

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7682927号
(P7682927)

(45)発行日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(24)登録日 令和7年5月16日(2025.5.16)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
A 6 1 K 35/17 (2025.01)	A 6 1 K 35/17	
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	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
請求項の数 18 (全31頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-567414(P2022-567414)	(73)特許権者	510019129 イムノコア リミテッド イギリス、アビンドン オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ、ミルトン パーク、パーク ドライブ 92 92 Park Drive Milton Park, Abingdon Oxfordshire OX14 4RY, United Kingdom
(86)(22)出願日	令和3年5月4日(2021.5.4)	(74)代理人	110000796 弁理士法人三枝国際特許事務所
(65)公表番号	特表2023-524788(P2023-524788 A)	(72)発明者	チツラクリ, チャンドラムーリ イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン 最終頁に続く
(43)公表日	令和5年6月13日(2023.6.13)		
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/061731		
(87)国際公開番号	WO2021/224261		
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		
審査請求日	令和6年1月22日(2024.1.22)		
(31)優先権主張番号	2006629.6		
(32)優先日	令和2年5月5日(2020.5.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		

(54)【発明の名称】 特異的結合性分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

VVVGADGVGK(配列番号1) - HLA-A*11複合体に対する特異的結合特性を有し、各々がFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4(FRはフレームワーク領域であり、CDRは相補性決定領域である)を含むTCR 鎖可変ドメイン及びTCR 鎖可変ドメインを含んでなる特異的結合性分子であって、

前記 鎖CDR中のCDR1がTRDTTY(配列番号32)であり、CDR2がRNSFDEQNE(配列番号33)であり、CDR3がCALSGPSGAGSYQLTF(配列番号34)であり、前記 鎖CDR中のCDR1がMNHEY(配列番号35)であり、CDR2がSVGEGT(配列番号36)であり、CDR3がCASSYGPGQHNSPLHF(配列番号37)である、

又は

前記 鎖中のCDR1がTRDTAYYであり、CDR2がQPWWGSSRGであり、CDR3がCAMSVPDMEGHYQFTFであり、前記 鎖中のCDR1がMNHEYであり、CDR2がSGWGKDであり、CDR3がCASKVGPQGHNSPLHFである、

又は

前記 鎖中のCDR1がTRDTAYYであり、CDR2がQPWWGSSRGであり、CDR3がCAMSVPDMEGHYQFFであり、前記 鎖中のCDR1がMNHEYであり、CDR2がSGWGKDであり、CDR3がCAMSVPDMEGHYQFTFである、

又は

前記 鎖中のCDR1がTRDTAYYであり、CDR2がQPWWGEQNEであり、CDR3はCAMSV

PSGDGSYQFTFであり、前記 鎖中のCDR1がMNHEYであり、CDR2がSGWGKDであり、
CDR3はCASSYGPGQHNSPLHFである、
特異的結合性分子。

【請求項 2】

鎖可変ドメインフレームワーク領域は、次の配列：

FR1 - 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 26、

FR2 - 配列番号 2 のアミノ酸 34 ~ 50、

FR3 - 配列番号 2 のアミノ酸 60 ~ 91、

FR4 - 配列番号 2 のアミノ酸 108 ~ 117、

又は、前記配列のそれぞれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、
少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、
少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含んでなり、及び/又は
鎖可変ドメインフレームワーク領域は、次の配列：

FR1 - 配列番号 3 のアミノ酸 1 ~ 26、

FR2 - 配列番号 3 のアミノ酸 32 ~ 48、

FR3 - 配列番号 3 のアミノ酸 55 ~ 90、

FR4 - 配列番号 3 のアミノ酸 106 ~ 115、

又は前記配列に対して少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98又は99%の
同一性を有するそれぞれの配列を含んでなる、請求項 1 に記載の特異的結合性分子。

【請求項 3】

前記 鎖可変ドメイン及び前記 鎖可変ドメインが、以下：

【表 1】

α鎖可変ドメイン	β鎖可変ドメイン
配列番号4	配列番号7
配列番号5	配列番号8
配列番号6	配列番号8

のアミノ酸配列の組合せから選択される、請求項 1 又は 2 に記載の特異的結合性分子。

【請求項 4】

- ヘテロダイマーであり、鎖TRAC定常ドメイン配列と鎖TRBC1又はTRBC2定常
ドメイン配列とを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 5】

(a) 非天然型共有結合性ジスルフィド結合が、前記 鎖の定常ドメインの残基を前記
鎖の定常ドメインの残基と連結している；

(b) V -L-V、V -L-V、V -C -L-V、V -L-V -C 型(式中、V 及びV は
それぞれTCR 及び の可変領域であり、C 及びC はそれぞれTCR 及び の定常領
域であり、Lはリンカー配列である)の単鎖形式である；又は

(c) 前記 鎖可変ドメインと抗体の可変ドメインの第 1 の結合性領域とを含む第 1 の
ポリペプチド鎖；及び

前記 鎖可変ドメインと前記抗体の可変ドメインの第 2 の結合性領域とを含む第 2 のポ
リペプチド鎖を含み、

ここで、前記それぞれのポリペプチド鎖は、当該特異的結合性分子がVVVGADGVGK(配
列番号 1) - HLA-A*11複合体と前記抗体の抗原とに同時に結合することができるように会
合している、

請求項 4 に記載の特異的結合性分子。

【請求項 6】

検出可能な標識及び/又は治療剤及び/又はPK改変成分に結合した請求項 1 ~ 5 のいずれか
1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 7】

抗CD3抗体が、前記TCRの 鎖又は 鎖のC末端又はN末端に、任意にリンカー配列を介
して、共有結合している、請求項 6 に記載の特異的結合性分子。

【請求項 8】

配列番号 9 若しくは 12 若しくは 15 に記載の 鎖アミノ酸配列、又は配列番号 9 若しくは 12 若しくは 15 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性、例えば、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 若しくは 100% の同一性を有する 鎖アミノ酸配列と、

配列番号 10 若しくは 11 若しくは 13 若しくは 14 若しくは 16 若しくは 17 に記載の 鎖アミノ酸配列、又は配列番号 10 若しくは 11 若しくは 13 若しくは 14 若しくは 16 若しくは 17 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性、例えば、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 若しくは 100% の同一性を有する 鎖アミノ酸配列と

を含む、請求項 7 に記載の VVVGADGVGK(配列番号 1) - HLA-A*11 複合体に対する特異的結合特性を有する特異的結合性分子-抗CD3抗体融合分子。

【請求項 9】

(a) 配列番号 9 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 10 の 鎖アミノ酸配列；

(b) 配列番号 9 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 11 の 鎖アミノ酸配列；

(c) 配列番号 12 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 13 の 鎖アミノ酸配列；

(d) 配列番号 12 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 14 の 鎖アミノ酸配列；

(e) 配列番号 15 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 16 の 鎖アミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 15 の 鎖アミノ酸配列及び配列番号 17 の 鎖アミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の特異的結合性分子 - 抗CD3抗体融合分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の TCR 鎖及び/又は TCR 鎖をコードする核酸。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 12】

下記：

(a) 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に規定された TCR 及び 可変鎖を単一のオープンリーディングフレーム又は異なる 2 つのオープンリーディングフレームにコードする請求項 11 に記載の発現ベクター；又は

(b) 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に規定された TCR の 可変鎖をコードする核酸を含む第 1 の発現ベクター、及び、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に規定された TCR の 可変鎖をコードする核酸を含む第 2 の発現ベクター。

を有する細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子を提示する、精製された及び/又は操作された細胞。

【請求項 14】

T細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子、請求項 8 又は 9 に記載の特異的結合性分子 - 抗CD3抗体融合分子、請求項 10 に記載の核酸、請求項 11 に記載の発現ベクター及び/又は請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の細胞を、1 又は 2 以上の薬学的に許容され得る担体又は賦形剤と共に含む医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子、請求項 8 又は 9 に記載の特異的結合性分子 - 抗CD3抗体融合分子、請求項 10 に記載の核酸、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の細胞からなる群より選択される少なくとも一種を含む医薬。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

癌を処置する方法に用いるための、請求項 1.5 に記載の医薬組成物又は請求項 1.6 に記載の医薬。

【請求項 1.8】

a) 請求項 1.2 ~ 1.4 のいずれか一項に記載の細胞を、特異的結合性分子鎖の発現に最適な条件下に維持すること、及び

b) 特異的結合性分子鎖を単離することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子又は請求項 8 又は 9 に記載の特異的結合性分子 - 抗CD3抗体融合分子を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、変異体KRASに由来するHLA制限ペプチドVVVGADGVGK(配列番号1)に結合する特異的結合性分子に関する。前記特異的結合性分子は、フレームワーク配列内に埋め込まれたCDR配列を含み得る。CDR及びフレームワーク配列は、T細胞受容体(TCR)可変ドメインに対応していてもよく、天然型TCR可変ドメインと比較して非天然変異をさらに含んでいてもよい。本発明の特異的結合性分子は、癌の処置用の新規免疫療法剤としての使用に特に適する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

20

カーステン・ラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; KRAS)は、成長因子受容体の下流の細胞シグナル伝達、生存及び増殖を駆動する、普遍的に発現する低分子量GTPアーゼである(Uniprot no: P01116)。KRASにおける発癌性体細胞性機能獲得変異は文献に十分に記載されており、例えば膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌、子宮内膜癌、卵巣癌及び前立腺癌を含む全てのヒト癌の約20%に存在すると報告されている(Coxら, Nat Rev Drug Discov. 2014 Nov; 13(11):828-51)。単一アミノ酸置換が、変異KRASを生じる原因となることがある。特に、KRASのG12位での変異は、全ての変異の83%を占めると報告されている(Hobbsら, Cancer Cell. 2016 Mar 14; 29(3):251-253)。G12D変異及びG12V変異は共に、膵臓及び結腸癌に共通する。G12変異KRASを標的とした幾つかの低分子薬が開発されているが、現時点では治療用途につ

30

いて承認されたものはない。そのため、変異KRASを標的とする、より効果的な薬剤の必要性及び低分子薬剤の代替品の必要性が存在する。

【0003】

T細胞受容体(TCR)は、主要組織適合性複合体(MHC)分子(ヒトでは、MHC分子はヒト白血球抗原又はHLAとしても知られる)と複合体化して抗原提示細胞の表面にディスプレイされる短いペプチド抗原を認識する(Davisら, Annu Rev Immunol. 1998; 16: 523-44)。HLA-A*11制限ペプチドVVVGADGVGK(配列番号1)(G12D変異KRASに由来するペプチド)を標的とするTCRは、当技術分野で公知である(Wangら, Cancer Immunol Res. 2016 Mar; 4(3):204-214)。VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体を標的とするTCRベースの治療剤の開発は難題である。なぜならば、当該TCRは、変異(腫瘍)ペプチドと、1アミノ酸だけ異なる非変異野生型ペプチドとを適切に識別することができなければならないからである。野生型ペプチドの交差認識は、正常な健常組織の望ましくない標的化をもたらし得る。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の説明

第1の観点において、本発明は、HLA-A11と複合体化したVVVGADGVGK(配列番号1)への結合性を有し、各々がFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4(FRはフレームワーク領域であり、CDRは相補性決定領域である)を含むTCR 鎖可変ドメイン及び/又はTCR

50

鎖可変ドメインを含んでなる特異結合性分子を提供する。ここで、

(a) 鎖CDRは、次の配列：

CDR1 - 1又は2以上の変異を有していてもよいTRDTTY(配列番号32)、

CDR2 - 1又は2以上の変異を有していてもよいRNSFDEQNE(配列番号33)、

CDR3 - 1又は2以上の変異を有していてもよいCALSGPSGAGSYQLTF(配列番号34)、
を有し、及び/又は

(b) 鎖CDRは、次の配列：

CDR1 - 1又は2以上の変異を有していてもよいMNHEY(配列番号35)、

CDR2 - 1又は2以上の変異を有していてもよいSVGEGT(配列番号36)、

CDR3 - 1又は2以上の変異を有していてもよいCASSYGPQGHNSPLHF(配列番号37)、
を有する。 10

【0005】

第1の観点の特異的結合性分子において、鎖可変ドメインフレームワーク領域は、次のフレームワーク配列：

FR1 - 配列番号2のアミノ酸1～26、

FR2 - 配列番号2のアミノ酸34～50、

FR3 - 配列番号2のアミノ酸60～91、

FR4 - 配列番号2のアミノ酸108～117、

又は、前記配列のそれぞれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、
少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、
少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含んでなり得、及び/
又は 20

鎖可変ドメインフレームワーク領域は、次の配列：

FR1 - 配列番号3のアミノ酸1～26、

FR2 - 配列番号3のアミノ酸32～48、

FR3 - 配列番号3のアミノ酸55～90、

FR4 - 配列番号3のアミノ酸106～115、

又は、前記配列のそれぞれに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、
少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、
少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有する配列を含んでなり得る。 30

【0006】

本発明は、HLA-A11制限ペプチドVVVGADGVGK(配列番号1)に結合する、TCR CDR及びフレームワーク領域を含む特異的結合性分子を提供する。前記特異的結合性分子は、癌の治療に特に望ましい治療特性を有する。

