれかの内の他の定義される位置におけるさらなるアミノ酸の変化を有してもよい。

曖昧さを回避するために、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質のうちのいずれかに関して、本明細書に記載される医薬組成物、キット、処置方法、医療上の使用、組合せ、投与の方法、および投薬量に関する実施形態のすべてが、単独またはさらなる治療剤(以下により詳細に示される)との組合せのいずれかで企図される。

【0165】

医薬組成物、投与の方法、投薬量

本発明は、さらに、少なくとも1つの本発明の多重特異性結合タンパク質を含む、疾患(以下により詳細に示される)の処置のための医薬組成物に関する。本発明は、さらに、

少なくとも1つの本発明の多重特異性タンパク質または以下に示される医薬組成物を使用して、疾患（以下により詳細に示される）を処置する方法を包含し、さらに、そのような本発明の結合タンパク質または医薬組成物を使用することによるそのような疾患の処置のための医薬の調製を包含する。

【0166】

本発明の結合タンパク質（たとえば、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 4 / CD3 # 1、DLL3 # 5 / CD3 # 1、DLL3 # 6 / CD3 # 1、DLL3 # 7 / CD3 # 1、DLL3 # 8 / CD3 # 1、DLL3 # 9 / CD3 # 1、DLL3 # 10 / CD3 # 1、DLL3 # 11 / CD3 # 1、DLL3 # 12 / CD3 # 1、DLL3 # 13 / CD3 # 1、DLL3 # 14 / CD3 # 1、DLL3 # 15 / CD3 # 1、DLL3 # 16 / CD3 # 1、DLL3 # 17 / CD3 # 1、DLL3 # 18 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 4 / CD3 # 2、DLL3 # 5 / CD3 # 2、DLL3 # 6 / CD3 # 2、DLL3 # 7 / CD3 # 2、DLL3 # 8 / CD3 # 2、DLL3 # 9 / CD3 # 2、DLL3 # 10 / CD3 # 2、DLL3 # 11 / CD3 # 2、DLL3 # 12 / CD3 # 2、DLL3 # 13 / CD3 # 2、DLL3 # 14 / CD3 # 2、DLL3 # 15 / CD3 # 2、DLL3 # 16 / CD3 # 2、DLL3 # 17 / CD3 # 2、DLL3 # 18 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 3、DLL3 # 4 / CD3 # 3、DLL3 # 5 / CD3 # 3およびDLL3 # 6 / CD3 # 3、DLL3 # 7 / CD3 # 3、DLL3 # 8 / CD3 # 3、DLL3 # 9 / CD3 # 3、DLL3 # 10 / CD3 # 3、DLL3 # 11 / CD3 # 3、DLL3 # 12 / CD3 # 3、DLL3 # 13 / CD3 # 3、DLL3 # 14 / CD3 # 3、DLL3 # 15 / CD3 # 3、DLL3 # 16 / CD3 # 3、DLL3 # 17 / CD3 # 3、DLL3 # 18 / CD3 # 3のうちのいずれか1つ、好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 3のうちのいずれか1つ）および/またはそれを含む組成物は、使用される具体的な医薬製剤または組成物に応じて、任意の好適な様式で、それを必要とする患者に投与され得る。したがって、本発明の結合タンパク質および/またはそれを含む組成物は、たとえば、
静脈内（i.v.）、皮下（s.c.）、筋肉内（i.m.）、腹腔内（i.p.）、経皮、経口、舌下（たとえば、舌下錠、スプレー、もしくはドロップ剤の形態で、舌下に入れ、粘膜を通じて舌下の毛細管網目構造に吸収される）、鼻（内）（たとえば、点鼻スプレーおよび/もしくはエアロゾルの形態で）、局所に、坐剤を用いて、吸入により、または任意の他の好適な様式で、有効量または有効用量において、投与され得る。結合タンパク質は、注入、ポータル、または注射によって投与してもよい。好ましい実施形態において、投与は、静脈内注入または皮下注射によって行われる。

【0167】

本発明の結合タンパク質および/またはそれを含む組成物は、処置または緩和しようとする疾患、障害、または状態を処置および/または緩和するのに好適な処置レジメンに従って投与される。臨床医は、一般に、処置または緩和しようとする疾患、障害、または状態、疾患の重症度、その症状の重症度、使用しようとする具体的な本発明の結合タンパク質、使用しようとする具体的な投与経路および医薬製剤もしくは組成物、患者の年齢、性別、体重、食事、全体的な状態、ならびに臨床医に周知の同様の因子といった因子に応じて、好適な処置レジメンを決定することができるであろう。一般に、処置レジメンは、治療有効量または用量での1つもしくは複数の本発明の結合タンパク質、またはそれを含む1つもしくは複数の組成物の投与を含む。

【0168】

一般に、本明細書に言及される疾患、障害、および状態の処置および/または緩和に関して、また処置しようとする具体的な疾患、障害、または状態、使用しようとする具体的

10

20

30

40

50

な本発明の結合タンパク質の有効性、使用される具体的な投与の経路および具体的な医薬製剤または組成物に応じて、本発明の結合タンパク質は、通常、体重1キログラムおよび1用量当たり0.005~20.0mgの量、好ましくは0.05~10.0mg/kg/用量で、連続的に（たとえば、注入によって）またはより好ましくは単回用量（たとえば、1週間に2回、週ごと、または月ごとの用量、以下を参照されたい）として投与されるが、特に前述のパラメーターに応じて、有意に変動し得る。したがって、一部の事例において、上記に提供された最小用量未満の使用が十分な場合があり、一方で、他の事例においては、上限を超える必要がある場合もある。多量に投与する場合は、それをある回数より少ない用量に分割し、それをその1日にわたって分散させることが賢明な場合がある。

10

【0169】

本発明の具体的な結合タンパク質ならびにその具体的な薬物動態および他の特性に応じて、それは、毎日、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、または6日に1回、週ごと、月ごとなどで投与され得る。投与レジメンは、長期の週ごとの処置を含み得る。「長期」とは、少なくとも2週間、および好ましくは数ヶ月、または数年の期間を意味する。

【0170】

本発明の多重特異性タンパク質およびそれを含む組成物の有効性は、関連する具体的な疾患に応じて、本質的に公知の任意の好適なインビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、インビボアッセイ、および/もしくは動物モデル、またはそれらの任意の組合せを使用して、試験することができる。好適なアッセイおよび動物モデルは、当業者には明らかであり、たとえば、以下の実施例において使用されるアッセイおよび動物モデルが挙げられる。

20

【0171】

製剤

医薬での使用のために、本発明の結合タンパク質は、(i)少なくとも1つの本発明の結合タンパク質（たとえば、DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3およびDLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3のうちのいずれか1つ、好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ）と、(ii)少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、アジュバント、および/または安定剤とを含み、(iii)1つまたは複数のさらなる

30

40

50

薬理学的に活性なポリペプチドおよび／または化合物を含んでもよい、医薬調製物として製剤化され得る。「薬学的に許容される」とは、それぞれの材料が、個別に投与した場合にいずれの生物学的作用もそれ以外の望ましくない作用も示さず、それが含まれている医薬組成物の他の成分（たとえば、薬学的に活性な成分）のうちのいずれとも有害な様式で相互作用しないことを意味する。具体的な例は、標準的な教本、たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990)などに見出すことができる。たとえば、本発明の結合タンパク質は、従来の抗体および抗体フラグメント、ならびに他の薬学的に活性なタンパク質に関して本質的に公知の任意の様式で製剤化および投与することができる。したがって、さらなる実施形態によると、本発明は、少なくとも1つの本発明の結合タンパク質と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、アジュバント、および／または安定剤とを含み、1つまたは複数のさらなる薬理学的に活性な物質を含んでもよい、凍結乾燥もしくはそうでない場合には乾燥された製剤、または水溶性もしくは非水溶性溶液もしくは懸濁液の形態の、医薬組成物または調製物に関する。

10

20

30

40

50

【0172】

非経口投与、たとえば、静脈内、筋肉内、皮下注射、または静脈内注入のための医薬調製物は、たとえば、活性成分を含む滅菌溶液、懸濁液、分散液、エマルジョン、または粉末であり得、これらは、任意にさらなる溶解または希釈ステップの後に、注入または注射に好適となる。そのような調製物に好適な担体または希釈剤としては、たとえば、限定することなく、滅菌水および薬学的に許容される水性緩衝液および溶液、たとえば、生理学的リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、およびハंकス溶液、水油、グリセロール、エタノール、グリコール、たとえば、プロピレングリコール、ならびに鉱油、動物油、および植物油、たとえば、ピーナッツ油、ダイズ油、ならびにこれらの好適な混合物が挙げられる。

【0173】

本発明の結合タンパク質の溶液はまた、微生物の成長を防止するための保存剤、たとえば、抗菌剤および抗真菌剤、たとえば、p-ヒドロキシ安息香酸、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チオメルサル、エチレンジアミン四酢酸（そのアルカリ金属塩）なども含有し得る。多くの事例において、等張剤、たとえば、糖、緩衝剤、または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。乳化剤および／または分散剤を使用してもよい。適切な流動性は、たとえば、リボソームの形成によって、分散剤の場合には、必要とされる粒子サイズの維持によって、または界面活性剤の使用によって、維持することができる。吸収を遅延させる他の薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンもまた、添加され得る。溶液は、注射用バイアル、アンプル、注入ボトルなどに充填され得る。

すべての事例において、最終的な剤形は、製造および保管の条件下において、滅菌、流体、かつ安定でなければならない。滅菌注射溶液は、必要に応じて、上記に列挙された様々な他の成分とともに、活性化化合物を、必要とされる量で、適切な溶媒中に組み込み、続いて濾過滅菌することによって、調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の事例において、調製の好ましい方法は、事前に滅菌濾過した溶液中に存在する活性成分と任意の追加の所望される成分の粉末を得る、真空乾燥および凍結乾燥の技法である。

【0174】

通常、水溶液または懸濁液が好ましい。一般に、本発明の結合タンパク質などの治療用タンパク質の好適な製剤は、緩衝タンパク質溶液、たとえば、好適な濃度（たとえば、0.001~400mg/ml、好ましくは0.005~200mg/ml、より好ましくは0.01~200mg/ml、より好ましくは1.0~100mg/ml、たとえば、1.0mg/ml（静脈内投与）、または100mg/ml（皮下投与）のタンパク質と、水性緩衝液、たとえば、

- リン酸緩衝食塩水、pH 7.4、
- 他のリン酸緩衝液、pH 6.2~8.2、

- 酢酸緩衝液、pH 3.2 ~ 7.5、好ましくは pH 4.8 ~ 5.5、
- ヒスチジン緩衝液、pH 5.5 ~ 7.0、
- コハク酸緩衝液、pH 3.2 ~ 6.6、および
- クエン酸緩衝液、pH 2.1 ~ 6.2 を含み、

溶液の等張性を提供するために、塩（たとえば、NaCl）ならびに／または糖（たとえば、スクロースおよびトレハロース）ならびに／または他の多価アルコール（たとえば、マンニトールおよびグリセロール）を含んでもよい、溶液である。

【0175】

加えて、他の薬剤、たとえば、界面活性剤、たとえば、0.02% Tween-20 または Tween-80 が、そのような溶液に含まれてもよい。皮下適用のための製剤は、著しく高い濃度、たとえば、最大 100 mg/ml またはさらには 100 mg/ml を上回る、本発明の抗体を含み得る。しかしながら、当業者には、上記に提供されている成分およびその量が、1つの好ましい選択肢を表すに過ぎないことは明らかであろう。その代替形および変化形が、当業者には即座に理解されるか、または上記の開示から容易に想起することができる。上述の製剤は、溶液、たとえば、注射用水（WFI）中に再構成される凍結乾燥製剤として提供されてもよい。

本発明のさらなる態様によると、本発明の結合タンパク質は、タンパク質の投与に有用なデバイス、たとえば、シリンジ、注射ペン、マイクロポンプ、または他のデバイスと組み合わせて使用され得る。

【0176】

治療の方法

本発明のさらなる態様は、がんを処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の本発明の結合タンパク質を投与するステップを含む、方法を提供する。

本発明のさらなる態様は、がんを処置する方法において使用するための本発明の結合タンパク質を提供する。

本発明のさらなる態様は、がんを処置するための医薬組成物を調製するための、本発明の結合タンパク質の使用である。

【0177】

曖昧さを回避するために、本発明の医学的使用の態様は、上述の本発明の特定の結合タンパク質のうちのいずれか（たとえば、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 4 / CD3 # 1、DLL3 # 5 / CD3 # 1、DLL3 # 6 / CD3 # 1、DLL3 # 7 / CD3 # 1、DLL3 # 8 / CD3 # 1、DLL3 # 9 / CD3 # 1、DLL3 # 10 / CD3 # 1、DLL3 # 11 / CD3 # 1、DLL3 # 12 / CD3 # 1、DLL3 # 13 / CD3 # 1、DLL3 # 14 / CD3 # 1、DLL3 # 15 / CD3 # 1、DLL3 # 16 / CD3 # 1、DLL3 # 17 / CD3 # 1、DLL3 # 18 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 4 / CD3 # 2、DLL3 # 5 / CD3 # 2、DLL3 # 6 / CD3 # 2、DLL3 # 7 / CD3 # 2、DLL3 # 8 / CD3 # 2、DLL3 # 9 / CD3 # 2、DLL3 # 10 / CD3 # 2、DLL3 # 11 / CD3 # 2、DLL3 # 12 / CD3 # 2、DLL3 # 13 / CD3 # 2、DLL3 # 14 / CD3 # 2、DLL3 # 15 / CD3 # 2、DLL3 # 16 / CD3 # 2、DLL3 # 17 / CD3 # 2、DLL3 # 18 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 3、DLL3 # 4 / CD3 # 3、DLL3 # 5 / CD3 # 3、および DLL3 # 6 / CD3 # 3、DLL3 # 7 / CD3 # 3、DLL3 # 8 / CD3 # 3、DLL3 # 9 / CD3 # 3、DLL3 # 10 / CD3 # 3、DLL3 # 11 / CD3 # 3、DLL3 # 12 / CD3 # 3、DLL3 # 13 / CD3 # 3、DLL3 # 14 / CD3 # 3、DLL3 # 15 / CD3 # 3、DLL3 # 16 / CD3 # 3、DLL3 # 17 / CD3 # 3、DLL3 # 18 / CD3 # 3 のうちのいずれか1つ、好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3

3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3のうちのいずれか1つ)を含み得る。

本明細書において使用される場合、「がん」という用語は、侵襲の組織病理学的種類または段階に関係なく、すべての種類のがん性成長もしくは発がんプロセス、転移組織、または悪性形質転換細胞、組織、もしくは器官を含むことを意味する。

【0178】

本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質を使用して、その成長を阻害することができる例示的ながんは、任意のD L L 3発現腫瘍、好ましくは、S C L C、L C N E C、神経膠腫、神経膠芽腫、黒色腫、または他のD L L 3発現神経内分泌腫瘍(たとえば、神経内分泌性前立腺がんもしくは神経内分泌性膵臓がん、小細胞膀胱がん)である。

10

【0179】

神経内分泌腫瘍(N E T)は、散在した内分泌系から生じ、身体の数多くの異なる領域で発生し得る。従来的には、N E Tは、起源となる解剖学的部位によって分類されており、典型的に、攻撃性が高い。これらは、消化管、膵臓、または肺(小細胞肺癌および大細胞神経内分泌癌)、ならびに腎臓、または泌尿生殖器(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、および子宮内膜)に位置することがもっとも多い。N E Tには、消化管および膵島細胞のある特定の腫瘍、ある特定の胸腺および肺腫瘍、ならびに甲状腺の傍濾胞細胞の髄様癌が含まれる。

本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質を使用してその成長を阻害することができる追加のがんは、ある特定の遺伝子型、表現型、または生化学的特徴が、従来的に定義される神経内分泌腫瘍と共通している、偽神経内分泌腫瘍(p N E T)である。

20

【0180】

一部の実施形態において、以下のがん、腫瘍、および他の増殖性疾患は、本発明の多重特異性結合タンパク質で処置することができる: 肺がん、好ましくは、S C L C、N S C L C、またはL C N E C、乳房、子宮頸、結腸、結腸直腸、子宮内膜、頭頸部、肝臓(肝芽腫または肝細胞癌)、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、甲状腺、副腎、腎臓、膀胱、子宮、食道、尿路上皮のがん、脳腫瘍、リンパ腫、ユーイング肉腫、ならびに他の神経内分泌腫瘍および小青色円形細胞腫瘍。

本発明の好ましい実施形態において、がんは、小細胞肺癌(S C L C)または神経膠芽腫である。

30

身体における特定の位置/起源によって特徴付けられる、上述のすべてのがん、腫瘍、新生物などは、原発性腫瘍およびそれに由来する転移性腫瘍の両方を含むことを意味する。

【0181】

患者が高いD L L 3発現を有することを特徴とするがんを有する場合、その患者は、本発明の(本明細書に記載される)結合タンパク質での処置に応答する可能性がより高いことが、可能である。したがって、一部の実施形態において、本発明の結合タンパク質で処置しようとするがんは、高いD L L 3発現を有するがんであり、たとえば、D L L 3発現が、同じ種類のD L L 3発現がんを患う患者の集団のがん細胞における平均発現よりも高い。

40

本発明の結合タンパク質は、第1選択肢、第2選択肢、または任意のさらなる選択肢の処置、および維持処置の状況における治療レジメンにおいて、使用することができる。

本発明の結合タンパク質は、上述の疾患の予防、短期または長期の処置に使用することができ、放射線療法、1つもしくは複数の追加の治療剤、および/または外科手術と組み合わせて使用してもよい。

【0182】

好ましい実施形態において、本発明のタンパク質は、P D - 1アンタゴニスト、たとえば、抗P D - 1抗体または抗P D L - 1抗体と組み合わせて、がんの処置に使用される。好ましくは、前記抗P D - 1抗体は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ピディリズマブ、本明細書に記載されるP D 1 - 1、P D 1 - 2、P D 1 - 3、P D 1 - 4、およびP D 1

50

- 5 (以下の表 A における配列によって定義される)、ならびに国際公開第 2017/198741 号 (参照により本明細書に組み込まれる) からなる群から選択される。好ましくは、前記抗 PDL-1 抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブからなる群から選択される。特に好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質 (好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、または DLL3 # 3 / CD3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、PD1-1 と組み合わせて、がんの処置に使用される。特に好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質 (好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、または DLL3 # 3 / CD3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、PD1-2 と組み合わせて、がんの処置に使用される。特に好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質 (好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、PD1-3 と組み合わせて、がんの処置に使用される。特に好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質 (好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、PD1-4 と組み合わせて、がんの処置に使用される。特に好ましい実施形態において、本発明の結合タンパク質 (好ましくは、DLL3 # 1 / CD3 # 1、DLL3 # 1 / CD3 # 2、DLL3 # 1 / CD3 # 3、DLL3 # 2 / CD3 # 1、DLL3 # 2 / CD3 # 2、DLL3 # 2 / CD3 # 3、DLL3 # 3 / CD3 # 1、DLL3 # 3 / CD3 # 2、DLL3 # 3 / CD3 # 3 のうちのいずれか 1 つ) は、PD1-5 と組み合わせて、がんの処置に使用される。

10

20

【0183】

【表 1】

表A:抗PD1抗体PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4、PD1-5の重鎖および軽鎖配列のアミノ酸配列および配列番号

配列番号	配列の簡単な説明	配列
配列番号256	PD1-1 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号257	PD1-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFYQQ KPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
配列番号258	PD1-2 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号259	PD1-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFYQQ KPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

10

20

30

40

配列番号260	PD1-3 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号261	PD1-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDVSGISFMNWKYQQ KPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
配列番号262	PD1-4 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAP GKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号263	PD1-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDVSGISFMNWKYQQ KPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

10

20

30

配列番号264	PD1-5 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAP KGKLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYAMDYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号265	PD1-5 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFYQQ KPGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

10

【0184】

20

これらの好ましい実施形態および本発明の態様のうちの任意のその他のものによると、抗体PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4、およびPD1-5は、国際公開第2017/198741号に開示されている抗体分子であり、上記の表Aに示される配列によって定義される。

【0185】

したがって、PD1-1は、配列番号256のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号257のアミノ酸配列を含む軽鎖とを有し、
PD1-2は、配列番号258のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号259のアミノ酸配列を含む軽鎖とを有し、
PD1-3は、配列番号260のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖とを有し、
PD1-4は、配列番号262のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号263のアミノ酸配列を含む軽鎖とを有し、
PD1-5は、配列番号264のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号265のアミノ酸配列を含む軽鎖とを有する。

30

【0186】

上記には、上述の疾患を処置する様々な方法においてそれを必要とする患者に治療有効用量を投与することによる本発明の結合タンパク質の使用、ならびにそのような疾患の処置のための医薬品の製造のためのこれらの結合タンパク質の使用、ならびに本発明のそのような結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびに本発明のそのような結合タンパク質を含む医薬品の調製および/または製造なども含まれる。

40

【0187】

他の活性な物質または処置との組合せ

本発明の結合タンパク質は、それ自体で使用されてもよく、または1つもしくは複数の追加の治療剤との組合せ、特に、化学療法剤、たとえば、DNA損傷剤、血管新生を阻害する治療的に活性な化合物、シグナル伝達経路阻害剤、EGFR阻害剤、免疫調節剤、免疫チェックポイント阻害剤、有糸分裂チェックポイント阻害剤、またはホルモン療法剤との組合せで使用されてもよい。

追加の治療剤は、同時に投与されてもよく、任意に同じ医薬調製物の成分として同時に投与されてもよく、またはDLL3/CD3結合タンパク質の投与の前もしくは後に投与

50

されてもよい。

【0188】

本発明の結合分子と組み合わせて投与され得る細胞分裂抑制性および／または細胞毒性の活性物質としては、ホルモン、ホルモン類似体および抗ホルモン薬、アロマトーゼ阻害剤、LHRHアゴニストおよびアンタゴニスト、成長因子（たとえば、血小板由来成長因子（PDGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、上皮成長因子（EGF）、インスリン様成長因子（IGF）、ヒト上皮成長因子（HER、たとえば、HER2、HER3、HER4）、および肝細胞成長因子（HGF）などの成長因子）の阻害剤、阻害剤としては、たとえば、（抗）成長因子抗体、（抗）成長因子受容体抗体、およびチロシンキナーゼ阻害剤、たとえば、セツキシマブ、ゲフィチニブ、アフ

10
10
20
30
40
50

ァチニブ、ニンテダニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ボスチニブ、およびトラスツズマブなどがある、抗代謝剤（たとえば、葉酸代謝拮抗剤（antifolate）、たとえば、メトトレキサート、ラルチトレキセド、ピリミジン類似体、たとえば、5-フルオロウラシル（5-FU）、ゲムシタビン、イリノテカン、ドキシソルビシン、TAS-102、カペシタビン、およびゲムシタビン、プリンおよびアデノシン類似体、たとえば、メルカプトプリン、チオグアニン、クラドリビン、およびペントスタチン、シタラビン（ara-C）、フルダラビン）、抗腫瘍抗生物質（たとえば、アントラサイクリン）、白金誘導体（たとえば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン）、アルキル化剤（たとえば、エストラムスチン、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ダカルバジン、シクロホスファミド、イホスファミド、テモゾロミド、ニトロソ尿素、たとえば、カルムスチンおよびロムスチンなど、チオテパ）、抗有糸分裂剤（たとえば、ビンカルカロイド、たとえば、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン、およびビンクリスチンなど、ならびにタキサン、たとえば、パクリタキセル、ドセタキセル）、血管新生阻害剤、たとえば、ビバシズマブ、ラムシルマブ、およびアフリベルセプト、チューブリン阻害剤、DNA合成阻害剤、PARP阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤（たとえば、エピボドフィロトキシン、たとえば、エトポシドおよびエトポホスなど、テニボシド、アムサクリン、トポテカン、イリノテカン、ミトキサントロン）、セリン／スレオニンキナーゼ阻害剤（たとえば、PDK1阻害剤、Raf阻害剤、A-Raf阻害剤、B-Raf阻害剤、C-Raf阻害剤、mTOR阻害剤、mTORC1/2阻害剤、PI3K阻害剤、PI3Kα阻害剤、二重mTOR/PI3K阻害剤、STK33阻害剤、AKT阻害剤、PLK1阻害剤（たとえば、ボラセルチブ）、CDKの阻害剤、たとえば、CDK9阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤）、チロシンキナーゼ阻害剤（たとえば、PTK2/FAK阻害剤）、タンパク質タンパク質相互作用阻害剤、MEK阻害剤、ERK阻害剤、FLT3阻害剤、BRD4阻害剤、IGF-1R阻害剤、Bcl-xL阻害剤、Bcl-2阻害剤、Bcl-2/Bcl-xL阻害剤、Erbb受容体阻害剤、BCR-ABL阻害剤、ABL阻害剤、Src阻害剤、ラパマイシン類似体（たとえば、エベロリムス、テムシロリムス、リダフォロリムス、シロリムス）、アンドロゲン合成阻害剤、アンドロゲン受容体阻害剤、DNMT阻害剤、HDAC阻害剤、ANG1/2阻害剤、CYP17阻害剤、放射性医薬、免疫療法剤、たとえば、免疫チェックポイント阻害剤（たとえば、CTLA4、PD1、PD-L1、LAG3、およびTIM3結合分子／免疫グロブリン、たとえば、イピリムマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ）、ならびに様々な化学療法剤、たとえば、アミフォスチン、アナグレリド、クロドロネート（clodronat）、フィルグラスチン（filgrastin）、インターフェロン、インターフェロナルファ、ロイコボリン、リツキシマブ、プロカルバジン、レバミゾール、メスナ、ミトタン、パミドロネート、およびボルフィマー、プロテアソーム阻害剤（たとえば、ボルテゾミブ）、SmacおよびBH3模倣体、p53機能性を回復させる薬剤、たとえば、mdm2-p53アンタゴニスト、Wnt/ベータ-カテニンシグナル伝達経路の阻害剤、ならびに／またはサイクリン依存性キナーゼ9阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0189】

