

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7476298号
(P7476298)

(45)発行日 令和6年4月30日(2024.4.30)

(24)登録日 令和6年4月19日(2024.4.19)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)		C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)		C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	

請求項の数 40 (全125頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-506617(P2022-506617)
 (86)(22)出願日 令和2年7月31日(2020.7.31)
 (65)公表番号 特表2022-541349(P2022-541349
 A)
 (43)公表日 令和4年9月22日(2022.9.22)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2020/071660
 (87)国際公開番号 WO2021/023658
 (87)国際公開日 令和3年2月11日(2021.2.11)
 審査請求日 令和4年8月25日(2022.8.25)
 (31)優先権主張番号 102019121007.0
 (32)優先日 令和1年8月2日(2019.8.2)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 ドイツ(DE)
 (31)優先権主張番号 62/882,131
 (32)優先日 令和1年8月2日(2019.8.2)

最終頁に続く

(73)特許権者 506258073
 イマティクスバイオテクノロジーズゲ
 ーエムベーハー
 ドイツ, 72076 テュービンゲン,
 パウル・エンリヒ・シュトラーセ 15
 (74)代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74)代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74)代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74)代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美
 (74)代理人 100221545
 弁理士 白江 雄介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 MAGE-Aに特異的に結合する抗原結合タンパク質

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

一緒に2つの抗原結合部位を形成する第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を含んでなる、抗原結合タンパク質であって、

前記第1のポリペプチド鎖が、式、

V₃ - L₁ - V₄ [I]

(式中、V₃は抗体可変軽鎖ドメインであり；V₄は配列番号62のアミノ酸配列を含む相補性決定領域(CDR)1、配列番号65のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号71のアミノ酸配列を含むCDR3を含むT細胞受容体(TCR)可変ドメインであり；L₁はリンカーである)によって表わされる構造を含み、

前記第2のポリペプチド鎖が、式、

V₅ - L₃ - V₆ [II]

(式中、V₅は配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号35のアミノ酸配列を含むCDR3を含むTCR可変ドメインであり；V₆は抗体可変重鎖ドメインであり；L₃はリンカーである)によって表わされる構造を含み、

および

前記抗体可変軽鎖ドメイン(V₃)と前記抗体可変重鎖ドメイン(V₆)が一緒にヒトTCR-CD3複合体に特異的に結合する1つの抗原結合部位を形成し、前記TCR可変ドメイン(V₄)およびTCR可変ドメイン(V₅)が一緒にヒト主要組織適合遺伝子

複合体（MHC）タンパク質との複合体において、配列番号1のアミノ酸配列KVLEH
VVRVからなるMAGE-A抗原ペプチドに特異的に結合する1つの抗原結合部位を形成し、

V₃が、配列番号159のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；

V₄が、配列番号150のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；

V₅が、配列番号151のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み；および

V₆が、配列番号160のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、抗原結合タンパク質。 10

【請求項2】

前記第1のポリペプチド鎖が、式、

V₃-L₁-V₄-L₅-F_{C1}[III]

によって表わされる構造を含み、

前記第2のポリペプチド鎖が、式、

V₅-L₃-V₆-L₆-F_{C2}[IV]

によって表わされる構造を含む

(式中、V₃、L₁、V₄、V₅、L₃およびV₆は、請求項1で定義されるようであり、L₅およびL₆はリンカーであり存在しましたは存在せず、F_{C1}およびF_{C2}はFc-ドメインであり、F_{C1}およびF_{C2}は同じかまたは異なる)、請求項1に記載の抗原結合タンパク質。 20

【請求項3】

F_{C1}が配列番号112のアミノ酸配列を含み、F_{C2}が配列番号113のアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項4】

V₃およびV₆がヒト化されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項5】

前記ヒトMHCタンパク質がHLA-A^{*}02である、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。 30

【請求項6】

V₃が、配列番号159のアミノ酸配列を含む；および

V₆が、配列番号160のアミノ酸配列を含む、

請求項1～5のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項7】

V₅が、FR1-a、FR2-a、FR3-a、およびFR4-aからなる群から選択される1つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

- FR1-aが、配列番号83のアミノ酸配列またはそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、

- FR2-aが、配列番号84のアミノ酸配列またはそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、

- FR3-aが、配列番号85のアミノ酸配列またはそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、および/または

- FR4-aが、配列番号86のアミノ酸配列またはそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、並びに

V₄が、FR1-b、FR2-b、FR3-b、およびFR4-bからなる群から選択される1つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

- FR1-bが、配列番号87のアミノ酸配列またはそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

- F R 2 - b が、配列番号 8 8 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、
- F R 3 - b が、配列番号 8 9 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、および / または
- F R 4 - b が、配列番号 9 0 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 8】

前記フレームワーク領域が、

- F R 1 - a の 1 9 位でのアミノ酸置換、
- F R 1 - a の 1 9 位でのアミノ酸置換であって、前記アミノ酸置換が S 1 9 A または S 1 9 V、
- F R 2 - a の 4 8 および / または 5 0 位でのアミノ酸置換、
- F R 2 - a の 4 8 および / または 5 0 位でのアミノ酸置換であって、4 8 位での前記アミノ酸置換が A 4 8 K および / または 5 0 位での前記アミノ酸置換が L 5 0 P、
- F R 2 - b の 4 6 、 4 7 および / または 5 4 位でのアミノ酸置換、
- F R 2 - b の 4 6 、 4 7 および / または 5 4 位でのアミノ酸置換であって、4 6 、 4 7 および / または 5 4 位での前記アミノ酸置換は、それぞれ M 4 6 P 、 M 4 7 G 、および I 5 4 F 、
- F R 3 - b の 6 6 位でのアミノ酸置換、
- F R 3 - b の 6 6 位でのアミノ酸置換であって、6 6 位での前記アミノ酸置換が I 6 6 C、

を含んでなるアミノ酸置換群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含んでなり、並びに

置換の位置が I M G T 命名法に従って付与される、請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

V 5 が、F R 1 - a 、 F R 2 - a 、 F R 3 - a 、 および F R 4 - a からなる群から選択される 1 つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

- F R 1 - a が、配列番号 9 1 のアミノ酸配列、または配列番号 9 1 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、
- F R 1 - a が、配列番号 9 1 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 1 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 1 9 V を含んでなる、
- F R 2 - a が、配列番号 9 2 のアミノ酸配列、または配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、
- F R 2 - a が、配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 4 8 K を含んでなる、
- F R 2 - a が、配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 4 8 K および 5 0 位のアミノ酸置換を含んでなる、
- F R 2 - a が、配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 2 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 4 8 K および L 5 0 P を含んでなる、
- F R 3 - a が、配列番号 8 5 のアミノ酸配列または配列番号 8 5 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、および / または
- F R 4 - a が、配列番号 8 6 のアミノ酸配列または配列番号 8 6 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、並びに

V 4 が、F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、 および F R 4 - b からなる群から選択される 1 つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

- F R 1 - b が、配列番号 8 7 のアミノ酸配列または配列番号 8 7 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

- F R 2 - b が、配列番号 9 3 のアミノ酸配列、または配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、

- F R 2 - b が、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 5 4 F を含んでなる、

- F R 2 - b が、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 5 4 F、および 4 6 および / または 4 7 位でのアミノ酸置換を含んでなる、

- F R 2 - b が、配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 3 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 5 4 F、および 4 6 および / または 4 7 位でのアミノ酸置換を含んでなり、4 6 および / または 4 7 位でのアミノ酸置換は、それぞれ M 4 6 P および / または M 4 7 G である、

- F R 3 - b が、配列番号 8 9 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 8 9 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列、または配列番号 9 4 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 9 4 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、

- F R 3 - b が配列番号 9 4 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記配列番号 9 4 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列は、アミノ酸 6 6 C を含む、および / または

- F R 4 - b が、配列番号 9 0 のアミノ酸配列、または配列番号 9 0 と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 1 0】

V 5 が、F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a からなる群から選択される 1 つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

F R 1 - a が、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、

F R 2 - a が、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む、

F R 3 - a が、配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む、および / または

F R 4 - a が、配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含む、並びに

V 4 が、F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b からなる群から選択される 1 つまたは複数のフレームワーク領域を含み、

F R 1 - b が、配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む、

F R 2 - b が、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、

F R 3 - b が、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む、および / または

F R 4 - b が、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 1 1】

V 5 が、フレームワーク領域 F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a を含み、

F R 1 - a が、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、

F R 2 - a が、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む、

F R 3 - a が、配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む、および

F R 4 - a が、配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含む、並びに

V 4 が、フレームワーク領域 F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b を含み、

F R 1 - b が、配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む、

F R 2 - b が、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、

F R 3 - b が、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む、および

F R 4 - b が、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 1 2】

V 3 が、配列番号 1 5 9 のアミノ酸配列を含む；

V 4 が、配列番号 1 5 0 のアミノ酸配列を含む；

10

20

30

40

50

V₅が、配列番号151のアミノ酸配列を含む；および

V₆が、配列番号160のアミノ酸配列を含む、

請求項1～11のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項13】

L₁およびL₃がそれぞれ別々にG G G S G G G Gのアミノ酸配列（配列番号96）を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項14】

前記第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み、

前記第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、

請求項1～13のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項15】

第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列を含み、

第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列を含む、

請求項1～14のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項16】

前記第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列からなり、

前記第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列からなる、

請求項15に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項17】

前記第1のポリペプチドと前記第2のポリペプチドがジスルフィド結合により共有結合している、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項18】

一緒に2つの抗原結合部位を形成する第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を含む抗原結合タンパク質であって、

前記第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列を含み、

前記第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列を含み、

一方の抗原結合部位はヒトT C R - C D 3複合体に特異的に結合し、他方の抗原結合部位はヒト主要組織適合遺伝子複合体（M H C）タンパク質H L A - A * 0 2との複合体中のアミノ酸配列K V L E H V V R V（配列番号1）からなる抗原ペプチドに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

20

【請求項19】

一緒に2つの抗原結合部位を形成する第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を含む抗原結合タンパク質であって、

前記第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列からなり、

前記第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列からなり、

一方の抗原結合部位はヒトT C R - C D 3複合体に特異的に結合し、他方の抗原結合部位はヒト主要組織適合遺伝子複合体（M H C）タンパク質H L A - A * 0 2との複合体中のアミノ酸配列K V L E H V V R V（配列番号1）からなる抗原ペプチドに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

30

【請求項20】

一緒に2つの抗原結合部位を形成する第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖からなる抗原結合タンパク質であって、

前記第1のポリペプチド鎖は、配列番号136のアミノ酸配列を含み、

前記第2のポリペプチド鎖は、配列番号137のアミノ酸配列を含み、

一方の抗原結合部位はヒトT C R - C D 3複合体に特異的に結合し、他方の抗原結合部位はヒト主要組織適合遺伝子複合体（M H C）タンパク質H L A - A * 0 2との複合体中のアミノ酸配列K V L E H V V R V（配列番号1）からなる抗原ペプチドに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

40

50

【請求項 2 1】

一緒に 2 つの抗原結合部位を形成する第 1 のポリペプチド鎖および第 2 のポリペプチド鎖からなる抗原結合タンパク質であって、

前記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 136 のアミノ酸配列からなり、

前記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 137 のアミノ酸配列からなり、

一方の抗原結合部位はヒト T C R - C D 3 複合体に特異的に結合し、他方の抗原結合部位はヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) タンパク質 H L A - A * 02 との複合体中のアミノ酸配列 K V L E H V V R V (配列番号 1) からなる抗原ペプチドに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

【請求項 2 2】

10

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質をコードする配列を含む単一の単離核酸、複数の単離核酸、または前記単一の単離核酸もしくは複数の単離核酸を含む核酸ベクター。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、または請求項 2 2 に記載の単一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクターを含む組換え宿主細胞であって、前記宿主細胞が、

a) リンパ球、T リンパ球または T リンパ球前駆細胞：または

b) 組換え発現のための細胞または組換え発現のための細胞であって前記組換え発現のための細胞がチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞

20

である宿主細胞。

【請求項 2 4】

宿主細胞が T リンパ球であり、前記 T リンパ球が C D 4 または C D 8 陽性 T 細胞である、請求項 2 3 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、または請求項 2 2 に記載の単一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクターを含む組成物。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を含んでなる医薬組成物であって、前記抗原結合タンパク質が薬学的に許容可能な担体または水性媒体に溶解または分散されている、医薬組成物。

30

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を薬学的に許容可能な担体または水性媒体に溶解または分散する工程を含む、医薬組成物の製造方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の単一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、または請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、安定剤および / または賦形剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 2 9】

40

a . 適切な宿主細胞を提供するステップと、

b . 請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質をコードするコード配列を含んでなる、遺伝子コンストラクトを提供するステップと、

c . 前記遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するステップと、

d . 前記適切な宿主細胞によって前記遺伝子コンストラクトを発現させるステップとを含んでなる、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を生成するインビトロ方法。

【請求項 3 0】

前記適切な宿主細胞から前記抗原結合タンパク質を単離および精製するステップをさらに含んでなる、請求項 2 9 に記載のインビトロ方法。

50

【請求項 3 1】

医薬において使用するための請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

増殖性疾患、癌または MAGEA4 および / もしくは MAGEA8 陽性癌の診断において使用するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

増殖性疾患、癌または MAGEA4 および / もしくは MAGEA8 陽性癌の治療において使用するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記がんが、肺がん、肝臓がん、頭頸部がん、皮膚がん、腎細胞がん、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、脾臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、骨肉腫がん、および食道がんからなる群から選択される、請求項 3 2 または 3 3 に記載の抗原結合タンパク質、单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

【請求項 3 5】

(i) 前期がんが肺がんであり、肺がんが非小細胞肺がん (NSCLC) 、非小細胞肺がん腺がん、扁平上皮細胞非小細胞肺がん (SNSCLC) 、または小細胞肺がん (SCLC) である；

(i i) 前期がんが皮膚がんであり、皮膚がんが黒色腫である；

(i i i) 前期がんが頭頸部がんであり、頭頸部がんが頭頸部扁上皮がん腫 (HNSCC) である；

(i v) 前期がんが肝臓がんであり、肝臓がんが肝細胞がん (HCC) である；または

(v) 前期がんが食道がんであり、食道がんが胃食道接合部がんである、

請求項 3 4 に記載の抗原結合タンパク質、单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

【請求項 3 6】

医薬品の製造のための請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 7】

増殖性疾患、癌または MAGEA4 および / もしくは MAGEA8 陽性癌の診断のための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 8】

増殖性疾患、癌または MAGEA4 および / もしくは MAGEA8 陽性癌の治療のための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、請求項 2 2 に記載の单一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、請求項 2 3 もしくは 2 4 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 もしくは 2 8 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 9】

前記がんが、肺がん、肝臓がん、頭頸部がん、皮膚がん、腎細胞がん、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、脾臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、骨肉腫がん、および食道がんからなる群から選択される、請求項 3 7 または 3 8 に記載の抗原結合タンパク質、单一の単離核酸、