特異的結合性分子又はその結合性フラグメントは、TCR可変ドメインを含み、このTCR可変ドメインは天然型TCRのものに対応してもよいし、より好ましくは、TCR可変ドメインは、操作されているものであり得る。天然型TCR可変ドメインは、野生型の、天然の、親の、非変異の又は足場ドメインとも呼ばれ得る。特異的結合性分子又は結合性フラグメントは、理想的な治療剤特性(例えば、標的に関する超生理的親和性、長い結合半減期、標的に対する高特異性及び良好な安定性)を有する分子を製造するために用いることができる。本発明はまた、特異的結合性分子又はその結合性フラグメント及びT細胞再指向化部位が組み込まれた二重特異性又は二機能性又は融合分子を包含する。このような分子は、ポリクローナルT細胞応答を再指向化し活性化することにより、癌細胞に対する強力の特異的な応答を媒介することができる。さらに、超生理的親和性を有する特異的結合性分子の使用は、低レベルのペプチド-HLAを提示する癌細胞の認識及びクリアランスを容易にする。或いは、特異的結合性分子又は結合性フラグメントは、他の治療薬及び/若しくは診断薬と融合させてもよく、並びに/又は養子療法用の遺伝子操作T細胞に組み込まれてもよい。

【0007】

TCRドメイン配列は、TCR分野の当業者に広く知られアクセス可能であるIMGT命名法

10

20

30

40

50

を参照して規定され得る。例えば、LeFranc and LeFranc(2001), 「T cell Receptor Factsbook」, Academic Press; Lefranc(2011), Cold Spring Harb Protoc 2011 (6): 595-603; Lefranc(2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 100; 及びLefranc(2003), Leukemia 17(1): 260-266を参照。簡潔には、TCRは2つのジスルフィド連結鎖からなる。各鎖(及び)は、一般に、2つのドメイン、すなわち可変ドメイン及び定常ドメインを有すると考えられる。短い連結領域が可変ドメインと定常ドメインとを連結し、これは、代表的には、可変領域の一部とみなされる。加えて、鎖は、通常、連結領域の次の短い多様性領域を含有する。この領域も、代表的には、可変領域の一部とみなされる。各鎖の可変ドメインはN末端側に位置し、フレームワーク配列(FR)に埋め込まれた3つの相補性決定領域(CDR)を含んでなる。CDRはペプチド-MHCへの結合のための認識部位を含む。鎖可変(V)領域をコードする幾つかの遺伝子及び鎖可変(V)領域をコードする幾つかの遺伝子が存在し、これらは、フレームワーク配列、CDR1配列及びCDR2配列並びに部分的に規定されるCDR3配列により区別される。V 及びV 遺伝子は、IMGT命名法では、それぞれ接頭語「TRAV」及び「TRBV」を用いて称呼される(Folch and Lefranc(2000)、Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner and Lefranc(2000)、Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc and LeFranc(2001), 「T cell Receptor Factsbook」, Academic Press)。同様に、鎖及び鎖について、それぞれ「TRAJ」又は「TRBJ」と呼ばれる幾つかの連結又はJ遺伝子が存在し、鎖については「TRBD」と呼ばれる多様性又はD遺伝子が存在する(Folch and Lefranc(2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 107-114; Scaviner and Lefranc(2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 97-106; LeFranc and LeFranc(2001), 「T cell Receptor Factsbook」, Academic Press)。T細胞レセプター鎖の非常に大きな多様性は、種々のV、J及びD遺伝子(対立遺伝子バリエーションを含む)の間での再配置の組合せ、更には連結多様性に起因する(Arstilaら(1999), Science 286(5441): 958-961; Robinsら(2009), Blood 114(19): 4099-4107)。TCR 及び鎖の定常又はC領域は、それぞれ「TRAC」及び「TRBC」と呼ばれる(LeFranc(2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10)。

【0008】

本明細書に用いる場合、用語「特異的結合性分子」とは、標的抗原に結合することができる分子をいう。このような分子は、本明細書に記載する幾つかの異なる形式を採用し得る。さらに、本発明の特異的結合性分子のフラグメントもまた想定される。フラグメントとは、標的抗原への結合を保持する、特異的結合性分子の部分を用いる。

用語「変異」は置換、挿入及び欠失を包含する。天然型特異的結合性分子(親の、天然の、非変異の、野生型又は足場の特異的結合性分子とも呼ばれる)に対する変異は、有益な治療剤特性(例えば高親和性、高特異性及び高効力)を付与し得る; 例えば、変異は、VVVGA DGVGK - HLA-A*11複合体への当該特異的結合性分子の結合親和性(k_D)及び/又は結合半減期($t_{1/2}$)を増加させるものを含んでもよい。

【0009】

鎖フレームワーク領域FR1、FR2及びFR3は、TRAV19*01鎖に対応するアミノ酸配列を含み得、及び/又は鎖フレームワーク領域FR1、FR2及びFR3は、TRBV6-2/3*01鎖のものに対応するアミノ酸配列を含み得る。

FR4領域は、可変鎖及び可変鎖の接合領域(それぞれ、TRAJとTRBJ)を含んでいてもよい。TRAJ領域は、TRAJ28*01のものに対応するアミノ酸配列を含んでいてもよい。TRBJ領域は、TRBJ1-6*02のものに対応するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0010】

TCR 鎖可変領域には、少なくとも1つの変異が存在していてもよい。鎖のCDRには(すなわち、3つ全てのCDRの合計で)、1又は2又は3又は4又は5又は6又は7又は8又は9又は10又は11又は12又は13又は14又は15又は16又は17又は18以上の変異が存在していてもよい。例えば、鎖のCDRには、17の変異が存在していてもよいし、10の変異が存在していてもよい。前記変異の1又は2以上は、配列番号2の番号付けを参照して、以下の変異

から選択されてもよい：

T31A、R51Q、N52P、S53W、F54W、D55G、E56S、Q57S、N58R、E59G、L94M、G96V、S98D、G99S又はG99M、A100R又はA100E又はA100D、S102H、L105F。
よって、上記の変異のいずれか又は全てが、任意に他の変異との組合せで存在し得る。

【0011】

変異 鎖CDRは、(配列番号2の番号付けを参照して)次の変異群の1つを含み得る：

群1：T31A、R51Q、N52P、S53W、F54W、D55G、E56S、Q57S、N58R、E59G、L94M、G96V、S98D、G99S、A100R、S102H、L105F

群2：T31A、R51Q、N52P、S53W、F54W、D55G、E56S、Q57S、N58R、E59G、L94M、G96V、S98D、G99M、A100E、S102H、L105F

群3：T31A、R51Q、N52P、S53W、F54W、D55G、L94M、G96V、A100D、L105F

10

【0012】

鎖CDR1は、次の配列を含み得る：

TRDTTTY(配列番号32)、

TRDTAYY(配列番号38)。

鎖CDR2は、次の配列を含み得る：

RNSFDEQNE(配列番号33)、

QPWWGSSRG(配列番号39)、

QPWWGEQNE(配列番号40)。

20

鎖CDR3は、次の配列を含み得る：

CALSGPSGAGSYQLTF(配列番号34)、

CAMSVPDSRGHYQFTF(配列番号41)、

CAMSVPDMEGHYQFTF(配列番号42)、

CAMSVPSGDGSYQFTF(配列番号43)。

【0013】

例えば、変異 鎖において、CDR1はTRDTAYYであり、CDR2はQPWWGSSRGであり、CDR3はCAMSVPDSRGHYQFTFである。或いは、CDR1はTRDTAYYであり、CDR2はQPWWGSSRGであり、CDR3はCAMSVPDMEGHYQFTFである。或いは、CDR1はTRDTAYYであり、CDR2はQPWWGEQNEであり、CDR3はCAMSVPSGDGSYQFTFである。

30

変異 鎖は任意の 鎖と対合していてもよい。

【0014】

TCR 鎖可変領域には、少なくとも1つの変異が存在していてもよい。鎖のCDRには(すなわち、3つ全てのCDRの合計で)、1又は2又は3又は4又は5又は6又は7又は8以上の変異が存在してもよい。例えば、鎖のCDRには、5の変異が存在してもよいし、7の変異が存在してもよい。前記変異の1又は2以上は、配列番号3の番号付けを参照して以下の変異から選択されてもよい：

V50G、G51W、E52G、G53K、T54D、S94K、Y95V。

よって、上記の変異のいずれか又は全てが、任意に他の変異との組合せで存在し得る。

【0015】

鎖CDRは、(配列番号3の番号付けを参照して)次の変異群の1つを含み得る：

群1：V50G、G51W、E52G、G53K、T54D、S94K、Y95V

群2：V50G、G51W、E52G、G53K、T54D。

40

【0016】

鎖CDR1は、次の配列を含み得る：

MNHEY(配列番号35)。

鎖CDR2は、次の配列を含み得る：

SVGEGT(配列番号36)、

SGWGKD(配列番号44)。

鎖CDR3は、次の配列を含み得る：

50

CASSYGPQGHNSPLHF(配列番号37)、
CASKVGPQGHNSPLHF(配列番号45)。

【0017】

例えば、変異鎖において、CDR1はMNHEYであり、CDR2はSGWGKDであり、CDR3はCASKVGPQGHNSPLHFである。或いは、CDR1はMNHEYであり、CDR2はSGWGKDであり、CDR3はCASSYGPQGHNSPLHFである。

変異鎖は、任意の鎖と対合していてもよい。

【0018】

鎖及び鎖の好ましい対合は、以下のCDR配列を含む：

鎖のCDR1はTRDTAYYであり、CDR2はQPWWGSSRGであり、CDR3はCAMSV PDS
RGHYQFTEであり、鎖のCDR1はMNHEYであり、CDR2がSGWGKDであり、CDR3がC
ASKVGPQGHNSPLHFである；

鎖ではCDR1がTRDTAYYであり、CDR2がQPWWGSSRGであり、CDR3がCAMSV P
DMEGHYQFTE、鎖ではCDR1がMNHEYであり、CDR2はSGWGKDであり、CDR3はC
ASSYGPQGHNSPLHFである；

鎖のCDR1はTRDTAYYであり、CDR2はQPWWGEQNEであり、CDR3はCAMSV P S G
DGSYQFTEであり、鎖のCDR1はMNHEYであり、CDR2はSGWGKDであり、CDR3はC
ASSYGPQGHNSPLHFである。

【0019】

CDR内の変異は、好ましくは、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体への特異的結合性分子の結合親和性又は特異性を改善するが、追加的又は代替的に、他の利点、例えば単離された形態での向上した安定性又は免疫エフェクターに融合されたときの向上した効力を付与し得る。1又は2以上の位置での変異は、追加的に又は代替的に、例えば相互作用のためのより好ましい角度を提供することにより、隣接する位置の同族pMHC複合体との相互作用に影響を及ぼし得る。変異は、非特異的結合の低減、すなわちVVVGADGVGK - HLA-A*11と比較して代替抗原に対する結合の低減をもたらすものを含んでいてもよい。変異は、フォールディングの効率及び/又は安定性及び/又は製造性を増大させるものを含んでいてもよい。これら特性の各々に寄与し得る変異もあれば、例えば、親和性に寄与し得るが特異性には寄与し得ない変異や、特異性に寄与し得るが親和性には寄与し得ない変異などもあり得る。

【0020】

代表的には、合計で少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15又はそれ以上のCDR変異が、標的抗原に関してpM親和性を有する特異的結合性分子を得るために必要とされる。合計で少なくとも5、少なくとも10又は少なくとも15のCDR変異が、標的抗原に関してpM親和性を有する特異的結合性分子を得るために必要とされ得る。標的抗原に関してpM親和性を有する特異的結合性分子は、可溶性治療剤に特に適切である。養子療法適用に用いる特異的結合性分子は、標的抗原に関してより低い親和性を有していてもよく、よってより少ないCDR変異、例えば合計で1まで、2まで、5まで又はそれ以上のCDR変異を有していてもよい。幾つかの場合において、pM親和性を有する特異的結合性分子を利用して、1又は2以上のCDR変異を元の天然型残基に戻すことにより、より低い親和性分子を作り出すことが可能であり得る。幾つかの場合において、天然型特異的結合性分子(非変異の特異的結合性分子ともいう)は、変異の必要なく、標的抗原に関して十分に高い親和性を有し得る。本発明の特異的結合性分子は、その天然型形態で、有利な治療特性(高特異性を含む)を有することが指摘されている。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、WTペプチドと変異Krasペプチドとを識別する本発明の分子の能力が、少なくとも一部は、HLAに結合したときに変異ペプチドが採用する異なるコンフォメーションに起因すると考えている。

【0021】

変異は、追加的に又は代替的に、CDRの外側に、フレームワーク領域内でなされ得る；このような変異は、特異的結合性分子の治療特性の改善、例えば結合及び/又は特異性及び

10

20

30

40

50

/又は安定性及び/又は精製可溶形態の収率の向上をもたらす得る。例えば、本発明の特異的結合性分子は、追加的又は代替的に、N末端メチオニン切断の効率を改善するために、一方又は両方の鎖のFR1のN末端に1又は2以上の変異を含んでいてもよい。N末端の開始メチオニンの除去は、タンパク質の機能及び安定性に重要である場合が多い。不十分な切断は治療剤に関しては有害であり得る。なぜならば、そのことは不均一なタンパク質産物をもたらす得、及び/又は開始メチオニンの存在はヒトにおいて免疫原性であり得るからである。幾つかの場合において、開始メチオニンは、本発明の特異的結合性分子に存在していてもよい。