抗PD-1および抗PD-L1剤ならびに抗LAG3剤を含む、1つまたは複数の免疫

10

20

30

40

50

療法剤と組み合わせた本発明の結合分子での処置が、特に好ましく、例示的な抗PD1剤としては、抗PD-1抗体PDR-001、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ビディリズマブ、ならびに本明細書(表A)および国際公開第2017/198741号に開示されているPD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4、およびPD1-5が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な抗PDL-1剤としては、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、本発明の結合分子(好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ)は、PD1-1と組み合わ 10
 される。好ましい実施形態において、本発明の結合分子(好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ)は、PD1-2と組み合わ 20
 される。好ましい実施形態において、本発明の結合分子(好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ)は、PD1-3と組み合わ 30
 される。好ましい実施形態において、本発明の結合分子(好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ)は、PD1-4と組み合わ 40
 される。好ましい実施形態において、本発明の結合分子(好ましくは、DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3のうちのいずれか1つ)は、PD1-5と 50
 組み合わされる。

【0190】

ある特定の実施形態において、追加の治療剤は、さらなる免疫療法剤、たとえば、TIM-1、TIM-3、TIM-4、PD-L2、LAG3、CTLA-4、ガレクチン9、ガレクチン-1、CD69、CD113、GPR56、CD48、GARP、CAECAM-1、BTLA、TIGIT、CD160、LAIR1、2B4、CEACAM、CD39、TGFβ、IL-10、Fasリガンド、ICOS、B7ファミリー(B7-1、B7-2、B7-H1(PDL-1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)、またはB7-H6)の調節剤であり得る。 30

一部の実施形態において、追加の免疫療法剤は、同族TNF受容体ファミリーメンバーに結合するTNFファミリーメンバーの分子であり、これには、CD40およびCD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、GITR、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TLLA、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンホトキシンα/TNFβ、TNFR2、TNFα、LTβR、リンホトキシンα1β2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFRが含まれる。 40

【0191】

一部の実施形態において、追加の治療剤は、SMAC模倣体である。SMAC模倣体は、アポトーシスタンパク質の阻害剤(IAP)に結合し、免疫調節機能を有し、動物また 50

はヒトに投与された場合に、全身性サイトカイン（たとえば、IL-6、TNF α など）およびケモカイン（たとえば、MCP-1）の誘導を媒介する、化合物である。一部の実施形態において、SMAC模倣体は、(i) LCL161、すなわち、国際公開第2008/016893号の実施例における化合物1（28/29ページ、[122]）もしくはその薬学的に許容される塩、(ii) Debio-1143として公知のSMAC模倣体もしくはその薬学的に許容される塩、(iii) ピリナパントとして公知のSMAC模倣体もしくはその薬学的に許容される塩、(iv) ASTX-660として公知のSMAC模倣体もしくはその薬学的に許容される塩、または(v) CUDC-427として公知のSMAC模倣体もしくはその薬学的に許容される塩である。

【0192】

一部の実施形態において、追加の免疫治療剤は、(i) T細胞活性化を阻害するサイトカイン（たとえば、IL-6、IL-10、TGF-B、VEGF、「免疫抑制性サイトカイン」）のアンタゴニスト、ならびに/または(ii) T細胞活性化を刺激するサイトカイン、および/もしくは免疫応答を刺激するための、たとえば、増殖性疾患、たとえばがんを処置するためのIL2などのサイトカインのアゴニストから選択される。

一部の実施形態において、追加の免疫療法剤は、T細胞活性化を刺激するタンパク質、たとえば、CD28、GITRL、OX40L、CD27、およびCD28Hのアゴニストである。

【0193】

一部の実施形態において、追加の治療剤は、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、(AdV)、単純ヘルペスウイルス(HSV1もしくはHSV2)、レオウイルス、粘液腫ウイルス(MYXV)、ポリオウイルス、水疱性口炎ウイルス(VSV)、マラバウイルス、水痘ウイルス、麻疹ウイルス(MV)、またはニューカッスル病ウイルス(NDV)に由来する腫瘍溶解性ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない、腫瘍溶解性ウイルスである。

【0194】

診断的使用

本発明の抗DLL3抗体分子は、診断および予後診断方法において有用であり、異なる抗原に対する結合特異性を有する色素、薬物、または別の分子を付着させることによって、（たとえば、ELISAアッセイ、FACS分析、免疫組織学法などにおいて）DLL3を発現する細胞または組織の標識化、局在化、または特定のために用いることができる。たとえば、検出可能な標識を、本発明の抗DLL3抗体分子にコンジュゲートさせてもよく、または本発明の抗体分子に対して特異的に結合し、検出可能な標識（二次抗体）にコンジュゲートされている二次試薬を、そのような診断方法において使用してもよい。一部の実施形態において、DLL3に特異的な抗体は、細胞において、細胞質および/または細胞表面のいずれかに発現されるDLL3に特異的に結合し、そのような細胞を局在化および/または特定するために使用される。一部の実施形態において、本明細書に提供されるDLL3特異的抗体は、DLL3を発現する細胞または組織（たとえば、腫瘍細胞）を特定するために使用される。

本発明の抗体は、それらが、高いレベルのエピトープ結合特異性およびDLL3ポリペプチドに対する高い結合親和性を有するように、選択される。一般に、抗体の結合親和性が高いほど、よりストリンジентな洗浄条件をイムノアッセイにおいて実行して、標的ポリペプチドを除去することなく、非特異的に結合した材料を除去することができる。

【0195】

したがって、生物学的サンプル中のDLL3を検出する方法が、本明細書においてさらに提供される。具体的には、一態様において、本発明は、サンプル（たとえば、組織サンプル、腫瘍組織サンプル）中のDLL3を検出する方法であって、

- (a) サンプルを、本発明の抗体と接触させるステップと、
 - (b) DLL3に結合した抗DLL3抗体を検出するステップと
- を含む、方法を提供する。

10

20

30

40

50

生物学的サンプルは、対象の任意の組織（生検を含む）、細胞、または体液から獲得／単離することができる。好ましい実施形態において、サンプルは、組織サンプル、好ましくは、腫瘍組織サンプルである。特定の実施形態において、サンプルは、固定（腫瘍）組織サンプル、好ましくはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプル、より好ましくはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍組織サンプルである。

【0196】

サンプルは、典型的に、複数の部分に分割され、顕微鏡分析のための媒体、たとえば、顕微鏡スライドに固定される。サンプルが組織サンプルである場合、複数の部分は、組織切片であり得る。一部の実施形態において、連続切片は、FFPE組織サンプルから得られる。一部の実施形態において、連続切片は、FFPEブロックの複数の異なる部位から得られ、これは、切片内の不均質性およびブロック内の不均質性の両方を捕捉するために行われ得る。一部の実施形態において、連続切片は、同じ腫瘍内の異なる位置から取得された複数の異なる生検サンプルから取得され、これは、切片内の不均質性および腫瘍内の不均質性の両方を捕捉するために行われ得る。典型的には、組織サンプルは、まず、脱パラフィン処理を受け、抗原検出の前に抗原賦活化（たとえば、プロテイナーゼKによる）を受ける。組織サンプルは、様々な組織（たとえば、生検）、特に、SCLC、LCNEC、神経膠腫、神経膠芽腫、黒色腫、または他の神経内分泌腫瘍（たとえば、神経内分泌性前立腺がんもしくは神経内分泌性膵臓がん、小細胞膀胱がん）を含むがこれらに限定されない腫瘍から得られた組織から獲得／単離され得る。

10

【0197】

（組織）サンプルを獲得／単離することができるさらなる例示的な腫瘍としては、肺がん、好ましくはSCLC、NSCLC、またはLCNEC、乳房、子宮頸、結腸、結腸直腸、子宮内膜、頭頸部、肝臓（肝芽腫または肝細胞癌腫）、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、甲状腺、副腎、腎臓、膀胱、子宮、食道、尿路上皮のがん、脳腫瘍、ユーイング肉腫、ならびに他の神経内分泌腫瘍（偽内分泌腫瘍を含む）および小青色円形細胞腫瘍が挙げられる。

20

サンプル中のDLL3検出の例示的な方法は、免疫細胞化学法（ICC）、免疫組織化学法（IHC）、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、および／またはELISAである。

好ましい実施形態において、DLL3は、IHCを使用して検出される。

30

【0198】

本発明の特定の態様において、組織サンプル中のDLL3を検出する方法は、

- a) 組織サンプル（たとえば、腫瘍組織、たとえば、SCLC、神経膠芽腫、または神経内分泌腫瘍）、好ましくは、固定組織サンプル（たとえば、ホルマリン固定およびパラフィン包埋）を、本発明の抗体（たとえば、DLL3 # 1またはDLL3 # 5）と接触させるステップと、
 - b) サンプル中で、抗体 - 抗原複合体を形成させるステップと、
 - c) DLL3に結合した抗DLL3抗体を検出するステップと
- を含む。

40

【0199】

本発明の方法の一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、検出可能なシグナルによって検出され、好ましくは、検出可能なシグナルは、検出可能な標識によって生成される。本発明の方法の好ましい実施形態において、検出可能なシグナルは、IHCアッセイにおいて検出される。一部の実施形態において、検出可能なシグナルは、ELISAアッセイにおいて、フローサイトメトリーによって、またはウエスタンブロットによって、検出される。一部の実施形態において、本明細書に記載される方法は、たとえば、フローサイトメトリーを使用して、細胞（たとえば、腫瘍細胞）の細胞表面上に存在するDLL3を検出するために使用され得る。一部の実施形態において、本明細書に記載される方法は、ELISA、ウエスタンブロット、またはIHCを使用して、組織サンプル（たとえば、腫瘍組織サンプル）中のDLL3の存在を検出するために使用され得る。

50

【0200】

一部の実施形態において、検出可能な標識は、抗DLL3抗体に直接的にコンジュゲートされており、したがって、抗DLL3抗体がDLL3に結合すると、サンプル上に堆積され、これは、一般に直接標識法と称される。直接標識法は、より直接的に定量可能であることが多いが、感度の欠如という問題を有することが多い。他の実施形態において、検出可能な標識の堆積は、本発明の抗体分子に特異的に結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされている、二次検出試薬（二次抗体）の使用によってもたらされ、これは、一般に、間接標識方法と称される。一部の実施形態において、具体的な二次検出試薬は、種特異性二次抗体、ハプテンにコンジュゲートした抗DLL3抗体に結合する抗ハプテン抗体、またはビオチン化抗DLL3抗体に結合したビオチン結合タンパク質であり得る。

10

【0201】

本発明の抗DLL3抗体または二次検出試薬のいずれかにコンジュゲートすることができる検出可能な標識の具体的な例としては、発色性、蛍光性、リン光性、発光性、および放射性分子および材料、1つの物質を別の物質に変換して検出可能な違いをもたらす（たとえば、無色の物質を有色の物質に変換することもしくはその逆によって、または沈殿物を産生するかもしれないサンプルの濁度を増加させることによって）触媒（たとえば、酵素）、さらなる検出可能な標識された抗体コンジュゲートを使用して抗体-ハプテンの結合相互作用を通じて検出することができるハプテン、ならびに常磁性および磁性の分子または材料が挙げられる。

たとえば、検出可能な標識は、酵素、たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリ性ホスファターゼ（AP）、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、およびβ-ラクタマーゼ、フルオロフォア、たとえば、フルオレセイン、発色団、クマリン、BODIPY色素、レゾルフィン、およびローダミン、ナノ粒子、たとえば、量子ドット（米国特許第6,815,064号、同第6,682,596号、および同第6,649,138号）、金属キレート剤、たとえば、放射性または常磁性金属イオン、たとえば、 Gd^{3+} のDOTAおよびDPTAキレート剤、ならびにリボソーム、たとえば、捕捉された蛍光分子を含有するリボソームであり得る。

20

【0202】

検出可能な標識が酵素を含む場合、検出可能な物質、たとえば、発色原、蛍光性化合物、または発光性化合物は、検出可能なシグナルを生成する酵素と組み合わせて使用することができる。発色性化合物の具体的な例としては、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニルホスフェート（nitrophenylphosphate）（pNPP）、ファーストレッド（fast red）、プロモクロロインドリルホスフェート（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファーストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート]（ABTS）、o-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド（ONPG）、o-フェニレンジアミン（OPD）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル-D-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、p-ニトロフェニル-a-D-ガラクトピラノシド（PNP）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロニド（X-Gluc）、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルー、およびテトラゾリウムバイオレットが挙げられる。

30

一部の例において、検出可能な部分は、クマリン、フルオレセイン（またはフルオレセイン誘導体および類似体）、ローダミン、レゾルフィン、発光団、およびシアニンを含む、いくつかの一般的な化学クラスに属する、フルオロフォアである。

40

【0203】

他の実施形態において、検出可能な部分は、明視野顕微鏡によって検出可能な分子、たとえば、ジアミノベンジジン（DAB）、4-（ジメチルアミノ）アゾベンゼン-4'-

50

スルホンアミド (D A B S Y L)、テトラメチルローダミン (D I S C O V E R Y パーブル)、N, N' - ビスカルボキシペンチル - 5, 5' - ジスルホナト - インド - ジカルボシアニン (C y 5)、およびローダミン 110 (ローダミン) を含む色素である。

ハプテンは、抗体が特異的に結合する小分子であるが、それ自体は、動物において免疫応答を誘起せず、免疫応答を生成するには、まず、タンパク質などのより大きな担体分子に結合しなければならない。ハプテンの例としては、ジ - ニトロフェニル、ビオチン、ジゴキシゲニン、およびフルオレセインである。

【0204】

一態様において、腫瘍を、D L L 3 発現腫瘍 (細胞質および / または細胞表面に D L L 3 を発現する) として診断または特定する方法であって、本発明の抗 D L L 3 抗体 (たとえば、D L L 3 # 1 または D L L 3 # 5) を使用して (たとえば、I H C を腫瘍組織サンプルに対して使用して)、対象のサンプル (たとえば、腫瘍組織サンプル) 中の D L L 3 を検出するステップを含む、方法が、本明細書においてさらに提供される。さらなる態様において、対象に D L L 3 標的化療法を選択する方法であって、本発明の抗 D L L 3 抗体 (たとえば、D L L 3 # 1 または D L L 3 # 5) を使用して (たとえば、I H C を腫瘍組織サンプルに対して使用して)、対象のサンプル (たとえば、腫瘍組織サンプル) 中の D L L 3 を検出するステップを含む、方法が、本明細書において提供される。さらなる態様において、対象における (たとえば、D L L 3 標的化療法の) 治療効果をモニタリングする方法であって、本発明の抗 D L L 3 抗体 (たとえば、D L L 3 # 1 または D L L 3 # 5) を使用して (たとえば、I H C を腫瘍組織サンプルに対して使用して)、対象のサンプル (たとえば、腫瘍組織サンプル) 中の D L L 3 を検出するステップを含む、方法が、本明細書において提供される。

【0205】

本発明の抗 D L L 3 抗体分子はまた、細胞を標的化するためにも使用することができる。一部の実施形態において、本明細書において提供される D L L 3 特異的抗体は、薬物または細胞毒性剤を前記 D L L 3 抗体に結合させることによって、そのような薬物または細胞毒性剤を標的細胞 (たとえば、D L L 3 を発現する腫瘍細胞) に送達し、それによって、たとえば、前記標的細胞を殺滅するために使用される。

【0206】

キット

本発明はまた、少なくとも、本発明の多重特異性結合タンパク質 (たとえば、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 4 / C D 3 # 1、D L L 3 # 5 / C D 3 # 1、D L L 3 # 6 / C D 3 # 1、D L L 3 # 7 / C D 3 # 1、D L L 3 # 8 / C D 3 # 1、D L L 3 # 9 / C D 3 # 1、D L L 3 # 10 / C D 3 # 1、D L L 3 # 11 / C D 3 # 1、D L L 3 # 12 / C D 3 # 1、D L L 3 # 13 / C D 3 # 1、D L L 3 # 14 / C D 3 # 1、D L L 3 # 15 / C D 3 # 1、D L L 3 # 16 / C D 3 # 1、D L L 3 # 17 / C D 3 # 1、D L L 3 # 18 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 4 / C D 3 # 2、D L L 3 # 5 / C D 3 # 2、D L L 3 # 6 / C D 3 # 2、D L L 3 # 7 / C D 3 # 2、D L L 3 # 8 / C D 3 # 2、D L L 3 # 9 / C D 3 # 2、D L L 3 # 10 / C D 3 # 2、D L L 3 # 11 / C D 3 # 2、D L L 3 # 12 / C D 3 # 2、D L L 3 # 13 / C D 3 # 2、D L L 3 # 14 / C D 3 # 2、D L L 3 # 15 / C D 3 # 2、D L L 3 # 16 / C D 3 # 2、D L L 3 # 17 / C D 3 # 2、D L L 3 # 18 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3、D L L 3 # 4 / C D 3 # 3、D L L 3 # 5 / C D 3 # 3 および D L L 3 # 6 / C D 3 # 3、D L L 3 # 7 / C D 3 # 3、D L L 3 # 8 / C D 3 # 3、D L L 3 # 9 / C D 3 # 3、D L L 3 # 10 / C D 3 # 3、D L L 3 # 11 / C D 3 # 3、D L L 3 # 12 / C D 3 # 3、D L L 3 # 13 / C D 3 # 3、D L L 3 # 14 / C D 3 # 3、D L L 3 # 15 / C D 3 # 3、D L L 3 # 16 / C D 3 # 3、D L L 3 # 17 / C D 3 # 3、D L L 3 # 18 / C D 3 # 3 のうちのいずれか 1 つ、好ましくは、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D L L 3

1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3のうちのいずれか1つ)を含み、上述の疾患および障害の処置に使用される他の薬物からなる群から選択される1つまたは複数の他の成分を含んでもよい、キットも包含する。

一実施形態において、キットは、単位剤形で有効量の本発明の結合タンパク質を含む、組成物を含む。

本発明はまた、少なくとも、本発明の多重特異性結合タンパク質と、上述の疾患および障害の処置に使用される他の薬物からなる群から選択される1つまたは複数の他の成分とを含む、キットも包含する。

10

【0207】

一実施形態において、キットは、単位剤形で、有効量の本発明の多重特異性結合タンパク質(好ましくは、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3のうちのいずれか1つ)を含有する、組成物を含む。さらなる実施形態において、キットは、単位剤形で有効量の本発明の多重特異性結合タンパク質(好ましくは、D L L 3 # 1 / C D 3 # 1、D L L 3 # 1 / C D 3 # 2、D L L 3 # 1 / C D 3 # 3、D L L 3 # 2 / C D 3 # 1、D L L 3 # 2 / C D 3 # 2、D L L 3 # 2 / C D 3 # 3、D L L 3 # 3 / C D 3 # 1、D L L 3 # 3 / C D 3 # 2、D L L 3 # 3 / C D 3 # 3のうちのい

20

【0208】

一部の実施形態において、キットは、そのような組成物を含む滅菌容器を含み、そのような容器は、箱、アンプル、瓶、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスターパック、または当該技術分野において公知の他の好適な容器の形態であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、または医薬品を保持するのに好適な他の材料から作製され得る。さらに、キットは、凍結乾燥形態の本発明の結合タンパク質を有する第1の容器内の医薬組成物、および注射用の薬学的に許容される希釈剤(たとえば、滅菌水)を有する第2の容器を含み得る。薬学的に許容される希釈剤は、結合タンパク質の再構成または希釈に使用され得る。

30

【0209】

所望される場合、本発明の多重特異性結合タンパク質は、がんを有する対象に多重特異性結合タンパク質を投与するための説明書とともに提供される。説明書は、一般に、がんの処置または予防のための組成物の使用に関する情報を含むであろう。他の実施形態において、説明書は、以下のうちの少なくとも1つを含む:治療剤の説明、がんもしくはその症状の処置もしくは予防のための投薬スケジュールおよび投与、注意書き、警告、適応症、禁忌、過量投与の情報、有害反応、動物薬理学、臨床研究、ならびに/または参考文献。説明書は、容器(存在する場合)に直接印刷されていてもよく、または容器に適用されるラベルとして、または容器内もしくは容器とともに提供される別個のシート、パンフレット、カード、もしくはフォルダとして印刷されてもよい。

40

本明細書に記載されるように、本開示は、生物学的サンプル中のD L L 3の発現を判定するための診断方法をさらに提供する。一態様において、本開示は、これらの方法を実行するためのキット、ならびに本開示の方法を実行するため、たとえば、組織を採取するためおよび/または検出アッセイを実行するためおよび/または結果を分析するための説明書を提供する。

【0210】

キットは、本発明のD L L 3抗体組成物(たとえば、モノクローナル抗体)および使用

50

のための説明書を含むか、または代替的にはそれから本質的になるか、またはさらにはそれからなる。キットは、生物学的サンプル、たとえば、身体組織の任意の体液または生検サンプル中のD L L 3ポリペプチドの存在を検出するのに有用である。一部の実施形態において、キットは、サンプル中のD L L 3ポリペプチドに結合することができる1つまたは複数のD L L 3抗体（たとえば、抗D L L 3抗体D L L 3 # 1またはD L L 3 # 5）、サンプル中のD L L 3ポリペプチドを検出するための手段を含み、サンプル中のD L L 3ポリペプチドのシグナル/量を対照と比較するための手段を含んでもよい。本発明の抗D L L 3抗体のうちの1つまたは複数の、標識化されてもよい。キットの構成要素（たとえば、試薬）は、好適な容器にパッケージングされ得る。キットは、キットを使用してD L L 3ポリペプチドを検出するための説明書をさらに含み得る。ある特定の実施形態において、キットは、本発明の抗D L L 3抗体（第1の抗体）、およびD L L 3ポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされている、第2の異なる抗体を含む。

10

【0211】

キットはまた、たとえば、緩衝化剤、保存剤、またはタンパク質安定剤を含み得る。キットは、検出可能な標識を検出するために必要な成分、たとえば、酵素または基質をさらに含み得る。キットはまた、アッセイし、試験サンプルと比較することができる、対照サンプルまたは一連の対照サンプルも含み得る。キットのそれぞれの構成要素は、個別の容器内に封入されてもよく、様々な容器のすべてが、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための説明書とともに、単一のパッケージ内に含まれてもよい。本開示のキットは、キットの容器上またはその中に、文書を含み得る。文書は、キットに含まれる試薬を使用する方法について記載している。

20

適宜、これらの提案されたキットの構成要素は、当業者による使用に慣例的な様式で、パッケージングされ得る。たとえば、これらの提案されたキットの構成要素は、溶液で、または分散液などとして、提供され得る。

【実施例】

【0212】

以下の実施例により、本発明を例証する。これらの実施例は、本発明の範囲を制限すると解釈されるものではない。

【0213】

（実施例1）

C D 3 / D L L 3 結合タンパク質の設計および構築

本発明者らは、D L L 3およびC D 3に結合し、D L L 3を発現する腫瘍細胞の溶解を引き起こすT細胞活性化を誘導する、多重特異性結合タンパク質を開発した。使用される分子設計は、I g G抗体スキャフォールドおよびI g G様構造を有する。これは、F cにおけるノブ（抗D L L 3）アームとホール（抗C D 3）アームとのヘテロ二量体化のためのノブインホール技術の特徴とする。加えて、結合タンパク質は、それぞれのアームにおいて軽鎖と対応する重鎖との間に可動性ペプチド配列を有する。したがって、結合タンパク質は、一方がC D 3に結合し、他方がD L L 3に結合し、それぞれが一本鎖F a bおよびF c領域を含む、2つのアームを含む。

40

好ましくは、結合分子は、二重特異性であり、二価である（2つの標的のそれぞれに対して一価である）。

【0214】

ハイブリドーマおよび培養した単一B細胞からの高スループットV遺伝子回収を使用したD L L 3およびC D 3を認識する結合ドメインの調製

抗D L L 3結合物質を得るために、D L L 3免疫付与野生型およびA l i v a M a b ヒト化マウス（A b l e x i s、S a n F r a n c i s c o、C A、U S A、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を用いたA l i v a M a b トランスジェニックマウスプラットフォーム）に由来するハイブリドーマまたは単一B細胞を、インビトロで培養した。上清を、A l p h a L I S A（P e r k i n E l m e r、W a l t h a m、M A、U S A）によって組

50

換えヒトD L L 3に対する反応性についてスクリーニングし、フローサイトメトリーによってヒトD L L 3を発現するS H P 7 7細胞（A T C C（登録商標）、C R L - 2 1 9 5 T M）に対する反応性についてスクリーニングした。

【0215】

免疫グロブリン（I g）V HおよびV L遺伝子を、次いで、特定された陽性クローンから増幅させた。ハイブリドーマからR N Aを単離するために、単一クローンに由来する約 2×10^6 個の細胞を、ペレットにし、原料として使用した。単一B細胞については、単一で単離したB細胞から増大させた100～500個の細胞を、原料として使用した。R N Aは、R N e a s y P l u s（Q i a g e n、H i l d e n、G e r m a n y）を使用して単離した。次いで、S m a r t e r c D N A合成キット（C l o n t e c h、M o u n t a i n V i e w、C A）を製造業者の説明に従って使用して、c D N Aを合成した。c D N A合成を促進するために、o l i g o d Tを使用して、全てのメッセンジャーR N A逆転写をプライミングし、次いで、S m a r t e r I I Aオリゴヌクレオチドで「5'キャッピング」した。続いて、V HおよびV Lフラグメントの増幅を、S m a r t e r I I Aキャップを標的とする5'プライマーおよびC H 1におけるコンセンサス領域を標的とする3'プライマーを使用して、2ステップのP C R増幅を使用して行った。簡単に述べると、それぞれの50 μ lのP C R反応物は、20 μ Mのフォワードおよびリバースプライマーの混合物、25 μ lのP r i m e S t a r M a x D N Aポリメラーゼプレミックス（C l o n t e c h）、2 μ lの未精製c D N A、ならびに21 μ lの二重蒸留H₂Oからなる。サイクリングプログラムは、94において3分間から開始され、続いて、35回のサイクル（94において30秒間、50において1分間、68において1分間）の後、72において7分間で終了する。2回目のP C Rは、それぞれのp T T 5母ベクター（V HおよびV L）におけるそれぞれの領域と「オーバーラップする」15bpの相補的伸長を含む、V LおよびV Hの2回目のプライマーを用いて行った。2回目のP C Rは、以下のプログラムで行った：94において3分間、35回のサイクル（94において30秒間、50において1分間、68において1分間）、72において7分間で終了。