10

20

30

40

50

複数の単離核酸もしくはベクター、宿主細胞、または医薬組成物の使用。

【請求項 40】

(i) 前記医薬品が肺がんの治療のためであり、肺がんが非小細胞肺がん (N S C L C) 、非小細胞肺がん腺がん、扁平上皮細胞非小細胞肺がん (S N S C L C) 、または小細胞肺がん (S C L C) である；

(i i) 前記医薬品が皮膚がんの治療のためであり、皮膚がんが黒色腫である；

(i i i) 前記医薬品が頭頸部がんの治療のためであり、頭頸部がんが頭頸部扁上皮がん腫 (H N S C C) である；

(i v) 前記医薬品が肝臓がんの治療のためであり、肝臓がんが肝細胞がん (H C C) である；または

(v) 前記医薬品が食道がんの治療のためであり、食道がんが胃食道接合部がんである、請求項 39 に記載の抗原結合タンパク質、単一の単離核酸、複数の単離核酸もしくはベクター、宿主細胞、または医薬組成物の使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、黒色腫関連抗原 A (M A G E - A) タンパク質由来抗原に特異的に結合する抗原結合タンパク質に関する。本発明は、特に、主要組織適合性 (M H C) タンパク質との複合体中の配列番号 1 を含んでなるかまたはそれからなる、 M A G E - A 抗原ペプチドに特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。本発明の抗原結合タンパク質は、特に、前記 M A G E - A ペプチド / M H C 複合体に特異的に結合する新規操作 T 細胞受容体 (T C R) の相補性決定領域 (C D R) を含有する。本発明の抗原結合タンパク質は、がん性疾患を発現する M A G E - A の診断、治療、および予防に有用である。さらに、本発明の抗原結合タンパク質をコード化する核酸、これらの核酸を含んでなるベクター、抗原結合タンパク質を発現する組換え細胞、および本発明の抗原結合タンパク質を含んでなる、医薬組成物が提供される。 20

【背景技術】

【0002】

M A G - 0 0 3 ペプチドとしても知られている、アミノ酸配列「 K V L E H V V R V 」 (配列番号 1) の M A G E - A 腫瘍抗原は、 M A G E - A 4 (アミノ酸 2 8 6 ~ 2 9 4) および M A G E - A 8 (アミノ酸 2 8 8 ~ 2 9 6) の H L A - A * 0 2 : 0 1 拘束性細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) エピトープである (非特許文献 1) 。 M A G E - A 4 および M A G E - A 8 は、どちらもタンパク質であり、 M A G E - A 遺伝子ファミリーのメンバーである。 M A G E - A 8 および - A 4 の機能は不明であるが、胎芽発育および腫瘍形質転換、または腫瘍進行の側面において役割を果たしてもよい。これらのタンパク質について、複数の選択的スプライシング変異型が同定されている。配列番号 1 に記載の M A G E - A 抗原は、腫瘍で発現されるが精巣および胎盤を除く正常組織では発現されない、がん / 精巣 (C T) 抗原に属する。例えば、 M A G E - A 4 タンパク質および m R N A の発現は、様々ながらんの発症および予後に関連付けられている。主要組織適合性複合体 (M H C) 分子によって提示される、 M A G E - A などのペプチド、特に M A G E - A 4 および / または M A G E - A 8 由来ペプチド「 K V L E H V V R V 」は、 T C R によって結合されてもよく、したがって例えば、 T 細胞ベースの免疫療の標的である。したがって、 M A G E - A 抗原抗原およびそれらのエピトープペプチドは、腫瘍免疫療法の試験で使用されている。 30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】 Z h e n g - C a i J . e t a l . C l i n D e v . I m m u n o l . 2 0 1 0 , 5 6 7 5 9 4

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

がん治療のための分子標的薬の開発が進歩している一方で、当該技術分野において、がん細胞に高度に特異的であるが、正常細胞にはそうでない分子を特異的に標的化する、新たな抗がん剤を開発する必要性がなおもある。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

したがって、本発明は、MHCタンパク質との複合体中の配列番号1の腫瘍発現抗原MAGE-Aに特異的な新規抗原結合タンパク質を提供する。

【0006】

国際公開第2017/158103号は、配列番号1のアミノ酸配列K V L E H V V R Vを有するMAGE-A抗原ペプチドとHLAクラスI分子との複合体に結合するTCR、より具体的には天然TCR-R7P1D5などの天然TCR、およびがん性疾患の診断、治療法および予防におけるそれらの使用を開示する。しかし、MHCに提示されたがん抗原に特異的に結合する天然TCRは、MHCに提示されたウイルス抗原に特異的に結合するTCRと比較して、親和性が低い($K_D = 1 - 300 \mu M$)ことが多い。この現象の説明の一部は、胸腺で発達するT細胞が自己ペプチドMHCリガンド上で負に選択され(耐性誘導)、このような自己ペプチドMHCに対して高すぎる親和性を有するT細胞が削除されることであるように見える。この低親和性は、腫瘍免疫逃避の1つの可能な説明であってもよい(Alek sic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec; 42(12): 3174-9)。したがって、養子細胞療法(ACT)の抗原認識コンストラクトとして、または可溶性アプローチの認識モジュールとして使用するために、すなわち二重特異性分子を使用するために、がん抗原に対してより高い親和性で結合するTCR変異型を設計することが望ましいようである(Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep; 21(8): 769-85)。

【0007】

しかし、TCRの親和性を高めることは、副作用のリスクもまた高めことがある。上述したように、自然界では、自己タンパク質である腫瘍関連抗原に対する高親和性TCRは、交差反応性を介した正常組織上に存在する自己ペプチドの認識を回避するために、胸腺選択によって排除される。したがって、その標的配列に対するTCR親和性を単純に増加させると、類似した非がん特異的ペプチドへの親和性も増加する可能性が高く、したがって、交差反応性および健常組織に対する望ましくない細胞傷害性効果のリスクが増加する。これが単なる理論上のリスクではないことは、MAGE-A3を対象とする操作されたTCRについて、痛切に発見されている。特に、これまでに発表された結果では、前臨床試験で交差反応が予測されていなかったにもかかわらず、筋肉タンパク質であるタイチンのペプチドと交差反応する、MAGE-A3を標的化するTCRを発現するように操作されたT細胞を注入された2人の患者において、致死的な毒性が示されている(Linette GP et al. Blood 2013; 122: 863-71, Cameroun BJ, et al. Sci. Transl. Med. 2013; 5: 197-103)。これらの患者は、TCRで操作されたT細胞が重篤で予測不可能なオフターゲットおよび臓器特異的毒性を有し得ることを実証した。

【0008】

したがって、オフターゲットペプチド(「類似ペプチド」とも称される)との交差反応性の低下または減少による高い安全性プロファイルを維持しながら、より高い親和性でそれらの標的に特異的に結合し、したがって標的抗原ペプチドの発現低下を伴う腫瘍細胞または細胞株でさえも標的化できる、TCRまたは抗原結合タンパク質を開発および提供するという、満たされていない医学的ニーズがある。換言すれば、本発明者らは、高い腫瘍選択性を維持しながら、それらの標的ペプチドに対して高い結合親和性を示す抗原結合タンパク質を開発することができた。

10

20

30

40

50

【0009】

さらに、本発明者らによって示されたように、MAGE-A特異的TCR分子TCR R7P1D5は、一本鎖コンストラクトとして、またはT細胞上の表面分子に特異的に結合する部分とMHC-ペプチド複合体に特異的に結合する部分とを含んでなるTCER(以下、「TCER(商標)」分子または「TCER(商標)」)と称される二重特異性形態において、比較的低い溶解性を示す。

【0010】

したがって、TCR技術の進歩にもかかわらず、追加的ながん治療法、特にがん細胞を効率的に標的化して滅殺する治療法に対する必要性が、依然として存在する。特に、i)所望の生物学的活性を有するMHCタンパク質との複合体中で、配列番号1の腫瘍特異的MAGE-Aペプチドに対して選択的かつ特異的であり、ii)良好な代謝、薬物動態、溶解性、安定性および/または安全性プロファイルを有し、iii)大規模に製造され得る、新規抗原結合タンパク質を開発する必要がある。10

【0011】

したがって、本発明の文脈において、本発明者らは、前記親TCR R7P1D5に由来するCDR変異型を含んでなる、いくつかの抗原結合タンパク質を操作した。これらの抗原結合タンパク質は、ペプチド-MHC複合体に対する結合親和性が増加し、安定性が増加し、および/または溶解性が増加しているため、医療用途に好適である。

【0012】

さらに、本発明者らによって実証されたように、これらの新規抗原結合タンパク質は、低コピー数の標的のがん細胞に効果的に結合して滅殺し、有利には、類似ペプチドに対する交差反応性が低く、高い安全性プロファイルを維持する。20

【0013】

さらに、これらの新規抗原結合タンパク質は、特にTCER(商標)分子の形態で、腫瘍細胞に対する高い細胞傷害性を示す。例えば、TCER(商標)分子の形態にある新規抗原結合タンパク質では、NCI-H1755、Hs695T細胞、およびU2OSに対する最大半量有効濃度(EC₅₀)は、細胞に対して1~300pM、1pM~100pMの範囲、より具体的には、1pM~20pMの間である。さらに、本発明の抗原結合タンパク質のEC₅₀は、腫瘍細胞株Hs695Tに対して、初代細胞株などの健常組織の細胞株では100倍、好ましくは1000倍以上高く、その安全性の高さが実証される。30

【0014】

さらに、本発明者らは、これらの新規抗原結合タンパク質、特にTCER(商標)分子について、生体内において、低用量であっても治療薬マウスモデルにおける有意な腫瘍増殖阻害を実証した。

【0015】

したがって本発明は、MHCタンパク質との複合体中のMAGE-A由来抗原ペプチドに特異的な抗原結合タンパク質に関連し、前記抗原結合タンパク質は、例えば、天然TCR R7P1D5と比較して、発現および/または精製中の凝集の減少など、安定性が増加している。さらに、前記抗原結合タンパク質は、例えば、細胞株NCI-H175、Hs695T細胞、およびU2OS細胞に対して、高い細胞傷害性を有する。40

【0016】

要約すると、本発明者らの驚くべき発見は、とりわけ、技術分野に以下の利点を提供する:(i)健常組織上の類似ペプチドとのTCRまたは抗原結合タンパク質の交差反応性的減少、および高い腫瘍選択性の維持;(ii)TCRまたは抗原結合タンパク質の安全性プロファイルの向上;(iii)TCRまたは抗原結合タンパク質が、オフターゲットおよび腫瘍外の細胞傷害性を低減させること;および(iv)改善された特異的、選択的、および安全なTCRまたは抗原結合タンパク質の提供。

【0017】

定義

本明細書における「抗原結合タンパク質」という用語は、少なくとも1つの抗原、特に

10

20

30

40

50

本発明の文脈で定義される抗原に結合できる、ポリペプチドまたは結合タンパク質を指す。好ましい実施形態では、前記抗原結合タンパク質は、例えば、二重特異性抗体から知られているように、2つの異なる抗原に同時に結合できる。本発明の抗原結合タンパク質は、本発明の文脈で定義されるように、元来T C Rに由来する少なくとも6つのC D Rを含んでなる。特定の実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、元来T C Rに由来する、本発明の文脈で定義される少なくとも1つの可変ドメインと、少なくとも1つの可変ドメインとを含んでなる。

【 0 0 1 8 】

「ドメイン」は、配列相同性に基づいて定義され、しばしば特定の構造的または機能的実体に関連する、タンパク質の領域である。このようなドメインの例は、抗体軽鎖の可変軽鎖ドメイン、抗体重鎖の可変重鎖ドメイン、抗体重鎖のC_H1、C_H2、およびC_H3ドメイン（定常ドメイン）、T C Rの鎖の可変ドメイン、またはT C Rの鎖の可変ドメインである。

【 0 0 1 9 】

「抗原」または「標的抗原」という用語は、本明細書の用法では、少なくとも1つの抗原結合部位によって結合され得る分子、または分子または複合体の一部を指し、その中では、前記1つの抗原結合部位は、例えば、従来の抗体、従来のT C R、および/または本発明の抗原結合タンパク質に存在する。

【 0 0 2 0 】

本発明の抗原結合タンパク質によって特異的に結合される抗原は、配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるM A G E - A 抗原ペプチドであり、より具体的には、M H C タンパク質との複合体中にある配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるM A G E - A 抗原ペプチドである。

【 0 0 2 1 】

「エピトープ」という用語は、本明細書の用法では、「構造的エピトープ」および「機能的エピトープ」という用語を含んでなる。「構造的エピトープ」は、抗原に結合したときに抗原結合タンパク質によってカバーされる、例えば、ペプチド - M H C 複合体などの抗原のアミノ酸である。典型的には、抗原結合タンパク質のアミノ酸の任意の原子から5

以内にある、抗原の全てのアミノ酸がカバーされていると見なされる。抗原の構造的エピトープは、X線結晶学またはN M R 分析をはじめとする、当該技術分野で知られている方法によって判定されてもよい。抗体の構造的エピトープは、典型的には、20～30個のアミノ酸を含んでなる。T C Rの構造的エピトープは、典型的には、20～30個のアミノ酸を含んでなる。「機能的エピトープ」は、構造的エピトープを形成するアミノ酸のサブセットであり、H結合、塩橋、芳香族スタッキングまたは疎水性相互作用などの非共有結合を直接形成することによって、または抗原の結合コンフォメーションを間接的に安定化させることによって、本発明の抗原結合タンパク質との界面形成に重要な抗原のアミノ酸を含んでなり、例えば、変異スキャニングによって判定される。典型的には、抗体が結合する抗原の機能的エピトープは、4～6個のアミノ酸を含んでなる。典型的には、ペプチド - M H C 複合体の機能的エピトープは、ペプチドの2～6個のアミノ酸と、M H C 分子の2～7個のアミノ酸とを含んでなる。M H C I 提示ペプチドは典型的には、8～10アミノ酸長を有するので、各所とのペプチドのアミノ酸のサブセットのみが、ペプチド - M H C 複合体の機能的エピトープの一部である。本発明の文脈において、エピトープ、特に本発明の抗原結合タンパク質によって結合される機能的エピトープは、結合界面の形成に必要とされる抗原のアミノ酸、したがって配列番号1のM A G E - A 抗原ペプチドの少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つのアミノ酸を含んでなる、機能的エピトープを含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 0 2 2 】

「M A G E - A 」または「黒色腫関連抗原A」サブファミリータンパク質は、分子レベルで同定された最初の腫瘍関連抗原であった(v a n d e r B r u g g e n P , e t