【0022】

好ましくは、本発明の特異的結合性分子の鎖可変ドメインは、配列番号2のフレームワークアミノ酸残基1~26、34~50、60~91、108~117に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有するそれぞれのフレームワークアミノ酸配列を含んでなり得る。本発明の特異的結合性分子の鎖可変ドメインは、配列番号3のフレームワークアミノ酸残基1~26、32~48、55~90、106~115に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の同一性を有するそれぞれのフレームワークアミノ酸配列を含んでなり得る。或いは、言及したパーセンテージ同一性は、全体として考慮する場合、フレームワーク配列全体にわたってでもよい。

【0023】

鎖可変ドメインは、配列番号4~6のアミノ酸配列(図2に示す配列)の任意の1つを含んでなり得、鎖可変ドメインは、配列番号7~8のアミノ酸配列(図3に示す配列)の任意の1つを含んでなり得る。

【表1】

α 鎖可変ドメイン	β 鎖可変ドメイン
配列番号4	配列番号7
配列番号5	配列番号8
配列番号6	配列番号8

例えば、特異的結合性分子は、次の鎖及び鎖可変ドメインの対：を含んでなり得る。

好ましいTCR鎖対は、配列番号4及び配列番号7である。

【0024】

本明細書に開示するいずれの本発明の特異的結合性分子の表現型上サイレントなバリエーションも、本発明の範囲内である。本明細書で用いる場合、用語「表現型上サイレントなバリエーション」は、上記の変異に加えて、1又は2以上の更なるアミノ酸変化(置換、挿入及び欠失を含む)が組み込まれたTCR可変ドメインを有する特異的結合性分子をいうと理解される。ここで、前記特異的結合性分子は前記変化を有しない対応の特異的結合性分子に類似する表現型を有する。本願の目的のためには、特異的結合性分子の表現型は、結合親和性(K_D 及び/又は結合半減期)及び特異性を含む。好ましくは、免疫エフェクターと結合した可溶性特異的結合性分子の表現型は、結合親和性及び特異性に加えて、免疫活性化の効力及び精製収率を含む。表現型上サイレントなバリエーションは、同一条件下で(例えば25にて及び/又は同じSPRチップ上で)測定されたとき、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して、前記変化を有しない対応の特異的結合性分子で測定された K_D 及び/又は結合半減期の50%以内、より好ましくは30%以内、25%以内、20%以内の K_D 及び/又は結合半減期を有していてもよい。適切な条件は実施例1及び2で更に提供する。

【0025】

さらに、表現型上サイレントなバリエーションは、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に対する結合と、WT KRASペプチドに対する結合及び/又は1若しくは2以上の追加のオフターゲットペプチド - HLA複合体に対する結合との間に同じ又は実質的に同じ治療ウィンド

ウを保持し得る。表現型上サイレントなバリエーションは、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体を提示する細胞に反応しての免疫細胞活性化の効力と、WT KRASペプチド及び/又は1若しくは2以上の追加のオフターゲットペプチド - HLA複合体を提示する細胞に反応しての免疫細胞活性化の効力との間に同じ又は実質的に同じ治療ウィンドウを保持し得る。治療ウィンドウは、正常細胞及び腫瘍細胞株について観察される最低有効濃度(「LOEL」)に基づき算出し得る。治療ウィンドウは、少なくとも100倍の差、少なくとも1000倍の差又はそれ以上であり得る。表現型バリエーションは、下記で更に説明する逐次変異導入技術によって決定されるものと同じ又は実質的に同一の認識モチーフを共有し得る。

【0026】

当業者に公知であるように、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体との相互作用の親和性若しくは特異性及び/又は他の機能的特性を変更することなく、可変ドメインに、上記のものからの変化が組み込まれた特異的結合性分子を製造することは可能であり得る。具体的には、このようなサイレント変異は、抗原結合に直接関与しないことが知られている配列の部分(例えば、抗原と接触しないフレームワーク領域及び/又はCDRの部分)に組み込まれてもよい。このようなバリエーションも本発明の範囲に含まれる。

当業者に自明であるように、C末端及び/又はN末端に提供される配列は、特異的結合性分子の機能的特性に実質的に影響を及ぼすことなく、1、2、3、4、5又は6以上の残基を短縮化又は延長することができ得る。C末端及び/又はN末端に提供される配列は、1、2、3、4又は5残基が短縮又は延長されていてもよい。このような全てのバリエーションは本発明に包含される。

表現型上サイレントなバリエーションは、1若しくは2以上の保存的置換及び/又は1若しくは2以上の寛容される置換を含んでいてもよい。寛容される置換は、下記に示される保存的置換の定義に該当しないにもかかわらず、表現型上サイレントである置換を意味する。当業者は、種々のアミノ酸が類似する特性を有し、よって「保存的」であることを理解する。タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのそのような1又は2以上のアミノ酸は、該タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの所望の活性を消失させないで1又は2以上の他のそのようなアミノ酸で置換し得る場合が多い。

【0027】

よって、アミノ酸 グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)は、互いに置換され得る場合が多い。これら可能な置換のうち、(相対的に短い側鎖を有するので)グリシン及びアラニンを互いに置換するために用い、(疎水性である、より長い脂肪族側鎖を有するので)バリン、ロイシン及びイソロイシンを互いに置換するために用いることが好ましい。互いに置換され得る場合が多い他のアミノ酸として：フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸)；リジン、アルギニン及びヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸)；アスパラギン酸及びグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸)；アスパラギン及びグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸)；並びにシステイン及びメチオニン(イオウ含有側鎖を有するアミノ酸)が挙げられる。本発明の範囲内のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸を用いて行い得ることを理解すべきである。例えば、本明細書では、アラニンのメチル基はエチル基で置換されてもよく及び/又は軽微な変化がペプチド骨格になされてもよいことが企図されている。天然又は合成のアミノ酸が用いられているか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

【0028】

この性質の置換は、「保存的」又は「半保存的」アミノ酸置換と呼ばれる場合が多い。したがって、本発明は、上記アミノ酸配列のいずれかにおいて1若しくは2以上の保存的置換及び/又は1若しくは2以上の寛容される置換を有するアミノ酸配列を含んでなる特異的結合性分子であって、そのアミノ酸配列が、配列番号2、4～6のアミノ酸1～117及び/又は配列番号7～8のアミノ酸1～115を含む特異的結合性分子に対して少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくと

10

20

30

40

50

も98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有する特異的結合性分子の使用にまで拡張される。

【0029】

「同一性」は、当該分野において公知のように、配列比較により決定される、2若しくは3以上のポリペプチド配列間又は2若しくは3以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当該分野において、同一性はまた、妥当な場合、ポリペプチド配列間又はポリヌクレオチド配列間の、配列の並びの一致性によって決定される配列関連性の程度を意味する。2つのポリペプチド配列間又は2つのポリヌクレオチド配列間の同一性を測定する方法は幾つか存在するが、同一性の決定に一般に用いられる方法は、コンピュータプログラム化されている。

10

2つの配列間の同一性を決定する好ましいコンピュータプログラムとしては、GCGプログラムパッケージ(Devereuxら、Nucleic Acids Research、12、387(1984))、BLASTP、BLASTN及びFASTA(Atschulら、J. Molec.Biol. 215、403 (1990))、SIM - Alignment Tool for protein sequences (Xiaoquin Huang及びWebb Miller: "A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm "Advances in Applied Mathematics, vol.12 (1991), pp.337-357)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

CLUSTALプログラムのようなプログラムを用いてアミノ酸配列を比較することができる。このプログラムはアミノ酸配列を比較し、必要な場合にはいずれかの配列にスペースを挿入して最適な整列(アラインメント)を見出す。最適な整列についてアミノ酸の同一性又は類似性(同一性+アミノ酸タイプの保存)を算出することができる。BLASTxのようなプログラムは、類似する配列を最も長く整列させ、その適合度に対して値を割り当てる。よって、各々が異なるスコアを有する幾つかの類似領域を見出す比較を得ることができる。両タイプの同一性分析が本発明において企図されている。

20

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント同一性は、最適比較を目的として配列を整列させ(例えば、最良整列のために第1の配列にギャップを導入することができる)、対応する位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較することにより決定される。「最良整列」は、最も高いパーセント同一性をもたらす2つの配列の整列である。パーセント同一性は、比較する配列中の同一アミノ酸残基又はヌクレオチドの数により決定される(すなわち、%同一性 = 同一位置の数/位置の総数 × 100)。

30

【0031】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、当業者に公知の数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列を比較する数学的アルゴリズムの例は、Karlin及びAltschul(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載されるように改変されたKarlin及びAltschul(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムである。Altschulら(1990)、J. Mol. Biol. 215:403-410のBLASTn及びBLASTpプログラムには、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性の決定は、BLASTnプログラムを用いて行うことができる。2つのタンパク質配列間のパーセント同一性の決定は、BLASTpプログラムを用いて行うことができる。比較目的でギャップを有する整列を得るためには、Altschulら(1997)、Nucleic acid Res. 25:3389-3402に記載されるようにGapped BLASTを利用することができる。或いは、PSI-Blastを用いて、分子間の遠い関連性を検出する累次サーチを行うことができる(前出)。BLAST、Gapped BLAST及びPSI-Blastプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム(例えば、BLASTp及びBLASTn)のデフォルトパラメータを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照。デフォルトの一般的パラメータとしては、例えば、Word Size = 3、Expect Threshold = 10を挙げ得る。パラメータは短い入力配列について自動的に調節されるように選択され得る。配列比較に利用される数学的アルゴリズムの別の例は、Myers及びMiller、CABIOS(1989)のアルゴリズムである。CGC配列整列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)には、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。当該分野において公知の他の配列分析

40

50

アルゴリズムとしては、Torellis及びRobotti(1994), Comput. Appl. Biosci., 10: 3-5に記載されるADVANCE及びADAM; 並びにPearson及びLipman(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載されるFASTAが挙げられる。FASTAにおいて、ktupは、サーチの感度及び速度を設定するコントロールオプションである。本開示においてパーセント同一性を評価する目的には、デフォルトパラメータを用いるBLASTpを比較法として使用する。加えて、記載したパーセント同一性がアミノ酸について非整数値である場合、得られた値は小数点以下を切り捨てて整数とする(すなわち、25アミノ酸の配列が90%配列同一性を有すると「22.5」となるが、「22」とする)。したがって、提供する実施例では、25アミノ酸のうち22がマッチする配列は、90%以内の配列同一性である。

【0032】

任意の適切な方法を用いることを条件に、変異(保存的及び寛容される置換、挿入及び欠失を含む)を配列に導入してもよい。このような方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をベースにする方法、制限酵素ベースのクローニング又はライゲーション非依存性クローニング(LIC)手順が挙げられるが、これらに限定されない。これら方法は、多くの標準的な分子生物学の教科書に詳述されている。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及び制限酵素ベースのクローニングに関する更なる詳細については、Sambrook及びRussell(2001), Molecular Cloning - A Laboratory Manual(第3版) CSHL Pressを参照。ライゲーション非依存性クローニング(LIC)手順についての更なる情報は、Rashtchian(1995), Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6に見出すことができる。本発明により提供されるTCR配列は、固相合成又は当該分野において公知の任意の他の適切な方法から得てもよい。

【0033】

本発明の特異的結合性分子は、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に結合する性質を有する。本発明の特異的結合性分子は、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して高度の特異性が証明されており、よって治療用途に特に適切である。特異性は、本発明の特異的結合性分子に関して、抗原陽性である標的細胞を認識できる一方で、抗原陰性である標的細胞を認識する能力が極めて小さいことに関する。抗原陽性細胞は、変異体KRASを発現していると判定された細胞、又はVVVGADGVGK - HLA-A*11複合体を提示していると判定された細胞である。本発明の特異的結合性分子は、1又は2以上のHLA-A*11サブタイプに結合したときの標的ペプチドの複合体に結合してもよく、例えば、本発明の特異的結合性分子は、HLA-A*1101に結合したときの標的ペプチドの複合体に結合してもよく、及び/又は本発明の特異的結合性分子は、HLA-A*1102に結合したときの標的ペプチドの複合体に結合してもよい。

【0034】

特異性は、インビトロで、例えば細胞アッセイ(例えば実施例3及び4に記載されるもの)において測定することができる。特異性を試験するため、特異的結合特異性分子は可溶性態であって、免疫エフェクターと結合していてもよく、及び/又は細胞(例えばT細胞)の表面に発現されていてもよい。特異性は、上記の抗原陽性標的細胞及び抗原陰性標的細胞の存在下でT細胞活性化のレベルを測定することによって決定してもよい。抗原陰性標的細胞の極めて小さい認識は、同一条件下でかつ治療上妥当なTCR濃度にて測定したとき、抗原陽性標的細胞の存在下で生じるT細胞活性化レベルの20%未満、好ましくは10%未満、好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満のレベルとして規定される。免疫エフェクターと結合した可溶性TCRについて、治療上妥当な濃度は、 10^{-9} M以下の濃度及び/又は対応するEC50値又はIC50値より100倍まで、好ましくは1000倍まで大きい濃度と規定されてもよい。好ましくは、免疫エフェクターと結合した可溶性の特異的結合性分子について、抗原陽性細胞に対するT細胞活性化と抗原陰性細胞に対するT細胞活性化との間で、EC50又はIC50値に少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも10000倍の差が存在する - この差は治療ウィンドウと呼ばれることがある。追加的に又は代替的に、治療ウィンドウは、正常細胞及び腫瘍細胞株について観察される最低有効濃度(「LOEL」)に基づいて算出し得る。抗原陽性細胞は、ガン細胞に匹敵するレベルの抗原提示を得るために適切なペプチド濃度を用いるペプチドパルスにより得られてもよく(例えば、Bossiら