【0216】

I n - F u s i o n（登録商標）H Dクローニングキット（C l o n t e c h、U . S . A .）を、V L遺伝子のp T T 5 h u I g Kベクターへの指向性クローニングおよびV H遺伝子のp T T 5 h u I g G 1 K Oベクターへの指向性クローニングに使用した。I n - F u s i o n（登録商標）H Dクローニングを促進するために、P C R産物を、精製し、I n - F u s i o n H Dクローニングの前に、クローニングエンハンサーで処理した。クローニングおよび形質転換は、製造業者のプロトコル（C l o n t e c h、U . S . A .）に従って行った。ミニプレップD N Aを、サンガーシーケンシングに供して、完全なV遺伝子フラグメントが得られたことを確認した。

この手法を使用して、D L L 3に対する特異性を有する結合ドメインをコードするI g V HおよびV L遺伝子の対を、調製した。C H O - E 3 7細胞に、対応する重鎖および軽鎖をコードするプラスミドを一過的にトランスフェクトすることによって、組換え抗体を産生させた。

【0217】

組換え抗体の確認用スクリーニング

発現された組換え抗体を含有する上清を、ヒトまたはカニクイザルD L L 3を発現する細胞株への結合について、フローサイトメトリーによってアッセイした。簡単に述べると、細胞を、組換え上清とともにインキュベートし、洗浄し、上清から結合したm A bを、抗ヒトI g G - A P C（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 109-136-098）を用いて検出した。シグナル対バックグラウンド比（S / B）は、サンプルの蛍光強度中央値（M F I）を、アイソタイプ対照（無関係のタンパク質に対する可変領域および異なる定常領域骨格）のもので除すことによって、計算した。

【0218】

Biacore 400における表面プラズモン共鳴 (SPR) を、組換え上清に行った。簡単に述べると、HTP上清中の最適化されていないIgGを、10ul/分で60秒間、プロテインA/Gを介してセンサ表面に捕捉した。捕捉したIgGへの100nMのヒトDLL3の結合を、30ul/分で180秒間の会合、続いてHBS-EP緩衝液中での120秒間の解離について、モニタリングした。プロテインA/G表面の再生を、それぞれの結合サイクルの合間に、pH2.1のグリシンを用いて行った。以下の材料を、このアッセイにおいて使用した：タンパク質試薬：組換えで発現させたヒトDLL3。システム泳動緩衝液：HBS-EP (10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、および0.005% v/vのポリソルベートP20)。捕捉用試薬：すべてのヒトIgGアイソタイプに特異性を有するプロテインA/G (ThermoFisher Scientific、Waltham、MA、USA)。

10

目的のクローン ($K_d < 300 \text{ pM}$) を、多重特異性形式に関して選択した。多重特異性結合タンパク質を生成し、機械的および機能的スクリーニング (たとえば、以下に記載される細胞結合、細胞毒性、およびT細胞活性化) においてさらに評価した。

【0219】

DLL3およびCD3結合物質のヒト化

上述のDLL3結合物質、ならびに文献に記載されているCD3結合物質 (Pessano et al., EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337-44、Salmeron A et al., J Immunol. 1991 Nov 1; 147(9):3047-52) の配列を、ヒト化および/または最適化した。抗体の配列最適化/ヒト化は、治療薬として使用するために、ヒトにおいて産生される抗体に似させ、それによって、特異性を維持しながら免疫原性などの可能性のある副作用を排除する、(特定の抗原/エピトープに対して) 非ヒト種において生じる抗体を操作するための手法である。利用される配列最適化/ヒト化アプローチは、Singh et al, 2015 (Singh S et al., mAbs 2015: 7(4):778-91) によって記載されている。簡単に述べると、緊密に一致するヒト生殖細胞系を、コンピュータで特定し、最適化/ヒト化バリエーションを、ファージスクリーニング方法を使用して評価した。最終的なリード候補配列は、結合、ヒトパーセントスコア、およびEpivax (可能性のある免疫原性をコンピュータで予測するツール) スコアに基づいて選択した。

20

【0220】

DLL3およびCD3に結合する二重特異性タンパク質の構築

DLL3およびCD3結合物質の可変領域を、一般的な分子生物学技法を使用して発現ベクターpTT5 (National Research Council、Canada) にクローニングして、DLL3に結合する一本鎖FabおよびFc領域を含む1つのDLL3特異的結合ユニット (そのような結合ユニットはまた、本明細書において、「DLL3アーム」または「DLL3鎖」とも称される) と、CD3に結合する一本鎖FabおよびFc領域を含むCD3特異的結合ユニット (そのような結合ユニットはまた、本明細書において、「CD3アーム」または「CD3鎖」とも称される) とを有する二重特異性結合タンパク質を形成した。DLL3およびCD3アームのFc領域には、「ノブ」または「ホール」のいずれかの突然変異が含まれ (Atwell et al, JMB, 1997, 270, 26-35)、それぞれの鎖は、ノブ鎖またはホール鎖と称される。多重フラグメントのDNAアセンブリについては、ギブソンアセンブリおよびNEBuilder HiFi DNAアセンブリのアプローチを、製造業者のプロトコルに従って使用した (New England Biolabs、Ipswich、MA、USA)。DNAミニプレップをシーケンシングした。

40

【0221】

それぞれの発現ベクターは、鎖をコードする遺伝子 (DLL3またはCD3アーム/鎖)、たとえば、シグナル配列ならびに軽鎖および重鎖をコードする遺伝子のための真核生物プロモーターエレメント、原核生物選択マーカー遺伝子、たとえば、アンピシリンの発現カセット、ならびに複製起点を含む。これらのDNAプラスミドを、アンピシリン耐性大腸菌コロニーおよび培養物において伝播させ、精製した。

50

【0222】

(実施例2)

DLL3およびCD3に結合する二重特異性、二価結合タンパク質の発現および精製

DLL3およびCD3に結合する二重特異性分子を、DLL3/CD3鎖をコードする遺伝子を保持するpTT5ベクターをCHO-E細胞に一過的にトランスフェクトすることによって産生させた。簡単に述べると、無血清培地において懸濁液中で成長するトランスフェクトしたCHO-E細胞を、140rpmでの攪拌、37℃、および5% CO₂下において、振盪フラスコ中で培養し、指数関数的成長の条件で維持した。トランスフェクションの日には、細胞に、ノブ鎖のプラスミドおよびホール鎖のプラスミドを1:3の質量比でトランスフェクトした。これらを、次いで、1~2×10⁶個の細胞/mlで、1LのGibco(登録商標)FreeStyle(商標)CHO発現培地(Life Technologies、NY、US)に播種した。細胞を、次いで、200mlの市販フィード溶液を一度にフィードして、10日間、回転振盪させながらインキュベートして、タンパク質の発現を可能にした。細胞培養上清中の抗体価を、Octet(登録商標)機器(Pall ForteBio、CA、US)およびprotAバイオセンサーチップを製造業者の説明書に従って使用して判定した。

10

【0223】

組換えDLL3/CD3結合タンパク質を、まず、MabSelect(商標)カラム(GE Healthcare)を使用したプロテインA親和性クロマトグラフィーによって、次に、Poros 50 HSカラム(Applied Biosystems、Carlsbad、CA、USA)を使用したカチオン交換クロマトグラフィーによって、2ステップのプロセスで培養上清から精製した。2ステップで精製した材料を、50mMの酢酸ナトリウムおよび100mMのNaCl、pH5.0の最終緩衝液中で保存した。サンプルの純度および不均質性の程度を、サイズ排除クロマトグラフィー分析、質量分析法、および超遠心分析法によって、評価した。機能性試験へと進めたサンプルは、2ステップで精製した材料を含み、約99%の単量体含量であった。

20

【0224】

【表 2】

表1:本明細書に記載されるタンパク質/抗体コンストラクトのCDR、VH、VL、scFab、DLL3アーム、およびCD3アームの配列のアミノ酸配列および配列番号

配列番号	配列の簡単な説明	配列
配列番号 1	DLL3#1 LCCDR1	RASQSVSSNFLV
配列番号 2	DLL3#1 LCCDR2	GASTRAS
配列番号 3	DLL3#1 LCCDR3	QQYGDSPYT
配列番号 4	DLL3#1 HCCDR1	GNTFTNYMH
配列番号 5	DLL3#1 HCCDR2	IIDPSVGSKSYAQKFLG
配列番号 6	DLL3#1 HCCDR3	AGKRFGESYFDY
配列番号 7	DLL3#2 LCCDR1	RASQGISNYLA
配列番号 8	DLL3#2 LCCDR2	AASSLQS
配列番号 9	DLL3#2 LCCDR3	LQHNSSPYT
配列番号 10	DLL3#2 HCCDR1	GYTFTSYMH
配列番号 11	DLL3#2 HCCDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
配列番号 12	DLL3#2 HCCDR3	GEAVGGNYYYYGMDV
配列番号 13	DLL3#3 LCCDR1	RASQGISNYLV
配列番号 14	DLL3#3 LCCDR2	AVSSLYS
配列番号 15	DLL3#3 LCCDR3	LQHDSYPYT
配列番号 16	DLL3#3 HCCDR1	GYTFTSYVH
配列番号 17	DLL3#3 HCCDR2	IINPGGGTTSYAQKFLG
配列番号 18	DLL3#3 HCCDR3	GEAVTGNFYFYGMDV

10

20

30

40

配列番号 19	DLL3#4 LCCDR1	RASKSVSSFGYSFMH
配列番号 20	DLL3#4 LCCDR2	LASNLES
配列番号 21	DLL3#4 LCCDR3	QHSRELPWT
配列番号 22	DLL3#4 HCCDR1	VYTFTSYFMY
配列番号 23	DLL3#4 HCCDR2	EISPTNGNSNLNERFKN
配列番号 24	DLL3#4 HCCDR3	GGDGYLDY
配列番号 25	DLL3#5 LCCDR1	QASQDISNYLN
配列番号 26	DLL3#5 LCCDR2	DASNLET
配列番号 27	DLL3#5 LCCDR3	QQYDNLPTWT
配列番号 28	DLL3#5 HCCDR1	GFTFTGYIHH
配列番号 29	DLL3#5 HCCDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG
配列番号 30	DLL3#5 HCCDR3	GWDY
配列番号 31	DLL3#6 LCCDR1	RASQDISNYFA
配列番号 32	DLL3#6 LCCDR2	AASTLQS
配列番号 33	DLL3#6 LCCDR3	QQLNSYPYT
配列番号 34	DLL3#6 HCCDR1	GGSISSYFWS
配列番号 35	DLL3#6 HCCDR2	RIYTSGSTNYNPSLNS
配列番号 36	DLL3#6 HCCDR3	RGDWGGFDI
配列番号 37	DLL3#1 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPG QAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAL YYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIK

10

20

30

40

配列番号 38	DLL3#1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYMHWVRQ APGPGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFL DLYSLRSEDVAVYFCARAGKRFGESYFDYWGQGTTLTVSS
配列番号 39	DLL3#2 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQKPG KVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIK
配列番号 40	DLL3#2 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDVAVYYCARGEAVGGNYYYYGMDVWGQGTTVT VSS
配列番号 41	DLL3#3 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQKPG KAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIK
配列番号 42	DLL3#3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQA PGQGLEWMVIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTSTNTVY MELKSLRSEDVAVYYCARGEAVTGNYFYYGMDVWGQGTTV TVSS
配列番号 43	DLL3#4 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFSGYSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DAATYYCQHSRELPTWTFGGGTKLEIK
配列番号 44	DLL3#4 VH	QVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTFTSYFMYWVKQR PGHGLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTLTVSS
配列番号 45	DLL3#5 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITVTCQASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDAT YYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIK
配列番号 46	DLL3#5 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWVRQA PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSINTAF MELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGTTLTVSS
配列番号 47	DLL3#6 VL	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVITICRASQDISNYFAWYQQKPGK APKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK
配列番号 48	DLL3#6 VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAG KGLEWIGRIYTSNSTNPNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGQGTVVTVSS

10

20

30

40

配列番号 49	DLL3#1 scFab	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPG QAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAL YYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGNTFTNYYMHWRQ APGPGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFL DLYSLRSED TAVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 50	DLL3#2 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQKPG KVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHNSSPYTFGQGTTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWRQ APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGEAVGGNYYYGMDVWGQGT T TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 51	DLL3#3 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQKPG KAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHDSYPYTFGQGTTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVHWVRQ APGQGLEWMVIINPGGGTTSY AQKFLGRVTMTRDTSTNTVY MELKSLRSED TAVYYCARGEAVTGNYFYGYGMDVWGQGT T TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

10

20

30

40

配列番号 52	DLL3#4 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DAATYYCQHSRELPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSQVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTFTSYFMY WVKQRPQHGLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 53	DLL3#5 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIA YYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWV RQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDRSSIN TAFMELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGTTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC
配列番号 54	DLL3#6 scFab	DIQLTQSPSFLSTSVGDRTITCRASQDISNYFAWYQQKPGK APKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCQQQLNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPA GKGLEWIGRIYTSNSTNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGQGTVVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSC

10

20

30

40

配列番号 55	CD3#1 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
配列番号 56	CD3#1 LCCDR2	GTNKRAP
配列番号 57	CD3#1 LCCDR3	ALWYSNLWV
配列番号 58	CD3#1 HCCDR1	GFTFNTYAMN
配列番号 59	CD3#1 HCCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
配列番号 60	CD3#1 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
配列番号 61	CD3#2 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
配列番号 62	CD3#2 LCCDR2	GTNKRAP
配列番号 63	CD3#2 LCCDR3	ALWYSNLWV
配列番号 64	CD3#2 HCCDR1	GFTFNTYAMN
配列番号 65	CD3#2 HCCDR2	RIRSKYINYATYYADSVKD
配列番号 66	CD3#2 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
配列番号 67	CD3#1 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
配列番号 68	CD3#1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLV TVSA
配列番号 69	CD3#2 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

10

20

30

配列番号 70	CD3#2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVT VSA
配列番号 71	CD3#1 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 72	CD3#2 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

10

20

30

配列番号 73	DLL3#1 鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPG QAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAL YYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYYMHWRQ APGPGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFL DLYSLRSEDТАVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 74	DLL3#2 鎖	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQKPG KVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQ APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARGEAVGGNYYYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

10

20

30

40

配列番号 75	DLL3#3 鎖	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQKPG KAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHDSYPYTFGQGKTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVHWVRQ APGQGLEWMVIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTSTNTVY MELKSLRSEDVAVYYCARGEAVTGNYFYGMVDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
配列番号 76	DLL3#4 鎖	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DAATYYCQHSRELPTWTFGGGKTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSQVQLQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTSYFMY WVKQRPQHGLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

配列番号 77	DLL3#5 鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCQASQDISNYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIAT YYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSIN TAFMELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 78	DLL3#6 鎖	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVITICRASQDISNYFAWYQQKPGK APKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTITSSSLQPEDFAT YYCQQQLNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPA GKGLEWIGRIYTSGSTNYPNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGQGTVVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

配列番号 79	CD3#1 鎖	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQ EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNRTQKS LSLSPG
配列番号 80	CD3#2 鎖	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQ EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNRTQKS LSLSPG

10

20

30

40

配列番号 81	Fc ドメイン * (IgG1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 82	Fc Wドメイン (IgG1, LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 83	Fc SAVドメイン (IgG1, RF/LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNRFTQKSLSLSPG
配列番号 84	Fc ドメイン (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号 85	Fc Wドメイン (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号 86	Fc SAVドメイン (IgG4Pro, RF)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNRFTQKSLSLGLG
配列番号 87	カッパ軽鎖 の定常領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 88	ラムダ軽鎖 の定常領域	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

10

20

30

40

配列番号 89	リンカー	GGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGS
配列番号 90	リンカー	GGGSGGGGSGGSGGSGGGGS
配列番号 91	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 92	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 93	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 94	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 95	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGG GGS
配列番号 96	CD3#3 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
配列番号 97	CD3#3 LCCDR2	GTNKRAP
配列番号 98	CD3#3 LCCDR3	ALWYSNLWV
配列番号 99	CD3#3 HCCDR1	GFTFNTYAMN
配列番号 100	CD3#3 HCCDR2	RIRSKYANYATYYADSVKD
配列番号 101	CD3#3 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
配列番号 102	CD3#3 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
配列番号 103	CD3#3 HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLV TVSA

10

20

30

配列番号 104	CD3#3 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTSLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 105	CD3#3 鎖	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQP EDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPAECSGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKST GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTSLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKS LSLSPG
配列番号 133	DLL3#7 LCCDR1	RASQSVNSNFLA
配列番号 134	DLL3#7 LCCDR2	GTSSRAT
配列番号 135	DLL3#7 LCCDR3	QQYGSSPWT
配列番号 136	DLL3#7 HCCDR1	GFTFSSYGMF

10

20

30

40

配列番号 137	DLL3#7 HCCDR2	VIWLDGDDDEDYVDSVKG
配列番号 138	DLL3#7 HCCDR3	VLDY
配列番号 139	DLL3#8 LCCDR1	KSSQSVLDTSNNKNYLV
配列番号 140	DLL3#8 LCCDR2	WASTRES
配列番号 141	DLL3#8 LCCDR3	QHYYNSPYT
配列番号 142	DLL3#8 HCCDR1	GYTFTDYMH
配列番号 143	DLL3#8 HCCDR2	WINPNSGGTNYEQKFQG
配列番号 144	DLL3#8 HCCDR3	DAVVIPMDY
配列番号 145	DLL3#9 LCCDR1	RASQSISRSYLA
配列番号 146	DLL3#9 LCCDR2	GASSRAT
配列番号 147	DLL3#9 LCCDR3	QQYGTSPIT
配列番号 148	DLL3#9 HCCDR1	GGSISSYYWS
配列番号 149	DLL3#9 HCCDR2	YRYYSNGNTNYPNPSLKS
配列番号 150	DLL3#9 HCCDR3	IGVAGFYFDY
配列番号 151	DLL3#10 LCCDR1	RASQSLNSIFLA
配列番号 152	DLL3#10 LCCDR2	GASSRAT
配列番号 153	DLL3#10 LCCDR3	QQYGGSMNT
配列番号 154	DLL3#10 HCCDR1	GYTFTGYMH
配列番号 155	DLL3#10 HCCDR2	WINPNSGGTIFAQRFQG
配列番号 156	DLL3#10 HCCDR3	DFGDTVGNAFDI

10

20

30

40

配列番号 157	DLL3#11 LCCDR1	SASSSVTYIH
配列番号 158	DLL3#11 LCCDR2	RTSYLAS
配列番号 159	DLL3#11 LCCDR3	QQRSSYPRT
配列番号 160	DLL3#11 HCCDR1	GYAFSDYWIT
配列番号 161	DLL3#11 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
配列番号 162	DLL3#11 HCCDR3	LYYYGSHYLDT
配列番号 163	DLL3#12 LCCDR1	SASSSVTYIH
配列番号 164	DLL3#12 LCCDR2	RTSYLAS
配列番号 165	DLL3#12 LCCDR3	QQRSSYPRT
配列番号 166	DLL3#12 HCCDR1	GYAFSDYWIT
配列番号 167	DLL3#12 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
配列番号 168	DLL3#12 HCCDR3	LYYYGSYYLDT
配列番号 169	DLL3#13 LCCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
配列番号 170	DLL3#13 LCCDR2	KVSNRFS
配列番号 171	DLL3#13 LCCDR3	FQGSHVPYT
配列番号 172	DLL3#13 HCCDR1	GYTFTNYGVT
配列番号 173	DLL3#13 HCCDR2	WINTYSGAPTYADDFNG
配列番号 174	DLL3#13 HCCDR3	LDDYDLYYFDY
配列番号 175	DLL3#14 LCCDR1	KASQSVDYDGD SYMN
配列番号 176	DLL3#14 LCCDR2	AASTLES

10

20

30

40

配列番号 177	DLL3#14 LCCDR3	QQSDEDPWT
配列番号 178	DLL3#14 HCCDR1	GYTFTDYIYH
配列番号 179	DLL3#14 HCCDR2	YIYPGNSYTAYNQKFKD
配列番号 180	DLL3#14 HCCDR3	SGGSAMDY
配列番号 181	DLL3#15 LCCDR1	KASQSVDYDGD SYLN
配列番号 182	DLL3#15 LCCDR2	AASNLES
配列番号 183	DLL3#15 LCCDR3	QQSSEDPRT
配列番号 184	DLL3#15 HCCDR1	GYTFTNYGMN
配列番号 185	DLL3#15 HCCDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
配列番号 186	DLL3#15 HCCDR3	FHFSSNGDAMDN
配列番号 187	DLL3#16 LCCDR1	RASQSVSDWLA
配列番号 188	DLL3#16 LCCDR2	RASSLES
配列番号 189	DLL3#16 LCCDR3	QLYNSYSPT
配列番号 190	DLL3#16 HCCDR1	GFTFSSYWMT
配列番号 191	DLL3#16 HCCDR2	NIKEDGSEKYYVDSVKG
配列番号 192	DLL3#16 HCCDR3	DWGYFDY
配列番号 193	DLL3#17 LCCDR1	RASENIYYSLA
配列番号 194	DLL3#17 LCCDR2	NTNSLED
配列番号 195	DLL3#17 LCCDR3	KQAYDFPLT
配列番号 196	DLL3#17 HCCDR1	GYTFISYYIH

10

20

30

40

配列番号 197	DLL3#17 HCCDR2	WIYPGDGSTNNNEKFKG
配列番号 198	DLL3#17 HCCDR3	GEGNAMDD
配列番号 199	DLL3#18 LCCDR1	RASENIYYSLA
配列番号 200	DLL3#18 LCCDR2	NANSLED
配列番号 201	DLL3#18 LCCDR3	KQAYDVPLT
配列番号 202	DLL3#18 HCCDR1	GYTFTAYFIH
配列番号 203	DLL3#18 HCCDR2	YIDPFNDDTNYNVKFKG
配列番号 204	DLL3#18 HCCDR3	GTSATLDY
配列番号 205	DLL3#7 VL	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQKPG QTPRLLIIGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPWTFGQGQTKVEIR
配列番号 206	DLL3#7 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQA PGKGLEWVAVIWLDGDDDEDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRVDDTAIYYCARVLDYWGQGTLLVTVSS
配列番号 207	DLL3#8 VL	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLVWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIK
配列番号 208	DLL3#8 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTAVYYCTRDVVIPMDYWGQGTLLVTVSS
配列番号 209	DLL3#9 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSSRSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGTSPITFGQGTTRLEIK
配列番号 210	DLL3#9 VH	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQTPG KGLDWIGYRYYSNTNYPNLSKSRVTISLDMNNQFSLKLSSV TAADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGQGTLLVTVSS

10

20

30

配列番号 211	DLL3#10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQKPG QAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYFCQQYGGSMNTFGGGTKLEIK
配列番号 212	DLL3#10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVRLA PGQGLEWMGWINPNSGGTIFAQRFQGRVTMTRDTSISTVYM DLNRLRSDDTAVYYCARDFTVGNAFDIWGQGGMVTVSS
配列番号 213	DLL3#11 VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGGTKLEIK
配列番号 214	DLL3#11 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQR PGQGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQF SSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTTLTVSS
配列番号 215	DLL3#12 VL	QVVLQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGGTKLEIK
配列番号 216	DLL3#12 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQR PGQGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQF SSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSYYLDTWGQGTTTLTVSS
配列番号 217	DLL3#13 VL	DVLMQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYL QKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK
配列番号 218	DLL3#13 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVTWVKQAP GKGLKWMGWINTYSGAPTYADDFNGRFALSLETSAAYLQ INNLKNETATYFCARLDDYDLYYFDYWGGGTALTSS
配列番号 219	DLL3#14 VL	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQ QKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEE EDAATYYCQQSDEDPWTFGGGTKLEIK
配列番号 220	DLL3#14 VH	QIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYTFTDYIHWKQRPQG GLEWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSS

10

20

30

配列番号 221	DLL3#15 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDAATYYCQQSSEDPRFTFGGGTKLEIK
配列番号 222	DLL3#15 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQ INNLRNEDMATYFCTKFHFSSNGDAMDNDWGQGTSTVTVSS
配列番号 223	DLL3#16 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVSDWLAWYQQKPG KAPKFLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPADFAT YYCQLYNSYSPTFGQGQTKVEIK
配列番号 224	DLL3#16 VH	EVHLLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQA PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRADETALYYCARDWGYFDYWGQGTSLTVTVSS
配列番号 225	DLL3#17 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGK SPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTA TYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELK
配列番号 226	DLL3#17 VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYYIHWVKQRPG QGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYMLL SSLTSEDSAVYFCARGEGNAMDDWGQGTSTVTVSS
配列番号 227	DLL3#18 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGK SPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINNMQPEDTA TYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELK
配列番号 228	DLL3#18 VH	QVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWVKQK PGQGLEWIGYIDPFNDNTNYNVKFKGKATLTSDTSSSIAYME LSSLTSEDSFYFCARGTSATLDYWGHTLTVTVSS
配列番号 229	DLL3#7 scFab	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQKPG QTPRLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGGSPWTFGQGQTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEGGSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQ APGKGLEWVAVIWLDDGDEDEDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRVDDTAIYYCARVLDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVPEPKSC

10

20

30

40

配列番号 230	DLL3#8 scFab	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLVWY QQKPGQPPKLLIWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESK STGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYY MHWVRQAPGQGLEWMGWNPNSGGTNYEQKFQGRVTMT RDTISISTAYMELNRLRSDDTAVYYCTRDAVVIPMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 231	DLL3#9 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSSIRSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGTSPITFGQGTTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQ VHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQTPGK GLDWIGYRYYSGNTNYPNPSLKSRTISLDMSNNQFSLKLSSVT AADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVF LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSC
配列番号 232	DLL3#10 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQKPG QAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWV RLAPGQGLEWMGWNPNSGGTIFAQRFQGRVTMT RDTISIST VYMDLNRLRSDDTAVYYCARD FGD TVGNAFDI WGQGT MVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

10

20

30

40

配列番号 233	DLL3#11 scFab	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQV QLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPG QGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSS LTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC
配列番号 234	DLL3#12 scFab	QVVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQV QLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPG QGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSS LTPEDSAVYYCVSLYYYGSYYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSC
配列番号 235	DLL3#13 scFab	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYL QKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPTYTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVT WVKQAPGKGLKWMGWINTYSGPTYADDFNGRFALSLETS ASTAYLQINNLIKNETATYFCARLDDYDLYYFDYWGQGTA LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