10

20

30

40

50

a 1 . S c i e n c e . 1 9 9 1 ; 2 5 4 : 1 6 4 3 - 4 7)。M A G E - A は、X染色体のq 2 8 領域にある1 2 個の遺伝子(M A G E - A 1 ~ M A G E - A 1 2)のサブファミリーである。M A G E - A サブファミリータンパク質のメンバーは通常、精巣または胎盤でのみ発現され、それらの制限された発現は、それらが胚細胞の発達において機能していくてもよいことを示唆する。M A G E - A タンパク質は、中枢神経系、脊髄、および脳幹の初期発生でも検出され、M A G E - A タンパク質が神経発生にもまた関与していくてもよいことが明らかにされた。このファミリーのメンバーは、互いに5 0 ~ 8 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードし、全てのM A G E タンパク質は、およそ1 7 0 個のアミノ酸からなる高度に保存されたドメインである、共通のM A G E 相同性ドメイン(M H D)を共有する。がんにおけるM A G E - A タンパク質発現の生物学的機能、および根底にある調節機序は、まだ完全には分かっていない。

10

【0 0 2 3】

「M A G E - A 4」または「黒色腫関連抗原4」タンパク質は、M A G E - A 遺伝子ファミリーのメンバーであり、配列番号9 7 のU n i p r o t 受入れ番号P 4 3 3 5 8 を有する(2 0 1 9年7月8日時点を利用可能)。M A G E - A 4 の局在は、細胞質として記載されている。しかし、M A G E - A 4 染色はまた核内でも検出されており、高分化型がんと低分化型がんとの対比では、核と細胞質の間で示差的分布があった(S a r c e v i c B et . a l . , 2 0 0 3 , O n c o l o g y 6 4 , 4 4 3 - 4 4 9)。M A G E - A 4 は、雄生殖細胞マーカーとして使用される。これは、精原細胞では発現されないが、前精原細胞および成熟胚細胞で発現される(M i t c h e l l et a l . , 2 0 1 4 , M o d . P a t h o l . 2 7 , 1 2 5 5 - 1 2 6 6)。M A G E - A 4 タンパク質およびm R N A の発現は、様々ながんの発症および予後に関連付けられている。

20

【0 0 2 4】

「M A G E - A 8」または「黒色腫関連抗原8」タンパク質は、M A G E - A スーパーファミリーのメンバーであり、配列番号9 8 のU n i p r o t 受入れ番号P 4 3 3 6 1 を有する(2 0 1 9年7月8日時点を利用可能)。

【0 0 2 5】

「M A G E - A 4」と「M A G E - A 8」タンパク質は、B L A S T P 2 . 9 . 0 アルゴリズムを用いたタンパク質配列アラインメントによる判定で、7 2 % の配列同一性を有する(S t e p h e n F . et a l . (1 9 9 7) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2)。さらに、「M A G E - A 4」と「M A G E - A 8」は、どちらもM A G - 0 0 3 ペプチド、すなわち、K V L E H V V R V (配列番号1)を含んでなる。

30

【0 0 2 6】

「主要組織適合性複合体」(M H C)は、脊椎動物の獲得免疫系が異物分子を認識するために不可欠な細胞表面タンパク質のセットであり、これによって組織適合性が決定される。M H C 分子の主な機能は、病原体に由来する抗原に結合し、それらを細胞表面上に提示して適切なT細胞に認識されることである。ヒトM H Cは、H L A (ヒト白血球抗原)複合体(しばしば単にH L A)とも称される。M H C 遺伝子ファミリーは、クラスI、クラスII、クラスIIIの3つのサブグループに分けられる。ペプチドとM H C クラスIの複合体が、適切なT細胞受容体(T C R)を保有するC D 8 陽性T細胞によって認識される一方で、ペプチドとM H C クラスII分子の複合体は、適切なT C Rを保有するC D 4 陽性ヘルパーT細胞によって認識される。C D 8 依存性およびC D 4 依存性の双方のタイプの応答が、抗腫瘍効果と共同して相乗的に寄与するので、腫瘍関連抗原および対応するT細胞受容体の同定および特性評価は、ワクチンおよび細胞療法などのがん免疫療法の開発において重要である。H L A - A 遺伝子は第6染色体の短腕上に位置し、H L A - A のより大きな鎖の構成物をコード化する。H L A - A 鎖の多様性は、H L A 機能の鍵である。この多様性は、集団の遺伝的多様性を促進する。各H L A は、特定の構造のペプチドに対して異なる親和性を有することから、H L A の種類が多いほど、細胞表面上に「提示」される抗原の種類も多くなる。各個人は、それぞれの親から1 タイプずつの最大2

40

50

タイプの HLA - A を発現し得る。一部の個人は、両親から同一の HLA - A を継承し、個々の HLA の多様性が低下する；しかし、大多数の個人は、HLA - A の 2 つの異なるコピーを受け継ぐ。全ての HLA 群が、この同じパターンに従う。換言すれば、各個人は、2432 個の既知の HLA - A 対立遺伝子のうちの 1 つまたは 2 つのみを発現する。

【 0 0 2 7 】

本発明の文脈における MHC クラス I HLA タンパク質は、HLA - A、HLA - B または HLA - C タンパク質、好ましくは HLA - A タンパク質、より好ましくは HLA - A * 02 であってもよい。

【 0 0 2 8 】

「HLA - A * 02」は特定の HLA 対立遺伝子を表し、その中では、文字 A は遺伝子を表し、接尾辞「* 02」は A2 血清型を示す。

【 0 0 2 9 】

MHC クラス I 依存免疫反応においては、ペプチドは腫瘍細胞によって発現される特定の MHC クラス I 分子に結合できるだけでなく、それらはまた、引き続いて特異的 T 細胞受容体 (TCR) を保有する T 細胞によって認識されなくてはならない。

【 0 0 3 0 】

TCR は、シグナル伝達媒介に関する CD3 複合体の不变タンパク質に関連する、免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質である。TCR は

および 形態で存在し、それらは構造的に類似しているが、かなり異なる解剖学的位置とおそらくは機能を有する。天然のヘテロ二量体 TCR および TCR の細胞外部分は、それぞれ 2 つのポリペプチドを含有し、そのそれぞれは膜近位定常ドメインおよび膜遠位可変ドメインを有する。定常ドメインおよび可変ドメインのそれぞれは、鎖内ジスルフィド結合を含む。可変ドメインは、抗体の相補性決定領域 (CDR) に類似した、高度に多型性のループを含有する。TCR 遺伝子治療の使用は、いくつかの現在のハードルを克服する。それは、典型的には対象（患者）自身の T 細胞に所望の特異性を与えて、十分な数の T 細胞を短期間で生成できるようにし、それらの枯渇を回避する。例えば、TCR は効力のある T 細胞（例えば、中央メモリー T 細胞または幹細胞特性を有する T 細胞）に形質導入され、それは移入時に良好な持続性、保存、および機能を確実にしてもよい。TCR 操作 T 細胞は、化学療法または照射によってリンパ球減少症になったがん患者に注入され、効率的な生着ができるようになるが、免疫抑制は阻害する。

【 0 0 3 1 】

本明細書における「TCR」という用語は、TCR およびそれらの断片、ならびに一本鎖 TCR およびそれらの断片、特に単一ドメイン TCR の可変 および ドメイン、ならびにキメラ、ヒト化、二重特異性または多重特異性 TCR を示す。

【 0 0 3 2 】

「TCR の断片」は、無傷または天然の TCR の一部、特に無傷または天然の TCR の抗原結合領域または可変領域を含んでなる。TCR 断片の例としては、V - C_a または V - C などの 、 、 、 鎖の断片またはその一部が挙げられ、このような断片は、対応するヒンジ領域；または V 、 V 、 V 、 V などの单一の可変ドメイン；一本鎖 V - V 断片；TCR 断片から形成される二重特異性 TCR および多重特異性 TCR もさらに含んでなるかもしれない。TCR 断片は、天然に存在する完全長 TCR と比較して同一の機能を發揮し、すなわち断片は、それらの標的ペプチドに選択的かつ特異的に結合する。

【 0 0 3 3 】

「一本鎖 TCR (scTCR)」は、本明細書ではタンパク質を示し、その中では、V と V 、または V と V などの TCR の可変ドメインが、1 つのポリペプチド上に位置する。典型的には、可変ドメインはリンクによって分離され、その中では、前記リンクは、典型的には、例えば、5 ~ 15 個など、5 ~ 20 個のアミノ酸を含む。

【 0 0 3 4 】

例えば、「天然 TCR」という文言で使用される「天然」は、野生型 TCR を指す。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

養子細胞移入（ A C T ）アプローチでは、生成された導入遺伝子 T 細胞が、野生型 鎖および 鎖を有する野生型 T C R と、それぞれの標的抗原 - M H C 複合体に特異的な 鎖および 鎖を有する遺伝子組換え T C R とを発現してもよい。野生型 鎖および 鎖と、遺伝子組換え 鎖および 鎖はどちらも、通常、なおも相互に交差対合できる。この望まれない対合の可能性は「 T C R 誤対合」と称され、 T C R （遺伝子）治療の分野で認識されている問題である。遺伝子組換え T C R または 鎖と、内在性 T C R または 鎖との間で、それぞれ誤対合および不正確な対合が起こると、遺伝子組換え T C R へテロ二量体の表面発現の減少が帰結することがあり、これによって、修飾 T 細胞の機能的結合活性が低下する。さらに、誤対合 T C R を発現して高 I L - 2 条件下で増殖された T 細胞は、前臨床モデルで移植片対宿主病（ G v H D ）を誘発することが実証された。

10

【 0 0 3 6 】

遺伝子組換え T C R および の対合を最適化して誤対合を回避するためのいくつかのストラテジーとしては、以下が挙げられてもよい： 1 . マウス化 T C R : このアプローチでは、ヒト T C R および 定常鎖が対応するマウスドメインで置き換えられる。ヒトとマウスの T C R - C ドメインは高度な相同意を示すが、小さな違いが T C R / C D 3 相互作用の安定性に影響を与え、したがって T C R 表面発現レベルに影響を与える。 2 . システイン修飾 T C R : このアプローチは、構造的に好ましい位置にシステインアミノ酸を導入し、したがって、少なくとも 1 つの追加的なジスルフィド架橋の形成を可能にし、 2 つの T C R 鎖間の正しい対合を促進する。例えば、 T C R 定常鎖中の T 4 8 C および T C R 定常鎖中の S 5 7 C などの部位特異的変異は、 2 つの鎖間結合（すなわち、導入されたジスルフィド架橋 + 内在性膜貫通ジスルフィド架橋（定常ドメインの 9 5 位と 定常ドメインの 1 3 1 位）によって連結される T C R へテロ二量体をもたらす。 3 . ドメイン交換：腫瘍特異的 T 細胞受容体の および 鎖の間で定常ドメインを入れ替え、ドメイン交換（ d s ） T C R を生成する。これらの d s T C R 鎖は、正しく対合すると、 C D 3 タンパク質を動員するのに必要な全てのドメインを保持し、 T 細胞の表面上で発現し、標的抗原との結合時の機能性 T 細胞応答を媒介する。対照的に、 1 つの d s T C R 鎖と 1 つの野生型 T C R 鎖を含有する誤対合 T C R は、 C D 3 の動員、搬出、およびシグナル伝達に必要な重要なドメインを欠いており、したがって有害な自己免疫を媒介できない。 4 . 排他的 T C R へテロ二量体：このアプローチでは、立体力と静電力をを利用して、 T C R および 導入遺伝子間の正しい対合を促進し、同時に外因性と内因性の T C R 鎖および 鎖間の対合を抑制する。一例では、静電荷の必要な変化を得るために、部位特異的変異を使用して、 S 8 5 R が 定常ドメインに、 R 8 8 G が 定常ドメインに導入され、したがって二次構造および三次構造を最小限に歪ませるとされる、「ノブ・インツー・ホール」の構成を相互に生成する。 5 . 各 T C R 鎖が C D 3 分子に融合している、キメラ T C R - C D 3 鎖の使用。 6 . 定義された T C R の V 鎖が、柔軟なペプチドリンカーを使用して 鎖に融合されている、一本鎖 T C R の使用。 7 . 内在性 T C R の発現をノックダウンするための s h R N A 配列またはジンクフィンガースクレアーゼの使用。「ベルクロ」と称される別のアプローチは、ヘテロ二量体状態での好ましい静電相互作用により、 2 つの T C R 鎖を互いに対合できる。すなわち、 2 つのペプチドは、主に単離形態で展開されるが、混合されると優先的に会合し、安定した平行コイルドコイルヘテロ二量体を形成する。このアプローチは、可溶性 T C R を生成するために適用されてもよく、その中では、ペプチドを短縮型 鎖および 鎖にそれぞれ融合させることによって、ヘテロ二量体複合体が優先される。

20

【 0 0 3 7 】

天然 - ヘテロ二量体 T C R は、 鎖と 鎖を有する。各 鎖は可変領域、連結領域、および定常領域を含んでなり、 鎖は通常、可変領域と連結領域の間の短い多様性領域もまた含有するが、この多様性領域は連結領域の一部と見なされることが多い。 T C R 鎖および 鎖の定常領域または C 領域は、それぞれ T R A C および T R B C と称される（ L e f r a n c , (2 0 0 1) , Curr Protoc Immunol Appendix 1 : Appendix 10 ）。本明細書において 可変ドメインおよび 可変ドメ

30

40

50

インと称される各可変領域は、フレームワーク配列に埋め込まれた3つの「相補性決定領域」(CDR)を含んでなり、1つはCDR3と命名された超可変領域である。可変ドメインCDRは、本明細書においてCDRa1、CDRa2、CDRa3と称され、可変ドメインCDRは、本明細書においてCDRb1、CDRb2、CDRb3と称される。それらのフレームワークによって、CDR1およびCDR2配列によって、ならびに部分的に定義されたCDR3配列によって区別される、数タイプの鎖可変(V)領域および数タイプの鎖可変(V)領域がある。Vタイプは、IMGT命名法で一意のTRAV番号によって参照され、Vタイプは、IMGT命名法で一意のTRBV番号によって参照される(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)。免疫グロブリン遺伝子についてより詳しくは、国際IMMUNOGENETICS information system(登録商標)、Lefranc M-P et al(Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43(データベース出版):D413-22;およびhttp://www.imgt.org/)を参照されたい。したがって、従来のTCR抗原結合部位には、および鎖可変領域のそれからのCDRセットを含んでなる、通常、6つのCDRが含まれ、その中では、CDR1およびCDR3配列は、HLAタンパク質に結合するペプチド抗原の認識および結合に関連し、CDR2配列は、HLAタンパク質の認識および結合に関連する。

【0038】

抗体と同様に、「TCRフレームワーク領域」(FR)は、CDRの間に挿入されたアミノ酸配列、すなわち、单一生物種中の異なるTCR間である程度保存されているTCRおよび鎖可変領域の部分を指す。TCRの鎖および鎖は、それぞれ4つのFRを有し、本明細書において、それぞれFR1-a、FR2-a、FR3-a、FR4-a、およびFR1-b、FR2-b、FR3-b、FR4-bと称される。したがって、鎖可変ドメインは、(FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a)と称されてもよく、鎖可変ドメインは、(FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b)と称されてもよい。