10

20

30

40

50

(2013), *Oncoimmunol.* 1;2(11):e26840に記載されているように 10^{-9} Mペプチド)、又は当該ペプチドを天然に提示するものであってもよい。好ましくは、抗原陽性細胞及び抗原陰性細胞は共にヒト細胞である。好ましくは、抗原陽性細胞はヒトガン細胞である。抗原陰性細胞は、好ましくは、健常ヒト組織に由来するものを含む。抗原陰性細胞は、野生型KRASペプチドを発現し又は提示する細胞を含み得る。

【0035】

特異性は、追加的に又は代替的に、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に結合し、代替ペプチド - HLA複合体のパネルにも、WT KRASペプチドにも結合しない特異的結合性分子の能力に関連し得る。このことは、例えば、実施例1及び2のBiacore法により決定されてもよい。前記パネルは、少なくとも5、好ましくは少なくとも10の代替ペプチド - HLA複合体を含んでいてもよい。代替ペプチドは、配列番号1と低レベルの配列同一性を有していてもよく、天然に提示されるものであってもよい。代替ペプチドは、好ましくは、健常ヒト組織で発現するタンパク質に由来する。VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体への特異的結合性分子の結合は、他の天然に提示されるペプチド - HLA複合体への結合より少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも10倍又は少なくとも100倍又は少なくとも1000倍又は少なくとも3000倍大きくあり得る。

10

【0036】

特異的結合性分子の特異性を決定する代替又は追加のアプローチは、標的ペプチドの逐次変異誘発(例えば、アラニンスキャニング)を用いて特異的結合性分子のペプチド認識モチーフを同定することであり得る。結合モチーフの部分形成する残基は、置換が許容されない残基である。非許容置換は、特異的結合性分子の結合親和性が、非変異ペプチドに関する結合親和性に比して、少なくとも50%又は少なくとも80%減少するペプチド位置として定義され得る。このようなアプローチは、TCRに関しては、Cameronら(2013), *Sci Transl Med.* 2013 Aug 7; 5 (197):197ra103及びWO2014096803にさらに記載されているが、その方法もまた、本発明の特異的結合性分子に適用可能であると理解される。この場合の特異的結合性分子の特異性は、代替モチーフ含有ペプチド、特にヒトプロテオーム中の代替モチーフ含有ペプチドを同定し、これらペプチドを特異的結合性分子に対する結合に関して試験することにより決定されてもよい。1又は2以上の代替ペプチドに対する特異的結合性分子の結合は特異性の欠如を示し得る。この場合、細胞アッセイによる特異的結合性分子の特異性の更なる試験が必要とされ得る。ペプチドの中央部分における(アラニン)置換に関する低い許容性は、特異的結合性分子が高い特異性を有し、したがって代替ペプチドとの交差反応性のリスクが低いことを示す。

20

30

【0037】

本発明の特異的結合性分子は、治療用薬剤としての使用に関して理想的な安全性プロファイルを有し得る。この場合、特異的結合性分子は可溶性形態であり得、好ましくは免疫エフェクターに融合されていてもよい。適切な免疫エフェクターとしては、サイトカイン(例えばIL-2及びIFN-) ; スーパー抗原及びその変異体 ; ケモカイン(例えばIL-8、血小板因子4、メラノーマ増殖刺激タンパク質) ; 免疫細胞(例えばT細胞又はNK細胞)上の抗原に結合する抗体及び抗体様足場(そのフラグメント、誘導體及びバリエーションを含む)(例えば抗CD3、抗CD28又は抗CD16) ; 及びFc受容体又は補体アクチベータ - が挙げられるが、これらに限定されない。理想的な安全性プロファイルは、本発明の特異的結合性分子が、良好な特異性を証明されていることに加えて、更なる前臨床安全性試験に合格している可能性があることを意味する。このような試験の例としては、全血存在下でのサイトカイン遊離が少ないこと(よって、インビボで可能性のあるサイトカイン遊離症候群を引き起こすリスクが低いこと)を確認する全血アッセイ、及び代替のHLAタイプを認識する可能性が低いことを確認するアロ反応性試験が挙げられる。

40

【0038】

本発明の特異的結合性分子は、特に可溶性形式の特異的結合性分子について、高収率精製が可能であり得る。収率は、元の培養量に対する、精製プロセスの終時に得られる正しくフォールディングした物質の量に基づいて決定し得る。高収率は、代表的には1 mg/L

50

以上又は 2 mg/L以上、より好ましくは 3 mg/L以上又は 4 mg/L以上又は 5 mg/L以上又は更に高い収率を意味する。

本発明の変異した特異的結合性分子は、好ましくは、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して、天然型TCR(非変異又は足場TCRともいう)より大きい(すなわち、より強い) K_D 、例えば 1 pM ~ 1 μ Mの範囲内の K_D を有する。1つの観点では、本発明の特異的結合性分子は、該複合体に関して約 1 pM ~ 約400nM、約 1 pM ~ 約1000pM、約 1 pM ~ 約500 pM、約 1 pM ~ 約100pMの K_D を有する(ここで、約は $\pm 10\%$ を意味する)。前記特異的結合性分子は、追加的に又は代替的に、該複合体に関して約 1分 ~ 約60時間、約20分 ~ 約50時間又は約 2時間 ~ 約35時間又は約 4時間 ~ 約20時間の範囲の結合半減期($T_{1/2}$)を有していてもよい。好ましくは、本発明の特異的結合性分子は、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して約 1 pM ~ 約200pMの K_D 及び/又は約 4時間 ~ 約20時間の結合半減期を有する。このような高親和性は、治療薬及び/又は検出可能な標識と結合している場合の可溶性形式の特異的結合性分子について好ましい。

【0039】

別の観点では、本発明の変異した特異的結合性分子は、該複合体に関して約50nM ~ 約200 μ M若しくは約100nM ~ 約2 μ Mの K_D 及び/又は該複合体に関して約 3秒 ~ 約12分の結合半減期を有し得る。このような特異的結合性分子は、養子療法適用に好ましくあり得る。

結合親和性(平衡定数 K_D に反比例する)及び結合半減期($T_{1/2}$ と表される)を決定する方法は当業者に公知である。好適な実施形態において、結合親和性及び結合半減期は、(例えばそれぞれBIAcore装置又はOctet装置を使用する)表面プラズモン共鳴(SPR)又はBio-Layer Interferometry(BLI)を用いて測定する。好適な方法は実施例 1 及び 2 に提供される。特異的結合性分子の親和性が 2 倍になれば K_D は1/2になることが理解される。 $T_{1/2}$ は $\ln 2 /$ 解離速度(k_{off})として算出する。よって、 $T_{1/2}$ が 2 倍になれば k_{off} は1/2になる。TCRの K_D 値及び k_{off} 値は、通常、可溶性形態のTCR、すなわち細胞質ドメイン及び膜貫通ドメインの残基を除去するように短縮された形態のTCR(単鎖TCR及び/又は非天然型ジスルフィド結合若しくは他の二量体化ドメインが組み込まれたTCRを含む)について測定する。個々の測定値間の変動、特に20時間を超える解離時間を有する相互作用についての変動を説明するため、所与の特異的結合性分子の結合親和性及び/又は結合半減期は、数回、例えば 3回又は 4回以上、同じアッセイプロトコルを用いて測定して、結果の平均をとり得る。2つのサンプル(すなわち、2つの異なる特異的結合性分子及び/又は同じ特異的結合性分子の2つの調製物)間の結合データを比較するため、測定値は同じアッセイ条件(例えば温度)、例えば実施例 1 及び 2 に記載の条件を用いて測定することが好ましい。

【0040】

本発明の特定の好適な、変異した特異的結合性分子は、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して、天然型TCRのものより実質的に高い結合親和性及び/又は結合半減期を有する。天然型TCRの結合親和性を増大させると、そのペプチド - MHCリガンドに関する当該TCRの特異性は低下し得る。このことは、Zhaoら(2007), J.Immunol, 179:9, 5845-5854において証明されている。しかし、本発明の変異した特異的結合性分子は、天然型TCRより実質的に高い結合親和性を有するにもかかわらず、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に関して特異的なままである。

本発明の特定の好適な、変異した特異的結合性分子は、抗原陽性細胞、特に抗原を低レベル(すなわち5 ~ 100のオーダー)で提示する細胞に対して、インビトロで非常に強力なT細胞応答を生じることが可能である。このような特異的結合性分子は、可溶性形態であり、免疫エフェクター(例えば、抗CD3抗体)に連結されていてもよい。測定されるT細胞応答は、T細胞活性化マーカー(例えば、インターフェロン 又はグランザイムB)の放出若しくは標的細胞殺傷又は他のT細胞活性化の尺度(例えばT細胞増殖)であってもよい。好ましくは、高度に強力な応答は、pM範囲のEC50値又はIC50値、例えば1000pM以下、又は500pM以下、又は200pM以下のEC50値又はIC50値を有するものである。

【0041】

10

20

30

40

50

本発明の特異的結合性分子は、TCR可変ドメインを含んでいてもよい。好ましくは、TCR可変ドメインは、鎖及び鎖のヘテロダイマーを含む。或いは、TCR可変ドメインは、鎖及び鎖のヘテロダイマーを含んでいてもよい。幾つかの場合において、本発明の特異的結合性分子は、TCR可変ドメインの二量体、例えば 又は ホモ二量体(又は若しくは ホモ二量体)を含んでいてもよい。

本発明の特異的結合性分子において、可変ドメイン及び存在する場合には定常ドメイン及び/又はその他のドメインは、任意の適切な形式/配置で組織化されていてもよい。このような配置の例は当該抗体分野において周知である。当業者は、抗体とTCRとの間の類似性を認識しており、その配置をTCR可変ドメイン及び定常ドメインに適用し得る(Brinkmanら, MAbs.2017 Feb-Mar; 9(2):182-212).例えば、可変ドメインは、モノクローナルTCR形式で配置されてもよく、ここで、2つの鎖は、定常ドメイン内若しくは可変ドメイン内のジスルフィド結合により連結されているか、又は可変ドメインが1若しくは2以上の二量ドメインに融合している。或いは、可変ドメインは、1若しくは2以上の定常ドメインの存在下若しくは非存在下で単鎖形式で配置されていてもよく、又は可変ドメインはダイアボディ形式で配置されてもよい。

本発明の特異的結合性分子は、少なくとも1つのTCR定常ドメイン又はそのフラグメント、例えば 鎖TRAC定常ドメイン及び/又は 鎖TRBC1若しくはTRBC2定常ドメインを含んでいてもよい。当業者が理解するように、用語TRAC及びTRBC1/2はまた、天然の多形バリエーション、例えばTRACの4位での N K を包含する(Bragadoら, International Immunology. 1994 Feb; 6(2): 223-30)。

【0042】

存在する場合、一方又は両方の定常ドメインは、天然型定常ドメイン配列に関して変異、置換又は欠失を含有し得る。定常ドメインは短縮化されていてもよく、すなわち、膜貫通ドメインもは細胞質ドメインも有していなくてもよい。或いは、定常ドメインは全長であり得る。全長とは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインがすべて存在することを意味する。TRAC及びTRBCドメインの配列は、TRACのエキソン2のCys4とTRBC1又はTRBC2のエキソン2のCys2との間の天然型ジスルフィド結合を欠失させるように短縮化又は置換により改変されていてもよい。及び/又は 鎖定常ドメイン配列は、例えばWO 03/020763に記載されるように、それぞれの定常ドメインの残基同士間に導入されたジスルフィド結合を有していてもよい。好ましくは、及び 定常ドメインは、TRACのThr 48の位置及びTRBC1又はTRBC2のSer 57の位置でのシステイン残基の置換により改変され、該システイン同士が当該TCRの 定常ドメインと 定常ドメインとの間の非天然ジスルフィド結合を形成していてもよい。TRBC1又はTRBC2は、追加的に、定常ドメインの75位でのシステイン アラニン変異及び定常ドメイン89位でのアスパラギン アスパラギン酸変異を含んでいてもよい。本発明の ヘテロ二量体に存在する細胞外定常ドメインの一方又は両方は、一方又は両方のC末端で、例えば15まで又は10まで又は8まで又は7以下のアミノ酸が欠失され、更に短縮化されていてもよい。本発明のヘテロ二量体に存在する細胞外定常ドメインの一方又は両方は、一方又は両方のC末端で、例えば15まで又は10まで又は8までのアミノ酸が欠失され、短縮化されていてもよい。鎖細胞外定常ドメインのC末端は、8アミノ酸が欠失され、短縮化されていてもよい。

或いは、完全長又は短縮型の定常ドメインではなく、TCR定常ドメインが存在しなくてもよい。したがって、本発明の特異的結合性分子は、TCR 及び 鎖の可変ドメインと、任意に、上記の追加のドメインとから構成されてもよい。追加のドメインとしては、免疫エフェクタードメイン(例えば、抗体ドメイン)、Fcドメイン又はアルブミン結合性ドメイン、治療剤又は検出可能な標識が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