10

20

30

40

配列番号 236	DLL3#14 scFab	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQ QKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEE EDAATYYCQQSDEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYTFTDYYIHW KQRPQGGLWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSS AYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSC
配列番号 237	DLL3#15 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEE EDAATYYCQQSSEDPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLTS ASTAYLQINNLLKNEEDMATYFCTKHFSSNGDAMDNWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC
配列番号 238	DLL3#16 scFab	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVSDWLAWYQQKPG KAPKFLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPADFAT YYCQLYNSYSPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGS EVHLLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQA PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQ MNSLRAEDTALYYCARDWGYFDYWGGGTGLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKSC

10

20

30

40

配列番号 239	DLL3#17 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGK SPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTA TYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGG GSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYIHWVKQR PGQGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYM LLSSLTSEDSAVYFCARGEGNAMDDWGQGTSTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC	10
配列番号 240	DLL3#18 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGK SPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTA TYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGG GSQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWVK QKPGQGLEWIGYIDPFNDNTNINVKFKGKATLTSDTSSSIAY MELSSLTSEDSFYFCARGTSATLDYWGHTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC	20
配列番号 241	DLL3#7 鎖	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQKPG QTPRLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGGSPWTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGG SQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQ APGKGLEWVAVIWLDDGDEYVDSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRVDDTAIYYCARVLDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVQLHWDNLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	30 40

配列番号 242	DLL3#8 鎖	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNNKNYLWVY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESK STGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY MHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMT RDTTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCTRDVAVIPMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
配列番号 243	DLL3#9 鎖	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSSRSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGTSPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQ VHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQTPGK GLDWIGYRYSGNTNYPNPSLKSRVTISLDMNQNQFSLKLSSVT AADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGGTGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

配列番号 244	DLL3#10 鎖	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQKPG QAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWV RLAPGQGLEWMGWINPNSSGTIFAQRFAQGRVTMTRDTSIST VYMDLNRRLRSDDTAVYYCARDFTGTVGNAFDIWGQGTMTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLWCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
配列番号 245	DLL3#11 鎖	QIVLTQSPAISASPGKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQV QLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPG QGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSS LTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

配列番号 246	DLL3#12 鎖	QVVL TQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSP KLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQV QLQQPGAEFVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPG QGLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSS LTPEDSAVYYCVSLYYGSGYYLDTWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 247	DLL3#13 鎖	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYL QKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVIYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVT WVKQAPGKGLKWMGWINTYSGPTYADDFNGRFALSLETS ASTAYLQINNKNEDTATYFCARLDDYDLYYFDYWGGTA LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

10

20

30

40

配列番号 248	DLL3#14 鎖	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQ QKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDAATYYCQQSDEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYTFTDYYIHW KQRPQGGLWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSST AYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 249	DLL3#15 鎖	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQ QKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDAATYYCQQSSEDPRTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKS TGGGGSQIQLVQSGPELVKPGGETVKISCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETS ASTAYLQINNKNEDMATYFCTKHFHSSNGDAMDNDWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

10

20

30

40

配列番号 250	DLL3#16 鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSVSDWLAWYQQKPG KAPKFLIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPADFAT YYCQLYNSYSPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECEGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGS EVHLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQA PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQ MNSLRAEDTALYYCARDWGYFDYWGGTGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 251	DLL3#17 鎖	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKG SPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMPEDTA TYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECEGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGG GSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYYIHWWKQR PGQGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYM LLSSLTSEDSAVYFCARGEENAMDDWGQGTSTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

配列番号 252	DLL3#18 鎖	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGK SPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINMQPEDTA TYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGG GSQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWVK QKPGQGLEWIGYIDPFNDDTNYNVKFKGKATLTSDTSSSIAY MELSSLTSEDSSFYYCARGTSATLDYWGHTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 253	重鎖の定常 領域 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号 254	マウスIgG2a HC	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFP PKIKDVLMLSLPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHT AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNK DLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCM VTDMPEDIVVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSK LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
配列番号 255	マウスカッ パLC	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

*下線で示される配列は、ヒンジ領域を示す

10

20

30

40

50

【0225】

(実施例3)

組換えタンパク質の産生

・ヒトDLL3-His

ヒトDLL3-Hisを産生するための細胞株を、HEK-293細胞(Thermo Fisher)、Lenti-Xレンチウイルス系(Clontech)、およびヒトDLL3-Hisをコードするプラスミド(ヒトDLL3、受託番号Q9NYJ7 hu DLL3-His:配列番号106)を使用して生成した。発現のために、細胞を、37、5% CO₂、および140rpmでの振盪で、培養し、増殖させた。発現の0日目に、細胞を、ペレット化し、Expi 293培地に再懸濁した。発現の3日目に、馴化させた培養上清を、細胞を40分間、4700rpmでペレット化することによって得た。プロテアーゼ阻害剤を、精製の前に生物材料(biomass)に添加した。発現を、ウエスタンブロットによって確認した。馴化した培養上清を、0.5mM TCEP、0.02% CHAPS、10mM イミダゾールを用いて調節した。精製は、HisTrap N

i エクセルカラムおよび緩衝液 A : 50 mM MES、50 mM NaCl、0.5 mM TCEP、0.02% CHAPS、pH 6.5 で実行した。目的のタンパク質を、20 mM イミダゾールから 500 mM イミダゾールへの溶出勾配を使用して、0.5 M イミダゾール、pH 8.5 を補充した緩衝液 A において溶出させた。プールした画分を、緩衝液 : 50 mM MES、50 mM NaCl、1 mM TCEP、0.02% CHAPS、0.2 M アルギニン、3% グリセロール、pH 6.5 中に透析した。精製した材料を、質量分析法および超遠心分析法によって定量した。

【0226】

・カニクイザル D L L 3 - H i s

カニクイザル D L L 3 - H i s を産生するための細胞株を、HEK - 293 細胞 (Thermo Fisher)、Lenti - X レンチウイルス系 (Clontech)、およびカニクイザル D L L 3 - H i s をコードするプラスミド (カニクイザル D L L 3、受託番号 X M _ 005589196.1 (RefSeq)、カニクイザル D L L 3 - H i s : 配列番号 107) を使用して生成した。発現のために、細胞を、37、5% CO₂、および 140 rpm の振盪で、培養し、増殖させた。発現の 0 日目に、細胞を、ペレット化し、Expi 293 培地に再懸濁した。発現の 3 日目に、馴化させた培養上清を、細胞を 40 分間、4700 rpm でペレット化することによって得た。プロテアーゼ阻害剤を、精製の前に生物材料に添加した。発現を、ウエスタンブロットによって確認した。馴化した培養上清を、0.5 mM TCEP、0.02% CHAPS、10 mM イミダゾールを用いて調節した。精製は、His Trap Ni エクセルカラムおよび緩衝液 A : 50 mM MES、50 mM NaCl、0.5 mM TCEP、0.02% CHAPS、pH 6.5 で実行した。目的のタンパク質を、20 mM イミダゾールから 500 mM イミダゾールへの溶出勾配を使用して、0.5 M イミダゾール、pH 8.5 を補充した緩衝液 A において溶出させた。プールした画分を、緩衝液 : 50 mM MES、50 mM NaCl、1 mM TCEP、0.02% CHAPS、0.2 M アルギニン、3% グリセロール、pH 6.5 中に透析した。精製した材料を、質量分析法および超遠心分析法によって定量した。

【0227】

・ヒト C D 3 E + G HuFc - 6 x H i s (E + G は、ε γ サブユニットを示す)

ヒト C D 3 E + G HuFc - 6 x H i s を産生するための細胞株を、HEK - 293 細胞 (Thermo Fisher)、Lenti - X レンチウイルス系 (Clontech)、およびヒト C D 3 E + G HuFc - 6 x H i s をコードするプラスミド (ヒト C D 3 E、受託番号 : P07766、ヒト C D 3 E + G - HuFc - H i s : 配列番号 108) を使用して生成した。発現のために、細胞を、Freestyle 293 培地中で、37、加湿 8% CO₂ 環境、および 135 rpm の振盪で、培養し、増殖させた。馴化させた培養上清を、9300 x g で 30 分間の遠心分離によって、6 日目に採取した。発現を、SDS - PAGE およびウエスタンブロッティングによってモニタリングした。馴化させた培養上清を、0.2 M スクロース、5% グリセロール、0.01% CHAPS、および 10 mM イミダゾールで調節した。pH を、次いで、7.2 に調節した。精製は、Ni / NTA 樹脂を使用した親和性精製 (4 で一晩のインキュベーション、および 250 mM イミダゾールでの溶出)、次いで、0.2 M スクロース、5% グリセロール、0.01% CHAPS、1 mM TCEP、pH 7.2 を有する最終 PBS 緩衝液中、Superdex 200 カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーという 2 ステップのプロセスにおいて実行した。プールした材料を、最終的な分析および保管の前に、分画分子量 (MWCO) が 10,000 の PES 膜 viva cell 100 遠心分離デバイスを使用して、濃縮した。精製した材料を、質量分析法および超遠心分析法によって定量した。

【0228】

・C D 3 E + G HuFc - 6 x H i s (E + G は、ε γ サブユニットを示す)

カニクイザル C D 3 E + G HuFc - 6 x H i s を産生させるための細胞株を、H

E K - 2 9 3 細胞 (T h e r m o F i s h e r)、L e n t i - X レンチウイルスシステム (C l o n t e c h)、およびカニクイザル C D 3 E + G H u F c - 6 x H i s をコードするプラスミド (カニクイザル C D 3 E 受託番号、Q 9 5 L I 5、カニクイザル C D 3 E + G h u F c - H i s : 配列番号 1 0 9) を使用して生成した。発現のために、細胞を、F r e e s t y l e 2 9 3 培地中で、3 7 °C、加湿 8 % C O 2 環境、および 1 3 5 r p m の振盪で、培養し、増殖させた。馴化させた培養上清を、9 3 0 0 x g で 3 0 分間の遠心分離によって、6 日目に採取した。発現を、S D S - P A G E およびウェスタンブロッティングによってモニタリングした。馴化させた培養上清を、0 . 2 M スクロース、5 % グリセロール、0 . 0 1 % C H A P S、および 1 0 m M イミダゾールで調節した。p H を、次いで、7 . 2 に調節した。精製は、N i / N T A 樹脂を使用した親和性精製 (4 時間一晩のインキュベーション、および 2 5 0 m M イミダゾールでの溶出)、次いで、0 . 2 M スクロース、5 % グリセロール、0 . 0 1 % C H A P S、1 m M T C E P、p H 7 . 2 を有する最終 P B S 緩衝液中、S u p e r d e x 2 0 0 カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーという 2 ステップのプロセスにおいて実行した。プールした材料を、最終的な分析および保管の前に、分画分子量が 1 0 , 0 0 0 の P E S 膜 v i v a c e l l 1 0 0 遠心分離デバイスを使用して、濃縮した。精製した材料を、質量分析法および超遠心分析法によって定量した。

10

【 0 2 2 9 】

(実施例 4 A)

組換え D L L 3 および C D 3 ε γ サブユニットに対する親和性ならびに種間交差反応性の S P R に基づく判定

20

精製した D L L 3 / C D 3 二重特異性コンストラクトの、組換えヒトおよびカニクイザル D L L 3 - E C D ならびにヒトおよびカニクイザル C D 3 ε γ サブユニットの F c 融合タンパク質に対する結合親和性を、P r o t e O n X P R 3 6 機器 (B i o - R a d) を使用して、表面プラズモン共鳴 (S P R) によって判定した。泳動緩衝液およびすべての希釈 (示される場合を除く) を、P B S - T - E D T A において行った。G L M センサーチップ (B i o - R a d) を、製造業者の推奨に従って正規化し、事前に整えた。センサーチップを、3 0 μ l / 分の流速で、3 0 0 秒間、水平方向の E D C / s - N H S の等量混合物で活性化し、3 0 μ l / 分の流速で、3 0 0 秒間、水平方向のプロテイン A / G (1 0 m M 酢酸、p H 4 . 5 中、2 0 μ g / m l) で固定化し、約 5 0 0 0 R U のプロテイン A / G を表面上に得た。センサーチップを、3 0 μ l / 分の流速で、3 0 0 秒間、水平方向の 1 M エタノールアミン H C l で脱活性化した。センサーチップを、1 0 0 μ l / 分の流速で、1 8 秒間、水平方向で 3 回、および垂直方向で 3 回、0 . 8 5 % のリン酸で安定させた。

30

【 0 2 3 0 】

D L L 3 に対する結合動態の判定のために、二重特異性分子を、2 5 μ l / 分の流速で、2 5 0 秒間、垂直方向に、プロテイン A / G 表面上に個別に捕捉した。4 0 μ l / 分の流速で 6 0 秒間、水平方向に P B S - T - E D T A を注射することによって、ベースラインを安定させた。分析物 (ヒト D L L 3 またはカニクイザル D L L 3) を、4 0 μ l / 分の流速で 6 0 0 秒間、捕捉した抗体の上に水平方向に注射し、2 7 0 0 秒間解離させた。分析物の濃度は、2 0 n M、1 0 n M、5 n M、2 . 5 n M、および 1 . 2 5 n M であった。0 . 8 5 % のリン酸溶液を、1 0 0 μ l / 分の流速で 1 8 秒間、水平方向に 1 回および垂直方向に 1 回注射することによって、表面を、再生させた。

40

【 0 2 3 1 】

C D 3 に対する結合動態の判定のために、ヒト C D 3 ε γ - F c およびカニクイザル C D 3 ε γ - F c (p H 4 . 5 酢酸中に溶解) を、3 0 μ l / 分の流速で 1 4 0 秒間、垂直方向でのアミンカップリングを通じて、センサー表面に直接的に固定化した。4 0 μ l / 分の流速で 6 0 秒間、水平方向に P B S - T - E D T A を注射することによって、ベースラインを安定させた。分析物 (二重特異性分子) を、4 0 μ l / 分の流速で 6 0 0 秒間、捕捉した C D 3 ε γ - F c コンストラクトの上に水平方向に注射し、6 0 0 秒間解離させ

50

た。分析物の濃度は、 250 nM 、 125 nM 、 62.5 nM 、 31.3 nM 、および 15.6 nM 、または $2\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ 、 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 、および $0.125\text{ }\mu\text{M}$ であった。 0.85% のリン酸溶液を、 $100\text{ }\mu\text{l}$ /分の流速で 18 秒間、水平方向に 1 回および垂直方向に 1 回注射することによって、表面を、再生させた。

【0232】

スポット間（センサー表面との境界部）およびブランク（PBS-T-EDTA）を、生データから差し引いた。次いで、センサーグラムを、 $1:1$ 動態モデルに当てはめて、ヒトDLL3およびカニクイザルDLL3に対する速度定数（ k_a 、 k_d ）、ならびに親和性（ K_D ）値を得、平衡に対して包括的に当てはめて、ヒトCD3 $\epsilon\gamma$ およびカニクイザルCD3 $\epsilon\gamma$ に対する親和性（ K_D ）値を得た。

10

【0233】

本明細書に記載されるDLL3/CD3結合タンパク質は、DLL3に対して pM 範囲の親和性を示した。CD3 $\epsilon\gamma$ サブユニットに対する親和性は、低めの nM 範囲であった。ヒトとカニクイザルとの間の種間ギャップを、平衡させる。3つの例示的なDLL3/CD3結合タンパク質（配列番号75のDLL3鎖、およびそれぞれ配列番号79、配列番号80、または配列番号105のCD3鎖を含む、DLL3/CD3結合タンパク質）の親和性を、表2Aに示す。

【0234】

【表3】

表2A: SPR分析によって判定したDLL3/CD3結合タンパク質のヒトおよびカニクイザルDLL3およびCD3 $\epsilon\gamma$ サブユニットに対する親和性(K_D)、ならびに種間ギャップ

20

DLL3/CD3結合タンパク質	組換えヒトDLL3	組換えカニクイザルDLL3	ヒト/カニクイザルDLL3の親和性ギャップ K_D	組換えヒトCD3 $\epsilon\gamma$	組換えカニクイザルCD3 $\epsilon\gamma$	ヒト/カニクイザルCD3 $\epsilon\gamma$ の親和性ギャップ K_D
DLL3#3/CD3#1	< 10 pM	< 10 pM	1	7 nM	8 nM	1.1
DLL3#3/CD3#2	< 10 pM	< 10 pM	1	90 nM	100 nM	1.1
DLL3#3/CD3#3	< 10 pM	< 10 pM	1	68 nM	71 nM	1.04

30

【0235】

（実施例4B）

組換えDLL3およびCD3 $\epsilon\gamma$ に対する親和性のSPRに基づく判定

精製したDLL3/CD3二重特異性コンストラクトの、組み換えヒトDLL3-EC DおよびヒトCD3 $\epsilon\gamma$ サブユニットのFc融合タンパク質に対する結合親和性を、Protein XPR36機器（Bio-Rad）を使用して、表面プラズモン共鳴（SPR）によって判定した。この方法は、実施例4Aと類似であったが、以下に概説されるいくつかの違いを有する。

【0236】

40

DLL3に対する結合動態の判定のために、抗DLL3/CD3分子を、 $30\text{ }\mu\text{l}$ /分の流速で 200 秒間、垂直方向で、プロテインA/G表面上に個別に捕捉した。 $30\text{ }\mu\text{l}$ /分の流速で 60 秒間、水平方向にPBS-T-EDTAを注射することによって、ベースラインを安定させた。分析物（ヒトDLL3）を、 $30\text{ }\mu\text{l}$ /分の流速で 300 秒間、捕捉した抗体の上に水平方向に注射し、 1800 秒間解離させた。分析物の濃度は、 20 nM 、 10 nM 、 5 nM 、 2.5 nM 、および 1.25 nM であった。 0.85% のリン酸溶液を、 $100\text{ }\mu\text{l}$ /分の流速で 18 秒間、水平方向に 1 回および垂直方向に 1 回注射することによって、表面を、再生させた。

【0237】

CD3に対する結合動態の判定のために、HuCD3E—HuCD3G-Fc（pH 4

50

．5酢酸中に溶解)を、 $30\mu\text{l}$ /分の流速で360秒間、垂直方向でのアミンカップリングを通じて、センサー表面に直接的に固定化した。 $30\mu\text{l}$ /分の流速で60秒間、水平方向にPBS-T-EDTAを注射することによって、ベースラインを安定させた。分析物(すべての抗DLL3/DLL3分子)を、 $30\mu\text{l}$ /分の流速で600秒間、捕捉した抗体の上に水平方向に注射し、1800秒間解離させた。分析物の濃度は、 250nM 、 83.3nM 、 27.8nM 、 9.3nM 、および 3.1nM であった。 0.85% のリン酸溶液を、 $100\mu\text{l}$ /分の流速で18秒間、水平方向に1回および垂直方向に1回注射することによって、表面を、再生させた。

例示的なDLL3/CD3結合タンパク質(配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、または配列番号252のDLL3鎖と配列番号79のCD3鎖とを含むDLL3/CD3結合タンパク質、配列番号75のDLL3鎖と配列番号80のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質、ならびに配列番号75のDLL3鎖と配列番号105のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質)の親和性を、2Bに示す。

【0238】

【表 4】

表2B: SPR分析によって判定したDLL3/CD3結合タンパク質のヒトDLL3およびCD3 $\epsilon\gamma$ サブユニットに対する親和性(KD)

DLL3/CD3結合 タンパク質	組換えヒトhu DLL3	組換えヒトhu CD3 $\epsilon\gamma$
DLL3#1/ CD3#1	52 pM	2 nM
DLL3#2/ CD3#1	91 pM	3 nM
DLL3#3/ CD3#1	75 pM	2 nM
DLL3#3/ CD3#2	120 pM	7 nM
DLL3#3/ CD3#3	116 pM	4 nM
DLL3#4/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#5/ CD3#1	< 20 pM	3 nM
DLL3#6/ CD3#1	152 pM	2 nM
DLL3#7/ CD3#1	637 pM	1 nM
DLL3#8/ CD3#1	40 pM	2 nM
DLL3#9/ CD3#1	46 pM	2 nM
DLL3#10/ CD3#1	141 pM	該当なし
DLL3#11/ CD3#1	37 pM	2 nM
DLL3#12/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#13/ CD3#1	23 pM	3 nM
DLL3#14/ CD3#1	60 pM	3 nM
DLL3#15/ CD3#1	該当なし	該当なし
DLL3#16/ CD3#1	228 pM	2 nM
DLL3#17/ CD3#1	< 20pM	2 nM
DLL3#18/ CD3#1	< 20 pM	3 nM

10

20

30

40

50

【0239】

(実施例5)

細胞外ドメインおよびそのサブドメインを細胞表面上に発現するHEK293細胞の生成それぞれ、全長ヒトDLL3(Uniprot: Q9NYJ7)、カニクイザルDLL3(UPI0003AB95BD)、ヒトDLL1(Q00548)、およびヒトDLL4(Q9NR61)を発現する安定なHEK293細胞の生成のために、それぞれのコーディング配列を、pcDNA3.1(Thermo Fisher Scientific)にクローニングし、FLAG-タグを、シグナル配列と細胞外ドメインとの間に挿入した。細胞表面上の発現を、抗FLAG抗体(クローンM2、Sigma)、続いてモノクローナル抗マウスIgG1(Acris)を使用して検証した。

10

【0240】

DLL3の細胞外ドメインは、異なるサブドメインからなる。

- ・ヒトDLL3シグナルペプチド：アミノ酸1～26
- ・ヒトDLL3 N末端ECDドメイン：アミノ酸27～175
- ・ヒトDLL3 DSL：アミノ酸176～215
- ・ヒトDLL3 EGF1：アミノ酸216～249
- ・ヒトDLL3 EGF2：アミノ酸274～310
- ・ヒトDLL3 EGF3：アミノ酸312～351
- ・ヒトDLL3 EGF4：アミノ酸353～389
- ・ヒトDLL3 EGF5：アミノ酸391～427
- ・ヒトDLL3 EGF6：アミノ酸429～465
- ・膜近傍ペプチド：アミノ酸466～492

20

【0241】

DLL3の以下のサブドメインを、HEK293細胞の細胞表面上に発現させた。

- ・ヒトDLL3 EGF1+2：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸216～310
- ・ヒトDLL3 EGF2+3：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸274～351
- ・ヒトDLL3 EGF3+4：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸312～389
- ・ヒトDLL3 EGF4+5：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸353～427
- ・ヒトDLL3 EGF5+6：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸391～465
- ・ヒトDLL3 EGF6+膜近傍ペプチド：Uniprot: Q9NYJ7、アミノ酸429～492

30

【0242】

6-His-mycタグ付けした、ヒトDLL3のサブドメインを発現するHEK293細胞の生成のために、それぞれのコーディング配列を、pcDNA3.1(Thermo Fisher Scientific)にクローニングした。コンストラクトは、N末端マウスIgG Vκリーディング配列、続いて、6-ヒスチジン-mycタグおよびそれぞれのヒトDLL3ドメインを含む。ヒトDLL3ドメインの細胞表面局在化を確実にするために、すべてのコンストラクトには、Ser/Glyリンカー、膜貫通ドメイン(アミノ酸266～288)、およびヒトEpCAM(P16422)の細胞内ドメイン(アミノ酸289～314)が続いた。サブドメインの発現は、国際公開第2013126746号に記載される様々なドメインに対するマウスモノクローナルIgG2a抗体を使用して検証した。結合したモノクローナル抗体を、ヤギ抗マウスIgG(F(ab')₂)-RPE(Jackson Immuno Research)で検出した。サンプルを、フローサイトメトリーによって測定した。ヒトDLL1およびDLL4の発現を、抗DLL1抗体(R&D Systems、MAB1818)および抗DLL4抗体R

40

50

& D Systems、MAB1506)、続いて、PE標識化抗マウスまたは抗ラット二次抗体を使用して、FACS分析によって確認した(図5の右パネルを参照されたい)。

【0243】

【表5】

表3: HEK293細胞上に発現される様々なDLL3サブドメインの配列

識別子	コンスト	配列	
	ラクト		
配列番号	FLAGタグ	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPDYKDDDDKAGVFELQI	
110	ヒトDLL3	HSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAESP	10
	全長	CALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWP	
		GTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRLAAGGPW	
		ARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRC	
		GPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLE	
		GTGGLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNP	
		CANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFN	
		GGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCR	
		NGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACAN	
		GGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAAG	20
		GRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPP	
		GLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHS	
		QDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSV	
		WNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQ	
		HLLFPYPSSILSVK	
配列番号	FLAGタグ	MVSPRMSRLLSQTIVILALIFIPQARPDYKDDDDKAGVFELQI	
111	カニクイ	HSFGPGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRVCLKPGLSEEAESP	
	ザルDLL3	CALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRDAWP	
	全長	GTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWA	
		RDIIQRAGAWELRFSYRARCELPVGTACTRLCRPRSAPSRC	30
		GPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCLE	
		GTGGLCMVPVSTSSCLGLRGPSTTTGCLVPGPGPCDGNP	
		CANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFN	
		GGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCR	
		NGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACAN	
		GGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADPCAARPCAAG	
		GRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGVSAALPAAPP	
		GLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHA	
		QDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGPGDVPSSSV	40
		WNRPEDVDSDGIYVISAPSIYAREVAMPLFPPLHTGRAGQRQ	
		NLLFPFPSSILSVK	

配列番号 112	FLAGタグ ヒトDLL1 全長	MGSRCALALAVLSALLCDYKDDDDKQVWSSGVFELKLQEF VNKKGLLGNRNCCRGAGPPPCACRTFFRVCLKHYQASVS PEPPCTYGS AVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNP IRFPFGF TWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGE EWSQDLHSSGRTDLKYSYRFVCDEHYGEGCSVFCRPRDD AFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFC DKPGECKCRVGWQGGRYCDECIRYPGCLHGTCQQPWQCNC QEGWGGLFCNQDLNYCTHHKPCKN GATCTNTGQGSYTC CRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSC TDLENSYSCTCPP GFYGKICELSAMTCADGPCFN GGRCS DSPDGGYSCRCPVGY SGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGR HCDDNVDDCASSPCANGGT CRDGVNDFSC TCPPGYTGRNC SAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQF LLPELPPGPAVVDL TEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILV LMLL LGCAAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRGETETMNNLANCQRE KDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGDHSADKNGFKARYPAVDY NLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDTKCQPQGSSGEEKGTPTTL RGGEASERKRPSGCS TSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV	10
配列番号 113	FLAGタグ ヒトDLL4 全長	MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGDYKDDDDKSGVFQ LQLQEFINERGVLASGRPC EPGC RTFFRVCLKHFQAVVSPG PCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPG TFSLIIEAWHAPGDDL RPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNW L LDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNY YGDNCSRLCKKRNDHFGH YVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPA ECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGT CSTPWQCTCDEGW GGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGY TGVDCELELSECD SNPCRNGGSC KDQEDGYHCLCPPGYG LHCEHSTLSCADSPCFN GGS CRERNQGANYACECPPNFTGS NCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYC ELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEV RTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGS RCEF PVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRP DDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSLGE KAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATE V	20 30
配列番号 114	FLAGタグ	DYKDDDDK	40