【0039】

本発明の文脈において、または鎖またはまたは鎖におけるCDR/FR定義は、IMGT定義に基づいて判定されることになっている(Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org)。したがって、TCRまたはTCR由来ドメインに関連する場合のCDR/FRアミノ酸位置は、前記のIMGT定義に従って示される。好ましくは、第1の可変ドメインのCDR/FRアミノ酸位置のIMGT位置は、TRAV5のIMGT番号付けとの類似性で与えられ、および/または第2の可変ドメインのCDR/FRアミノ酸位置のIMGT位置は、TRBV12-4のIMGT番号付けとの類似性で与えられる。/TCRに関して、「TCR可変ドメイン」という用語は、本明細書の用法ではリーダー領域(L)のないTCR V(TRGV)領域とTCR J(TRGJ)領域との連結を指し、TCR 定常ドメインという用語は、細胞外TRGC領域を指し、またはC末端切断型TRGC配列を指す。同様に、「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダー領域(L)のないTCR V(TRDV)領域とTCR D/J(TRDD/TRDJ)領域との連結を指し、「TCR 定常ドメイン」という用語は、細胞外TRDC領域を指し、またはC末端切断型TRDC配列を指す。

【0040】

「免疫グロブリン」とも称される「抗体」では、2つの重鎖がジスルフィド結合によって互いに連結され、各重鎖はジスルフィド結合によって軽鎖に連結されている。軽鎖には

、ラムダ(λ)およびカッパ(κ)の2タイプがある。抗体分子の機能的活性を決定する5つの主要な重鎖クラス(またはイソタイプ)がある: IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgE。それぞれの鎖は、異なる配列ドメインを含有する。軽鎖は、可変ドメイン(V_L)と定常ドメイン(C_L)との2つのドメインまたは領域を含む。重鎖は、可変ドメイン(V_H)と、3つの定常ドメイン(集合的にC_Hと称される、C_H1、C_H2、およびC_H3)との4つのドメインを含む。軽鎖(V_L)と重鎖(V_H)の双方の可変領域は、抗原への結合認識および特異性を決定する。軽鎖(C_L)と重鎖(C_H)の定常領域ドメインは、抗体鎖の結合、分泌、胎盤通過性、補体結合、およびF_c受容体(F_cR)への結合などの重要な生物学的特性を付与する。Fv断片は、免疫グロブリンのFab断片のN末端部分であり、1つの軽鎖可変部分と1つの重鎖可変部分とからなる。抗体の特異性は、抗体組み合わせ部位(抗体結合部位の同義語)と抗原決定基の間の構造的相補性にある。抗体組み合わせ部位は、主に超可変または相補性決定領域(CDR)からの残基で構成されている。時折、非超可変またはFRからの残基は、全体的なドメイン構造に影響を与え、したがって結合組み合わせ部位に影響を与える。CDRは、天然免疫グロブリン結合部位の天然Fr領域の結合親和性および特異性を一緒に定義するアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれCDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、およびCDR1-H、CDR2-H、CDR3-Hと称される、3つのCDRをそれぞれ有する。したがって、従来の抗体抗原結合部位は、重鎖および軽鎖V領域のそれからのCDRセットを含んでなる6つのCDRを含む。

【0041】

本発明の文脈において、抗体または免疫グロブリンは、IgM、IgD、IgG、IgAまたはIgEである。

【0042】

「抗体フレームワーク領域」(FR)は、CDRの間に挿入されたアミノ酸配列、すなわち、單一生物種の異なる免疫グロブリン間で比較的保存されている、免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれFR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、およびFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと称される、4つのFRをそれぞれ有する。したがって、軽鎖可変ドメインは、(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)と称されてもよく、重鎖可変ドメインは、(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)と称されてもよい。

【0043】

本発明の文脈において、Fcドメイン以外の免疫グロブリン軽鎖または重鎖中のCDR/FRの定義は、IMGT定義に基づいて決定されることになっている(Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1): 55-77; www.imgt.org)。したがって、所与の可変鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸配列と、FR1、FR2、FR3、FR4、およびFR5のアミノ酸配列は、前記のIMGT定義に従って示される。

【0044】

当業者であれば理解できるように、抗体の構造、特に抗体の可変重鎖および軽鎖の構造は、TCRおよび可変ドメイン構造に類似している。したがって、本発明のTCRのCDRは、従来の抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体中にグラフト化され得る。

【0045】

本発明の抗体、TCRまたは抗原結合タンパク質のCDRのアミノ酸配列を知ることにより、当業者は、TCRフレームワーク領域または抗体フレームワーク領域などのフレームワーク領域を容易に判定し得る。しかし、CDRが示されていない場合、当業者は、最初に、TCRのIMGT定義または抗体のIMGT定義に基づいてCDRアミノ酸配列を決定し、次に、フレームワーク領域のアミノ酸配列を決定し得る。

【0046】

10

20

30

40

50

本明細書の用法では、「ヒトフレームワーク領域」は、天然由来ヒト抗体またはヒトT C Rなどの天然由来抗原結合タンパク質のフレームワーク領域と実質的に（約85%以上、特に90%、95%、97%、99%または100%）同一のフレームワーク領域である。

【0047】

「抗体」という用語は、抗体およびそれらの断片、ならびに単一ドメイン抗体およびそれらの断片、特に単一ドメイン抗体の可変重鎖、およびキメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性または多重特異性抗体を意味する。

【0048】

本明細書で言及される「従来の抗体」は、自然から単離された抗体と同じドメインを有し、抗体由来のC D Rおよびフレームワーク領域を含んでなる抗体である。同様に、本明細書で言及される「従来のT C R」は、天然T C RおよびT C R由来のC D Rおよびフレームワーク領域と同じドメインを含んでなる、T C Rである。

10

【0049】

「ヒト化抗体」という用語は、完全にまたは部分的に非ヒト起源であり、ヒトの免疫反応を回避しまたは最小化するために、特に重鎖および軽鎖のフレームワーク領域において特定のアミノ酸を置換するように修飾された抗体を指す。ヒト化抗体の定常ドメインは、主にヒトC_HおよびC_Lドメインである。

【0050】

抗体配列をヒト化するための多くの方法が当該技術分野で公知であり；例えば、A l m a g r o & F r a n s s o n (2 0 0 8) F r o n t B i o s c i . 1 3 : 1 6 1 9 - 1 6 3 3によるレビューを参照されたい。一般的に使用される方法の1つは、C D Rグラフト化、または抗体再形成であり、これは、通常はマウス抗体であるドナー抗体のC D R配列を異なる特異性のヒト抗体のフレームワークスキャフォールドにグラフト化することを伴う。C D Rグラフト化は、C D Rグラフト化非ヒト抗体の結合特異性および親和性、ひいては生物学的活性を低下させることもあるので、親抗体の結合特異性および親和性を保持するために、C D Rグラフト化抗体の選択された位置に復帰変異が導入されてもよい。可能な復帰変異の位置の同定は、文献および抗体データベースで利用可能な情報を使用して実施され得る。C D Rグラフト化および復帰変異の代替のヒト化技術は、表面再構成であり、その中では、非ヒト起源の非表面露出残基が保持される一方、表面残基はヒト残基に改変される。別の代替技術は「ガイド付き選択」(J e s p e r s e t a l . (1 9 9 4) B i o t e c h n o l o g y 1 2 , 8 9 9)として知られ、例えばマウスまたはラット抗体から、親抗体のエピトープおよび結合特性を維持する完全ヒト抗体を誘導するために使用され得る。ヒト化のさらなる方法は、いわゆる4 Dヒト化である。4 Dヒト化プロトコルは、米国特許出願第2 0 1 1 0 0 2 7 2 6 6 A 1号明細書（国際公開第2 0 0 9 0 3 2 6 6 1 A 1号パンフレット）に記載され、ラット抗体の可変軽鎖（V_L）および重鎖（V_H）ドメインのヒト化のために4 Dヒト化を適用した例が、以下に例示される。

20

30

【0051】

キメラ抗体では、ヒト化は典型的には、可変領域配列のフレームワーク領域の修飾を伴う。

40

【0052】

C D Rの一部であるアミノ酸残基は、典型的にはヒト化に関連して改変されないが、特定例では、例えば、グリコシル化部位、脱アミド化部位、異性化部位または望ましくないシステイン残基を除去するために、個々のC D Rアミノ酸残基を改変することが望ましい場合がある。N結合グリコシル化は、トリペプチド配列A s n - X - S e rまたはA s n - X - T h r中のアスパラギン残基にオリゴ糖鎖が結合することによって起こり、式中、XはP r o以外の任意のアミノ酸であってもよい。Nグリコシル化部位の除去は、A s nまたはS e r / T h r残基のいずれかを異なる残基に変異させることによって、特に保存的置換を介して達成されてもよい。アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミド化は、

50

pH および表面露出などの要因に応じて生じ得る。アスパラギン残基は、主に Asn-Gly の配列で存在する場合に特に脱アミドの影響を受けやすく、Asn-Ala などの他のジペプチド配列ではその影響より少ない。したがって、このような脱アミド化部位、特に Asn-Gly が CDR 配列中に存在する場合、典型的には保存的置換によって、関与する残基の 1 つを除去することによって、その部位を除去することが望ましくあってもよい。関与する残基の 1 つを除去するための CDR 配列中の置換もまた、本発明に包含されることが意図される。

【0053】

「抗体の断片」は、無傷抗体の一部、特に無傷抗体の抗原結合領域または可変領域を含んでなる。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、二特異性抗体、および抗体断片から形成される二重抗体および多重特異性抗体が挙げられる。抗体の断片はまた、重鎖抗体またはVHH などの單一ドメイン抗体であってもよい。

10

【0054】

「Fab」という用語は、約 50,000 ダルトンの分子量および抗原結合活性を有する抗体断片を意味し、その中では、IgG を例えれば、パパインなどのプロテアーゼで処理して得られた断片のうち、H鎖の N 末端側の約半分と L鎖全体が、ジスルフィド結合を介して共に結合する。

【0055】

本発明の抗原結合タンパク質に関する「二重特異性」という用語は、少なくとも 2 つの原子価と、2 つの異なる抗原に対する結合特異性とを有し、したがって 2 つの抗原結合部位を含んでなる抗原結合タンパク質を指す。「原子価」という用語は、抗原結合タンパク質の結合部位の数を指し、例えば、二価の抗原結合タンパク質は、2 つの結合部位を有する抗原結合タンパク質に関連する。原子価という用語は、結合部位の数を指すことに留意すべきであり、その中では、それらの結合部位は、同じかまたは異なる標的に結合してもよく、すなわち、二価の抗原結合タンパク質は、单一特異性、すなわち 1 つの標的に結合するか、または二重特異性、すなわち 2 つの異なる標的に結合してもよい。標的は、抗原、標的ペプチド、オフターゲット、すなわち類似ペプチドなどであってもよい。

20

【0056】

本発明の文脈において、少なくとも 1 つの抗原結合部位が TCR に由来することが好ましく、より具体的には、少なくとも 1 つの抗原結合部位が、本発明の文脈で定義される TCR 由来の CDR を含んでなることが好ましい。

30

【0057】

「二重特異性」という用語の本発明の文脈において、抗原結合部位の少なくとも 1 つの特異性が TCR に由来することが好ましく、より特には、少なくとも 1 つの抗原結合部位が、本発明の文脈において定義される TCR 由来の CDR を含んでなることが好ましい。したがって、本発明の文脈における「二重特異性」は、本発明の文脈において定義される CDR を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位、すなわち TCR 由来の CDR と、少なくとも 1 つのさらなる抗原結合部位とを組み合わせた抗原結合タンパク質を指し、その中では、前記少なくとも 1 つのさらなる抗原結合部位は、抗体に由来して、したがって抗体 CDR を含んでなってもよく、またはさらなる TCR に由来し、したがってさらなる TCR の CDR を含んでなってもよい。しかし、好ましい実施形態では、前記のさらなる抗原結合部位は、抗体に由来し、したがって抗体 CDR を含んでなる。

40

【0058】

本明細書における「形態」という用語は、前記抗原結合タンパク質中およびその空間的構成中に存在する、特定の数およびタイプのドメインを含んでなる抗原結合タンパク質を指す。

【0059】

二重特異性形態などの多くの異なる形態は、典型的には、抗体の文脈で当該技術分野で記載され、このような形態としては、典型的には、二特異性抗体、クロスオーバー二重可

50

変ドメイン(C O D V)および/または二重可変ドメイン(D V D)タンパク質が挙げられる。これらの異なる二重特異性抗体の概要およびそれらを生成する方法は、例えば、Brinkmann U. and Kontermann E. E. M A b s . 2 0 1 7 F e b - M a r ; 9 (2) : 1 8 2 - 2 1 2 で開示される。特に、D V D形態は、例えば、以下の科学論文で開示される(Wu C. et al. N a t B i o t e c h n o l 2 0 0 7 ; 2 5 : 1 2 9 0 - 7 ; P M I D : 1 7 9 3 4 4 5 2 ; Wu C. et al. M A b s 2 0 0 9 ; 1 : 3 3 9 - 4 7 ; Lacy S E et al. M A b s 2 0 1 5 ; 7 : 6 0 5 - 1 9 ; P M I D : 2 5 7 6 4 2 0 8 ; Craig R B et al. P L o S O n e 2 0 1 2 ; 7 : e 4 6 7 7 8 ; P M I D : 2 3 0 5 6 4 4 8 ; Piccione E C et al. M A b s 2 0 1 5)。C O D Vは、例えばOnuoha S C et al. A r t h r i t i s R he u m a t o l . 2 0 1 5 O c t ; 6 7 (1 0) : 2 6 6 1 - 7 2 または例えば、国際公開第2 0 1 2 / 1 3 5 3 4 5号パンフレット、国際公開第2 0 1 6 / 1 1 6 6 2 6号パンフレットで開示される。二重特異性二特異性抗体は、例えば、Holliger P et al. P r o t e i n E n g 1 9 9 6 ; 9 : 2 9 9 - 3 0 5 ; P M I D : 8 7 3 6 4 9 7 ; Atwell J L et al. M o l I mm u n o l 1 9 9 6 ; 3 3 : 1 3 0 1 - 1 2 ; P M I D : 9 1 7 1 8 9 0 ; Kontermann R E , N a t B i o t e c h n o l 1 9 9 7 ; 1 5 : 6 2 9 - 3 1 ; P M I D : 9 2 1 9 2 6 3 ; Kontermann R E et al. I mm u n o t e c h n o l o g y 1 9 9 7 ; 3 : 1 3 7 - 4 4 ; P M I D : 9 2 3 7 0 9 8 ; C o c h l o v i u s B et al. C a n c e r R e s 2 0 0 0 ; 6 0 : 4 3 3 6 - 4 1 ; P M I D : 1 0 9 6 9 7 7 2 ; およびDeNardo D G et al. C a n c e r B i o t h e r R a d i o p h a r m 2 0 0 1 ; 1 6 : 5 2 5 - 3 5 ; P M I D : 1 1 7 8 9 0 2 9 で説明される。