単鎖形式としては、V -L-V 、 V -L-V 、 V -C -L-V 、 V -L-V -C 又はV -C -L-V -C タイプ(ここで、V 及びV はそれぞれTCR 及び 可変領域であり、C 及びC はそれぞれTCR 及び 定常領域であり、Lはリンカー配列である)の TCR ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない(Weidanzら(1998), J Immunol

Methods. Dec 1; 221(1-2): 59-76 ; Epelら(2002) , Cancer Immunol Immunother. Nov; 51(10): 565-73 ; WO 2004/033685 ; WO9918129)。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2~10アミノ酸長である。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。本発明の複数ドメイン結合性分子に用い得る適切なリンカーの例として、GGGGS(配列番号18)、GGGSG(配列番号19)、GGSGG(配列番号20)、GSGGG(配列番号21)、GSGGGP(配列番号22)、GGEPS(配列番号23)、GGE GGGP(配列番号24)及びGGEGGGSEGGGS(配列番号25)(WO2010/133828に記載)並びにGGGSGGGG(配列番号26)が挙げられるが、これらに限定されない。追加のリンカーは、次の配列モチーフ：GGGS(配列番号27)、GGGGS(配列番号28)、TVLRT(配列番号29)、TVSSAS(配列番号30)及びTVLSSAS(配列番号31)の1又は2以上を有する配列を含み得る。存在する場合、一方又は両方の定常ドメインは完全長であり得、又は上記のとおり、短縮化され得及び/又は変異を含有し得る。好ましくは、単鎖TCRは可溶性である。特定の実施形態において、本発明の単鎖TCRは、WO 2004/033685に記載されるように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有してもよい。単鎖TCRは、WO2004/033685 ; WO98/39482 ; WO01/62908 ; Weidanzら(1998) , J Immunol Methods 221(1-2): 59-76 ; Hooら(1992) , Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763 ; Schodin(1996) , Mol Immunol 33(9): 819-829)に更に記載されている。

【0044】

TCR可変ドメインは、ダイアボディ形式で配置されていてもよい。ダイアボディ形式において、2つの単鎖フラグメントは、ヘッド テイル方向に二量化して、タンデムscFvに類似する分子量(約50kDa)を有するコンパクトな分子を生じる。

本発明はまた、本発明の特異的結合性分子をディスプレイする粒子を包含し、該粒子は粒子ライブラリに含まれる。このような粒子は、ファージ、酵母細胞、リボソーム又は哺乳動物細胞を含むが、これらに限定されない。このような粒子及びライブラリを製造する方法は当該分野において公知である(例えば、WO2004/044004 ; WO01/48145 ; Chervinら(2008) , J. Immunol. Methods 339.2:175-184を参照)。

本発明の特異的結合性分子は、抗原提示細胞及び抗原提示細胞を含有する組織への検出可能な標識又は治療薬剤の送達に有用である。したがって、これらは、(特異的結合性分子を用いて同族抗原を提示する細胞の存在を検出する診断目的のための)検出可能な標識 ; 及び/又は治療薬剤(免疫エフェクターを含む) ; 及び/又は薬物動態(PK)改変成分と(共有結合又はその他の様式で)結合していてもよい。

PK改変成分の例としては、PEG(Dozierら(2015) , Int J Mol Sci. Oct 28;16(10):25831-64及びJevsevarら(2010) , Biotechnol J. Jan;5(1):113-28)、PAS化(Schlapschyら(2013) , Protein Eng Des Sel. Aug;26(8):489-501)、アルブミン及びアルブミン結合性ドメイン(Dennisら(2002) , J Biol Chem. Sep 20;277(38):35035-43)及び/又は非構造化ポリペプチド(Schellenbergerら(2009) , Nat Biotechnol. Dec;27(12):1186-90)が挙げられるが、これらに限定されない。更なるPK改変成分として、抗体Fcフラグメントが挙げられる。PK改変成分は、本発明の特異的結合性分子のインビボ半減期を延長するように働き得る。

【0045】

免疫グロブリンFcドメインは、用いられる場合、任意の抗体のFc領域であり得る。Fc領域は、細胞表面のFcレセプター及び補体系の幾つかのタンパク質と相互作用する抗体テイル領域である。Fc領域は、代表的には、共に2つ又は3つの重鎖定常ドメイン(CH2、CH3及びCH4と呼ぶ)及びヒンジ領域を有する2つのポリペプチド鎖を含んでなる。この2つ

の鎖はヒンジ領域内でのジスルフィド結合により連結されている。免疫グロブリンサブクラスIgG1、IgG2及びIgG4のFcドメインは、FcRnに結合して、FcRn媒介リサイクリングを受け、長い循環半減期(3～4週間)を提供する。IgGとFcRnとの相互作用は、CH2及びCH3ドメインの部分をカバーするFc領域に局在化されている。本発明における使用に好適な免疫グロブリンFcは、IgG1又はIgG4のFcドメインを含むがこれらに限定されない。好ましくは、Fcドメインはヒト配列に由来する。Fc領域はまた、好ましくは、二量体化を容易にするKiH変異を含んでいてもよく、活性化している受容体との相互作用を防止する変異を含んでいてもよい(すなわち、機能的にサイレントな分子であってもよい)。免疫グロブリンFcドメインは、その他のドメイン(すなわち、TCR可変ドメイン及び/又はTCR定常ドメイン及び/又は免疫エフェクタードメイン)のC又はN末端に、任意の適切な順序又は形態で融合されていてもよい。免疫グロブリンFcは、1又は2以上のその他のドメイン(すなわち、TCR可変ドメイン及び/又はTCR定常ドメイン及び/又は免疫エフェクタードメイン)にリンカーを介して融合されていてもよい。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2～10アミノ酸長である。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。本発明の多ドメイン結合性分子に用い得る適切なリンカーの例としては、GGGGS(配列番号18)、GGGSG(配列番号19)、GGSGG(配列番号20)、GSGGG(配列番号21)、GSGGGP(配列番号22)、GGEPS(配列番号23)、GGEGGGP(配列番号24)及びGGEGGGSEGGGS(配列番号25)(WO2010/133828に記載)並びにGGGSGGGG(配列番号26)が挙げられるが、これらに限定されない。追加のリンカーは、次の配列モチーフ：GGGS(配列番号27)、GGGGS(配列番号28)、TVLRT(配列番号29)、TVSSAS(配列番号30)及びTVLSSAS(配列番号31)の1又は2以上を有する配列を含み得る。免疫グロブリンFcは、TCRに融合される場合、又は鎖のいずれかに、リンカー有り又は無しで融合され得る。更に、Fcの個々の鎖がTCRの個々の鎖に融合され得る。

【0046】

好ましくは、Fc領域はIgG1又はIgG4サブクラスに由来し得る。2つの鎖は、CH2及びCH3定常ドメインとヒンジ領域の全て又は一部とを含んでなってもよい。ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のヒンジ領域に実質的に又は部分的に相当してもよい。ヒンジは、コアヒンジドメインの全て又は一部及び低位ヒンジ領域の全て又は一部を含んでなってもよい。好ましくは、ヒンジ領域は、2つの鎖を連結する少なくとも1つのジスルフィド結合を含有する。

Fc領域は、WT配列に関して変異を含んでいてもよい。変異には、置換、挿入及び欠失が含まれる。このような変異は、望ましい治療特性の導入を目的としてなされたものであってもよい。例えば、ヘテロ二量体化を容易にするために、ノブ・インツー・ホール(KiH)変異がCH3ドメイン中に工学的操作により導入されていてもよい。この場合、一方の鎖が嵩高い突出残基(すなわちノブ)、例えばYを含有するように操作され、他方の鎖が相補性ポケット(すなわちホール)を含有するように操作されている。KiH変異の適切な位置は当該分野において公知である。追加的に又は代替的に、Fcγレセプターへの結合を消失させるか若しくは低減させる及び/又はFcRnへの結合を増大させる変異、及び/又はFabアーム交換を防止するか又はプロテアーゼ部位を除去する変異が導入されていてもよい。追加的に又は代替的に、変異は、製造性を向上させるために、例えばグリコシル化部位を除去又は変更するようになされ得る。

【0047】

PK改変成分はまた、アルブミン結合性ドメイン(これもまた、半減期を延長するように作用し得る)であり得る。当該分野において公知であるように、アルブミンは、(腎閾値を超える)そのサイズの一部起因し、その特異的相互作用及びFcRnを介するリサイクリング

10

20

30

40

50

により、19日の長い循環半減期を有する。アルブミンへの付着は、インビボで治療分子の循環半減期を向上させる周知のストラテジである。アルブミンは、特異的アルブミン結合性ドメインの使用により非共有結合的に、又は接合若しくは直接遺伝子融合により共有結合的に付着されてもよい。半減期を向上させるために、アルブミンへの付着が利用されている治療分子の例は、Sleepら, *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1830(12):5526-34に見出される。

アルブミン結合性ドメインは、アルブミンに結合することができる任意の部分(任意の既知のアルブミン結合性部分を含む)であり得る。アルブミン結合性ドメインは、アルブミンに特異的に結合する内因性又は外因性リガンド、小さな有機分子、脂肪酸、ペプチド及びタンパク質から選択され得る。好適なアルブミン結合性ドメインの例としては、短いペプチド、例えばDennisら, *J Biol Chem*. 2002 Sep 20; 277(38): 35035-43に記載のもの(例えばペプチドQRLMEDICLPRWGCLWEDDF); アルブミンに結合するよう操作されたタンパク質、例えば抗体、抗体フラグメント及び抗体様足場、例えばGSKが市場に提供するAlbudab(登録商標)(O'Connor-Semmesら, *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Dec; 96(6): 704-12)及びAblynxが市場に提供するナノボディ(登録商標)(Van Royら, *Arthritis Res Ther*. 2015 May 20; 17: 135); 及び天然に見出されるアルブミン結合性ドメインをベースにするタンパク質、例えばStreptococcalタンパク質であるGタンパク質(Storkら, *Eng Des Sel*. 2007 Nov;20(11):569-76)、例えばAffibodyが市場に提供するAlbumod(登録商標)が挙げられる。

好ましくは、アルブミンはヒト血清アルブミン(HSA)である。アルブミン結合性ドメインのヒトアルブミンに関する親和性は、ピコモル~マイクロモルの範囲内であり得る。ヒト血清におけるアルブミンの極端に高い濃度(35~50mg/ml、約0.6mM)を考慮すれば、アルブミン結合性ドメインの実質的に全てがインビボでアルブミンに結合すると計算される。

【0048】

アルブミン結合性成分は、その他のドメイン(すなわち、TCR可変ドメイン及び/又はTCR定常ドメイン及び/又は免疫エフェクタードメイン)のC又はN末端に、任意の適切な順序又は形態で融合されていてもよい。アルブミン結合性成分は、1又は2以上のその他のドメイン(すなわち、TCR可変ドメイン及び/又はTCR定常ドメイン及び/又は免疫エフェクタードメイン)にリンカーを介して融合されていてもよい。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2~10アミノ酸長である。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。本発明の多ドメイン結合性分子に用い得る適切なリンカーの例としては、GGGGS(配列番号18)、GGGSG(配列番号19)、GGSGG(配列番号20)、GSGGG(配列番号21)、GSGGGP(配列番号22)、GGEPS(配列番号23)、GGEGGGP(配列番号24)及びGGEGGGSEGGGS(配列番号25)(WO2010/133828に記載)並びにGGGSGGG(配列番号26)が挙げられるが、これらに限定されない。追加のリンカーは、次の配列モチーフ: GGGGS(配列番号27)、GGGGGS(配列番号28)、TVLRT(配列番号29)、TVSSAS(配列番号30)及びTVLSSAS(配列番号31)の1又は2以上を有する配列を含み得る。アルブミン結合部位は、TCRに連結される場合、又は鎖のいずれかに、リンカー有り又は無しで連結され得る。

【0049】

診断目的の検出可能な標識には、例えば、蛍光標識、放射性標識、酵素、核酸プローブ及び造影剤が含まれる。

幾つかの目的のために、本発明の特異的結合性分子は、幾つかの特異的結合性分子を含んでなる複合体に凝集して、多価特異的結合性分子複合体を形成していてもよい。多価特

10

20

30

40

50

異的結合性分子複合体の製造に使用し得る多量体化ドメインを含むヒトタンパク質が存在する。例えば、p53の四量体化ドメインは、単量体scFvフラグメントと比較して増大した血清残留性及び顕著に低減した解離速度を示す四量体のscFv抗体フラグメントを作製するために利用されている(Willudaら(2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392)。ヘモグロビンもまた、この種の適用に使用することができる四量体化ドメインを有する。本発明の多価特異的結合性分子複合体は、本発明の非多量体天然型T細胞受容体ヘテロ二量体(親の、天然の、非変異の野生型又は足場のT細胞受容体ヘテロ二量体とも呼ばれる)と比較して、当該複合体に関して向上した結合能を有していてもよい。よって、本発明の特異的結合性分子の多価複合体もまた本発明に含まれる。本発明によるこのような多価特異的結合性分子複合体は、インビトロ又はインビボで特定の抗原を提示する細胞を追跡又は標的するために特に有用であり、このような用途を有する更なる多価特異的結合性分子複合体の製造のための中間体としても有用である。