配列番号 115	Vkリーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	
配列番号 116	6His-myc タグ	HHHHHHEQKLISEEDL	
配列番号 117	Ser/Glyリ ンカー	SGGGGS	
配列番号 118	EpCAM膜 貫通ドメ イン	AGVIAVIVVVVIAVVAGIVLVI	10
配列番号 119	EpCAM細 胞内ドメ イン	SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA	
配列番号 120	EGF1	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCT	
配列番号 121	ヒトDLL3 EGF 1+2	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSS CLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFE CTCPRGFYGLRCE	
配列番号 122	EGF2	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE	20
配列番号 123	ヒトDLL3 EGF 2+3	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGV TCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE	
配列番号 124	EGF3	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE	
配列番号 125	ヒトDLL3 EGF 3+4	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE KRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE	
配列番号 126	EGF4	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE	
配列番号 127	ヒトDLL3 EGF 4+5	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCR	30
配列番号 128	EGF5	DLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCR	
配列番号 129	ヒトDLL3 EGF 5+6	DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERAD PCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE	
配列番号 130	EGF6	RADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE	
配列番号 131	ヒトDLL3 EGF6膜近 傍ペプチ ド	RADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPV HPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL	40
配列番号 132	膜近傍ペ プチド	FPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL	

【 0 2 4 4 】

(実施例 6)

D L L 3 / C D 3 結合タンパク質のエピトープドメインマッピング

エピトープドメインを、D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の、D L L 3 のサブドメイン 50

を発現する組換え細胞株への結合によって、判定した（図2を参照されたい）。これらの細胞株の生成は、実施例5に記載されている。

DLL3/CD3結合タンパク質は、実施例2に記載されるように、鎖をコードする遺伝子を保持するpTT5ベクターをCHO-E細胞に一過的にトランスフェクトすることによって産生させた。

【0245】

DLL3のサブドメインを発現する細胞を、FACS緩衝液（PBS/0.5%BSA/0.05%アジ化ナトリウム）中1.6nMの2ステップで精製したDLL3/CD3結合タンパク質で染色した。結合した分子を、PEにコンジュゲートした抗ヒト二次抗体（Sigma-Aldrich、番号P8047）で検出した。陰性対照として、細胞を、二次抗体のみとともにインキュベートした。サンプルを、フローサイトメトリーによって測定した。図3A~Cは、DLL3の異なる領域に結合する例示的な結合物質（配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、または配列番号252のDLL3鎖と配列番号79のCD3鎖とを含むDLL3/CD3結合タンパク質、および配列番号75のDLL3鎖と配列番号80のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質）を示す。エピトープドメインの配列は、実施例5、表3に列挙されている。

10

【0246】

20

（実施例7）

種間交差反応性

種間交差反応性は、DLL3/CD3結合タンパク質の、2つのSCLC細胞株であるNCI-H82細胞（HTB-175（商標））およびSHP77細胞（ATCC（登録商標）、CRL-2195（登録商標））、ならびにカニクイザルDLL3を発現する組換え細胞株への結合によって判定される（実施例5に記載される細胞株の生成）。

【0247】

DLL3/CD3結合タンパク質は、実施例2に記載されるように、鎖をコードする遺伝子を保持するpTT5ベクターをCHO-E細胞に一過的にトランスフェクトすることによって産生させた。ヒトまたはカニクイザルDLL3を発現する細胞を、FACS緩衝液（PBS/0.5%BSA/0.05%アジ化ナトリウム）中、漸増濃度の2ステップで精製したDLL3/CD3結合タンパク質で染色した。結合した分子を、PEにコンジュゲートした抗ヒト二次抗体（Sigma-Aldrich、番号P8047）で検出した。陰性対照として、細胞を、二次抗体のみとともにインキュベートした。サンプルを、フローサイトメトリーによって測定した。図4は、7つの例示的なDLL3/CD3結合タンパク質（配列番号73のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号74のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号75のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号75のDLL3鎖および配列番号80のCD3鎖、配列番号76のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号77のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、または配列番号78のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖を含む、DLL3/CD3結合タンパク質）の、ヒトおよびカニクイザルDLL3を発現する細胞への結合を示す。

30

40

【0248】

（実施例8）

ヒトDLL1およびDLL4の結合の不在の確認

ヒトDLL1およびDLL4に対する交差反応性の不在を、DLL3/CD3結合タンパク質の、ヒトDLL1またはDLL4を発現する組換え細胞への結合によって判定した（細胞株の生成は、実施例5に記載されている）。

DLL3/CD3結合タンパク質は、実施例2に記載されるように、鎖をコードする遺伝子を保持するpTT5ベクターをCHO-E細胞に一過的にトランスフェクトすること

50

によって産生させた。

【0249】

DLL1およびDLL4を発現する細胞を、FACS緩衝液(PBS/0.5%BSA/0.05%アジ化ナトリウム)中、漸増濃度の2ステップで精製したDLL3/CD3結合タンパク質で染色した。結合した分子を、PEにコンジュゲートした抗ヒト二次抗体(Sigma-Aldrich、番号P8047)で検出した。陰性対照として、細胞を、二次抗体のみとともにインキュベートした。サンプルを、フローサイトメトリーによって測定した。ヒトDLL1およびDLL4の発現を、抗DLL1抗体(R&D Systems、MAB1818)および抗DLL4抗体R&D Systems、MAB1506)、続いて、PE標識化抗マウスまたは抗ラット二次抗体を使用して、FACS分析によって確認した。図5は、7つの例示的なDLL3/CD3結合タンパク質(配列番号73のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号74のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号75のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号75のDLL3鎖および配列番号80のCD3鎖、配列番号76のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、配列番号77のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖、または配列番号78のDLL3鎖および配列番号79のCD3鎖を含む、DLL3/CD3結合タンパク質)の、ヒトDLL1およびDLL4を発現する細胞への結合を示す。

10

【0250】

(実施例9)

DLL3/CD3結合タンパク質のSCLC細胞株およびT細胞への結合

20

DLL3/CD3結合タンパク質の、ヒトSCLC細胞株への結合を、NCI-H82(HTB-175(商標))およびSHP77(ATCC(登録商標)、CRL-2195(商標))のフローサイトメトリーによって、試験した。DLL3/CD3結合タンパク質は、実施例2に記載されるように産生させた。

【0251】

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、Ficoll密度勾配遠心分離によって、濃縮されたリンパ球調製物(軟膜)、および輸血用の血液を採取している血液バンクの副産物から調製した。すべての軟膜は、ヘルシンキ宣言およびAustriaのcantonal ethical committeeの承認に従い、告知に基づく同意の後に得、PBMCを、採取と同じ日に調製した。したがって、単核細胞は、Ficoll密度勾配遠心分離(1400rpmでブレーキなしで35分間)およびPBSでの広範な洗浄によって単離した。残留赤血球は、ACK溶解緩衝液(Thermo Fisher Scientific、A1049201)中で3分間インキュベートし、続いて、PBS中で洗浄した後、RPMI 1640 GlutaMAX(Gibco、番号61870-010)、5%ヒトAB血清AB(Gemini、GemCellカタログ番号100-512、ロット番号H56500I)+1% MEM-NEAA(Gibco、番号11140-035)、10mM HEPES(Affymetrix、番号7365-49-9)、10μM ベータ-メルカプトエタノール(Gibco、番号21985-023)、およびピルビン酸ナトリウム(Gibco、番号11360-039)を含有するアッセイ培地に再懸濁させることによって、除去した。

30

40

【0252】

T細胞を、パンT細胞単離キットII(Miltenyi Biotec、番号130-091-156)を使用して、ネガティブセレクションによって単離した。簡単に述べると、細胞を、40μlの緩衝液PBS/0.5% BSA(Gibco、参照番号041-94553 M)/2mM EDTA(Invitrogen、参照番号15575-038)中に、10個のMio細胞ずつ再懸濁させ、10個のMio細胞当たり10μlのビオチン-抗体カクテルとともに、4で5分間インキュベートした。続いて、30μlの緩衝液および20μlの抗ビオチンMicroBeds/1000万個の細胞を、添加し、4で10分間インキュベートした。続いて、混合物を、好適なMACSセパレータ(Miltenyi Biotec)の磁場において、事前にすすいだ25LSカラ

50

ム (Miltenyi Biotec、番号 130-042-401) に入れた。フロー
スルーを収集し、アッセイ培地中で洗浄した。

【0253】

細胞 (T細胞またはヒト SCLC細胞) を、FACS 緩衝液 (PBS / 0.5% BSA / 0.05% アジ化ナトリウム) 中、漸増濃度で、漸増濃度の 2 ステップで精製した DLL3 / CD3 結合タンパク質で染色した。結合した分子を、PE にコンジュゲートした抗ヒト二次抗体 (Sigma-Aldrich、番号 P8047) で検出した。DSL (DLL3 #6)、EGF1 (DLL3 #5)、または EGF4 (DLL #4) ドメインを標的とする DLL3 / CD3 結合タンパク質は、DLL3 を発現する SCLC 細胞株に対して、膜近傍ペプチド (DLL3 #1、DLL3 #2、DLL3 #3) を標的とする DLL3 / CD3 結合タンパク質と比較して、より強力な結合を示す。異なるエピトープドメインに対する例示的な DLL3 / CD3 結合タンパク質 (配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、または配列番号 252 の DLL3 鎖と配列番号 79 の CD3 鎖とを含む DLL3 / CD3 結合タンパク質、および配列番号 75 の DLL3 鎖と配列番号 80 の CD3 鎖とを含む DLL3 結合タンパク質) の SHP77、NCI-H82 細胞、および T細胞への結合を、図 6A ~ V に示す。

10

【0254】

20

(実施例 10A)

刺激されていない PBMC をヒト SCLC 細胞株に対して再指向させる有効性

乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出を細胞溶解の読取りとして使用して、SCLC 細胞株に対する刺激されない PBMC の有効性を判定した。このアッセイにおいて、DLL3 陽性 SCLC 細胞株である SHP77 および NCI-H82 を、エフェクター細胞としてヒト PBMC および漸増濃度の DLL3 / CD3 結合タンパク質とともに、エフェクター対標的細胞比 10 : 1 で、72 時間、共培養した。DLL3 / CD3 結合タンパク質 (配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78 の DLL3 鎖と配列番号 79 の CD3 鎖とを含む DLL3 / CD3 結合タンパク質、および配列番号 75 の DLL3 鎖と配列番号 80 の CD3 鎖とを含む DLL3 結合タンパク質) を、実施例 2 に記載されるように、鎖をコードする遺伝子を保持する pTT5 ベクターを CHO-E 細胞に一過的にトランスフェクトすることによって、産生させた。

30

【0255】

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を、Ficoll 密度勾配遠心分離によって、濃縮されたリンパ球調製物 (軟膜)、および輸血用の血液を採取している血液バンクの副産物から調製した。すべての軟膜は、ヘルシンキ宣言および Austria の cantonal ethical committee の承認に従い、告知に基づく同意の後に得、PBMC を、採取と同じ日に調製した。したがって、単核細胞は、Ficoll 密度勾配遠心分離 (1400 rpm でブレーキなしで 35 分間) および PBS での広範な洗浄によって単離した。残留赤血球を、ACK 溶解緩衝液 (Thermo Fisher Scientific、A1049201) 中で 3 分間インキュベートし、続いて、PBS 中で洗浄することにより除去し、その後、RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco、番号 61870-010)、5% ヒト AB 血清 AB (Gemini、GemCell カタログ番号 100-512、ロット番号 H56500I) + 1% MEM-NEAA (Gibco、番号 11140-035)、10 mM HEPES (Affymetrix、番号 7365-49-9)、10 μ M ベータ-メルカプトエタノール (Gibco、番号 21985-023)、およびビルビン酸ナトリウム (Gibco、番号 11360-039) を含有するアッセイ培地に再懸濁した。

40

続いて、標的細胞である SHP77 および NCI-H82、ならびに PBMC を、1 : 10 の比で、0.0001 nM ~ 100 nM の濃度の DLL3 / CD3 結合タンパク質と

50

ともに、72時間インキュベートした。

【0256】

細胞毒性検出キット^{PLUS} (Roche) を、製造業者の説明書に従って使用して、細胞毒性活性を判定した。簡単に述べると、この方法は、死細胞または形質膜損傷細胞からのLDHの放出の量に基づく。細胞培養上清を、キットから得られた反応混合物とともに30分間インキュベートし、LDH活性の結果として、ホルマザンの形成を、細胞溶解の代理として、500nmで分光光度計において測定する。最大溶解対照に対する細胞毒性のパーセンテージを、以下の式に従って計算した。

【0257】

【数1】

10

$$\text{細胞毒性(対照に対する)} = \frac{\text{測定値} - \text{バックグラウンド}}{\text{最大溶解} - \text{最小溶解}}$$

バックグラウンド：標的細胞 + エフェクター細胞

最大溶解：標的細胞 + 5% Triton X-100

最小溶解：標的細胞

GraphPad Prism 5ソフトウェアを使用して、最大溶解対照に対する細胞毒性のパーセンテージを、対応するDLL3/CD3結合タンパク質濃度に対してプロットした。用量応答曲線を、シグモイドの用量応答曲線の評価のための4パラメーターのロジスティック方程式モデルを用いて分析し、EC₉₀値を計算した (EC₉₀値を、表4A

20

【0258】

図7Aは、異なるエピトープドメインに結合する7つの例示的なDLL3/CD3結合タンパク質 (配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78のDLL3鎖と配列番号79のCD3鎖とを含むDLL3/CD3結合タンパク質、および配列番号75のDLL3鎖と配列番号80のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質) の細胞溶解における有効性の例を示す。

【0259】

【表6】

表4A:エフェクター細胞として刺激されていないPBMC、ならびに標的細胞としてSCLC細胞株、NCI-H82、およびSHP77を用いて、72時間の細胞毒性アッセイにおいて測定された、DLL3/CD3結合タンパク質のEC₉₀値[nM]

30

DLL3/CD3結合タンパク質	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	1.7	1.4
DLL3#2/CD3#1	2.9	3.4
DLL3#3/CD3#1	0.9	1.5
DLL3#3/CD3#2	3.9	16.5
DLL3#4/CD3#1	100nMで飽和なし	100nMで飽和なし
DLL3#5/CD3#1	100nMで飽和なし	100nMで飽和なし
DLL3#6/CD3#1	100nMで飽和なし	100nMで飽和なし

40

【0260】

(実施例10B)

刺激されていないT細胞をヒトSCLC細胞株に対して再指向させることの有効性

T細胞を、実施例9に記載されるように単離した。続いて、実施例10Aに記載されるように、標的細胞としてSHP77およびNCI-H82細胞を用いた細胞毒性アッセイにおいて、精製したT細胞をエフェクター細胞として使用した。用量応答曲線を、図7B

50

～ H (S H P 7 7 細胞) および図 7 I ～ O (N C I - H 8 2 細胞) に示す。計算した E C 9 0 値を、表 4 B に示す。

【 0 2 6 1 】

図 7 B ～ O は、 1 9 個の例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (配列番号 7 3 、 配列番号 7 4 、 配列番号 7 5 、 配列番号 7 6 、 配列番号 7 7 、 配列番号 7 8 、 配列番号 2 4 1 、 配列番号 2 4 2 、 配列番号 2 4 3 、 配列番号 2 4 4 、 配列番号 2 4 5 、 配列番号 2 4 6 、 配列番号 2 4 7 、 配列番号 2 4 8 、 配列番号 2 4 9 、 配列番号 2 5 0 、 配列番号 2 5 1 、 配列番号 2 5 2 の D L L 3 鎖を含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質) の細胞溶解における有効性の例を示す。

【 0 2 6 2 】

10

【表 7】

表4B:エフェクター細胞として精製されたT細胞、ならびに標的細胞としてSCLCおよびNCI-H82細胞株を用いて、72時間の細胞毒性アッセイにおいて測定された、DLL3/CD3結合タンパク質のEC₉₀値[nM]

DLL3/CD3結合タンパク質	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	0.66	0.15
DLL3#2/CD3#1	1.51	0.16
DLL3#3/CD3#1	0.27	0.02
DLL3#3/CD3#2	2.50	3.00
DLL3#4/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#5/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#6/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#7/CD3#1	21.84	8.37
DLL3#8/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#9/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#10/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#11/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#12/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#13/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#14/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#15/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#16/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#17/CD3#1	活性なし	活性なし
DLL3#18/CD3#1	活性なし	活性なし

20

30

【 0 2 6 3 】

(実施例 1 1)

40

インビトロ内部移行アッセイ

標的細胞として D L L 3 陽性 S H P 7 7 細胞とともに事前インキュベートした後の D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の有効性の変化を、測定した。D L L 3 / C D 3 結合タンパク質が内部移行された場合、有効濃度は、これにより減少するはずであり、したがって、見かけの有効性が減少するはずである。

D L L 3 / C D 3 結合タンパク質を、実施例 2 に記載されるように产生させた。ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を、実施例 1 0 に記載されるように調製した。

S H P 7 7 標的細胞を、播種し、 0 . 0 0 0 1 ~ 1 0 0 n M の濃度で D L L 3 / C D 3 結合タンパク質とともに、 2 時間および 4 時間インキュベートした後、刺激されていない P B M C を 4 8 時間添加した。エフェクター対標的細胞の比は、 1 0 : 1 であった。実施

50

例 10 に記載されるように、細胞毒性検出キット^{PLUS} (R o c h e) を使用して、細胞毒性活性を判定した。

図 8 は、2 つの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 7 9 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質、および配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 8 0 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質) の細胞溶解の有効性および効果に違いがないことを示す。有効性および効果が、事前インキュベートしていないサンプル (0 時間) と比較して観察された。結果は、D L L 3 / C D 3 結合タンパク質で有意な内部移行が生じないことを示唆する。

【 0 2 6 4 】

(実施例 1 2)

マウス薬物動態研究

D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の薬物動態を、C 5 7 B L / 6 マウスにおいて、1 m g / k g の単回静脈内投薬の後に評価した。D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の血清濃度を、D L L 3 捕捉 / C D 3 検出アッセイを使用して、判定した。

簡単に述べると、雄性 C 5 7 B L / 6 マウスに、1 m g / k g の単回静脈内 (I V) 投薬 (n = 分子当たり 3) 。血液サンプルを、投薬前、ならびに投薬の 0 . 1 5 時間後、2 時間後、8 時間後、2 4 時間後、7 2 時間後、9 6 時間後、1 6 8 時間後、2 4 0 時間後、および 3 3 6 時間後に採取した。血清薬物レベルを、M S D に基づくリガンド結合アッセイで、捕捉試薬としてビオチン化 D L L 3 および検出試薬としてスルホタグ化 C D 3 を使用して、測定した。薬物動態 (P K) パラメーターを、非コンパートメント分析を使用して、血清濃度時間プロファイルから計算した。以下の薬物動態パラメーターを評価した：A U C t l a s t (時間ゼロから、最後の定量可能時点までの血清濃度 - 時間曲線下の面積)、A U C i n f (無限に外挿された血清濃度 - 時間曲線下の面積)、C L (全身クリアランス)、V s s (安定状態の体積分布)、ならびに 1 / 2 (消失半減期)。

【 0 2 6 5 】

例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 7 9 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質、および配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 8 0 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質) の平均 (S D) 血清濃度時間プロファイルを、図 9 に要約する。これらの例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の平均 (S D) 薬物動態パラメーターを、表 5 に要約する。

【 0 2 6 6 】

【 表 8 】

表5: 1mg/kg単回静脈内投薬後の雄性C57BL/6マウスにおける、例示的なDLL3/CD3結合タンパク質の平均(SD)PKパラメーター

DLL3/CD3結合 タンパク質	AUC _{0-last} (μ g*d/mL)	AUC _{0-inf} (μ g*d/mL)	CL (mL/日/kg)	V _{ss} (mL/kg)	t _{1/2} (日)
DLL3#3/CD3#1	1180 (127)	1760 (179)	13.7 (1.48)	178 (57.7)	10.6 (4.67)
DLL3#3/CD3#2	1260 (170)	1440 (154)	16.8 (1.74)	109 (19.5)	4.97 (0.78)

【 0 2 6 7 】

(実施例 1 3)

インビボ異種移植片有効性研究

ヒト T 細胞で再構成したヒト異種移植片マウスモデルを使用して、有効性研究を行った。詳細に述べると、ヒト S H P 7 7 小細胞肺がん細胞 (2×10^7 個) を、致死以下で照射した (2 G y 、 - 1 日目) 雌性 N O D . C g - P r k d c ^{s c i d} I l 2 r g ^{t m 1 S u g} / J i c T a c マウスの右背面腹部に皮下 (s . c .) 注射した (1 日目) 。並行して、ヒト C D 3 陽性 T 細胞 (健常なヒト血液ドナーから単離した) を、インビトロで増殖させた。

ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を、実施例 10 に記載されるように調製した。

【0268】

T 細胞を、パン T 細胞単離キット I I (M i l t e n y i B i o t e c、番号 130 - 091 - 156) を使用して、ネガティブセレクションによって単離した。簡単に述べると、細胞を、40 μ l の緩衝液 P B S / 0, 5 % B S A (g i b c o、参照番号 041 - 94553 M) / 2 m M E D T A (I n v i t r o g e n、参照番号 15575 - 038) 中に、10 個の M i o 細胞ずつ再懸濁させ、10 個の M i o 細胞当たり 10 μ l のビオチン - 抗体カクテルとともに、4 で 5 分間インキュベートした。続いて、30 μ l の緩衝液および 20 μ l の抗ビオチン M i c r o B e d s / 1000 万個の細胞を、添加し、4 で 10 分間インキュベートした。続いて、混合物を、好適な M A C S セパレータ (M i l t e n y i B i o t e c) の磁場において、事前にすすいだ 25 L S カラム (M i l t e n y i B i o t e c、番号 130 - 042 - 401) に入れた。フロースルーを収集し、アッセイ培地中で洗浄した。

10

【0269】

続いて、T 細胞を、T 細胞活性化 / 増殖キットヒト (M i l t e n y i B i o t e c、カタログ番号 130 - 091 - 441、ロット番号 5170720843) を使用して、20 日間増殖させた。簡単に述べると、抗ビオチン M A C S i B e a d (商標) 粒子に、C D 2 -、C D 3 -、C D 28 ビオチンをローディングし、精製した T 細胞に、粒子 1 つ当たり 2 つの細胞の比で移入し、0.5 ~ 1 106 個の細胞 / m l の密度で、20 ユニットの組換え I L - 2 (R & D、番号 202 - I L - 050 / C F) の存在下において、20 日間インキュベートした。細胞に、3 日ごとに 20 ユニットの新しい I L - 2 を補充した。動物に注射する 3 日前に、細胞 4 つ当たり 1 つのビーズの比で C D 2 -、C D 3 -、C D 28 ビオチンをローディングした抗ビオチン M A C S i B e a d (商標) 粒子で、T 細胞をさらに 3 日間再刺激した。最後に、ビーズを、M A C S i M A G セパレーター (M i l t e n y i B i o t e c) で除去し、T 細胞を、P B M C 中で洗浄した。

20

【0270】

14 日目に、動物を、腫瘍体積に基づいて処置群にランダム化し、 2×10^7 個のヒト T 細胞を、腹腔内 (i . p .) 注射した。処置は、17 日目に開始し、D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (配列番号 75 の D L L 3 鎖と配列番号 79 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質、および配列番号 75 の D L L 3 鎖と配列番号 80 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質) またはビヒクル緩衝液 (50 m M N a O A c、100 m M N a C l、p H 5.0) を、7 日間に 1 回の投薬レジメンで、静脈内 (i . v .) ポーラス注射で側方尾静脈に投与した。腫瘍成長を、外部キャリパー測定によってモニタリングし、腫瘍体積を、標準的な半楕円式を使用して計算した。ヒト T 細胞生着を、研究の終了時に、ヒト C D 3 に対する免疫組織化学 (I H C) 染色によって、脾臓において評価した。研究の終了時にヒト T 細胞生着を示した動物のみを、統計学的分析に含めた。殺処分基準に到達した動物は、道徳的理由により研究中に早期に安楽死させた。1 週間に 1 回、0.25 m g / k g の静脈内 D L L 3 / C D 3 結合タンパク質による腫瘍保持マウスの処置は、有意な腫瘍退縮を誘導した (図 10)。

30

【0271】

40

(実施例 14)

D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の単量体含量パーセント

例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質 (配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、または配列番号 252 の D L L 3 鎖と配列番号 79 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質、配列番号 75 の D L L 3 鎖と配列番号 80 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 結合タンパク質、および配列番号 75 の D L L 3 鎖と配列番号 105 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 結合タンパク質) の単量体パーセントを、サイズ排除クロマトグラフィー分析 (a S E C) によって

50

判定した（表 6 に示される）。aSEC は、Protein BEH SEC カラム 200、 $1.7\mu\text{m}$ 、 $4.6\times 150\text{mm}$ （カタログ番号 186005225）を使用して、Waters（Milford、MA、USA）Acquity UPLC システムにおいて実行した。泳動条件は、次の通りであった：移動相：50 mM リン酸ナトリウム、200 mM アルギニン、および 0.05 % アジ化ナトリウム、流速：0.5 ml / 分、泳動時間：5 分間、サンプルローディング量：10 μg 、ピーク検出：280 nm、自動化クロマトグラム処理方法。