【 0 0 6 0 】

抗体の文脈で使用される「二特異性抗体」は、典型的には、同じまたは異なる抗体からの、それぞれがV HおよびV L ドメインを含んでなる2つの鎖から構成される二価の分子を指す。2つの鎖は典型的には、V H A - V L BとV H B - V L A (AとBは2つの異なる特異性を表す)、またはV L A - V H BとV L B - V H Aの構成を有する。

【 0 0 6 1 】

本発明の文脈において、「二特異性抗体(D b)」または「二重特異性抗体形態」は、本明細書でそれぞれ、リンカー(L D b 1 およびL D b 2)によって連結された2つの可変ドメインを含んでなる2つのポリペプチド鎖から構成された二価の分子を指し、その中では、ドメインの2つは、本発明の文脈で定義される第1および第2のドメイン(V 1 およびV 2)であり、他の2つのドメインは、T C R に由来するまたは抗体に由来する可変ドメイン(V A 、 V B)であってもよい。V 1 V 2 ドメインは、2つの異なるポリペプチド上に位置し、V A V B ドメインは、2つの異なるポリペプチド上に位置し、ドメインは頭-尾方向で二量体化する。したがって、配向は、V 1 - L D b 1 - V A とV B - L D b 2 - V 2 、V 2 - L D b 1 - V A とV B - L D b 2 - V 1 、V 1 - L D b 1 - V B とV A - L D b 2 - V 2 、またはV 2 - L D b 1 - V B とV A - L D b 2 - V 1 であってもよい。ドメインが頭-尾方向で二量体化できるようにするために、リンカー、すなわちL D b 1 およびL D b 2 は同一であるかまたは異なり得て、短いリンカーである。短いリンカーは、典型的には例えば、4、5など、例えば3、4、5、6、7、8、9アミノ酸長の2~12、3~13アミノ酸長の間のリンカーであり(Brinkmann U. and Kontermann E. E. (M A b s . 2 0 1 7 F e b - M a r ; 9 (2) : 1 8 2 - 2 1 2))、または配列番号1 0 0 の「G G G S 」、配列番号1 0 1 の「G G G G S 」、または配列番号9 6 の「G G G S G G G G 」などの8アミノ酸長である。

【 0 0 6 2 】

「二重可変ドメイン免疫グロブリン(D V D - I g (商標))」形態は、2 0 0 7 年に最初にWu C. et al. (N a t B i o t e c h n o l . 2 0 0 7 N o v ; 2 5 (1 1) : 1 2 9 0 - 7)によって記載された。この形態では、典型的には、第2のモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体（B）の標的結合可変ドメインは、典型的には従来の抗体（A）（ドメインV_LAおよびV_HAを含んでなる）に融合し、その中では、従来の抗体（A）の軽鎖は、したがって追加的な軽鎖可変ドメイン（V_LB）を含んでなり、従来の抗体（A）の重鎖は、追加的な重鎖可変ドメイン（V_HB）を含んでなる。当該技術分野で記載されるようなDVD-Ig（商標）は、したがって典型的には、V_HB-L-V_HA-C_H1-C_H2-C_H3を含んでなる1つの重鎖と、V_LB-L-V_LA-C_Lを含んでなる1つの軽鎖との2つのポリペプチド鎖から構成される。ドメイン対V_LA/V_HAおよびV_LA/V_LAは、したがって平行して対合する。

【0063】

本発明の文脈において、「二重可変ドメインIg形態」は、それぞれ、リンカー（L₁、L₃）によって連結された、2つの可変ドメインを含んでなる2つのポリペプチド鎖を含んでなるタンパク質を指し、その中では、ドメインの2つは、本発明の文脈で定義される第1および第2のドメイン（V₁およびV₂）であり、他の2つのドメインは、重鎖および軽鎖可変ドメイン（V_HAおよびV_HB）に由来する抗体である。本発明の文脈におけるDVD-Ig形態では、ポリペプチド鎖は、例えば、V₁-L₁-V_HA-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV₂-L₃-V_LA-L₄-C_L、またはV₂-L₁-V_HA-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV₁-L₃-V_LA-L₄-C_Lの構成を有する。接続リンカーL₁およびL₃は、好ましくは5～15アミノ酸残基などの5～20アミノ酸残基長の間であり、および/または接続リンカーL₂およびL₄は、存在してもまたは存在しなくてよい。

【0064】

抗体の文脈で当該技術分野で記載されるような「クロスオーバー二重可変ドメインIg様タンパク質」は、2つのV_Hおよび2つのV_Lドメインが、可変V_H-V_Lドメインのクロスオーバー対合を可能にする様式で連結され、それらは、V_HA-V_HBおよびV_LB-V_LAの順序、またはV_HB-V_HAおよびV_LA-V_LBの順序のいずれかで（NからC末端方向に）配列される形態を表す。

【0065】

本発明の文脈において、「クロスオーバー二重可変ドメインIg様タンパク質」は、それがリンカー（L₁、L₂、L₃およびL₄）によって連結された2つの可変ドメインを含んでなる、2つのポリペプチド鎖を含んでなるタンパク質を指し、その中では、2つのドメインは、本発明の文脈で定義される第1および第2のドメイン（V₁およびV₂）であり、他の2つのドメインは、抗体重鎖および軽鎖可変ドメイン（V_HA、V_HB）に由来する。本発明の文脈におけるCDVD-Ig形態では、ポリペプチド鎖は、例えば、V₁-L₁-V_HA-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV_LA-L₃-V₂-L₄-C_L、V₂-L₁-V_HA-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV_LA-L₃-V₁-L₄-C_L、V_HA-L₁-V₁-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV₂-L₃-V_LA-L_{DVD3}-C_L、またはV_HA-L₁-V₂-L₂-C_H1-C_H2-C_H3とV₁-L₃-V_LA-L₄-C_Lの構成を有する。このCDVD形態では、リンカー（L₁～L₄）は、典型的には、全グリシンリンカーおよび本明細書のリンカーの項で下に記載されるリンカーを含めて、異なる長さである。例えば、L₁は3～12アミノ酸残基の長さであり、L₂は3～14アミノ酸残基の長さであり、L₃は1～8アミノ酸残基の長さであり、L₄は1～3アミノ酸残基の長さであるか、またはL₁は5～10アミノ酸残基の長さであり、L₂は5～8アミノ酸残基の長さであり、L₃は1～5アミノ酸残基の長さであり、L₄は1～2アミノ酸残基の長さであるか、またはL₁は7アミノ酸残基の長さであり、L₂は5アミノ酸残基の長さであり、L₃は1アミノ酸残基の長さであり、L₄は2アミノ酸残基の長さである。

【0066】

本明細書における「少なくとも1つ」は、1、2、3、4、5または6つ以上の特定の物体などの1つ以上の特定の物体を指す。例えば、本明細書における少なくとも1つの結合部位は、1、2、3、4、5または6つ以上の結合部位を指す。

【0067】

10

20

30

40

50

「参照配列と少なくとも 85% の同一性を有する」配列とは、その全長において、参照配列の全長と 85% 以上、特に 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列である。

【0068】

本出願の文脈では、「同一性の百分率」は、グローバルなペアワイズアラインメントを用いて計算される（すなわち、2つの配列が、それらの全長にわたって比較される）。2つ以上の配列の同一性を比較するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Needleman-Wunsc h 大域アラインメントアルゴリズム (Needleman and Wunsc h, 1970 J. Mol. Biol. 48 : 443 - 453) を用いて、それらの全長を考慮した場合の2つの配列の最適なアラインメント（ギャップを含む）を見つける「needle」プログラムが、用いられてもよい。Needle プログラムは、例えば、World Wide Web サイトで利用でき、以下の出版物でさらに説明されている (EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276 - 277)。本発明による2つのポリペプチド間の同一性の百分率は、10.0 に等しい「Gap Open」パラメーター、0.5 に等しい「Gap Extend」パラメーター、および Blosum62 マトリックスで、EMBOSS : needle (大域) プログラムを用いて計算される。10

【0069】

参照配列と「少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一」のアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列と比較して、欠失、挿入および / または置換などのアミノ酸変異を含んでなってもよい。置換の場合、参照配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一のアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列とは別の種に由来する相同配列に対応してもよい。20

【0070】

「アミノ酸置換」は、保存的または非保存的であってもよい。好ましくは、置換は保存的置換であり、その中ではあるアミノ酸が類似の構造的および / または化学的特性を有する別のアミノ酸によって置換される。30

【0071】

一実施形態では、保存的置換としては、その内容全体が参照により援用される、Dayhoff によって "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research に記載されるものが挙げられてもよい。例えば、一態様では、以下のグループの1つに属するアミノ酸は、互いに交換され得て、したがって、保守的な交換を構成する：グループ1：アラニン (A)、プロリン (P)、グリシン (G)、アスパラギン (N)、セリン (S)、スレオニン (T)；グループ2：システイン (C)、セリン (S)、チロシン (Y)、スレオニン (T)；グループ3：バリン (V)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F)；グループ4：リジン (K)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)；グループ5：フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)、ヒスチジン (H)；およびグループ6：アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)。一態様では、保存的アミノ酸置換は、T → A、G → A、A → I、T → V、A → M、T → I、A → V、T → G、および / または T → S から選択されてもよい。40

【0072】

さらなる実施形態では、保存的アミノ酸置換としては、例えば、(1) 非極性 : Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp；(2) 非荷電極性 : Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln；(3) 酸性 : Asp、Glu；および (4) 塩基性 : Lys、Arg、His など、同一クラスの別のアミノ酸によるア50

ミノ酸の置換が挙げられてもよい。その他の保存的アミノ酸置換はまた、以下のように行われ得る：(1)芳香族：Phe、Tyr、His；(2)プロトン供与体：Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp；および(3)プロトン受容体：Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln（例えば、その内容全体が参照により援用される、米国特許第10,106,805号明細書を参照されたい）。

【0073】

別の実施形態では、表1に従って保存的置換が行なわれてもよい。タンパク質修飾に対する耐性を予測する方法は、例えば、その内容全体が参照により援用される、Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210(2004)にある。

10

【0074】

表1：保存的アミノ酸置換

【表1】

Conservative Amino Acid Substitutions	
Amino Acid	Substitutions (others are known in the art)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

【0075】

別の実施形態では、保存的置換は、「保存的置換」の見出しの下で表2に示されるものであってもよい。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表2で「例示的な置換」と命名される、より実質的な変化が導入され、必要に応じて生成物がスクリーニングされてもよい。

40

【0076】

表2：アミノ酸置換

50

【表 2】

Amino Acid Substitutions		
Original Residue (naturally occurring amino acid)	Conservative Substitutions	Exemplary Substitutions
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

【0077】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は変異型抗原結合タンパク質を含んでもよく、その中では、前記変異型抗原結合タンパク質は、変異型がそれに由来する抗原結合タンパク質と比較して、好ましくは第1の可変ドメイン（Vドメインなど）および第2の可変ドメイン（Vドメインなど）のCDR領域にある、最大8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれ以上のアミノ酸置換を含んでなる、第1のポリペプチド鎖（鎖など）および第2のポリペプチド鎖（鎖など）を含む。この点において、抗原結合タンパク質のCDR領域のそれぞれの中に、または第1および/または第2の可変ドメインのCDR領域の全ての中に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のアミノ酸置換があってもよい。置換は、第1および/または第2の可変ドメインのどちらかのCDR中にあってもよい。

【0078】

一実施形態では、変異型は機能的変異型である。

【0079】

「機能的変異型」という用語は、本明細書の用法では、保存的アミノ酸置換を含有する抗原結合タンパク質などの親抗原結合タンパク質と、実質的または有意な配列同一性また

10

20

30

40

50

は類似性を有する抗原結合タンパク質を指し、その中では、前記機能的変異型は、親抗原結合タンパク質の生物学的活性を保持する。一態様では、機能的変異型は、例えば、親抗原結合タンパク質とほぼ同程度、同程度、またはより高い程度で標的細胞を認識する能力を保持する、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の変異型（本明細書に記載の抗原結合タンパク質それ自体は、親抗原結合タンパク質と称される）を包含する。親抗原結合タンパク質に関して、機能的変異型は、例えば、親抗原結合タンパク質へのアミノ酸配列と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一の配列であるアミノ酸配列を有し得る。

【 0 0 8 0 】

機能的変異型は、例えば、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を含む親抗原結合タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり得る。代案としては、またはそれに加えて、機能的変異型は、少なくとも 1 つの非保存的アミノ酸置換を有する、親抗原結合タンパク質のアミノ酸配列を含んでなり得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が機能的変異型の生物学的活性を妨害または阻害しないことが好ましい。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は、機能的変異型の生物学的活性を増強し、その結果、機能的変異型の生物学的活性は、親抗原結合タンパク質と比較して増加する。

10

【 0 0 8 1 】

本開示の修飾された TCR、ポリペプチド、および抗原結合タンパク質（機能的部分および機能的変異型を含む）は、修飾された TCR、ポリペプチド、またはタンパク質（またはその機能的部分または機能的変異型）が、例えば、抗原に特異的に結合する能力、宿主における罹患細胞を検出する能力、または宿主における疾患を治療または予防する能力などのそれらの生物学的活性を保持するという条件で、任意の長さであり得て、すなわち、任意の数のアミノ酸を含んでなり得る。

20

【 0 0 8 2 】

本発明の抗原結合タンパク質（機能的部分および機能的変異型を含む）は、1 つまたは複数の天然アミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含んでなり得る。このような合成アミノ酸は、当該技術分野で公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノ n -デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-およびトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン-ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、-ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸酸モノアミド、N-ベンジル-N-メチル-リジン、N,N-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、 α -アミノシクロペプトンカルボン酸、 β -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 γ -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 δ -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 ϵ -ジアミノ酪酸、 ζ -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および α -tert-ブチルグリシンが挙げられてもよい。

30

【 0 0 8 3 】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質（機能的部分および機能的変異型をはじめとする）は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N アシル化され得て、例えば、ジスルフィド架橋を介して環化され得て、または酸付加塩に変換され得て、および / または任意選択的に、二量体化または重合、または抱合され得る。