10

本発明の特異的結合性分子と組み合わせられ得る治療薬剤としては、免疫モジュレーター及びエフェクター、放射性化合物、酵素(例えば、パーフォリン)又は化学療法剤(例えば、シスプラチン)が挙げられる。治療効果が確実に所望の位置で発揮されるために、薬剤は、化合物が緩徐に放出されるように特異的結合性分子に連結されたりポソーム又は他のナノ粒子構造の内部に存在し得る。このことにより、体内輸送の間の損傷効果が防止され、該当する抗原提示細胞への特異的結合性分子の結合後に、薬剤が最大効果を有することが保証される。

【0050】

20

適切な治療薬剤の例として、次のものが挙げられるがそれらに限定されない：

- ・ 抗体又はそのフラグメント。抗T細胞又はNK細胞決定基抗体(例えば、抗CD3、抗CD28又は抗CD16)が挙げられる；

- ・ 抗体様結合特性を有するオルターナティブタンパク質足場(例えばDARPin)

- ・ 免疫刺激物質、すなわち、免疫応答を刺激する免疫エフェクター分子。例えば、サイトカイン(例えばIL-2及びIFN-)、

- ・ ケモカイン、例えばIL-8、血小板第4因子、メラノーマ増殖刺激タンパク質など；

- ・ 補体経路の活性化因子又はFc受容体

- ・ チェックポイント阻害剤、例えば、PD1又はPD-L1を標的とするもの

- ・ 小分子細胞傷害性物質、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有する分子量700ダルトン未満の化合物。このような化合物はまた、細胞傷害性効果を有することができる毒性金属を含有し得る。さらに、これら小分子細胞傷害性物質にはまた、プロドラッグ、すなわち、生理学的条件下で崩壊又は変換して細胞傷害性物質を放出する化合物が含まれると理解される。このような物質の例として、シスプラチン、メイタンシン(maytansine)誘導体、ラケルマイシン(rachelmycin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、ドセタキセル、エトポシド、ゲムシタピン、イホスファミド、イリノテカン、メルファラン、ミトキサントロン、ソルフィマーソディウムホトフィリンII(sorfiner sodiumphotofrin II)、テモゾロマイド(temozolmide)、トポテカン、トリメトレキサート(trimetreate)、アルブレート(arbourlate)、オーリスタチンE(auristatin E)、ピンクリスチン及びドキシソルピシンが挙げられる；

30

- ・ ペプチド細胞毒素、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有するタンパク質又はそのフラグメント。例えば、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス細菌外毒素A、DNAアーゼ及びRNAアーゼ；

40

- ・ 放射性核種、すなわち、1又は2以上の 粒子若しくは 粒子又は 線の同時放射を伴って崩壊する元素の不安定同位体。例えば、ヨウ素131、レニウム186、インジウム111、イットリウム90、ビスマス210及び213、アクチニウム225及びアスタチン213；キレート化剤がTCR又はその多量体へのこれら放射性核種の結合を容易にするために使用されてもよい；

- ・ スーパー抗原及びその変異体

- ・ TCR - HLA融合体、ここで、ペプチドは、一般的なヒト病原体、例えばエプスタイン

50

バーウイルス(EBV)に由来する；

・ 異種タンパク質ドメイン、同種タンパク質ドメイン、ウイルス性/細菌性タンパク質ドメイン、ウイルス性/細菌性ペプチド。

【0051】

免疫エフェクターと(通常、任意の適切な形態で鎖若しくは鎖又は両鎖のN末端又はC末端に融合することによって)結合した本発明の可溶性の特異的結合性分子が好ましい。TCRのN末端は、免疫エフェクターポリペプチドのC末端に連結されていてもよい。

特に好適な免疫エフェクターは、抗CD3抗体又は該抗CD3抗体の機能的フラグメント若しくはバリエーションである。本明細書で用いる場合、用語「抗体」は前記のようなフラグメント及びバリエーションを包含する。抗CD3抗体の例としては、OKT3、UCHT-1、BMA-031及び12F6が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の組成物及び方法における使用に適した抗体フラグメント及びバリエーション/アナログには、ミニボディ、ダイアボディ、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、dsFv及びscFvフラグメントが含まれる。用語抗体に包含される更なる例としては、NanobodiesTM(Ablynx(ベルギー)が販売する構築物であって、ラクダ科(例えば、ラクダ又はラマ)抗体由来の合成単一免疫グロブリン可変重鎖ドメインを含む構築物)、親和性成熟単一免疫グロブリン可変重鎖ドメイン又は免疫グロブリン可変軽鎖ドメインを含むドメイン抗体(Domantis、ベルギー)、及び抗体様結合特性を示す代替タンパク質足場、例えば、操作されたプロテインA足場を含むアフィボディ(Affibody、スウェーデン)又は操作されたアンチカリンを含むAnticalin(Pieris、ドイツ)又は操作されたアンキリン反復タンパク質を含むDARPin(Molecular Partners、スイス)が挙げられる。

融合分子の好ましい配置の例としては、WO2010133828、WO2019012138及びWO2019012141に記載されているものが挙げられる。

【0052】

本発明の特異的結合性分子は、以下：

鎖可変ドメインと抗体の可変ドメインの第1の結合領域とを含む第1のポリペプチド鎖；及び

鎖可変ドメインと前記抗体の可変ドメインの第2の結合領域とを含む第2のポリペプチド鎖

を含んでなってもよく、

ここで、それぞれのポリペプチド鎖は、当該特異的結合性分子がVVVGADGVGK(配列番号1)-HLA-A*11複合体と前記抗体の抗原とに同時に結合できるように会合している。

【0053】

本明細書には、第1のポリペプチド鎖及び第2のポリペプチド鎖を含んでなる分子の群より選択される二重特異性ポリペプチド分子もまた提供される。ここで：

第1のポリペプチド鎖は、ヒト免疫エフェクター細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体の可変ドメインの第1の結合領域(VD1)と、MHC結合ペプチドエピトープに特異的に結合するTCRの可変ドメインの第1の結合領域(VR1)と、前記両ドメインを接続する第1のリンカー(LINK1)とを含んでなり、

第2のポリペプチド鎖は、MHC結合ペプチドエピトープに特異的に結合するTCRの可変ドメインの第2の結合領域(VR2)と、ヒト免疫エフェクター細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体の可変ドメインの第2の結合領域(VD2)と、前記両ドメインを接続する第2のリンカー(LINK2)とを含んでなり、

ここで、前記第1の結合領域(VD1)及び前記第2の結合領域(VD2)は会合して、前記ヒト免疫エフェクター細胞の細胞表面抗原に結合する第1の結合性部位(VD1)(VD2)を形成し、

前記第1の結合領域(VR1)及び前記第2の結合領域(VR2)は会合して、前記MHC結合ペプチドエピトープに結合する第2の結合性部位(VR1)(VR2)を形成し、

ここで、前記2つのポリペプチド鎖は、ヒトIgGヒンジドメイン及び/又はヒトIgG Fcドメイン又はその二量体化部分と融合されており、

10

20

30

40

50

ここで、前記2つのポリペプチド鎖は、前記ヒンジドメイン及び/又はFcドメイン間の共有及び/又は非共有結合により接続されており、

ここで、前記二重特異性ポリペプチド分子は、前記細胞表面分子及び前記MHC結合ペプチドエピトープに同時に結合することができ、2つのポリペプチド鎖中の結合性領域の順序がVD1-VR1及びVR2-VD2、又はVD1-VR2及びVR1-VD2、又はVD2-VR1及びVR2-VD1、又はVD2-VR2及びVR1-VD1から選択され、ドメインはLINK1又はLINK2のいずれかにより接続され、MHC結合ペプチドエピトープはVVVGADGVGK複合体であり、MHCはHLA-A*11である。

【0054】

特異的結合性分子と抗CD3抗体との連結は、共有結合によってもよいし、非共有結合によってもよい。共有結合は直接であってもよいし、リンカー配列を介する間接的であってもよい。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2~10アミノ酸長である。本発明の多ドメイン結合性分子に用い得る適切なリンカーの例としては、GGGS(配列番号18)、GGSG(配列番号19)、GSGG(配列番号20)、GSGG(配列番号21)、GSGGGP(配列番号22)、GGEPS(配列番号23)、GGEGGGP(配列番号24)及びGGEGGGSEGGGS(配列番号25)(WO2010/133828に記載)並びにGGSGGGG(配列番号26)が挙げられるが、これらに限定されない。追加のリンカーは、次の配列モチーフ：GGGS(配列番号27)、GGGS(配列番号28)、TVLRT(配列番号29)、TVSSAS(配列番号30)及びTVLSSAS(配列番号31)の1又は2以上を有する配列を含み得る。

本発明の抗CD3特異的結合性分子融合構築物の具体的実施形態としては、鎖が配列番号4~6のアミノ酸配列を含むTCR可変ドメインで構成され、及び/又は鎖が配列番号7~8のアミノ酸配列を含むTCR可変ドメインで構成される、鎖と鎖とが対合したものが挙げられる。前記鎖及び鎖は、非天然型ジスルフィド結合を含む定常領域をさらに含んでいてもよい。鎖の定常ドメインは、8アミノ酸が欠失(短縮化)されていてもよい。鎖及び/又は鎖のN又はC末端は、配列番号18~31から選択されるリンカーを介して抗CD3 scFv抗体フラグメントに融合されてもよい。このような抗CD3特異的結合性分子融合構築物の特定の好ましい実施形態は、下記表及び図3に示される。

【0055】

【表2】

抗CD3に連結された特異的結合性分子	
α鎖	β鎖-抗CD3
配列番号9	配列番号10
配列番号11	配列番号12
配列番号13	配列番号14
配列番号15	配列番号16
配列番号17	配列番号18
配列番号19	配列番号20

好ましい、抗CD3に結合した特異的結合性分子は、配列番号9及び配列番号10を含む。前記抗CD3-TCR融合構築物の機能的バリエーション(表現型上サイレントなバリエーション)もまた、本発明の範囲に含まれる。前記機能的バリエーションは、好ましくは、参照配列に対して、少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するにもかかわらず、機能的に等価である。

【0056】

1つの更なる観点において、本発明は、本発明の特異的結合性分子又は特異的結合性分子-抗CD3融合体をコードする核酸を提供する。幾つかの実施形態では、核酸はcDNAで

10

20

30

40

50

ある。いくつかの実施形態では、核酸はmRNAであってもよい(例えば、mRNAがコードする二重特異性分子(Stadlerら, Nat Med.2017 Jul;23(7):815-817))。幾つかの実施形態では、本発明は、本発明のTCRの鎖可変ドメインをコードする配列を含む核酸を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、本発明の特異的結合性分子の鎖可変ドメインをコードする配列を含む核酸を提供する。核酸は、天然に存在しない及び/又は精製された及び/又は操作されたものであり得る。核酸配列は、用いる発現系に応じてコドン最適化されていてよい。当業者に公知であるように、発現系は、細菌細胞、例えばE. coli、又は酵母細胞又は哺乳動物細胞又は昆虫細胞を含み得、或いは、発現系は細胞フリー発現系であり得る。いくつかの実施形態では、分子は、mRNAにコードされた二重特異性抗体であってもよい。

10

別の1つの観点では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。好ましくは、ベクターはTCR発現ベクターである。適切なTCR発現ベクターは、例えば、ガンマレトロウイルスベクター、より好ましくはレンチウイルスベクターを含む。更なる詳細は、Zhang(2012)及びその引用文献中に見出すことができる(Zhangら, Adv Drug Deliv Rev. 2012 Jun 1; 64(8): 756-762)。

本発明はまた、本発明のベクター、好ましくはTCR発現ベクターを有する細胞を提供する。適切な細胞として、哺乳動物細胞、好ましくは免疫細胞、尚より好ましくはT細胞が挙げられる。ベクターは、鎖及び鎖を単一オープンリーディングフレームにコードするか、又は2つの別個のオープンリーディングフレームにそれぞれをコードする本発明の核酸を含んでなってもよい。別の1つの観点は、本発明の特異的結合性分子の鎖をコードする核酸を含む第1の発現ベクター及び本発明の特異的結合性分子の鎖をコードする核酸を含む第2の発現ベクターを有する細胞を提供する。この細胞は養子療法に特に有用である。本発明の細胞は、単離され及び/又は組み換えられ及び/又は天然に存在しない及び/又は工学的に操作されていてよい。

20

【0057】

本発明の特異的結合性分子は養子療法に有用であるので、本発明は、本発明の特異的結合性分子を提示する、天然に存在しない及び/又は精製された及び/又は工学的に操作された細胞、特にT細胞を包含する。本発明はまた、本発明の特異的結合性分子を提示するT細胞の拡大された集団を提供する。本発明の特異的結合性分子をコードする核酸(例えば、DNA、cDNA又はRNA)でのT細胞のトランスフェクションに適切な幾つかの方法が存在する(例えば、Robbinsら(2008) J Immunol. 180:6116-6131を参照)。本発明の特異的結合性分子を発現するT細胞は、養子療法ベースのガン治療における使用に適切である。当業者に公知であるように、養子療法の実施を可能にする適切な幾つかの方法が存在する(例えば、Rosenbergら(2008), Nat Rev Cancer 8(4)を参照)。