【 0 2 7 2 】

【表 9】

表6:第1および第2の精製ステップ後の単量体パーセント

10

DLL3/CD3結合タンパク質	第1の精製ステップ後の単量体パーセント	第2の精製ステップ後の単量体パーセント
DLL3#1/CD3#1	76.4	99.4
DLL3#2/CD3#1	54.4	98.0
DLL3#3/CD3#1	69.5	99.8
DLL3#3/CD3#2	77.6	99.5
DLL3#3/CD3#3	70.8	98.3
DLL3#4/CD3#1	72.2	99.1
DLL3#5/CD3#1	70.5	99.1
DLL3#6/CD3#1	55.2	99.9
DLL3#7/CD3#1	78.1	99.0
DLL3#8/CD3#1	54.8	99.5
DLL3#9/CD3#1	72.0	99.0
DLL3#10/CD3#1	70.2	98.3
DLL3#11/CD3#1	68.2	94.7
DLL3#12/CD3#1	66.2	98.7
DLL3#13/CD3#1	52.8	99.9
DLL3#14/CD3#1	52.6	87.0
DLL3#15/CD3#1	61.5	該当なし
DLL3#16/CD3#1	71.8	99.5
DLL3#17/CD3#1	60.2	94.7
DLL3#18/CD3#1	61.5	98.2

20

30

【 0 2 7 3 】

（実施例 15 A）

熱安定性

熱安定性を、示差走査熱量測定（DSC）によって判定し、DLL3 / CD3 結合タンパク質の第 1 の融解転移（ T_m1 ）の結果を、表 7 に示す。DSC 熱融解は、緩衝液対照と比べた溶液中のタンパク質の熱安定性に関する情報を提供する。20 mM クエン酸、115 mM NaCl、pH 6 中の 1 mg / ml のタンパク質の溶液の熱変性および凝集を、20 から 110 まで、60 / 時間の走査速度で、自動化キャピラリー DSC によってモニタリングした。

40

【 0 2 7 4 】

【表 10】

表7A

DLL3/CD3結合タンパク質	Tm1
DLL3#3/CD3#1	64
DLL3#3/CD3#2	60
DLL3#3/CD3#3	63
DLL3#4/CD3#1	63

【0275】

10

(実施例15B)

熱安定性

熱安定性を、熱シフト分析(TSA)によって判定し、DLL3/CD3結合タンパク質(配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、または配列番号252のDLL3鎖と配列番号79のCD3鎖とを含むDLL3/CD3結合タンパク質、配列番号75のDLL3鎖と配列番号80のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質、および配列番号75のDLL3鎖と配列番号105のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質)の第1の融解転移(Tm1)の結果を、表7Bに示す。SYPROオレンジ(Invitrogen、Carlsbad、CA)を外来フルオロフォアとして用いてQuantStudio 6 FlexリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems、Waltham、MA)を使用して、温度に対する関数としての蛍光強度プロファイルを取得した。サンプルを、10mMヒスチジン、pH6.0中、40mM塩化ナトリウムおよび0.02%アジ化ナトリウムで0.4mg/mlに希釈した。融解曲線を、2/分の速度で、25から95の熱傾斜で生成し、データを、およそ0.4ごとに、「ROX」フィルターセット(励起:580±10nm、放出:623±14nm)を通じて取得した。データを、タンパク質熱シフトソフトウェアバージョン1.3(ThermoFisher Scientific、Waltham、MA)を使用して分析した。

20

30

【0276】

【表 1 1】

表7B

DLL3/CD3結合タンパク質	Tm1 (°C)
DLL3#1/CD3#1	65.6
DLL3#2/CD3#1	65.5
DLL3#3/CD3#1	65.6
DLL3#3/CD3#2	63.0
DLL3#3/CD3#3	65.5
DLL3#4/CD3#1	65.8
DLL3#5/CD3#1	65.6
DLL3#6/CD3#1	65.8
DLL3#7/CD3#1	65.6
DLL3#8/CD3#1	65.8
DLL3#9/CD3#1	65.9
DLL3#10/CD3#1	64.6
DLL3#11/CD3#1	66.0
DLL3#12/CD3#1	65.9
DLL3#13/CD3#1	65.8
DLL3#14/CD3#1	65.9
DLL3#15/CD3#1	該当なし
DLL3#16/CD3#1	65.8
DLL3#17/CD3#1	65.8
DLL3#18/CD3#1	65.8

10

20

【0 2 7 7】

(実施例 1 6)

E p i v a x によるコンピュータでの免疫原性スコアの予測：

配列の免疫原性を、数学的アルゴリズムを用いてコンピュータで評価した。具体的には、免疫原性スコアの尺度として、D L L 3 / C D 3 結合タンパク質（配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 2 4 1、配列番号 2 4 2、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 6、配列番号 2 4 7、配列番号 2 4 8、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 1、または配列番号 2 5 2 の D L L 3 鎖と配列番号 7 9 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 / C D 3 結合タンパク質、配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 8 0 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 結合タンパク質、および配列番号 7 5 の D L L 3 鎖と配列番号 1 0 5 の C D 3 鎖とを含む D L L 3 結合タンパク質）の E p i M a t r i x T r e g 調整済みスコア（E p i V a x I n c .、P r o v i d e n c e R I）を判定し、様々な F c 配列のスコアと比較した。これらのスコアは、T 細胞エピトープおよび T r e g エピトープを考慮に入れる。免疫原性スコアが低いほど、配列が免疫原性である可能性が低い。一般に、負のスコアは、免疫原性のリスクが低いと考えられ、一方で高度に正のスコアは、免疫原性の可能性を示すと解釈される。以下の表に示されるように、本明細書に記載される D L L 3 / C D 3 結合タンパク質は、非常に低い免疫原性スコアを示し、免疫原性であるリスクが、これらの結合タンパク質については低いことを示す。

30

40

【0 2 7 8】

【表 1 2】

表8: DLL3/CD3結合タンパク質の調整済みEpivaxスコア

DLL3/CD3結合タンパク質	VH	VL	全長ポリペプチド鎖(VL-CL-リンカー-VH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3)
DLL3#1 DLL3鎖	-36.88	-59.85	-43.31
DLL3#2 DLL3鎖	-46.99	31.40	-33.53
DLL3#3 DLL3鎖	-34.44	2.84	-35.50
DLL3#4 DLL3鎖	25.97	28.92	-21.93
DLL3#5 DLL3鎖	-59.87	-46.45	-44.95
DLL3#6 DLL3鎖	29.70	-14.55	-27.26
CD3#1 CD3鎖	-9.68	-50.52	-35.25
CD3#2 CD3鎖	-15.54	-50.52	-36.23
CD3#3 CD3鎖	-13.49	-50.52	-35.88
DLL3#7 DLL3鎖	-48.55	-34.92	-41.60
DLL3#8 DLL3鎖	-54.39	-37.79	-42.89
DLL3#9 DLL3鎖	35.95	-60.37	-31.83
DLL3#10 DLL3鎖	-33.82	-34.60	-40.73
DLL3#11 DLL3鎖	-24.00	26.66	-30.50
DLL3#12 DLL3鎖	-30.43	25.68	-31.67
DLL3#13 DLL3鎖	8.64	18.63	-25.96
DLL3#14 DLL3鎖	1.58	-10.63	-31.72
DLL3#15 DLL3鎖	8.93	-8.31	-29.91
DLL3#16 DLL3鎖	-55.14	13.98	-35.59
DLL3#17 DLL3鎖	11.89	12.55	-26.52
DLL3#18 DLL3鎖	5.82	15.85	-27.01

10

20

【 0 2 7 9 】

【表 1 3】

表9: Fcドメインの調整済みEpivaxスコア

Fcタンパク質鎖	調整済みEpivaxスコア
Fc-IgG1-WT	-25.64
Fc-IgG1-LALA	-29.83
Fc-IgG1-LALA-KNOB	-31.76
Fc-IgG1-LALA-HOLE	-18.01

30

【 0 2 8 0 】

(実施例 1 7 A)

40

表面への非特異的結合

本発明のDLL3/CD3結合タンパク質の特異性を、高度に荷電したタンパク質を使用して、SPRに基づくアッセイにおいてさらに試験した。バイオセンサー技術を使用して、結合タンパク質が無関係の荷電タンパク質に対して有意な結合を有するかどうかを判定するための非特異的結合アッセイを開発した。このアッセイにおいて、DLL3/CD3結合タンパク質を、一方が負に荷電したタンパク質(トリプシン阻害剤)をコーティングし、一方が正に荷電したタンパク質(リゾチーム)をコーティングした、2つのSPR表面を通過させた。タンパク質が、これらの表面に対して有意な非特異的結合を示す場合、候補物上の正または負に荷電した表面パッチの存在が結合の原因である可能性が高い。タンパク質の非特異的結合は、薬物動態(PK)および生体分布の不良と解釈され得、下

50

流の製造可能性の影響も有し得る。

実験を、Biacore T200において行った。希釈、表面調製、および結合実験を、10倍HBS-EPから調製した1倍HBS-EP緩衝液において、25で行った。固定化プロトコルおよび結合実験のいずれについても、流速は、5 μ L / 分であった。

【0281】

表面を非特異的結合実験用に調製するために、ニワトリの卵白リゾチームおよびグリシンマックスダイズ (glycine max soybean) に由来するトリプシン阻害剤を、アミンカップリングキットを製造業者の説明書に従って使用して、3000 ~ 5000 RUの表面密度で、手作業でSシリーズのCM5チップにカップリングさせた。

サンプルを、1倍HBS-EP緩衝液中、1 μ Mで調製した。サンプルを、10分間の会合および10分間の解離で、活性化表面上に注射した。データは、Biacore T200コントロールソフトウェアバージョン2.0.1を使用して収集し、Biacore T200評価ソフトウェアバージョン3.0を使用して分析した。

【0282】

DLL3 / CD3結合タンパク質は、これらの高度に荷電した表面には結合しなかった。表10Aは、2つの例示的なDLL3 / CD3結合タンパク質での、トリプシン阻害剤およびリゾチームである2つの高度に荷電したタンパク質への結合の不在を示す。

【表14】

表10A:

DLL3/CD3結合タンパク質	非特異的結合	
	リゾチーム(正)	トリプシン阻害剤(負)
DLL3#3/CD3#1	なし	なし
DLL3#3/CD3#2	なし	なし

【0283】

(実施例17B)

表面への非特異的結合

DLL3 / CD3結合タンパク質 (配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、または配列番号252のDLL3鎖と配列番号79のCD3鎖とを含むDLL3 / CD3結合タンパク質、配列番号75のDLL3鎖と配列番号80のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質、および配列番号75のDLL3鎖と配列番号105のCD3鎖とを含むDLL3結合タンパク質) の特異性を、実施例17aに記載されるように、10分間の会合および15分間の解離で、高度に荷電したタンパク質を使用してSPRに基づくアッセイにおいてさらに試験した。結果を、表10Bに示す。

【0284】

【表 15】

表10B:低いRU数は、無関係の荷電タンパク質への有意な結合を示さない

DLL3/CD3結合タンパク質	非特異的結合(RU)	
	リゾチーム(正)	トリプシン阻害剤(負)
DLL3#1/CD3#1	4	1
DLL3#2/CD3#1	7	2
DLL3#3/CD3#1	54	85
DLL3#3/CD3#2	44	36
DLL3#3/CD3#3	17	28
DLL3#4/CD3#1	16	37
DLL3#5/CD3#1	4	0
DLL3#6/CD3#1	6	0
DLL3#7/CD3#1	9	3
DLL3#8/CD3#1	39	18
DLL3#9/CD3#1	15	27
DLL3#10/CD3#1	25	12
DLL3#11/CD3#1	11	13
DLL3#12/CD3#1	8	9
DLL3#13/CD3#1	11	3
DLL3#14/CD3#1	18	6
DLL3#15/CD3#1	該当なし	該当なし
DLL3#16/CD3#1	6	0
DLL3#17/CD3#1	15	8
DLL3#18/CD3#1	23	81

10

20

【0285】

30

(実施例18)

DLL3陽性およびDLL3陰性腫瘍細胞の存在下における溶解、T細胞活性化、T細胞脱顆粒化、T細胞増殖、およびサイトカイン分泌の誘導

PBMCを、実施例9に記載されるように精製した。T細胞活性化、T細胞脱顆粒化、およびサイトカイン分泌を判定するために、PBMCおよびDLL3陽性SHP77またはDLL3陰性RKO-E6細胞を標的細胞として用いた細胞毒性アッセイを、実施例10Bに記載されるように、設定した。T細胞をヒトSHP77またはRKO-E6細胞へと再指向させることによる細胞溶解の有効性を、実施例10Aに記載されるように、判定した。T細胞活性化およびT細胞脱顆粒化を判定するために、細胞を、遠心分離し、CD4(BD、番号550630)、CD8(BD、番号557834)、CD25(BD、番号340907)に対する抗体で染色し、続いて、細胞を、固定/透過処理溶液(BD、番号554714)を使用して透過処理し、パーフォリン(BioLegend、番号308120)およびグランザイムB(BD、番号560221)に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーによって測定した。上清中のサイトカインレベルを、U-PLEX Biomarker Group 1(hu)アッセイ(MSD、番号K15067L-2、キット)によって判定した。

40

T細胞の増殖を判定するために、PBMCを、5μMのCell Trace(商標)CFSE(Invitrogen、C34554)で標識し、T細胞を、抗CD3抗体(BioLegendカタログ番号:317336)で染色した。続いて、標識したPBMCを、10:1の比のSHP77またはRKO-E6細胞、ならびに漸増濃度のDLL3

50

/ C D 3 結合タンパク質とともに、6日間インキュベートした。

図 1 1 ~ 1 5 は、S H P 7 7 または R O - E 6 細胞ならびに D L L 3 / C D 3 結合タンパク質の存在下における、T 細胞再指向による S H P 7 7 または R K O - E 6 細胞の溶解の誘導 (図 1 1)、および用量依存的 T 細胞活性化の誘導 (図 1 2)、T 細胞脱顆粒化 (図)、サイトカインの分泌 (図 1 4 A : インターフェロンガンマ、1 4 B : M C P - 1)、ならびに T 細胞の増殖 (図 1 5) を示す。

【 0 2 8 6 】

(実施例 1 9)

T 細胞サブセットの S H P 7 7 細胞への再指向

P B M C を、実施例 1 0 a に記載されるように単離した。続いて、T 細胞サブセットを、以下の試薬およびプロトコールを使用して単離した。

【 0 2 8 7 】

【 表 1 6 】

表11: T細胞サブセットの単離のための試薬およびプロトコール

T細胞サブセット	使用した試薬およびプロトコール
ナイーブT細胞	Miltenyi Biotech、番号130-097-095
CD4 ⁺ T細胞	Miltenyi Biotech、番号130-096-533
CD4 ⁺ エフェクターメモリーT細胞	Miltenyi Biotech、番号130-094-125
CD4 ⁺ セントラルメモリーT細胞	Miltenyi Biotech、番号130-094-302
CD8 ⁺ T細胞	Miltenyi Biotech、番号130-096-495
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ エフェクターT細胞	Miltenyi Biotech、番号130-094-485
CD8 ⁺ メモリーT細胞	Miltenyi Biotech、番号130-094-412

10

20

30

図 1 6 ~ 2 0 は、D L L 3 / C D 3 結合タンパク質による、パン T 細胞 (図 1 6)、ナイーブ T 細胞 (図 1 6)、C D 4 ⁺ T 細胞 (図 1 7、1 8)、C D 4 ⁺ エフェクターメモリー T 細胞 (図 1 8)、C D 4 ⁺ セントラルメモリー T 細胞 (図 1 7)、C D 8 ⁺ T 細胞 (図 1 9、2 0)、C D 8 ⁺ C D 4 5 R A ⁺ エフェクター T 細胞 (図 1 9)、C D 8 ⁺ メモリー T 細胞 (図 2 0) の、ヒト S H P 7 7 細胞への再指向の有効性を示す。

【 0 2 8 8 】

(実施例 2 0)

例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質による S H P 7 7 異種移植片腫瘍組織への T 細胞浸潤

実施例 1 3 に記載される研究におけるマウスに由来する残りの腫瘍組織を調製し、ホルマリンに固定し、パラフィンに包埋した。続いて、組織切片を調製し、T 細胞上の C D 3 発現について染色した (2 G V 6 V e n t a n a)。例示的な D L L 3 / C D 3 結合タンパク質による S H P 7 7 異種移植片腫瘍組織への T 細胞浸潤を、図 2 1 に示す。表 1 2 におけるスコア付けを使用して、異種移植片腫瘍組織における C D 3 発現を定量した。

【 0 2 8 9 】

40

【表 17】

表12:浸潤CD3陽性T細胞の定量化のスコア付け

スコア	説明
0	切片面にCD3+細胞がない
1	主として間質における、まれに散乱した細胞または小クラスターがある
2	間質および辺縁における、まれに散乱した細胞または小クラスターがある
3	間質、上皮、および辺縁に少数の細胞またはクラスターがある
4	間質および辺縁に中等度の数の細胞またはクラスターがあり、上皮内の細胞数は少ない
5	間質および辺縁に多数の細胞またはクラスターがあり、上皮内の細胞数は少ない

10

【0290】

(実施例21)

抗DLL3抗体の産生

抗DLL3結合物質を得るために、DLL3免疫付与野生型およびAlivamaヒト化マウス(Ablexis、San Francisco、CA、USA、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を用いたAlivamaトランスジェニックマウスプラットフォーム)に由来するハイブリドーマまたは単一B細胞を、インビトロで培養した。上清を、AlphaLISA(PerkinElmer、Waltham、MA、USA)によって組換えヒトDLL3に対する反応性についてスクリーニングし、フローサイトメトリーによってヒトDLL3を発現するSHP-77細胞(ATCC(登録商標)、CRL-2195TM)に対する反応性についてスクリーニングした。

20

【0291】

免疫グロブリン(Ig)VHおよびVL遺伝子を、次いで、特定された陽性クローンから増幅させた。ハイブリドーマからRNAを単離するために、単一クローンに由来する約 2×10^6 個の細胞を、ペレットにし、原料として使用した。単一B細胞については、単一で単離したB細胞から増大させた100~500個の細胞を、原料として使用した。RNAは、RNeasy Plus(Qiagen、Hilden、Germany)を使用して単離した。次いで、Smarter cDNA合成キット(Clontech、Mountain View、CA)を製造業者の説明に従って使用して、cDNAを合成した。cDNA合成を促進するために、oligo dTを使用して、全てのメッセンジャーRNA逆転写をプライミングし、次いで、Smarter IIAオリゴヌクレオチドで「5'キャッピング」した。続いて、VHおよびVLフラグメントの増幅を、Smarter IIAキャップを標的とする5'プライマーおよびCH1におけるコンセンサス領域を標的とする3'プライマーを使用して、2ステップのPCR増幅を使用して行った。簡単に述べると、それぞれの50 μ lのPCR反応物は、20 μ Mのフォワードプライマーおよびリバースプライマーの混合物、25 μ lのPrimeStar Max DNAポリメラーゼプレミックス(Clontech)、2 μ lの未精製cDNA、ならびに21 μ lの二重蒸留H₂Oからなる。サイクリングプログラムは、94において3分間から開始され、続いて、35回のサイクル(94において30秒間、50において1分間、68において1分間)の後、72において7分間で終了する。2回目のPCRは、それぞれのpTT5母ベクター(VHおよびVL)におけるそれぞれの領域と「オーバーラップする」15bpの相補的伸長を含む、VLおよびVHの2回目のプライマーを用いて行った。2回目のPCRは、以下のプログラムで行った：94において3分間、35回のサイクル(94において30秒間、50において1分間、68において1

30

40

50

分間)、72 において7分間で終了。

【0292】

In-Fusion (登録商標) HDクローニングキット (Clontech、U.S.A.) を、VL遺伝子のpTT5 huIgKベクターへの指向性クローニングおよびVH遺伝子のpTT5 huIgG1KOベクターへの指向性クローニングに使用した。In-Fusion (登録商標) HDクローニングを促進するために、PCR産物を、精製し、In-Fusion HDクローニングの前に、クローニングエンハンサーで処理した。クローニングおよび形質転換は、製造業者のプロトコール (Clontech、U.S.A.) に従って行った。ミニプレップDNAを、サンガーシーケンシングに供して、完全なV遺伝子フラグメントが得られたことを確認した。

10

この手法を使用して、DLL3に対する特異性を有する結合ドメインをコードするIgVHおよびVL遺伝子の対を、調製した。CHO-E37細胞に、対応する重鎖および軽鎖をコードするプラスミドを一過的にトランスフェクトすることによって、組換え抗体を産生させた。

【0293】

組換え抗体の確認用スクリーニング

発現された組換え抗体を含有する上清を、ヒトDLL3を発現する細胞株への結合について、フローサイトメトリーによってアッセイした。簡単に述べると、細胞を、組換え上清とともにインキュベートし、洗浄し、上清から結合したmAbを、抗ヒトIgG-APC (Jackson ImmunoResearch 109-136-098) を用いて検出した。シグナル対バックグラウンド比 (S/B) は、サンプルの蛍光強度中央値 (MFI) を、アイソタイプ対照のもので除することによって、計算した。

20

【0294】

Biacore 400における表面プラズモン共鳴 (SPR) を、組換え上清に行った。簡単に述べると、HTP上清中の最適化されていないIgGを、10ul/分で60秒間、プロテインA/Gを介してセンサー表面に捕捉した。捕捉したIgGへの100nMのヒトDLL3の結合を、30ul/分で180秒間の会合、続いてHBS-EP緩衝液中での120秒間の解離について、モニタリングした。プロテインA/G表面の再生を、それぞれの結合サイクルの合間に、pH2.1のグリシンを用いて行った。以下の材料を、このアッセイにおいて使用した：タンパク質試薬：組換えで発現させたヒトDLL3。システム泳動緩衝液：HBS-EP (10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、および0.005% v/vのポリソルベートP20)。捕捉用試薬：すべてのヒトIgGアイソタイプに対して特異性を有するプロテインA/G。

30

目的のクローン (300pMを下回るKdを有する) を、選択し、以下に記載される様々な検出アッセイにおいてさらに評価した。

【0295】

(実施例22)

抗DLL3抗体の組換えヒトDLL3タンパク質への結合

抗体の結合を、ELISAにおいて行った。簡単に述べると、抗DLL3抗体を、4で一晩、2μg/mlの濃度でコーティングした。プレートを洗浄した後、室温で1時間、ブロッキング緩衝液 (Gibco、Gibco番号043-90309A) でブロッキングし、続いて、洗浄し、漸増濃度の組換えDLL3タンパク質とともにインキュベートした。検出のために、結合したDLL3タンパク質を、ポリクローナル抗DLL3抗体 (R&D Systems、AB4315) とともにインキュベートし、続いて、SULFO-TAG標識化抗ヤギ抗体 (R32AG-1) とともに1時間インキュベートした。結合した抗体を、Sectorイメージャー6000 (MSD) においてRead Buffer (MSD) を使用して定量した。図22は、3つの例示的な抗DLL3抗体の組換えタンパク質への結合を示す。膜近傍ペプチドドメインを標的とする抗DLL3抗体 (DLL3#3) は、EGF4 (DLL3#4) またはEGF1ドメイン (DLL3#5) を

40

50

標的とする抗 D L L 3 抗体と比較して、組換え D L L 3 タンパク質への強力な結合を示す。

【 0 2 9 6 】

(実施例 2 3)

抗 D L L 3 抗体の S C L C 細胞株への結合

細胞 (T 細胞またはヒト S C L C 細胞) を、漸増濃度の F A C S 緩衝液 (P B S / 0 . 5 % B S A / 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム) 中の漸増濃度の抗 D L L 3 抗体で染色した。結合した分子を、 F A C S 分析によって P E にコンジュゲートした抗マウス二次抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 1 1 5 - 1 1 6 - 0 7 2) で検出した。 D S L (D L L 3 # 6) 、 E G F 1 (D L L 3 # 5) 、または E G F 4 (D L L 3 # 4) ドメインを標的とする抗 D L L 3 抗体は、図 2 3 に示されるように、 C 末端ペプチドを標的とする抗 D L L 3 抗体 (D L L 3 # 1 、 D L L 3 # 2 、 D L L 3 # 3) よりも、 D L L 3 を発現する S C L C 細胞株への効力な結合を示す。

10

【 0 2 9 7 】

(実施例 2 4)

(I H C)

抗 D L L 3 抗体を、 2 0 μ g / m l の濃度で、 V e n t a n a D i s c o v e r y u l t r a (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c 、 A r i z o n a) を製造業者の説明書に従って使用して、 D L L 3 m R N A 陽性 S C L C サンプルにおいて試験した。簡単に述べると、 I H C を、抗 D L L 3 抗体で染色したホルマリン固定パラフィン包埋組織および切片 (4 μ m) に行った。 I H C アッセイを、 R U O D i s c o v e r y U n i v e r s a l プロトコルを使用して、 V e n t a n a D i s c o v e r y U l t r a プラットフォームで行った。抗 D L L 3 抗体染色は、 1 2 分間、エピトープ賦活剤としてプロテイナーゼ K を使用して最適化させた。抗 D L L 3 抗体を、 6 0 分間インキュベートした後、抗マウス H Q 検出システムおよび抗 H Q H R P とともにいずれも 1 2 分間インキュベートした。陰性対照 (I g G 抗体) は、それぞれの組織切片に対して行い、試験スライドと同じように処理した。

20

ヒト S C L C 細胞株 S H P 7 7 を、陽性対照として使用した。全組織切片のデジタル画像を、 L e i c a S C N 4 0 0 組織学スキャナー (L e i c a M i c r o s y s t e m s 、 M i l t o n K e y n e s 、 U K) を使用して取得した。

30

例示的な抗 D L L 3 抗体を用いたヒト S C L C サンプルの免疫組織化学的分析を、図 2 4 に示す。

【 0 2 9 8 】

(実施例 2 5)

S C L C 細胞株における発現レベルの判定

抗 D L L 3 抗体の細胞表面発現を、 Q I F I K I T (K 0 0 7 8 、 D a k o) を使用して定量した。簡単に述べると、 S C L C 細胞株 (S H P 7 7 、 N C I - H 8 2 、および N C I - H 2 2 8 6) を、抗 D L L 3 抗体 (D L 3 0 9 、国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 3 0 9 7 号) または無関係の抗体 (アイソタイプ対照) で、 5 μ g / m l で標識した。別個のバイアルにおいて。続いて、細胞およびキットに提供されているビーズを、並行して、フルオレセインをコンジュゲートした抗マウス二次抗体で標識した。サンプルを、 B D C a n t o I I F l u o r o c y t o m e t e r において測定したが、結果的に、蛍光は、細胞およびビーズ上に結合した抗 D L L 3 抗体の数と相関する。表 1 2 は、 3 つの S C L C 細胞株の細胞表面上に発現される D L L 3 分子を示す。