40

【 0 0 8 4 】

本開示の抗原結合タンパク質は、合成、組換え、単離、および / または精製され得る。

【 0 0 8 5 】

本明細書における「共有結合」は、例えば、ポリペプチドリンクーなどのリンカーまたはリンカー配列を介した、ジスルフィド架橋またはペプチド結合、または共有結合を指す。

【 0 0 8 6 】

50

「リンカー」という用語は、本明細書の用法では、例えば、一本鎖コンストラクト中、本発明の抗原結合タンパク質の第1の可変ドメインと第2の可変ドメインの間、および任意選択的に、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間などの2つのドメインの間に挿入されて、ドメインに十分な可動性を提供し、正しく折りたたまれて抗原結合部位を形成し、または二重特異性抗原結合タンパク質の場合は、本発明の抗原結合タンパク質のクロスオーバー対合（C O D V形態の、または二重特異性抗体形態のいくつかの）または平行対合構成（例えば、D V D形態）のいずれかで、抗原結合部位と、少なくとも1つのさらなる抗原結合部位を形成する、1つまたは複数のアミノ酸残基を指す。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、リンカーは0個のアミノ酸からなり、すなわちリンカーは存在しない。リンカーは、アミノ酸配列レベルで、可変ドメイン間、または可変ドメインと定数ドメイン間の移行部にそれぞれ挿入される。免疫グロブリンドメインならびにTCRDドメインのおよそのサイズが良く理解されているため、ドメイン間の移行部が同定され得る。実験データによって実証されるように、またはモデル化または二次構造予測測の技術を使用して同定または想定され得るように、シートまたはらせんなどの二次構造要素を形成しないペプチドストレッチの位置を特定することによって、ドメイン移行部の正確な位置が判定され得ることは、当業者によって知られている。本発明の文脈で使用されるリンカーという用語は、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆と称されるリンカーを指すが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 0 8 8 】

それぞれの文脈で特に指定されていない限り、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆などのリンカーは、長さが少なくとも1～30アミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆などのリンカーは、2～25、2～20、または3～18アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、L₁、L₂、L₃、L₅、およびL₆などのリンカーは、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5アミノ酸長以下のさペブチドであり得る。その他の実施形態では、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆などのリンカーは、5～25、5～15、4～11、10～20、または20～30アミノ酸長であり得る。その他の実施形態では、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆などのリンカーは、約、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、または30アミノ酸長であり得る。特定の実施形態では、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、およびL₆などのリンカーは、例えば、長さが、5～24、10～24または5～10などの24未満、20未満、16未満、12未満、10未満のアミノ酸残基であってもよい。いくつかの実施形態では、前記リンカーは、長さが、1を超える、2を超える、5を超える、10を超える、20を超えるアミノ酸残基、長さが22を超えるアミノ酸残基などの長さが1以上のアミノ酸残基である。

20

〔 0 0 8 9 〕

50

A D D A K K D A A K K D G K S (配列番号 146)、G G Q G S G G T G S G G Q G S G G T G S G G Q G S (配列番号 147)、T V L S S A S (配列番号 109) および G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 110)、特に G G G S G G G G (配列番号 NO: 96)、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 110) および G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 108) のアミノ酸配列からなるアミノ酸群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0090】

本発明の文脈で使用される「F_cドメイン」という用語は、以下でさらに定義される天然F_cドメインおよびF_cドメインの変異型および配列を包含する。F_c変異型および天然F_c分子と同様に、「F_cドメイン」という用語には、抗体全体から分解されたか、またはその他の手段で生成されたかにかかわらず、単量体または多量体の形態の分子が含まれる。

10

【0091】

「天然F_c」という用語は、本明細書の用法では、抗体の消化から得られるか、または単量体または多量体の形態であるかどうかにかかわらず、その他の手段によって生成された非抗原結合断片の配列を含んでなり、ヒンジ領域を含有してもよい分子を指す。天然F_cの元の免疫グロブリン源は、特にヒト由来であり、免疫グロブリンのいずれかであり、好ましくはIgG1またはIgG2、最も好ましくはIgG1であり得る。天然F_c分子は、共有結合（すなわち、ジスルフィド結合）および非共有結合によって二量体または多量体形態に結合し得る単量体ポリペプチドで構成される。天然F_c分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、およびIgEなど）またはサブクラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgA1、およびIgG4など）に応じて、1～4の範囲である。天然F_cの一例は、IgGのパパイン消化から得られるジスルフィド結合二量体である。「天然F_c」という用語は、本明細書の用法では単量体、二量体、および多量体の形態に一般的である。天然F_cアミノ酸配列の一例は、IGHG1*01の配天然F_cアミノ酸配列である、列番号111のアミノ酸配列である。

20

【0092】

「ヒンジ」または「ヒンジ領域」または「ヒンジドメイン」は、典型的には、C_{H1}ドメインとC_{H2}ドメインの間に位置する重鎖の柔軟な部分を指す。それは約25アミノ酸長であり、「上部ヒンジ」、「中部ヒンジ」または「コアヒンジ」、および「下部ヒンジ」に分割される。「ヒンジサブドメイン」は、上部ヒンジ、中部（またはコア）ヒンジ、または下部ヒンジを指す。IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4分子のヒンジのアミノ酸配列を以下に示す：

30

IgG1 : E₂₁₆P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G (配列番号 114)

IgG2 : E₂₁₆R K C C V E C P P C P A P P V A G P (配列番号 115)

IgG3 : E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E₂₁₆
P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G (配列番号 116)

IgG4 : E₂₁₆S K Y G P P C P S C P A P E F L G (配列番号 117)。

40

【0093】

本発明の文脈において、これはF_cドメイン中のアミノ酸位置に言及し、これらのアミノ酸位置または残基は、例えば、Edelman, G. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63, 78-85 (1969)に記載されるようなEU番号付けシステムに従って示される。

【0094】

「F_c変異型」という用語は、本明細書の用法では、天然F_cから修飾されているが、サルベージ受容体であるF_cRn（新生児F_c受容体）に対する結合部位をなおも含んでなる、分子または配列を指す。例示的なF_c変異型、およびそれらとサルベージ受容体との相互作用は、当該技術分野で公知である。したがって、「F_c変異型」という用語は、

50

非ヒト天然 F_c からヒト化された分子または配列を含んでなり得る。さらに、天然 F_c は、本発明の抗原結合タンパク質に必要でない構造的特徴または生物学的活性を提供するので、除去され得る領域を含んでなる。したがって、「F_c 変異型」という用語は、1つまたは複数の天然 F_c 部位または残基を欠く分子または配列を含んでなり、またはその中では、1つまたは複数の F_c 部位または残基が修飾されて、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択された宿主細胞との非適合性、(3)選択された宿主細胞での発現時の N 末端不均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外の F_c 受容体への結合、または(7)抗体依存性細胞の細胞傷害性 (ADCC) に影響を与えたまは関与している。

【0095】

10

したがって、一実施形態では、F_{c1} および / または F_{c2} などの F_c - ドメインは、ヒンジドメインを含んでなる。一実施形態では、F_c - ドメインは、ヒト IgG F_c ドメインであり、好ましくはヒト IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4、好ましくは IgG1 または IgG2、より好ましくは IgG1 に由来する。

【0096】

いくつかの実施形態では、特に、抗原結合タンパク質が、2つの F_c ドメイン、すなわち本明細書で以下に記載される T C E R (商標) 形態 (F_{c1} および F_{c2} など) を含んでなる場合に、2つの F_c ドメインは、同じ免疫グロブリンイソタイプまたはイソタイプサブクラスであっても、または異なる免疫グロブリンイソタイプまたはイソタイプサブクラスであってもよく、好ましくは同じものである。したがって、いくつかの実施形態では、F_{c1} および F_{c2} は、IgG1 サブクラス、または IgG2 サブクラス、または IgG3 サブクラス、または IgG4 サブクラスであり、好ましくは IgG1 サブクラス、または IgG2 サブクラス、より好ましくは IgG1 サブクラスである。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、F_c ドメインは、変異型 F_c ドメインであり、したがって本明細書で以下に記載されるアミノ酸置換の1つまたは複数を含んでなる。

【0098】

いくつかの実施形態では、F_c ドメインは、「RF」および / または「ノブ・インツー・ホール」変異、好ましくは「ノブ・インツー・ホール」を含んでなるかまたはさらに含んでなる。

30

【0099】

「RF 変異」は、Jendeberg, L. et al. (1997, J. Immunological Method., 201: 25-34) によって記載されたような C_{H3} ドメイン中のアミノ酸置換 H435R および Y436F などの、F_c ドメインの C_{H3} ドメインにおけるアミノ酸 HY の RF へのアミノ酸置換を一般に指し、プロテイン A への結合を無効にすることから、精製目的に有利であると記載されている。抗原結合タンパク質が2つの F_c ドメインを含んでなる場合、RF 変異は片方または双方、好ましくは1つの F_c ドメインにあってもよい。

【0100】

40

「ノブ・インツー・ホール」技術とも称される「ノブ・インツー・ホール」は、どちらも C_{H3} - C_{H3} 界面でヘテロ多量体形成を促進する、アミノ酸置換 T366S、L368A、および Y407V (ホール) と、T366W (ノブ) とを指す。これらの「ノブ・インツー・ホール」変異は、追加的なシステインアミノ酸置換である Y349C および S354C の導入によってさらに安定化され得る。「ノブ・インツー・ホール」技術は、安定化システインアミノ酸置換と一緒に、米国特許第 5731168 号明細書および米国特許第 8216805 号明細書に記載される。

【0101】

本発明の文脈において、「ノブ」変異は、システインのアミノ酸置換 S354C と一緒に、例えば、配列番号 112 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、F_c ドメインに存在し、「ホール」変異は、システインアミノ酸置換 Y349C と一緒に、配列

50

番号 113 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、 F_c ドメインに存在する。

【0102】

いくつかの実施形態では、例えば、 F_{c1} などのポリペプチドの 1 つの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 T 3 6 6 W (ノブ) を含んでなり、例えば、 F_{c2} などのその他のポリペプチドの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V (ホール) を含んでなり、逆もまた同様である。

【0103】

いくつかの実施形態では、例えば、 F_{c1} などのポリペプチドの 1 つの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 S 3 5 4 C を含んでなるかまたはさらに含んでなり、例えば、 F_{c2} などのその他のポリペプチドの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 Y 3 4 9 C 含んでなるかまたはさらに含んでなり、逆もまた同様である。 10

【0104】

したがって、いくつかの実施形態では、例えば、 F_{c1} などのポリペプチドの 1 つの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 S 3 5 4 C および T 3 6 6 W (ノブ) を含んでなり、例えば、 F_{c2} などのその他のポリペプチドの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V (ホール) を含んでなり、逆もまた同様である。

【0105】

この一連のアミノ酸置換は、Wei et al. (Structural basis of a novel heterodimeric F_c for bispecific antibody production, Oncotarget. 2017) によって記載されたように、一方のポリペプチドにアミノ酸置換 K 4 0 9 A を含め、もう一方のポリペプチドに F 4 0 5 K を含めることによって、さらに拡張され得る。したがって、いくつかの実施形態では、例えば、 F_{c1} などのポリペプチドの 1 つの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 K 4 0 9 A を含んでなるかまたはさらに含んでなり、例えば、 F_{c2} などのその他のポリペプチドの F_c ドメインは、その C_{H3} ドメイン中にアミノ酸置換 F 4 0 5 K を含んでなるかまたはさらに含んでなり、逆もまた同様である。 20

【0106】

場合によっては、人為的に導入されたシステイン架橋は、最適には抗原結合タンパク質の結合特性を妨げることなく、抗原結合タンパク質の安定性を改善してもよい。このようなシステイン架橋は、ヘテロ二量体化をさらに改善し得る。 30

【0107】

得られたタンパク質のヘテロ二量体化を改善するための、荷電対置換などのさらなるアミノ酸置換が、例えば、欧州特許第 2 9 7 0 4 8 4 号明細書など、当該技術分野で記載される。

【0108】

したがって一実施形態では、例えば、 F_{c1} などのポリペプチドの 1 つの F_c ドメインは、電荷対置換 E 3 5 6 K、E 3 5 6 R、D 3 5 6 R、または D 3 5 6 K および D 3 9 9 K または D 3 9 9 R のを含んでなるかまたはさらに含んでなり、例えば、 F_{c2} などのその他のポリペプチドの F_c ドメインは、電荷対置換 R 4 0 9 D、R 4 0 9 E、K 4 0 9 E、または K 4 0 9 D および N 3 9 2 D、N 3 9 2 E、K 3 9 2 E、または K 3 9 2 D を含んでなるかまたはさらに含んでなり、逆もまた同様である。 40

【0109】

さらなる実施形態では、ポリペプチド鎖の片方または双方、好ましくは双方の上の F_c ドメインは、 F_c 受容体 (F_{cyR}) 結合を阻害する、1 つまたは複数の改変を含んでなり得る。このような改変としては、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A が挙げられ得る。

【0110】

ヒンジ、 C_{H2} および C_{H3} ドメインからなる F_c 部分、またはそれらの部分を抗原結合タンパク質、より具体的には二重特異性抗原結合タンパク質に含めることにより、 F_c : F_c - 受容体 (F_{cgR}) によって誘発されるこれらの分子の非特異的固定化の問題が 50

生じた。F_cgRは、異なる細胞表面分子(F_cgRI、F_cgRIIa、F_cgRIIb、F_cgRIII)結合から構成され、IgG-分子のF_c部分によって提示されるエピトープに対する異なる親和性を有する。このような非特異的(すなわち、二重特異性分子の2つの結合ドメインのいずれによっても誘導されない)固定化は、i)分子の薬物動態への影響、およびii)免疫エフェクター細胞の様々なF_c-変異型のオフターゲット活性化の理由から好ましくなく、F_cgR結合を除去する変異が同定されている。これに関連して、Morgan et al. 1995, Immunology (The N-terminal end of the CH₂ domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, FcyRI and FcyRIII binding)は、ヒトIgG1の残基233～236と、ヒトIgG2に由来する対応する配列、すなわち、残基233P、234V、および235Aとの交換を開示しており、その中では、236位にアミノ酸が存在せず、F_cgRI結合が消滅し、C1q結合が消滅し、F_cgRIII結合が減少している。10
欧洲特許第1075496号明細書は、F_c領域の(233P、234V、235Aの1つまたは複数、236位に残基またはGがなく、327G、330Sおよび331Sなどの)多様性を有する抗体およびその他のF_c含有分子を開示しており、その中では、組換え抗体は、有意な補体依存性溶解、または標的の細胞媒介性破壊を誘発することなく、標的分子に結合できる。

【0111】

したがって、いくつかの実施形態では、F_c領域は、233P、234V、235A、236(残基なし)またはGと；327G、330S、331Sからなる群から選択されるアミノ酸の1つまたは複数または欠失とを含んでなるかまたはさらに含んでなり、好ましくは、F_c領域は、アミノ酸233P、234V、235A、236(残基なし)またはGと；327G、330S、331Sからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸とを含んでなるかまたはさらに含んでなり、最も好ましくは、F_c領域は、アミノ酸233P、234V、235A、236(残基なし)および331Sを含んでなるかまたはさらに含んでなる。

【0112】

さらなる一実施形態では、F_cドメインは、アミノ酸置換N297Q、N297GまたはN297A、好ましくはN297Qを含んでなるかまたはさらに含んでなる。

【0113】

アミノ酸置換「N297Q」、「N297G」、または「N297A」は、F_cドメイン内の天然Nグリコシル化部位を抑制する297位でのアミノ酸置換を指す。このアミノ酸置換は、F_c受容体相互作用をさらに妨げ、最終的なタンパク質産物、すなわち例えば、Tao, MH and Morrison, SL (J Immunol. 1989 Oct; 143(8): 2595-601.)に記載されたような糖残基に起因する、本発明の抗原結合タンパク質のばらつきを減少させる。