30

当技術分野で周知のように、タンパク質(本発明の特異的結合性分子を含むタンパク質を包含する)のインピボ産生は、翻訳後修飾をもたらし得る。グリコシル化はそのような修飾の1つであり、ポリペプチド鎖中の規定されたアミノ酸へのオリゴ糖部分の共有結合的付加を含む。例えば、アスパラギン残基又はセリン/スレオニン残基は、周知のオリゴ糖付加位置である。特定のタンパク質のグリコシル化状況は、タンパク質配列、タンパク質コンホメーション及び特定の酵素の利用可能性を含む幾つかの因子に依存する。更に、グリコシル化状況(すなわち、オリゴ糖タイプ、共有結合及び付加の総数)は、タンパク質の機能に影響することがある。したがって、組換えタンパク質を製造するときには、グリコシル化の制御が望ましい場合が多い。制御されたグリコシル化は、抗体ベースの治療薬を改善するために用いられている(Jefferisら(2009) Nat Rev Drug Discov Mar;8(3):226-34)。本発明の特異的結合性分子について、グリコシル化は、例えば特定の細胞株(哺乳動物細胞株、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又はヒト胎児腎(HEK)細胞を含むが、これらに限定されない)を用いることにより、又は化学的修飾により制御されてもよい。このような修飾は、グリコシル化が薬物動態を改善し、免疫原性を低減させ及び天然型ヒトタンパク質をより厳密に模擬することができるので、望ましくあり得る(Sinclair及びElliott(2005), Pharm Sci. Aug; 94(8):1626-35)。幾つかの場合では、変異が、翻訳

40

50

後修飾を制御及び/又は改変するために導入され得る。

【0058】

患者への投与のために、本発明の特異的結合性分子(好ましくは、検出可能な標識若しくは治療薬剤と結合しているか、又はトランスフェクトされたT細胞に発現しているもの)、又は本発明の特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、核酸、発現ベクター若しくは細胞は、滅菌医薬組成物の一部として、1又は2以上の薬学的に許容され得るキャリア又は賦形剤と共に提供されてもよい。この医薬組成物は、(患者への望ましい投与方法に依存して)任意の適切な形態であり得る。医薬組成物は、単位剤形で提供されてもよく、一般には密封容器内で提供され、キットの一部として提供されてもよい。このようなキットは、(必須ではないが)通常、使用指示書を含む。キットは複数の単位剤形を含み得る。

10

医薬組成物は、任意の適切な経路、例えば非経口経路(皮下、筋内、髄腔内又は静脈内経路を含む)、経腸(経口又は直腸経路を含む)、吸入又は鼻内経路による投与に適合していてもよい。このような組成物は、薬学分野において公知の任意の方法により、例えば活性成分をキャリア又は賦形剤と滅菌条件下で混合することにより、製造されてもよい。

本発明の物質の投薬量は、治療すべき疾患又は異常、治療すべき個体の年齢及び状態などに依存して広範に変化し得る。特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子に適切な用量範囲は、25ng/kg ~ 50 µg/kg又は1 µg ~ 1gであり得る。医師が、使用すべき適切な投薬量を最終的には決定する。好適な投与レジメンの例は、WO2017208018に提供されている。

本発明の特異的結合性分子、特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、医薬組成物、ベクター、核酸及び細胞は、実質的に純粋な形態、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%純粋で提供されてもよい。

20

【0059】

本発明はまた、次のものを提供する：

- ・ 医学における使用のため、好ましくは癌(膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、卵巣癌(明細胞癌、類内膜癌、粘液癌を含む)、胃腸癌(胆管癌、胆嚢癌、小腸癌、乳頭癌、盲腸癌、虫垂癌を含む)及び子宮内膜癌を含むが、これらに限定されない)を治療する方法における使用のための、本発明の特異的結合性分子、特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、核酸、医薬組成物又は細胞、特に好ましい癌適応症は、膵臓癌及び結腸直腸癌である。

30

- ・ 膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、卵巣癌(明細胞癌、類内膜癌、粘液癌を含む)、胃腸癌(胆管癌、胆嚢癌、小腸癌、乳頭癌、盲腸癌、虫垂癌を含む)及び子宮内膜癌を含むがこれに限定されない癌を処置するための医薬の製造における、本発明の特異的結合性分子、特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、核酸、医薬組成物又は細胞の使用特に好ましい癌適応症は、膵臓癌及び結腸直腸癌である。

- ・ 膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌(非小細胞肺癌を含む)、卵巣癌(明細胞、内膜症、粘液質を含む)、胃腸癌(胆管癌、胆嚢癌、小腸癌、乳頭癌、盲腸癌、虫垂癌を含む)及び子宮内膜癌を含むがこれらに限定されない癌を処置するための方法であって、処置を必要とする対象に治療有効量の特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子を投与することを含む、処置方法。特に好ましい癌適応症は、膵臓癌及び結腸直腸癌である。

40

- ・ 本発明の特異的結合性分子、特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、核酸、医薬組成物又は細胞を含む、ヒト対象に投与するための注射可能製剤。

【0060】

本発明の特異的結合性分子、特異的結合性分子 - 抗CD3融合分子、核酸、医薬組成物又は細胞は、注射により、例えば静脈内注射、皮下注射、又は直接腫瘍内注射により投与され得る。ヒト対象はHLA-A*02サブタイプであり得る。患者は、処置前にスクリーニングを受けて、変異体Krasタンパク質の発現及び/又は変異体ペプチドの存在を確認されていてもよい。追加的に又は代替的に、患者はHLA-A11についてスクリーニングされていてもよい。腫瘍の処置が意図されている場合、腫瘍は固形腫瘍であっても液性腫瘍であっても

50

よい。

処置方法は、1又は2以上の追加の抗新生物剤を別々に、組み合わせて又は逐次に投与することを更に含んでもよい。

【0061】

用語「処置」、「処置する」、「治療すること」及び同様な表現は、癌の進行を遅らせ、停止させ又は逆転させることを含む意味である。また、これらの用語には、癌が実際に除去されない場合及び癌の進行それ自体が遅くならず、停止せず又は逆転しない場合であっても、疾患又は病的状態の1又は2以上の症状を緩和させ、改善し、減衰させ、除去し又は軽減させることが含まれる。

「治療有効量」は、対象に投与された化合物又はその薬学的に許容される塩の量であって、該対象の生物学的若しくは医学的応答又は対象に対する所望の治療効果を引き起こす量を意味する。

10

治療有効量は、当業者としての担当医が、公知の技法の使用により、及び類似の状況下で得られた結果を観察することにより、容易に決定することができる。対象の有効量の決定において、以下を含むがこれらに限定されない幾つかの要因が担当医によって考慮される：体格、年齢及び全身の健康状態；関与する特定の疾患又は障害；疾患又は障害の関与の程度又は重症度；個々の対象の反応；投与する特定の化合物；投与形態；投与する製剤のバイオアベイラビリティ特性；選択する投与レジメン；併用薬の使用；及びその他の関連状況。

本発明の各々の観点の好適な特徴は、他の観点の各々についても同様である(ただし、必要な変更は加える)。本明細書において言及した先行技術文献は、法が許容する最大範囲まで組み込まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】図1は、可溶性足場TCRの 及び 可変ドメイン及び定常ドメインのアミノ酸配列を示す。CDR配列に下線が付されている。

【図2】図2は、変異TCR 及び 可変ドメインのアミノ酸配列の例を示す。CDRに下線を付し、WT配列に対する変異を太字で示す。

【図3】図3は、変異TCR可変ドメインが組み込まれたTCR - 抗CD3融合タンパク質のアミノ酸配列の例を示す。

30

【図4】図4は、TCR - 抗CD3融合タンパク質が、変異体KRASペプチド(VVV(D)K-RAS G12Dと表記)でパルスした細胞の存在下で、WT KRASペプチド(VVV(G)wt K-RASと表記)でパルスした細胞に比して強力なT細胞活性化を駆動することが可能であることを示す例示のグラフを提供する。IFN γ 放出が、T細胞活性化の読み出し値として利用される。

【図5】図5は、TCR - 抗CD3融合タンパク質が、変異体KRASを発現する癌細胞株(Panc-1xA11 2M及びCL40)の存在下で強力なT細胞活性化を駆動できることを示す例示のグラフを提供する。細胞株NCI-H2030及びSK-Mel-28はWT KRASを発現する。IFN γ 放出が、T細胞活性化の読み出し値として利用される。

【図6】図6は、TCR - 抗CD3融合体が、WT KRASペプチドを発現する細胞株(SK-Mel-28)に比して、変異体KRASペプチドを発現する癌細胞株(CL40)の強力な殺傷を媒介することを示す例示のグラフを提供する。72時間後に残存する標的細胞のパーセンテージを標的細胞の死のマーカーとして使用する。

40

【図7】図7は、TCR - 抗CD3融合タンパク質が、1 nM以下の濃度で、正常組織由来の細胞株(正常細胞)に対してほとんど又は全く活性をもたらさないことを示す例示のグラフである。Panc-1xA11 2M及びSK-Mel-28細胞は、それぞれポジティブコントロール及びネガティブコントロールである。IFN γ 放出が、T細胞活性化の読み出し値として利用される。

【実施例】

【0063】

本発明を、下記の非限定的な実施例において更に説明する。

50

実施例

実施例 1 - WT TCRの単離及び特徴決定

a) 可溶性WT TCRの調製

VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体を認識するTCRを、既知のT細胞クローニング法を用いてドナーPBMCから同定し、その後TCR鎖をRACEにより同定した。

WT TCRを、以前に記載されたように可溶性ヘテロダイマーとして調製した(Boulterら、Protein Eng. 2003 Sep;16(9):707-11及びWO03/020763)。

簡潔には、配列番号1及び2に提供されるアミノ酸配列を含む可溶性TCRの及び細胞外領域をコードするDNA配列を、標準的な方法を用いて発現プラスミドに別々にクローニングし、E. coli株Rosetta 2(DE3)pLysSに別々に形質転換した。発現のために、細胞を、1%グリセロール(+100 µg/mlアンピシリン及び34 µg/mlクロラムフェニコール)を補充した自己誘導培地中で2時間37にて増殖させた後、温度を30に低下させ、一晚インキュベートした。採集した細胞ペレットをBugBusterタンパク質抽出試薬(Merck Millipore)で溶解させた。封入体ペレットを、遠心分離により回収し、Triton緩衝液(50 mM Tris-HCl pH8.1、0.5% Triton-X100、100mM NaCl、10mM NaEDTA)中で2回洗浄し、最後に界面活性剤フリー緩衝液(50mM Tris-HCl pH8.1、100mM NaCl、10 mM NaEDTA)中に再懸濁した。

【0064】

リフォールディングについては、封入体を先ず混合し、可溶化/変性緩衝液(6 M グアニジン-塩酸、50mM Tris HCl pH8.1、100mM NaCl、10mM EDTA、20mM DTT)中に希釈し、続いて30分間37にてインキュベートした。次いで、リフォールド緩衝液(100 mM Tris pH8.1、800又は400mM L-アルギニンHCl、2 mM EDTA、4 M 尿素、6.5 mM システアミン塩酸及び1.9mM シスタミン二塩酸)中に更に希釈することによりリフォールディングを開始する。リフォールドした混合物を、1 Lあたり10 LのH₂Oに対して18~20時間5 ± 3にて透析した。その後、透析緩衝液を10mM Tris pH8.1(10 L)と2回交換し、透析を更に15時間継続した。次いで、透析混合物を0.45 µmセルロースフィルターで濾過した。次に、サンプルを、POROS(登録商標) 50HQアニオン交換カラムにアプライし、結合したタンパク質を、20mM Tris pH 8.1中0~500mM NaClのグラジエントで6カラムボリュームにわたって溶出させた。ピーク画分をSDS PAGEにより同定した後、プールし、濃縮した。次いで、濃縮サンプルを、ダルベッコPBS緩衝液で予め平衡化させたSuperdex(登録商標)200 Increase 10/300 GLゲル濾過カラム(GE Healthcare)に適用した。ピーク画分をプールし、濃縮した。

【0065】

b) 可溶性WT TCRの生物物理学的特性決定

可溶性TCRのVVVGADGVGK - HLA-A*11複合体への結合を、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて評価した。結合特異性は、非変異KRASペプチドVVVGAGGVGKと、高い配列相同性を有し及び/又はアラニンスキャニング法により特定される同じ結合モチーフを有する追加のペプチドとの交差認識を測定することにより決定した。種々の長さの共通に提示されるHLA-A11ペプチドの更なるプールに対する交差反応性も評価した(CPmixと呼ぶ)。

先ず、短縮化されビオチン化されたHLA-A11重鎖及びヒト 2-ミクログロブリン(2 m)を、E. coliから封入体として調製し、既述のようにリフォールドさせて精製した(Garbo czi, Hung, & Wiley, 1992; O'Callaghanら, 1999)。その後、ビオチン化ペプチド - HLAモノマーを、ストレプトアビジン結合CM-5シリーズS センサチップに固定した。平衡結合定数は、約500応答単位(RU)のペプチド - HLA複合体を被覆したフローセル上に10~30 µl/分の定流量で注入した可溶性TCRの系列希釈物を用いて決定した。平衡応答は、各TCR濃度について、ペプチド - HLAを含まないコントロールフローセルでのバルク緩衝液応答を減算して規格化した。K_D値は、Prism 8ソフトウェア及びLangmuir結合等温式 結合 = C × Max / (C + K_D) (式中、「結合」は注入したTCRの濃度Cでの平衡結合(RU)であり、Maxは最大結合である)を用いる非線形曲線フィッティングにより得る。全ての測定は、0.005%界面活性剤P20を補充したダルベッコPBS緩衝液中で25にて行う。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