40

【 0 2 9 9 】

【表 18】

表13: SCLC細胞株の細胞表面上に発現されるDLL3分子

SCLC細胞株	細胞表面のDLL3分子/細胞
SHP77(ATCC(登録商標)、C2061RL-2195(商標))	
NCI-H82 (HTB-175TM)	824
NCI-H2286	129

【0300】

10

(実施例26)

SCLC細胞株ブロックにおけるIHCプロトコルの感度の判定

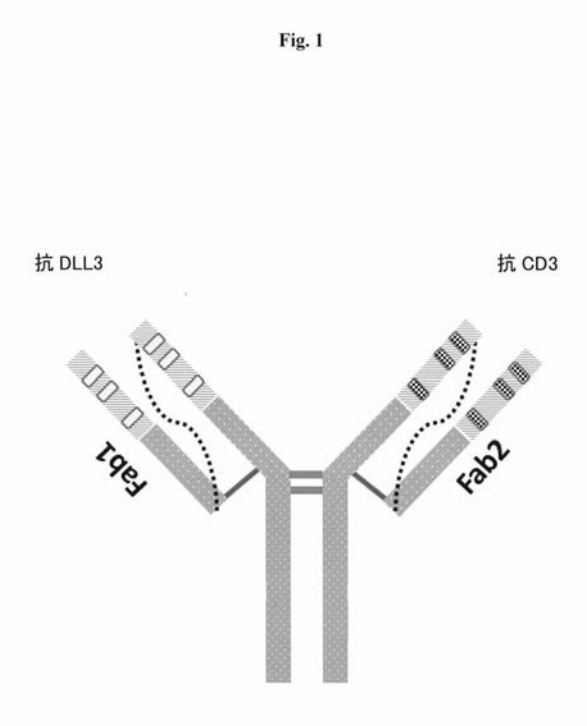
IHCプロトコルの感度を評価するために、SCLC細胞株(SHP77、NCI-H82、およびNCI-H2286)を、病院における組織のように処理し、ホルマリンに固定し、続いて、パラフィンに包埋した。

【0301】

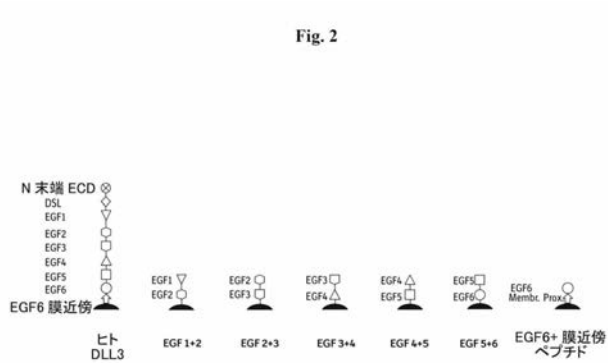
SCLC細胞株を、ATCCの説明書に従って培養した。細胞を、プレートからこそげ落とし、ホルマリンに固定し、続いて、可溶化したHistogel(Thermo Fisher scientific、HG-4000-012)中に添加し、4で一晩インキュベートし、続いて、標準的なパラフィン包埋手順を、慣例的な病理研究室において行った。簡単に述べると、細胞ブロックを、エタノールおよびイソプロパノール中でインキュベートした後、パラフィンに包埋する(roti-Plast、番号6642.5)。細胞ペレットブロックの切片を行い、切片を、実施例24に記載されるプロトコルで染色した。図25に示される結果は、抗DLL3抗体DLL3#5を用いたIHCプロトコルにより、非常に低いDLL3発現を有する細胞を検出することができることを示す。