【0114】

さらなる一実施形態は、特に軽鎖なしの場合、F_cドメインは、アミノ酸置換S220Cを含んでなるかまたはさらに含んでなる。アミノ酸置換「S220C」は、CH₁CLジスルフィド架橋を形成するシステインを欠失させる。

【0115】

いくつかの実施形態では、F_cドメインは、例えば、S354CとY349CまたはL242CとK334Cなどの少なくとも2つの追加的なシステイン残基を含んでなるかまたはさらに含んでなり、その中ではS354Cは、F_c1などの1つのポリペプチドのF_cドメイン中にあり、Y349Cは、F_c2などの他のポリペプチドのF_cドメイン中にあって、ヘテロ二量体を形成し、および/またはその中ではL242CおよびK334Cは、ポリペプチドの片方または双方のF_c1またはF_c2のいずれかの同じF_cドメインに位置して、ドメイン内C-C橋を形成する。

【0116】

10

20

30

40

50

「精製された」および「単離された」とは、ポリペプチド（すなわち、本発明の抗原結合タンパク質）またはヌクレオチド配列を指す場合、示された分子が、同じタイプのその他の生物学的巨大分子の実質的な不在下で、存在することを意味する。「精製された」という用語は、本明細書の用法では、特に、同じタイプの生物学的巨大分子の少なくとも75重量%、85重量%、95重量%、または98重量%が存在することを意味する。

【0117】

特定のポリペプチドをコード化する「単離された」核酸分子は、対象ポリペプチドをコード化しない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子を指す；しかし、分子は、組成物の基本的特性に悪影響を及ぼさないいくつかの追加的な塩基または部分を含んでもよい。

10

【0118】

「ドメイン」は、タンパク質の任意の領域であってもよく、一般に配列相同性に基づいて定義され、しばしば特定の構造的または機能的実体に関連している。

【0119】

「組換え」分子は、組換え手段によって調製、発現、生成、または単離された分子である。

【0120】

「遺伝子」という用語は、1つまたは複数のタンパク質または酵素の全部または一部を含んでなるアミノ酸の特定の配列をコードするか、またはそれに対応するDNA配列を意味し、例えば、遺伝子が発現される条件を判定するプロモーター配列などの調節DNA配列を含んでも含まなくてもよい。構造遺伝子ではないいくつかの遺伝子は、DNAからRNAに転写されてもよいが、アミノ酸配列には翻訳されない。その他の遺伝子は、構造遺伝子の調節因子またはDNA転写の調節因子として機能してもよい。特に、遺伝子という用語は、タンパク質をコード化するゲノム配列、すなわち、調節因子、プロモーター、イントロン、およびエクソン配列を含んでなる配列を意図してもよい。

20

【0121】

「親和性」は、理論的には、抗原結合タンパク質と抗原との間の平衡結合によって、本発明の文脈では、抗原結合タンパク質とその抗原、すなわちMHCタンパク質との複合体中の配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドとの間の平衡結合によって、定義される。親和性は、例えば、最大半量有効濃度(E_{C50})または平衡解離定数(K_D)で表わされてもよい。

30

【0122】

「K_D」は、抗原結合タンパク質とその抗原の間の平衡解離定数、k_{off}/k_{on}の比率である。K_Dおよび親和性は、反比例の関係にある。K_D値は、抗原結合タンパク質の濃度に関係し、K_D値が低いほど、抗原結合タンパク質の親和性がより高くなる。親和性、すなわちK_D値は、本明細書の「抗原結合タンパク質」の項で下に詳細に説明されるように、表面プラズモン共鳴(SPR)またはバイオレイヤー干渉法(BLI)を用いて会合や解離の速度を測定するなど、様々な既知の方法によって実験的に評価され得る。

【0123】

「E_{C50}」とも称される「最大半量有効濃度」は、通常、指定された曝露時間後に、ベースラインと最大値の中間の応答を誘発する分子の濃度を指す。E_{C50}と親和性は反比例の関係にあり、E_{C50}値が低いほど、分子の親和性がより高くなる。一例として、「E_{C50}」は、指定された露光時間後に、ベースラインと最大値の中間の反応を誘発する本発明の抗原結合タンパク質の濃度を指し、より具体的には、指定された露光時間後に、ベースラインと最大値の中間の反応を誘発する本発明の抗原結合タンパク質の濃度を指す。E_{C50}値は、本明細書の「抗原結合タンパク質」の項で下に詳細に記載されるように、例えば、IFN- γ 放出アッセイまたはLDH放出アッセイなどを使用して、様々な既知の方法によって実験的に評価され得る。

40

【0124】

「CD3」はタンパク質複合体であり、4つの異なる鎖から構成される。哺乳類では、

50

複合体は、CD3鎖、CD3鎖、および2つのCD3鎖を含有するこれらの鎖は、T細胞受容体（TCR）および鎖として知られている分子に結合し、Tリンパ球中で活性化シグナルを生じる。

【0125】

「CD28」はまた、T細胞上でも発現され、T細胞活性化に必要な共刺激シグナルを提供し得る。CD28は、T細胞の増殖と生存、サイトカイン産生、およびTヘルパー2型発生に重要な役割を果たす。

【0126】

「CD134」はまた、OX40とも称される。CD134/OX40は、活性化に続いて24~72時間後に発現しており、二次共刺激分子を定義していると考えられる。

10

【0127】

「4-1BB」は、抗原提示細胞（APC）上の4-1BBリガンドに結合でき、それによってT細胞の共刺激シグナルが生じる。

【0128】

「CD5」は主にT細胞上に見られる受容体の別の例であり、CD5はB細胞上にも低レベルで見られる。

【0129】

「CD95」は、T細胞機能を修飾する受容体のさらなる例であり、その他の細胞の表面上で発現されるFasリガンドによるアポトーシスシグナル伝達を媒介するFas受容体としても知られている。CD95は、休止状態のTリンパ球におけるTCR/CD3駆動型シグナル伝達経路を調節することが報告されている。

20

【0130】

「NK細胞特異的受容体分子」は、例えば、CD16、低親和性Fc受容体、およびNKGD2Dである。

【0131】

T細胞とナチュラルキラー（NK）細胞の双方の表面上に存在する受容体分子の一例は、CD2、およびCD2スーパーファミリーのさらなるメンバーである。CD2は、TおよびNK細胞上で共刺激分子として機能できる。

【0132】

本発明の文脈において、本明細書で上に（i）で言及される「膜貫通領域」は、例えば、TCRまたは膜貫通ドメインであってもよい。

30

【0133】

「細胞質シグナル伝達領域」は、例えば、TCRまたは細胞内ドメインであってもよい。

【0134】

本明細書における「診断薬」は、（直接的または間接的に）シグナルを提供する、蛍光分子、放射性分子、または当該技術分野で公知の任意のその他の標識などの検出可能な分子または物質を指す。

【0135】

当該技術分野で公知の「蛍光分子」としては、イソチオシアニ酸フルオレセイン（FITC）、フィコエリトリン（PE）、青色レーザーで使用するためのフルオロフォア（例えば、PerCP、PE-Cy7、PE-Cy5、FL3およびAPCまたはCy5、FL4）、赤色、紫色、またはUVレーザーで使用するためのフルオロフォア（例えば、パシフィックブルー、パシフィックオレンジ）が挙げられる。

40

【0136】

「放射性分子」としては、 I^{123} 、 I^{124} 、 In^{111} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Tc^{99} などのシンチグラフィー研究用の放射性原子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の抗原結合タンパク質はまた、ヨウ素123、インジウム111、フッ素19、炭素13、窒素15、酸素17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄などの、核磁気共鳴（NMR）イメージング（磁気共鳴画像法、MRIとしても知られている）の

50

ためのスピン標識を含んでなってもよい。

【0137】

このような診断薬は、抗原結合タンパク質に直接結合（すなわち、物理的に結合）されるか、または間接的に結合されてもよい。

【0138】

本明細書における「治療薬」は、治療効果を有する薬剤を指す。一実施形態では、このような治療薬は、細胞傷害剤または放射性同位体などの増殖阻害剤であってもよい。

【0139】

無差別に使用され得る「増殖阻害剤」または「抗増殖剤」は、生体外または生体内のどちらかで、細胞、特に腫瘍細胞の増殖を阻害する化合物または組成物を指す。

【0140】

「細胞傷害剤」という用語は、本明細書の用法では、細胞の機能を阻害した妨げる、および／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。「細胞傷害剤」という用語は、化学療法剤、酵素、抗生物質、および細菌、真菌、植物または動物由来の小分子毒素または酵素活性毒素などの毒素（それらの断片および／または変異型を含む）、ならびに以下に開示される様々な抗腫瘍剤または抗がん剤を含むことが意図される。いくつかの実施形態では、細胞傷害剤は、タキソイド、ピンカ、タキサン、メイタンシノイドまたはDM1もしくはDM4などのメイタンシノイド類似体、小型薬剤、トマイマイシンまたはピロロベンゾジアゼピン誘導体、クリプトフィシン誘導体、レプトマイシン誘導体、オーリスタチンまたはドラスタチン類似体、プロドラッグ、トポイソメラーゼⅠ阻害剤、DNAアルキル化剤、抗チューブリン剤、CC-1065またはCC-1065類似体である。

【0141】

「放射性同位体」という用語は、 $^{At-211}$ 、 $^{Bi-212}$ 、 $^{Er-169}$ 、 $^{I-131}$ 、 $^{I-125}$ 、 $^{Y-90}$ 、 $^{In-111}$ 、 $^{P-32}$ 、 $^{Re-186}$ 、 $^{Re-188}$ 、 $^{Sm-153}$ 、 $^{Sr-89}$ 、およびLuの射性同位体などのがん治療に適する放射性同位体を含むことが意図される。このような放射性同位元素は、一般的に主に線を放出する。一実施形態では、放射性同位体は、放射性同位体、より正確には、線を放出するトリウム227である。

【0142】

本明細書における「PK修飾部分」は、本発明の抗原結合タンパク質の薬物動態(PK)を修飾する部分を指す。したがって、この部分は、特に、本発明の抗原結合タンパク質の生体内半減期および分布を改変する。好ましい実施形態では、PK修飾部分は、抗原結合タンパク質の半減期を延長する。PK修飾部分の例としては、PEG(Dozier et al., (2015) Int J Mol Sci. Oct 28; 16(10): 25831-64; およびJevsevar et al., (2010) Biotechnol J. Jan; 5(1): 113-28)、Pas化(Schlapschyt et al., (2013) Protein Eng Des Sel. Aug; 26(8): 489-501)、アルブミン(Dennis et al., (2002) J Biol Chem. Sep 20; 277(38): 35035-43)、抗体および／または非構造化ポリペプチドのFc部分(Schellenberger et al., (2009) Nat Biotechnol. Dec; 27(12): 1186-90)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0143】

「半減期($T_{1/2}$)」とは、一般に、生体内に沈着した薬物またはその他の物質の半分の量が、通常の生物学的プロセスによって代謝または排除されるのに必要な時間を指す。したがって、本発明の文脈における半減期は、本発明の抗原結合タンパク質の半分の量が、例えば、マウスにおいて排除されるのに必要な時間を指す。半減期は、当該技術分野で周知の方法によって判定され得る。一例では、半減期は、実施例10で詳細に説明されるように判定される。したがって、一例では、半減期は、例えば、本発明の抗原結合タンパク質を高度免疫不全NODマウスなどのマウスに投与することによって、例えば、静脈内投与した後、0時間、0.1時間、2時間、8時間、24時間、48時間、120時間、

10

20

30

40

50

240時間、360時間などの異なる時点で、後頭葉神経叢から血漿サンプルを採取することによって、判定される。抗原結合タンパク質の血漿レベルは、次に、ELISAなどの当該技術分野で公知の技術を使用して、Fc-VLアッセイおよびCD3-pMHCアッセイなどの異なる設定を用いて判定される。サンプルの血漿濃度は、典型的には、それぞれの標準曲線からの補間にによって取得され、半減期は、典型的には、異なる時点で採取された血漿レベルの線形回帰によって判定される。

【0144】

抗原結合タンパク質

国際公開第2017/158103号パンフレットで開示されるようなTCR R7P 1D5を出発点として使用し、本発明者らは、一本鎖(sCTCR)形態で、本明細書の実施例1および2に記載されるような酵母スクリーニングアッセイを使用して、または一本鎖二重特異性TCRコンストラクトで、TCR可変(V)および任意選択的に可変(V)ドメイン変異型を設計、生成、および試験し、本明細書の実施例4に記載されるような可溶性の二重特異性sCTCRコンストラクトの結合親和性、ならびに収量および安定性をさらに最適化した。このようにして、本発明者らは、可変および任意選択的にドメインの異なる変異型、より具体的には可変ドメインのCDRa3(5つの変異型がある)の異なる変異型を同定したが、これらは、親TCRのCDRa1、CDRa2、CDRb1、CDRb2、および/またはCDRb3と、または本発明の抗原結合タンパク質が標的に、すなわち、MHCタンパク質との複合体中の、好ましくはHLA-A*02との複合体中の、配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるMAGE-A抗原ペプチドに、高い親和性だけでなく高い特異性で結合するのに有利な変異型である、CDRa1(1つの変異型)、CDRa2(3つの変異型)、CDRb1(1つの変異型)、CDRb2(5つの変異型)および/またはCDRb3(1つの変異型)について発見されたCDR変異型のいずれかと、有利に組み合わせることができるかもしれない。

【0145】

本発明者らは、CDRが、ACTのTCR、一本鎖TCRコンストラクト、ならびにその他の二重特異性形態で使用されてもよいことを実施例で実証し、したがって、同定されたCDR変異型を使用して、配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるMAGE-A抗原ペプチドに対して高い親和性だけでなく高い特異性を有する、MHCタンパク質との複合体中の、好ましくはHLA-A*02との複合体中の異なる抗原結合タンパク質が生成されてもよいことを原理実証で実証した。

【0146】

さらに、本発明者らは、TCR可変(V)および可変(V)ドメインのフレームワークを変異させることで、本明細書で実施例4に記載されるように、可溶性の二重特異性sCTCRコンストラクトの結合特異性、ならびに収量および安定性が改善されることを発見した。

【0147】

実施例5~8では、本発明者らは、ヒトTCR-CD3複合体に、および例えば、HLA-A*02:01などのMHCクラスI分子に結合した、配列番号1のMAGE-Aペプチドを含んでなるペプチド:MHC複合体に、特異的に結合する、TCER(商標)形態にある抗原結合タンパク質などの腫瘍細胞株に対する生体外および生体内効力を設計し、発現させ、そして成功裏に試験した。BMA031を標的化するために、Zhu et al.(J Immunol, 1995, 155, 1903-1910)によって記載されたCD3特異的ヒト化抗体hUCHT1に由来するTCR-CD3複合体であるVHおよびVLドメイン、またはShearman et al.(J Immunol, 1991, 147, 4366-73)によって記載された/TCR特異的抗体が修飾され、これらの実施例で使用された。MAGE-A:MHC複合体を標的化するために、本明細書で開示されるCDRを含んでなるVおよびVドメインを用いて、抗原結合タンパク質の安定性および親和性成熟がもたらされてもよい。同じVLおよびVH、VおよびVドメインを実施例4に記載されるように、Fabドメイン(CH1ヒンジおよびCLを含