結果

可溶性WT TCRと各種ペプチド - HLA-A11複合体との相互作用の結合特性を以下に示す。

【表 3】

タンパク質	ペプチド	親和性 K_D (μM)
KRAS G12D (10 マー)	VVVGADGVGK	70
KRAS G12D (9 マー)	VVGADGVGK	NB
KRAS WT	VVVGAGGVGK	NB
KRAS G12C	VVVGACGVGK	NB
ERAS	VVVGASGVGK	NB
RRAS	VVVGGGGVGK	NB
MRAS	VVVGDDGVGK	NB
DIRAS2	VVFGAGGVGK	NB
RAP1A	VVLGSGGVGK	NB
A11-10-CPmix01	10 のデカマーペプチド	NB
A11-10-CPmix02	10 のデカマーペプチド	NB
A11-9-CPmix01	8つのノナマーペプチド	NB

NB=結合なし

【 0 0 6 7 】

これらデータは、WT TCRがVVVGADGVGK - HLA-A*11複合体に特異的に結合でき、変異KRASペプチドと非変異KRASペプチドとを識別することができることを示している。さらに、幾つかの追加のペプチド(高レベルの配列相同性を有するペプチドを含む)への結合は検出されなかった。

【 0 0 6 8 】

実施例 2 - 高親和性TCR及びTCR - 抗CD3融合タンパク質の作製

実施例 1 に記載の可溶性WT TCRをテンプレートとして使用し、当技術分野で公知のファージディスプレイ及びランダム変異誘発技術を用いて、ペプチドHLA複合体に関するTCRの結合親和性を増大させる変異を特定した(例えば、Liら、Nat Biotechnol.2005 Mar; 23(3):349-54を参照)。非変異KRASペプチドを、ファージディスプレイプロセスの間の除外に使用した。続いて、高親和性TCRを、抗CD3 scFVに融合した可溶性TCRを含む二重特異性融合タンパク質として調製した。

a) TCR - 抗CD3融合タンパク質の調製

TCR 鎖を抗CD3単鎖抗体とリンカーを介して融合させたことを除き、実施例 1 において可溶性TCRについて記載したものと同一プロセスに従った。また、リフォールディング工程における酸化還元試薬の濃度は、1 mMシスタミン二塩酸、10mMシステアミン塩酸であった。最後に、カチオン交換工程を、アニオン交換工程後に付加した。この場合、アニオン交換のピーク画分を40mM MES(pH6.2)中に20倍希釈し、POROS(登録商標) 50 HSカチオン交換カラムにアプライした。結合タンパク質を、40mM MES中0 ~ 500mM NaClのグラジエントを用いて溶出させた。ピーク画分をプールし、200mM Tris pH8.1に調整後、濃縮し、ゲル濾過マトリクスに直接アプライした。

【 0 0 6 9 】

b) TCR - 抗CD3融合タンパク質の生物物理学的特性決定

結合分析を、実施例 1 に記載したものに類似するSPR法を用いて行った。高親和性相互作用を除いて、結合パラメータは、単一サイクル速度論分析により決定した。5つの異なる濃度の可溶性TCR又は融合タンパク質を、約50 ~ 200RUのペプチド - HLA複合体を被覆したフローセル上に50 ~ 60 μl /分の流速で注入した。代表的には、60 ~ 200 μl の可溶性TCR又は融合分子を2 ~ 100nMの最高濃度で注入し、他の4つの注入については2倍系列希釈物を用いた。最低濃度を先ず注入した。解離相を測定するため、10%の解離が生じるまで、代表的には1 ~ 3時間後まで、緩衝液を注入した。速度論パラメータは製造業者のソフトウェアを用いて算出した。半減期の算出を可能とするため、解離相を一次指数関数的減衰式にフィッティングした。平衡定数 K_D は k_{off}/k_{on} から算出した。

【 0 0 7 0 】

【表 4】

TCR-CD3 融合体	K _D (pM)	k _{on} (ka) (1/Ms)	k _{off} (kd)	t _{1/2} (h)	親和性ウィンドウ K _D WT/K _D G12D
a96b35U28	66	1.55E+05	1.02E-05	19	>3000
a96b35U	46	2.15E+05	9.93E-06	19	>3000
a95b9U28	87	1.11E+05	9.63E-06	20	>3000
a95b9U	70	1.39E+05	9.77E-06	20	>3000
a41b9U28	172	5.61E+04	9.63E-06	20	>3000
a41b9U	168	5.72E+04	9.63E-06	20	>3000

これらデータは、高親和性バリエーションがVVVGADGVGK - HLA-A*11複合体への結合特異性を保持し、変異KRASペプチドと非変異KRASペプチドとを識別できることを示している。

10

【0071】

実施例3 - 可溶性TCR - 抗CD3融合タンパク質の細胞内解析

可溶性TCR - 抗CD3融合タンパク質は強力に特異的なT細胞活性化を媒介する

a) ペプチドパルスした細胞

TCR - 抗CD3融合タンパク質を、変異体G12Dペプチド又はWTペプチドのいずれかでパルスした標的細胞の存在下で、T細胞活性化を媒介する能力について試験した。

T細胞活性化はIFN γ 放出を用いて評価し、ELISPOTアッセイキットを用いて検出した。HLA-A11陽性SUP-B15細胞を標的細胞として用い、10 μ Mのペプチドでパルスした。ドナー血液から得たHLA-A11+ PBMCをエフェクター細胞として用いた。エフェクターとターゲットとの比は1:1であった。ヒトIFN γ ELISPOTキット(BD Biosciences)を製造業者の指示に従って用いてアッセイを行った。簡潔には、ELISpotプレートを、IFN γ 抗体で、アッセイの1~7日前にコートした。アッセイ当日、ELISPOTプレートを100 μ lのアッセイ培地(R10)でブロックした。ブロックの除去後、標的細胞を50 μ l中で50,000/ウェルにてプレートした融合タンパク質を、滴定して、予想される生物学的活性範囲(代表的には、最高濃度10nMの対数又は半対数希釈率)にわたる最終濃縮物を得て、50 μ l体積にてウェルに加えた。エフェクター細胞を液体窒素から解凍して計数し、50 μ l中に40~50,000細胞/ウェルでプレートした(各実験に用いる正確な細胞数は、ドナー依存性であり、当該アッセイに適切な範囲内の応答を生じるように調整され得る)。各ウェルの最終体積をR10で200 μ lにした。プレート/細胞を一晩培養し、翌日にプレートを洗浄し、製造業者の指示に従ってアッセイし、室温で少なくとも2時間乾燥させた後、Immunospotソフトウェア(Cellular Technology Limited)を備えるCTL分析装置を用いてスポットを計数した。用量応答曲線を、PRISMソフトウェアを使用してプロットした。

20

30

コントロールは、i)標的及び/又はエフェクターのみ、ii)エフェクター及び10nM TCR - 抗CD3融合体を用いて調製したサンプルを含んでいた。

【0072】

結果

本発明のTCR - 抗CD3融合タンパク質は、変異体Krasペプチド(VVVGADGVGK)HLA-A*11複合体を提示する細胞の存在下で、強力に特異的なT細胞活性化をもたらした。各場合において、変異体ペプチドとWTペプチドとの間でT細胞活性化に必要な濃度に少なくとも100倍の差が存在し、TCR - 抗CD3融合タンパク質は変異型ペプチドとWTペプチドを十分に識別できることが示された。5つのTCR - 抗CD3融合タンパク質のグラフを図4に示す。

40

【0073】

b) 細胞株

TCR - 抗CD3融合タンパク質によるT細胞活性化を、さらに、抗原について陽性又は陰性のいずれかである細胞株を用いて更に試験した。

本実施例では、次のヒト癌細胞株を標的細胞として用いた：

- ・ Panc-1xA11 2M(膵臓)抗原陽性(KRAS G12D陽性；HLA-A11及び 2Mを形質導入)
- ・ CL40(結腸直腸)抗原陽性(KRAS G12D陽性)

50

- ・ SK-Mel-28(メラノーマ)抗原陰性(wt KRAS陽性)
- ・ NCI-H2030(肺)抗原陰性(KRAS G12C陽性)。

細胞株を、6点の濃度範囲のTCR - 抗CD3融合タンパク質で処理し、ドナー血液から得たHLA-A11+ PBMCと、エフェクター対ターゲット比0.8 : 1で共培養した。IFN γ 放出を、上記のようにELISPOTアッセイにより測定した。

【0074】

結果

本発明のTCR - 抗CD3融合タンパク質は、変異体KRASペプチドを天然に提示する細胞の存在下で、強力なT細胞活性化を媒介し、EC50値はピコモル範囲(1000pM)である。WTペプチド又は代替の変異体ペプチドを提示する細胞株は、1nM以下のTCR - 抗CD3融合体濃度で、T細胞活性化をほとんど又は全く生じなかった。2つのTCR - 抗CD3融合タンパク質のグラフを図5に示す。

10

【0075】

c) 可溶性TCR - 抗CD3融合タンパク質は癌細胞株の強力で特異的な殺傷を媒介する

TCR - 抗CD3融合タンパク質を、抗原について陽性又は陰性のいずれかである癌細胞株のT細胞媒介殺傷を駆動する能力について試験した。

本実施例では、CL40及びSK-Mel-28をそれぞれ陽性標的細胞及び陰性標的細胞として用いた。標的細胞を、7点の濃度範囲のTCR - 抗CD3融合タンパク質で処理し、HLA-A11 + PBMCと共に、カスパーゼ感受性緑色蛍光プローブ存在下で、IncuCyte ZOOMプラットフォームを使用して72時間共培養した。画像を2時間ごとに取得し、赤色蛍光標的細胞の再指向化T細胞による殺傷を検出し、IncuCyte ZOOMソフトウェアを用いて解析した。PRISMソフトウェアを用いて用量応答曲線をプロットし、IC50値を算出した。

20

【0076】

結果

抗原陽性細胞の存在下での各TCR - 抗CD3融合タンパク質についてのIC50値を下表に示す。4つのTCR - 抗CD3融合タンパク質のグラフを図6に示す。

【表5】

TCR-抗CD3融合体	IC50 (pM)	R ²
a95b9	122.6	0.8993
a95b9U28	120.6	0.8115
a96b35	112.1	0.7497
a96b35U28	56.6	0.9717
a41b9	240	0.9571
a41b9U28	137.4	0.8942

30

【0077】

これらデータは、本発明のTCR - 抗CD3融合タンパク質が、VVVGADGVGK - HLA-A*11複合体を天然に提示する結腸直腸癌細胞株の強力なT細胞媒介殺傷を駆動することを示す。IC50値はピコモル領域(1000pM)である。SK-Mel-28細胞のT細胞による殺傷は、1nM以下のTCR - 抗CD3融合体濃度では、ほとんど又は全く観察されなかった。

【0078】

実施例4 - TCR - 抗CD3融合タンパク質のさらなる特異性試験

40

TCR - 抗CD3融合タンパク質を更に、正常な健常組織に由来する細胞株のパネルの存在下でT細胞活性化を評価することにより、治療薬としての適性について試験した。

細胞株を、6点の濃度範囲のTCR - 抗CD3融合タンパク質で処理し、ドナー血液から得たHLA-A11+ PBMCと、エフェクター対ターゲット比1 : 1で共培養した。IFN γ 放出を、上記のようにELISPOTアッセイにより測定した。Panc-1xA11及びSK-Mel-28をそれぞれ陽性対照及び陰性対照として用いた。

【0079】

結果

これらデータは、本発明のTCR - 抗CD3融合タンパク質が、1nMの濃度で、種々の正常組織に対して最小限のT細胞活性を生じるか又はT細胞活性を全く生じないことを示す

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C

(72)発明者

ン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 9 2、シーノオー イムノコア リミテッド
 プール、アンドリュウ

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス1 4 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 9 2、シーノオー イムノコア リミテッド

(72)発明者

ベイリー、サラ

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス1 4 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 9 2、シーノオー イムノコア リミテッド

審査官 山 崎 慈恵

(56)参考文献

- WANG, Qiong J. et al. , Cancer Immunology Research , 2016年 , Vol. 4, No. 3 , p.204-214 , DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0188
- BOULTER, J . M. et al. , Protein Engineering Design and Selection , 2003年 , Vol. 16, No. 9 , p.707-711 , DOI: 10.1093/protein/gzg087
- LIDDY, Nathaniel et al. , Nature Medicine , 2012年 , Vol. 18, No. 6 , p.980-987 , DOI: 10.1038/nm.2764
- LI, Yi et al. , Nature Biotechnology , 2005年 , Vol. 23, No. 3 , p.349-354 , DOI: 10.1038/nbt1070
- HOLLER, Phillip D. et al. , Proceedings of the National Academy of Sciences , 2000年 , Vol. 97, No. 10 , p.5387-5392 , DOI: 10.1073/pnas.080078297

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d