20

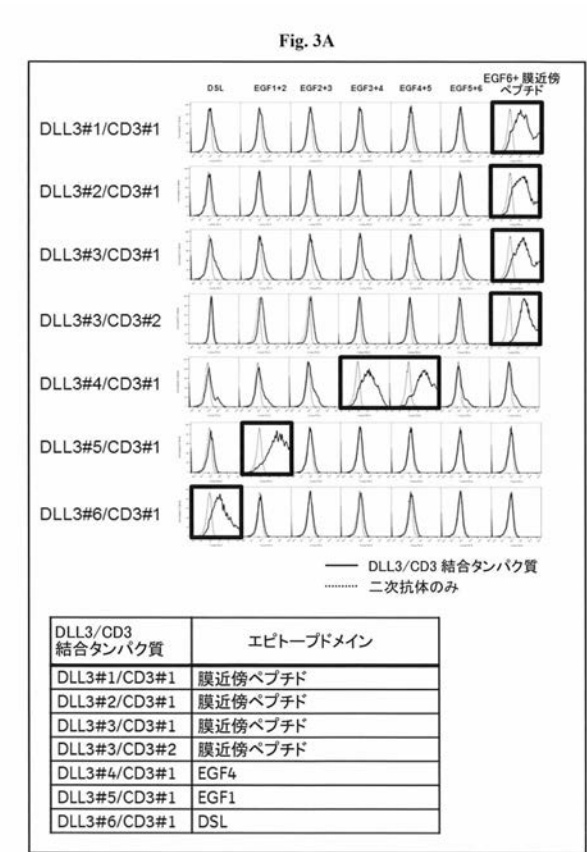
【 図 1 】



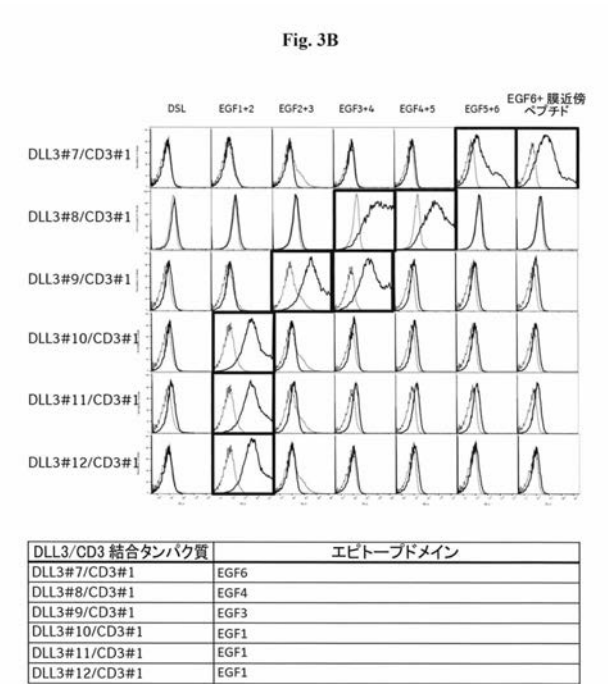
【 図 2 】



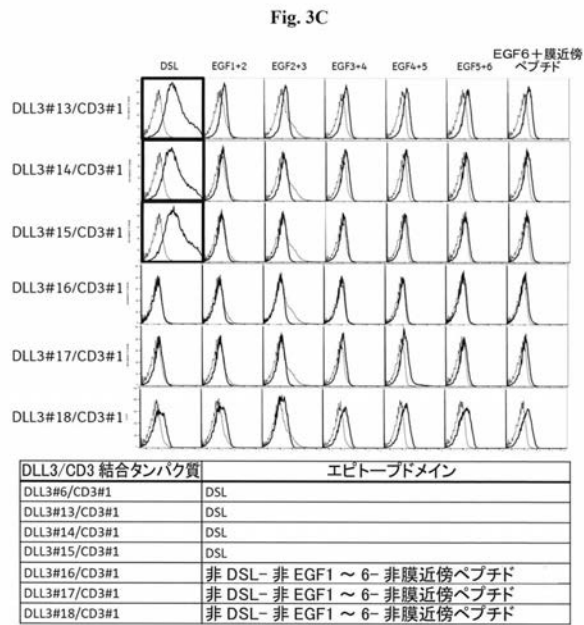
【 図 3 A 】



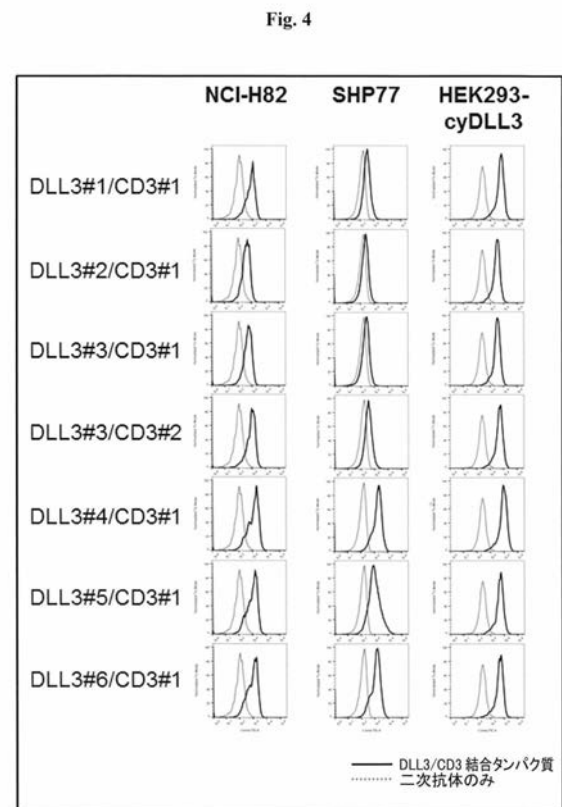
【 図 3 B 】



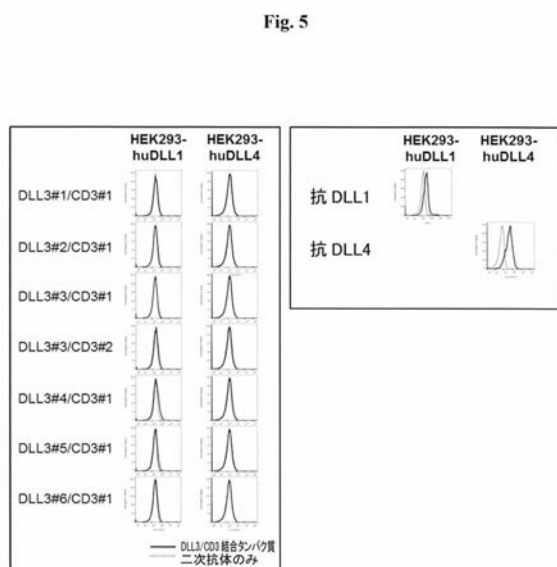
【 図 3 C 】



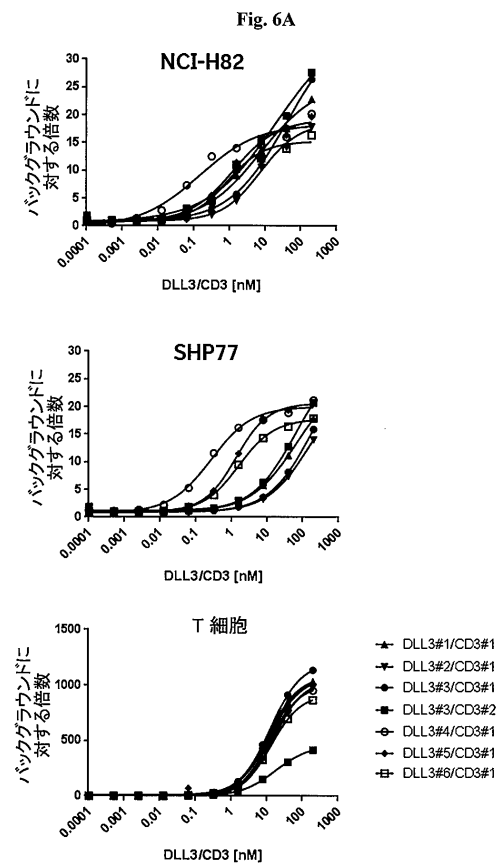
【 図 4 】



【 図 5 】

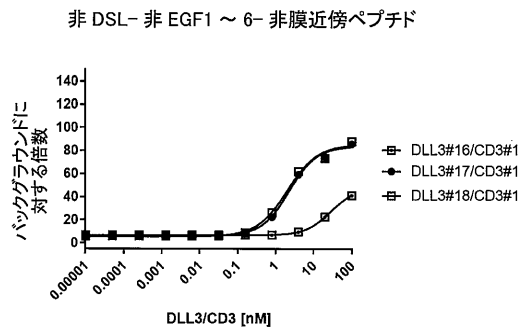


【 図 6 A 】



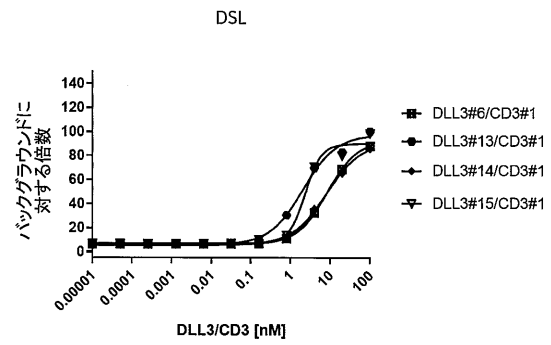
【 図 6 B 】

Fig. 6B



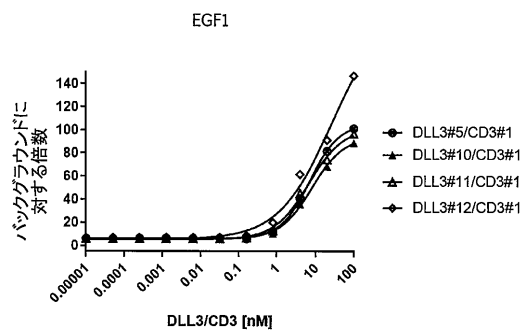
【 図 6 C 】

Fig. 6C



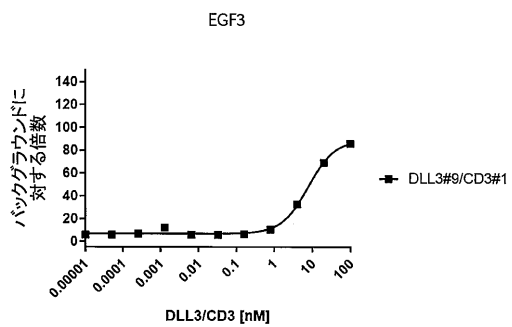
【 図 6 D 】

Fig. 6D



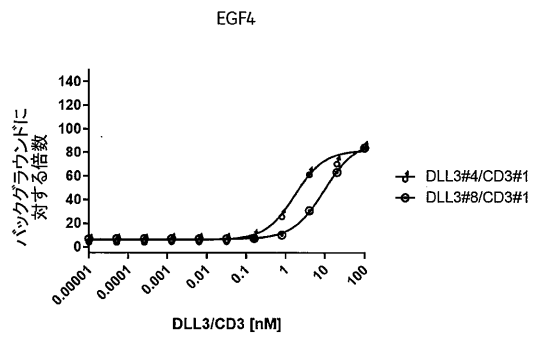
【 図 6 E 】

Fig. 6E



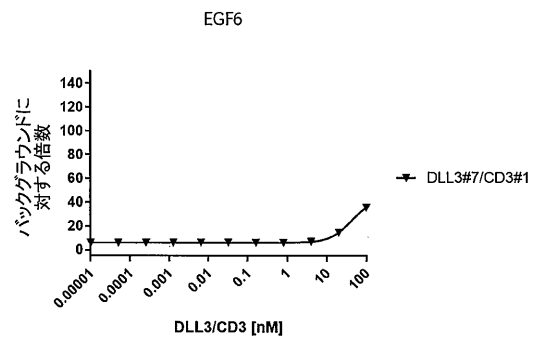
【 図 6 F 】

Fig. 6F



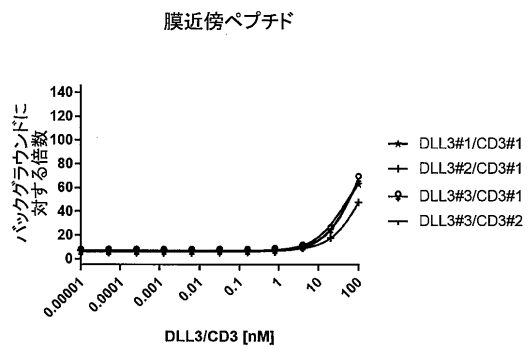
【 図 6 G 】

Fig. 6G



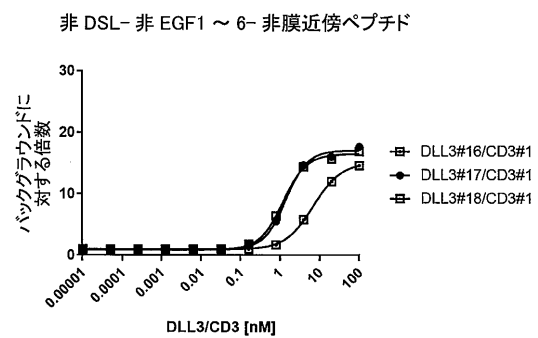
【 図 6 H 】

Fig. 6H



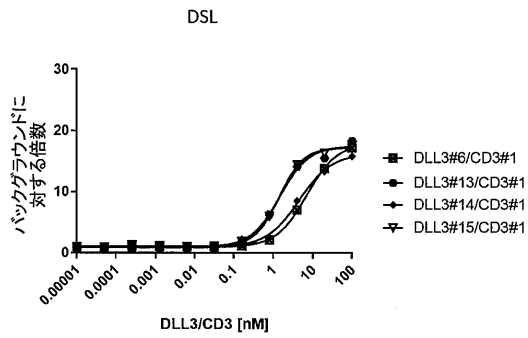
【 図 6 I 】

Fig. 6I



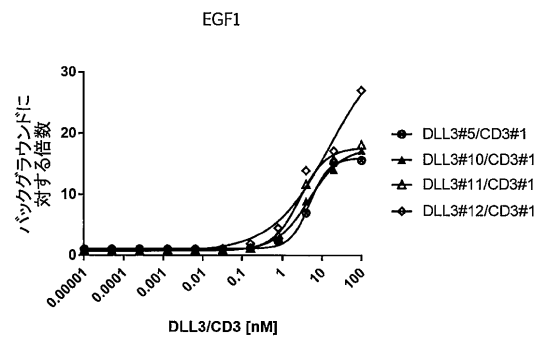
【 図 6 J 】

Fig. 6J



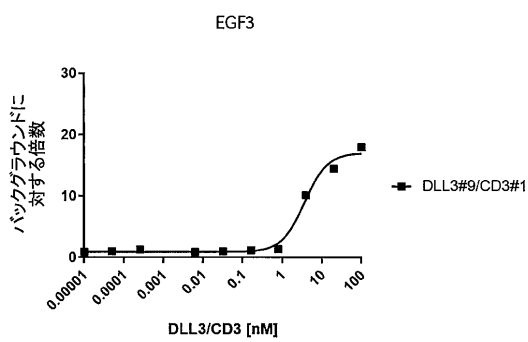
【 図 6 K 】

Fig. 6K



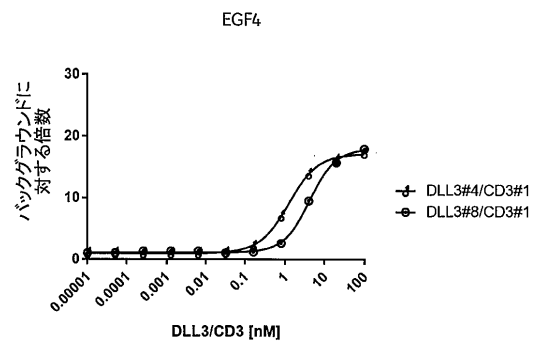
【 図 6 L 】

Fig. 6L



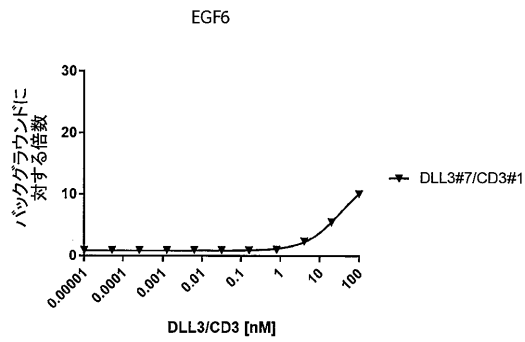
【 図 6 M 】

Fig. 6M



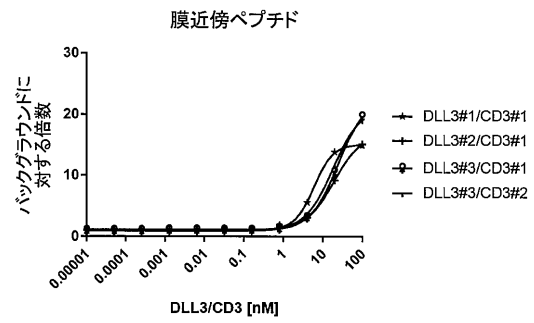
【図 6 N】

Fig. 6N



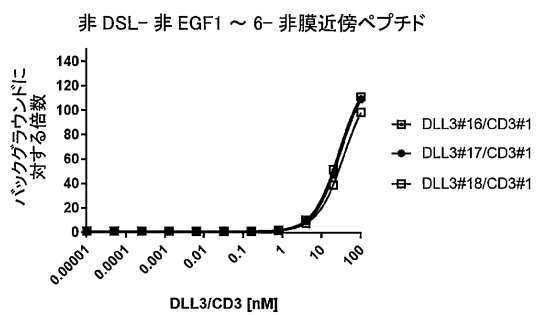
【図 6 O】

Fig. 6O



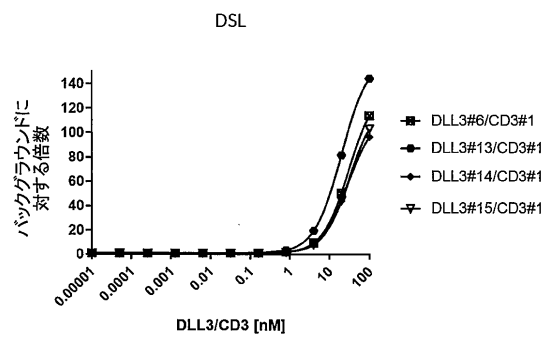
【図 6 P】

Fig. 6P



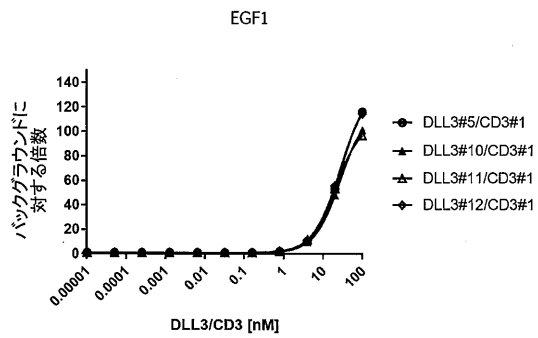
【図 6 Q】

Fig. 6Q



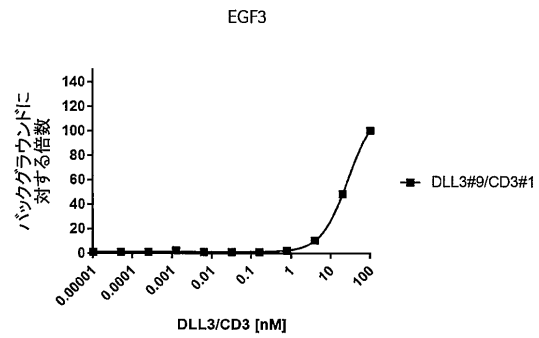
【図 6 R】

Fig. 6R



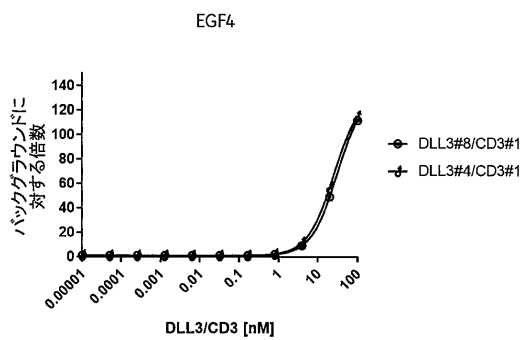
【図 6 S】

Fig. 6S



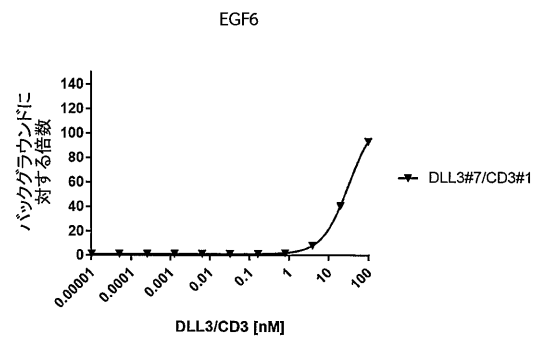
【図 6 T】

Fig. 6T



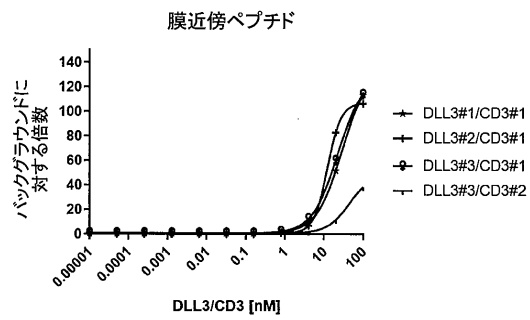
【図 6 U】

Fig. 6U



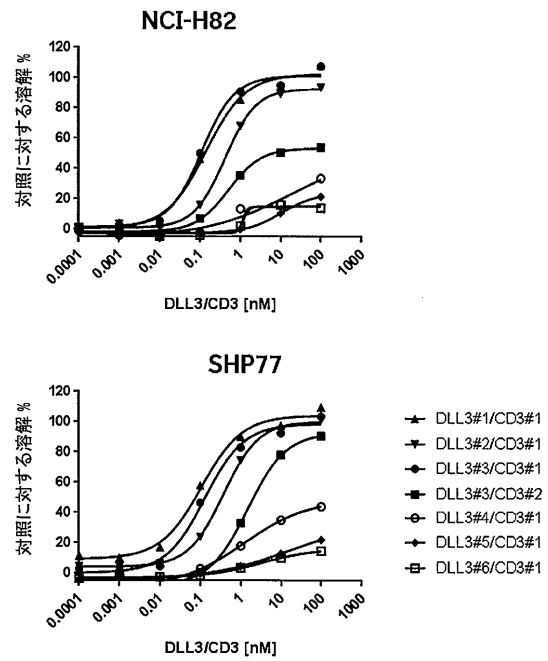
【図 6 V】

Fig. 6V



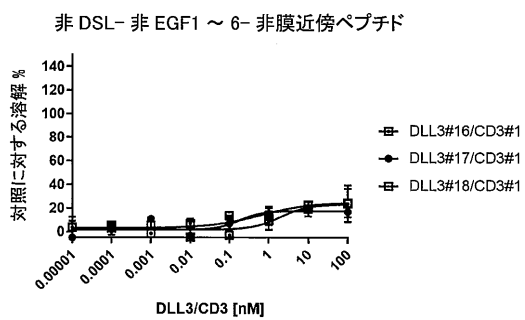
【図 7 A】

Fig. 7A



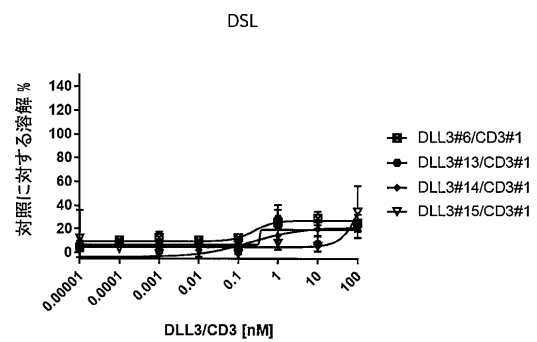
【図 7 B】

Fig. 7B



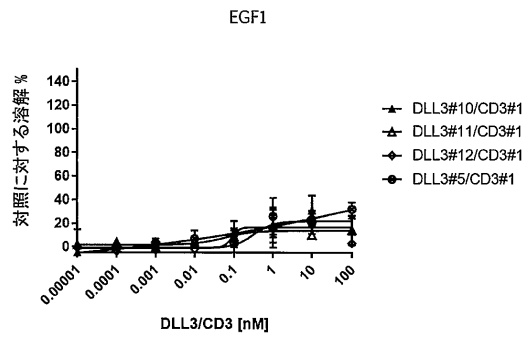
【図 7 C】

Fig. 7C



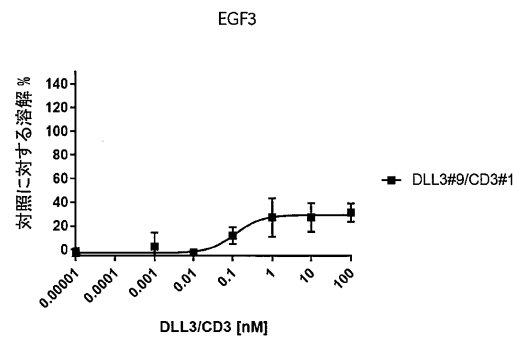
【 図 7 D 】

Fig. 7D



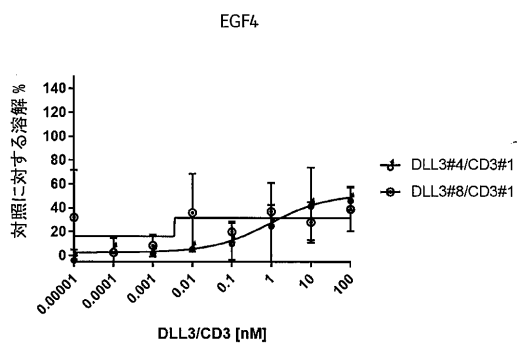
【 図 7 E 】

Fig. 7E



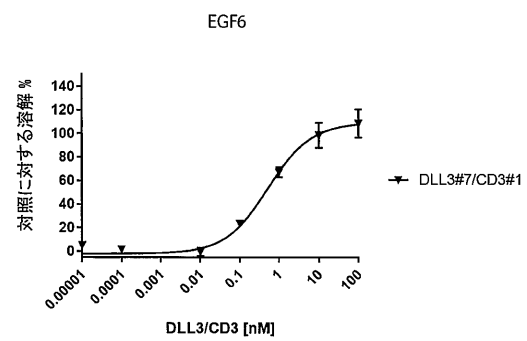
【 図 7 F 】

Fig. 7F



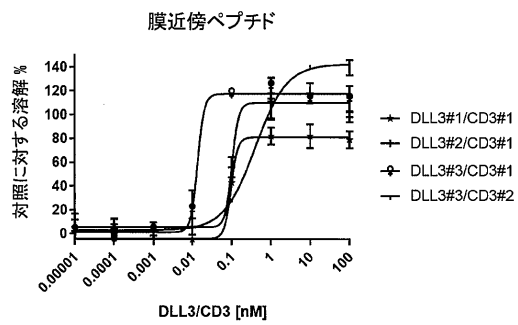
【 図 7 G 】

Fig. 7G



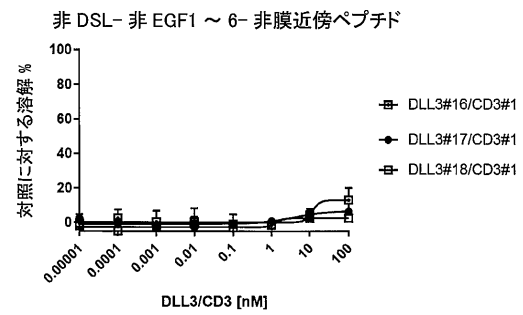
【 図 7 H 】

Fig. 7H



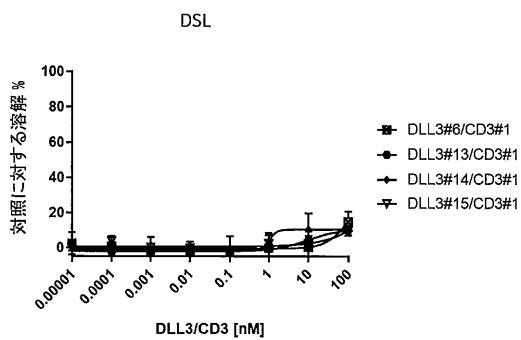
【 図 7 I 】

Fig. 7I



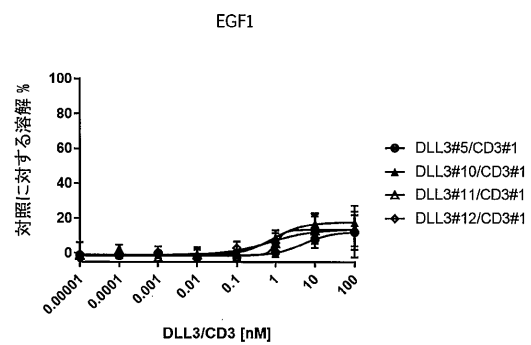
【 図 7 J 】

Fig. 7J



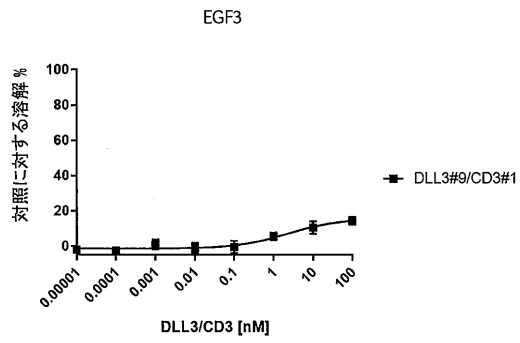
【 図 7 K 】

Fig. 7K



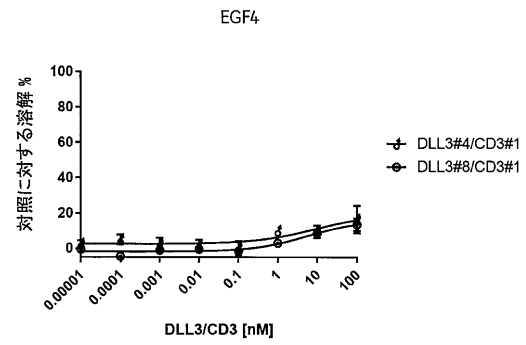
【図 7 L】

Fig. 7L



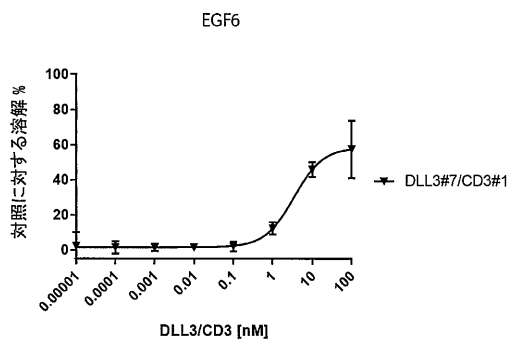
【図 7 M】

Fig. 7M



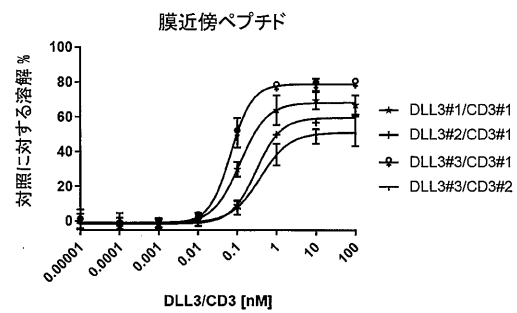
【図 7 N】

Fig. 7N



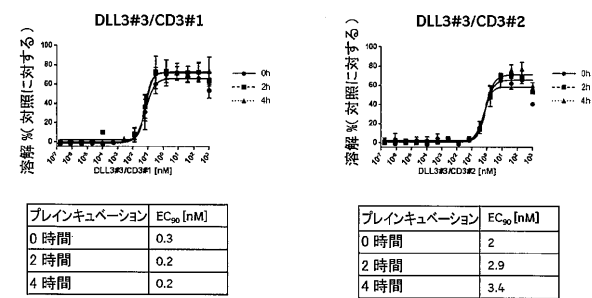
【図 7 O】

Fig. 7O



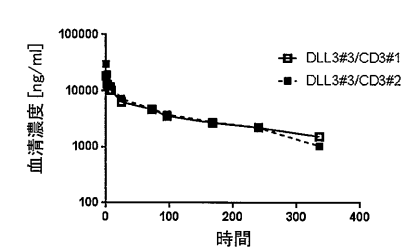
【 図 8 】

Fig. 8



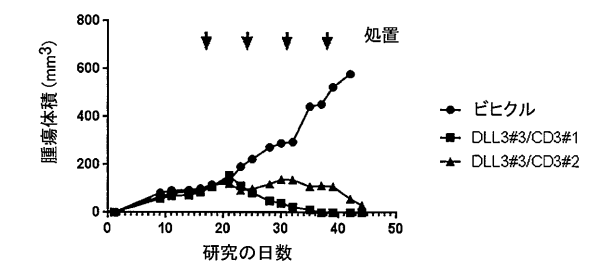
【 図 9 】

Fig. 9



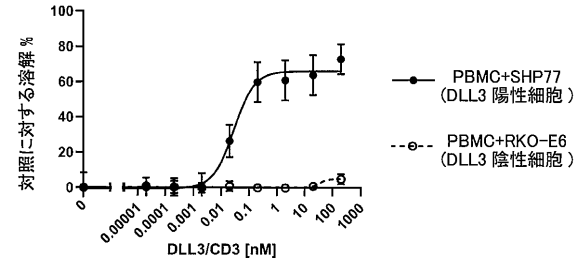
【 図 1 0 】

Fig. 10



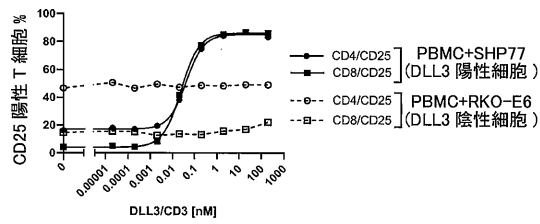
【 図 1 1 】

Fig. 11



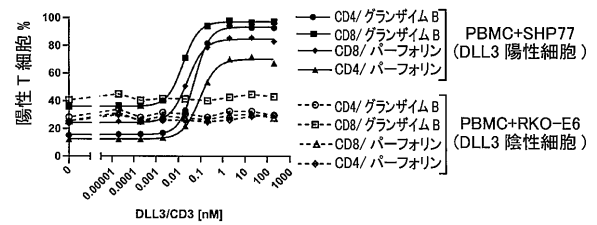
【 図 1 2 】

Fig. 12



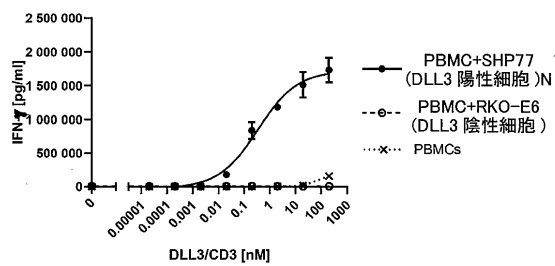
【 図 1 3 】

Fig. 13



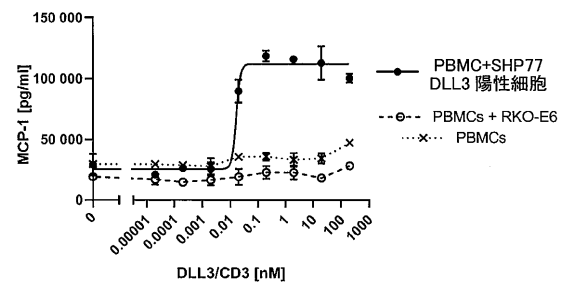
【 図 1 4 A 】

Fig. 14A



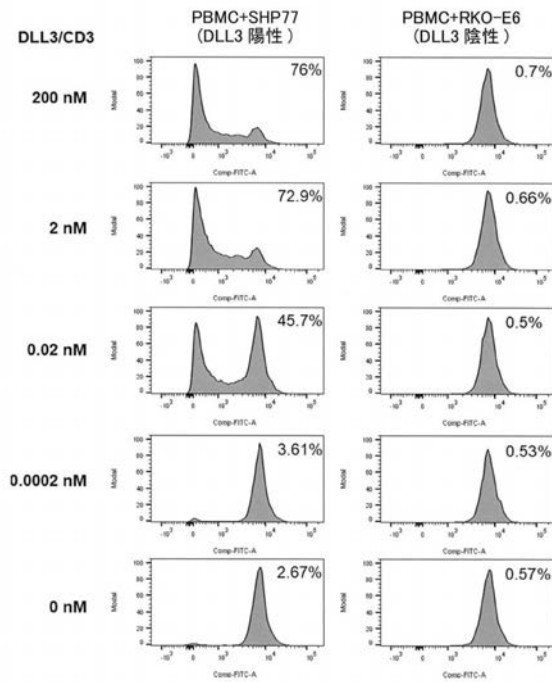
【 図 1 4 B 】

Fig. 14B



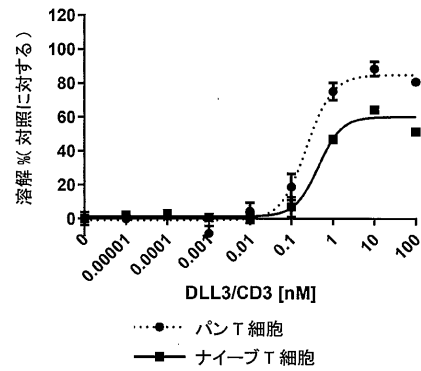
【図 15】

Fig. 15



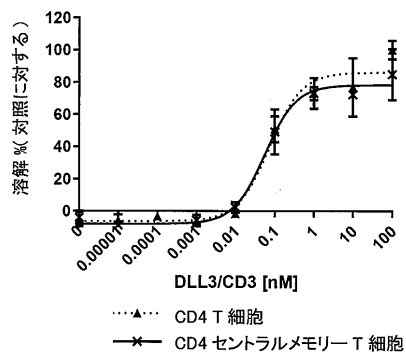
【図 16】

Fig. 16



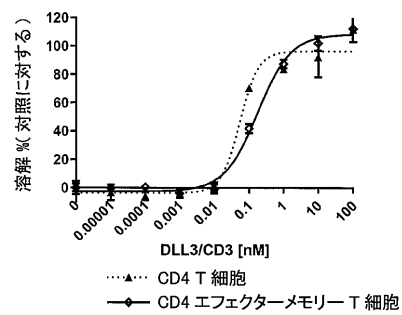
【図 17】

Fig. 17



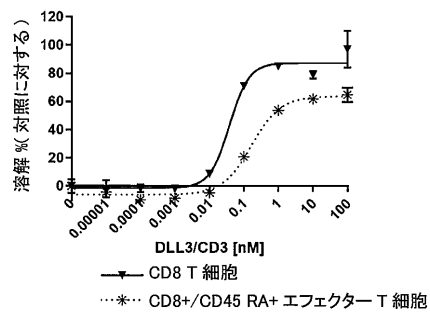
【図 18】

Fig. 18



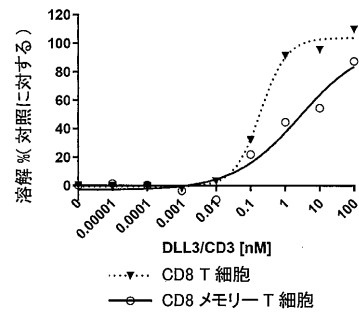
【 図 1 9 】

Fig. 19



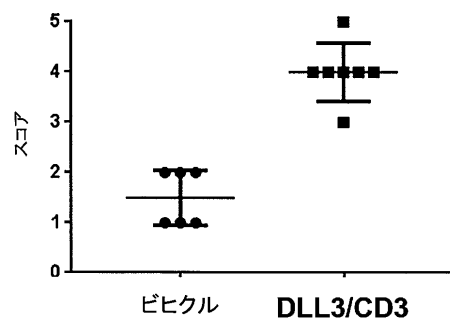
【 図 2 0 】

Fig. 20



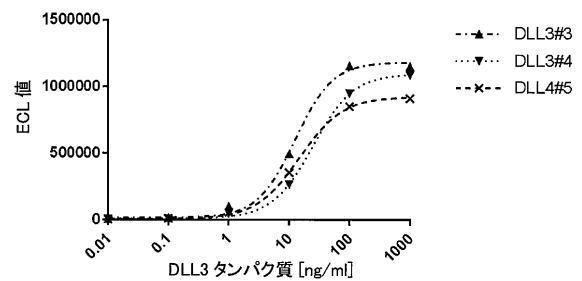
【 図 2 1 】

Fig. 21



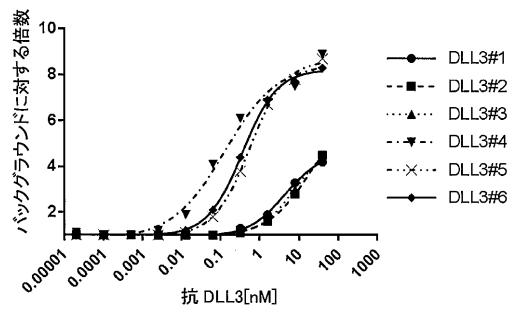
【 図 2 2 】

Fig. 22



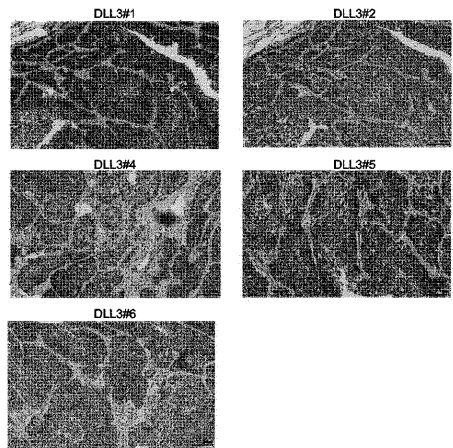
【 図 2 3 】

Fig. 23



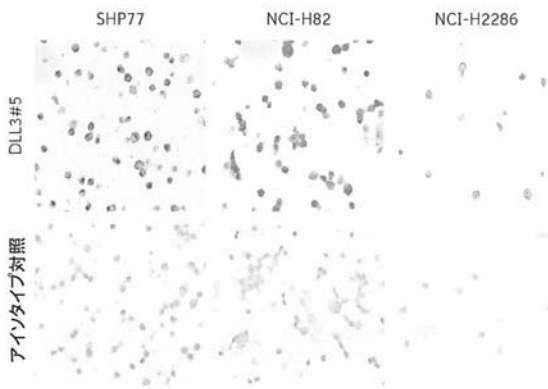
【 図 2 4 】

Fig. 24



【 図 2 5 】

Fig. 25



【配列表】

2021526816000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/064942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28
ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/021349 A1 (AMGEN RES GMBH [DE]) 9 February 2017 (2017-02-09) cited in the application See claims, examples -----	1-47
A	WO 2013/126746 A2 (STEM CENTRX INC [US]) 29 August 2013 (2013-08-29) cited in the application See page 34, lines 28-43, figure 2, claims 1-28 -----	1-47
A	WO 2014/125273 A1 (OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD [GB]) 21 August 2014 (2014-08-21) cited in the application See claims -----	1-47

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2019

Date of mailing of the international search report

06/08/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, Stéphane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/064942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017021349 A1	09-02-2017	AU 2016302569 A1	07-12-2017
		BR 112018000475 A2	18-09-2018
		CA 2986848 A1	09-02-2017
		CL 2018000267 A1	05-10-2018
		CN 108271376 A	10-07-2018
		CO 2018000877 A2	19-04-2018
		CR 20180066 A	29-05-2018
		EA 201890336 A1	29-06-2018
		EP 3328889 A1	06-06-2018
		JP 2018527908 A	27-09-2018
		KR 20180033501 A	03-04-2018
		PE 11522018 A1	17-07-2018
		PH 12018500241 A1	13-08-2018
		TW 201708261 A	01-03-2017
		US 2017037130 A1	09-02-2017
		WO 2017021349 A1	09-02-2017
WO 2013126746 A2	29-08-2013	AU 2013203459 B2	03-11-2016
		AU 2016244333 A1	03-11-2016
		AU 2018282328 A1	17-01-2019
		BR 112014020826 A2	04-07-2017
		CA 2865404 A1	29-08-2013
		CL 2014002240 A1	15-05-2015
		CL 2016001616 A1	03-02-2017
		CN 104520324 A	15-04-2015
		CO 7111274 A2	10-11-2014
		CY 1119590 T1	07-03-2018
		DK 2817338 T3	23-10-2017
		EP 2817338 A2	31-12-2014
		EP 3093293 A1	16-11-2016
		EP 3093294 A1	16-11-2016
		EP 3095797 A1	23-11-2016
		ES 2645272 T3	04-12-2017
		HK 1200174 A1	31-07-2015
		HK 1231485 A1	22-12-2017
		HK 1231486 A1	22-12-2017
		HK 1231488 A1	22-12-2017
		HR P20171549 T1	17-11-2017
		HU E037021 T2	28-08-2018
		IL 234155 A	31-10-2018
		JP 6010241 B2	19-10-2016
		JP 6089047 B2	01-03-2017
		JP 2015509947 A	02-04-2015
		JP 2016098232 A	30-05-2016
		JP 2016098233 A	30-05-2016
		JP 2018162257 A	18-10-2018
		KR 20150003169 A	08-01-2015
		LT 2817338 T	10-11-2017
		ME 02928 B	20-04-2018
		NZ 628804 A	25-08-2017
		PE 00902015 A1	16-02-2015
		PE 20190658 A1	08-05-2019
		PH 12014501876 A1	17-11-2014
		PL 2817338 T3	29-12-2017
		PT 2817338 T	13-11-2017
		RU 2014138474 A	10-04-2016
		SG 10201806867V A	27-09-2018
		SG 11201405131X A	30-10-2014

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/064942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		SI 2817338 T1	30-11-2017	
		US 9133271 B1	15-09-2015	
		US 9173959 B1	03-11-2015	
		US 9334318 B1	10-05-2016	
		US 9345784 B1	24-05-2016	
		US 9352051 B1	31-05-2016	
		US 9764042 B1	19-09-2017	
		US 2014363455 A1	11-12-2014	
		US 2014363826 A1	11-12-2014	
		US 2014363887 A1	11-12-2014	
		US 2014364590 A1	11-12-2014	
		US 2014364593 A1	11-12-2014	
		US 2014370037 A1	18-12-2014	
		US 2015265724 A1	24-09-2015	
		US 2016075779 A1	17-03-2016	
		US 2016136296 A1	19-05-2016	
		US 2016228571 A1	11-08-2016	
		US 2016250348 A1	01-09-2016	
		US 2016251431 A1	01-09-2016	
		US 2017000901 A1	05-01-2017	
		US 2017266312 A1	21-09-2017	
		US 2017266313 A1	21-09-2017	
		US 2017266315 A1	21-09-2017	
		US 2017274094 A1	28-09-2017	
		US 2017307622 A1	26-10-2017	
		US 2017368195 A1	28-12-2017	
		US 2018015178 A1	18-01-2018	
		US 2018036421 A1	08-02-2018	
		US 2018036422 A1	08-02-2018	
		US 2019046656 A1	14-02-2019	
		WO 2013126746 A2	29-08-2013	

WO 2014125273	A1	21-08-2014	AU 2014217611 A1	06-08-2015
			CA 2900134 A1	21-08-2014
			CL 2015002223 A1	29-04-2016
			CN 105143266 A	09-12-2015
			EA 201500835 A1	29-02-2016
			EP 2956483 A1	23-12-2015
			JP 2016513094 A	12-05-2016
			KR 20150119164 A	23-10-2015
			PH 12015501744 A1	07-12-2015
			US 2016032006 A1	04-02-2016
			US 2018201691 A1	19-07-2018
			WO 2014125273 A1	21-08-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	Y

(31)優先権主張番号 19159321.9

(32)優先日 平成31年2月26日(2019.2.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100215670

弁理士 山崎 直毅

(72)発明者 ヒップ スザンヌ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレン
クテル ハフツング コーポレート パテンツ内

(72)発明者 アダム ポール

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシュレン
クテル ハフツング コーポレート パテンツ内

(72)発明者 ジェゲレフスキ マイケル

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー

- ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 ガネサン ラージクマール
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 ゴーマン フィリップ ニコラス
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 グプタ ブリヤンカー
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 グプタ パンカジ
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 シェアー ジャスティン
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 ヴォイノフ ウラジミール エイチ
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
 ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
 ボレイション ヴイピー アイピー リーガル内

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44

4C084 AA19 NA05 ZA362 ZB072 ZB092 ZB262 ZC032 ZC412 ZC422

4C085 AA13 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01 EE03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA28 FA74