10

20

30

40

50

んでなる)をさらに含んでなる、ヒト一本鎖T細胞受容体形態で使用した。

【0148】

したがって、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドに特異的に結合する抗原結合タンパク質に言及し、その中では前記抗原ペプチドは、MHCタンパク質との複合体中にあり、抗原結合タンパク質は、

(a) 3つの相補性決定領域(CDR)CDRa1、CDRa2、およびCDRa3を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、および

(b) CDRb1、CDRb2、およびCDRb3の3つの相補性決定領域(CDR)を含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる第2のポリペプチド鎖
10

- CDRa1は、アミノ酸配列「X₁S S S T Y」配列番号72を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は任意のアミノ酸、好ましくはDまたはE、より好ましくはEであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号72と異なるアミノ酸配列であり、

- CDRa2は、アミノ酸配列「I X₁ S X₂ X₃ D X₄」配列番号73を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₄は、任意のアミノ酸であり、式中、好ましくはX₁はFまたはY、より好ましくはYであり、X₂はNまたはS、好ましくはSであり、X₃はQまたはM、好ましくはQであり、X₄はM、V、SまたはQ、好ましくはSまたはQ、より好ましくはQであり、
20

- CDRa3は、アミノ酸配列「C A E X₁ X₂ S X₃ S K I I F」配列番号77を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₃は任意のアミノ酸であり、式中、CDRa1がアミノ酸配列番号5を含んでなるかまたはそれからなり、CDRa2がアミノ酸配列番号6を含んでなるかまたはそれからなる場合は、CDRa3はアミノ酸配列「C A E Y S S A S K I I F」(配列番号7)を含まずまたはそれからならないという条件で、好ましくは、CDRa3がアミノ酸配列「C A E Y S S A S K I I F」(配列番号7)を含まずまたはそれからならないという条件で、好ましくはX₁は、A、FまたはM、より好ましくはMであり、好ましくはX₂は、S、T、またはN、より好ましくはTであり、好ましくはX₃はEまたはA、好ましくはEであり、または
30

- CDRa3は、アミノ酸配列「C A E X₁ X₂ S X₃ S K I I F」配列番号77を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₃は、任意のアミノ酸であり、好ましくはX₁は、F、MまたはA、好ましくはMであり、好ましくはX₂は、S、T、またはN、より好ましくはTであり、好ましくはX₃は、EまたはA、好ましくはEであり、または

- CDRb1は、アミノ酸配列「X₁ G H D」配列番号78を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはSまたはP、より好ましくはPであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で配列番号78とは異なるアミノ酸配列であり、

- CDRb2は、アミノ酸配列「F X₁ X₂ X₃ X₄ P」配列番号79を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₄は任意のアミノ酸であり、好ましくはX₁はCまたはN、より好ましくはCであり、好ましくはX₂はYまたはN、より好ましくはYであり、好ましくはX₃はGまたはN、より好ましくはGであり、好ましくはX₄はH、V、T、AまたはM、好ましくはHまたはT、最も好ましくはTであり、式中、好ましくは、X₁がCである場合、FR3-bアミノ酸配列はアミノ酸66位にアミノ酸66Cを含んでなり、
40

- CDRb3は、アミノ酸配列「C A S R A X₁ T G E L F F」配列番号82を含んでなるかまたはそれからなる、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはDまたはN、好ましくはDであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号82とは異なるアミノ酸配列である。

【0149】

特定の一実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるM A G E - A抗原ペプチドに特異的に結合する抗原結合タンパク質に言及し、その中では、前記抗原ペプチドはM H Cタンパク質との複合体中にあり、抗原結合タンパク質は、

(a) 3つの相補性決定領域(C D R) C D R a 1、C D R a 2、およびC D R a 3を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、

(b) C D R b 1、C D R b 2、およびC D R b 3の3つの相補性決定領域(C D R)を含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる第2のポリペプチド鎖を含んでなり、

- C D R a 1は、配列番号5のアミノ酸配列、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号5とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R a 2は、配列番号6のアミノ酸配列、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号6とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R a 3は、アミノ酸配列「C A E X₁ X₂ S X₃ S K I I F」配列番号77を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₃は、任意のアミノ酸であり、式中、C D R a 1がアミノ酸配列番号5を含んでなるかまたはそれからなり、C D R a 2がアミノ酸配列番号6を含んでなるかまたはそれからなる場合は、C D R a 3はアミノ酸配列「C A E Y S S A S K I I F」(配列番号7)を含まずまたはそれからならないという条件で、好ましくは、C D R a 3がアミノ酸配列「C A E Y S S A S K I I F」(配列番号7)を含まずまたはそれからならないという条件で、好ましくはX₁は、A、FまたはM、より好ましくはMであり、好ましくはX₂は、S、T、またはN、より好ましくはTであり、好ましくはX₃は、EまたはA、好ましくはEであり、

- C D R a 3は、アミノ酸配列「C A E X₁ X₂ S X₃ S K I I F」配列番号77を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁～X₃は、任意のアミノ酸であり、好ましくはX₁は、F、MまたはA、好ましくはMであり、好ましくはX₂は、S、TまたはN、より好ましくはTであり、好ましくはX₃はEまたはA、好ましくはEであり、

- C D R b 1は、配列番号12のアミノ酸配列、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号12とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R b 2は、配列番号13のアミノ酸配列、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号13とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R b 3は、アミノ酸配列番号14、または少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号14とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0150】

特定の一実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるM A G E - A抗原ペプチドに特異的に結合する、可溶性抗原結合タンパク質などの抗原結合タンパク質に言及し、その中では、前記抗原ペプチドはM H Cタンパク質との複合体中にあり、抗原結合タンパク質は

(a) 3つの相補性決定領域(C D R) C D R a 1、C D R a 2、およびC D R a 3を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、および

(b) C D R b 1、C D R b 2、およびC D R b 3の3つの相補性決定領域(C D R)を

10

20

30

40

50

含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる第2のポリペプチド鎖を含んでなり、

- C D R a 1 は、アミノ酸配列「X₁ S S S T Y」配列番号72を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は任意のアミノ酸、好ましくはDまたはE、より好ましくはEであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号72と異なるアミノ酸配列であり、

- C D R a 2 は、アミノ酸配列「I Y S S Q D X₁」配列番号74を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはQ、VまたはS、好ましくはQであり、

- C D R a 3 は、アミノ酸配列配列「C A E M T S E S K I I F」配列番号35、または少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号35とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R b 1 は、アミノ酸配列「X₁ G H D Y」配列番号78を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は任意のアミノ酸、好ましくはSまたはP、より好ましくはPであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号78と異なるアミノ酸配列であり、

- C D R b 2 は、アミノ酸配列「F C Y G X₁ P」配列番号81を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはH、V、AまたはT、好ましくはTであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つまたは2つのアミノ酸置換で、より好ましくは1つのアミノ酸置換で、配列番号81とは異なるアミノ酸配列であり、式中、好ましくはC D R b 2 がアミノ酸配列「F C Y G X₁ P」配列番号81を含んでなるかまたはそれからなる場合、F R 3 - b アミノ酸配列はアミノ酸66位にアミノ酸66Cを含んでなり、

- C D R b 3 は、アミノ酸配列「C A S R A X₁ T G E L F F」配列番号82を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはDまたはN、好ましくはDであり、または少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、配列番号82とは異なるアミノ酸配列である。

【0151】

本明細書で上に示されるように、いくつかの実施形態では、C D R b 2 アミノ酸配列は、57位にアミノ酸57Cを含んでなり、このアミノ酸は、好ましくはF R 3 - b アミノ酸配列の66位に存在するシステインと、ジスルフィド架橋を好ましくは形成する。したがって、好ましい実施形態では、C D R b 2 アミノ酸配列が57位にアミノ酸57Cを含んでなる場合、次にF R 3 - b アミノ酸配列は、好ましくは、アミノ酸66位にアミノ酸66Cを含み、逆もまた同様である。したがっていくつかの実施形態では、F R 3 - b アミノ酸配列は、好ましくは、この66位でのアミノ酸置換を含んでなり、したがって、いくつかの関連実施形態では、F R 3 - b アミノ酸配列は、アミノ酸置換I66Cを含んでなる。

【0152】

いくつかの実施形態では、本発明の文脈におけるC D R a 1 は、配列番号5または配列番号55のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0153】

一実施形態では、本発明の文脈におけるC D R a 2 は、アミノ酸配列：「I Y S S Q D X₁」配列番号74を含んでなるかまたはそれからなり、式中、X₁は、任意のアミノ酸、好ましくはQ、VまたはS、より好ましくはQ、または配列番号6であり、または1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換などの少なくとも1つのアミノ酸置換で、より好ましくは1つのアミノ酸置換で、配列番号74または配列番号6とは異なるアミノ酸配列であり、好ましくはC D R a 2 は、アミノ酸配列「I Y S S Q D X₁」配列番号74を含んでな

10

20

30

40

50

るかまたはそれからなり、式中、 X_1 は任意のアミノ酸、好ましくはQ、VまたはS、より好ましくはQであり、または1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換などの少なくとも1つのアミノ酸置換で、より好ましくは1つのアミノ酸置換で、配列番号74とは異なるアミノ酸配列である。

【0154】

いくつかの実施形態では、本発明の文脈におけるCDR_a2は、配列番号6および配列番号56、57、および59、好ましくは配列番号6および配列番号56のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

【0155】

いくつかの実施形態では、CDR_a3は、配列番号35、36、37、38、39、好ましくは配列番号35のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0156】

いくつかの実施形態では、CDR_b1は、配列番号12または配列番号62のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0157】

いくつかの実施形態では、CDR_b2は、アミノ酸配列：

- 「F N N N V P」配列番号13、または
- 「F C Y G X₁」配列番号81

を含んでなるかまたはそれからなり、

式中、 X_1 は、任意のアミノ酸、好ましくはH、V、AまたはT、より好ましくは、Tであり（式中、好ましくは、CDR_b2がアミノ酸配列「F C Y G X₁ P」配列番号81を含んでなるかまたはそれからなる場合、FR3-bアミノ酸配列は、アミノ酸66位にアミノ酸66Cを含んでなる）、または

1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換などの少なくとも1つのアミノ酸置換で、より好ましくは1つのアミノ酸置換で、配列番号13または81とは異なるアミノ酸配列である。

【0158】

いくつかの実施形態では、本発明の文脈におけるCDR_b2は、アミノ酸配列配列番号13および配列番号63、64、65、66、および70、好ましくは配列番号13および配列番号65からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、好ましくは、CDR_b2が、アミノ酸配列番号63、64、65、66または70を含んでなるかまたはそれからなる場合は、FR3-bアミノ酸配列は、好ましくはアミノ酸66位にアミノ酸66Cを含んでなる。

【0159】

一実施形態では、本発明の文脈におけるCDR_b3は、配列番号14または配列番号71のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0160】

特定の一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、

(a) 3つの相補性決定領域(CDR)CDR_a1、CDR_a2、およびCDR_a3を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、

(b) CDR_b1、CDR_b2、およびCDR_b3の3つの相補性決定領域(CDR)を含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる第2のポリペプチド鎖を含んでなり、

- CDR_a1は、配列番号5のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、
- CDR_a2は、配列番号6のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、
- CDR_a3は、配列番号35、36、37、38、39、好ましくは配列番号35、36、37、38、より好ましくは配列番号35などの配列番号35および38のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、
- CDR_b1は、配列番号12のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、
- CDR_b2は、配列番号13のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

10

20

30

40

50

- C D R b 3 は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 6 1 】

特定の一実施形態では、抗原結合タンパク質は、

(a) 3 つの相補性決定領域 (C D R) C D R a 1 、 C D R a 2 、および C D R a 3 を含んでなる、第 1 の可変ドメインを含んでなる第 1 のポリペプチド鎖、

(b) C D R b 1 、 C D R b 2 、および C D R b 3 の 3 つの相補性決定領域 (C D R) を含んでなる、第 2 の可変ドメインを含んでなる第 2 のポリペプチド鎖を含んでなり、

- C D R a 1 は、配列番号 5 または配列番号 5 5 、好ましくは配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R a 2 は、配列番号 5 6 、 5 7 および 5 9 、好ましくは配列番号 5 6 および 5 9 、より好ましくは配列番号 5 6 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R a 3 は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R b 1 は、配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- C D R b 2 は、配列番号 6 3 、 6 4 、 6 5 、 6 6 、および 7 0 、好ましくは配列番号 6 5 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、式中、好ましくは、 C D R b 2 が、配列番号 6 3 、 6 4 、 6 5 、 6 6 または 7 0 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる場合に、 F R 3 - b アミノ酸配列は、好ましくはアミノ酸 6 6 位にアミノ酸 6 6 C を含んでなり、

- C D R b 3 は、配列番号 1 4 または配列番号 7 1 、好ましくは配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 6 2 】

本発明は、本発明の文脈で開示される C D R アミノ酸配列の変異型、典型的には C D R a 1 、 C D R a 2 、 C D R a 3 、 C D R b 1 、 C D R b 2 および / または C D R b 3 の変異型を含んでなる抗原結合タンパク質にさらに言及し、このような変異型は、 4 つ、 3 つ、 2 つ、または 1 つなどの少なくとも 1 つ、好ましくは 1 つ、 2 つまたは 3 つのアミノ酸置換を含んでもよく、その中では、アミノ酸置換の好ましい数は、好ましくは、それぞれの C D R の長さに依存する。

【 0 1 6 3 】

したがって、いくつかの実施形態では、 C D R a 1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つ、 2 つのまたは 3 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、または 1 つのみのアミノ酸置換で、本明細書で開示される C D R a 1 アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は、好ましくはアミノ酸 2 8 、 2 9 、 3 6 、 3 7 および 3 8 位のいずれか、より好ましくは 2 8 位にある。

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態では、 C D R a 2 は、少なくとも 1 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つ、 2 つまたは 3 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、または 1 つのみのアミノ酸置換で、本明細書で開示される C D R a 2 アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は、好ましくは 5 6 または 6 5 位、より好ましくは 6 5 位にある。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、 C D R a 3 は、本明細書で開示される C D R a 3 アミノ酸配列とは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つ、 2 つ、 3 つまたは 4 つのアミノ酸置換で、好ましくは 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換で、または 1 つのみのアミノ酸置換で、異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は、好ましくはアミノ酸 1 0 5 、 1 0 6 、 1 0 7 、 1 0 8 、 1 0 9 、 1 1 3 、 1 1 4 、 1 1 5 、 1 1 6 、および 1 1 7 位のいずれかである。

【 0 1 6 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、CDR b 1は、少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つのアミノ酸置換などの1つまたは2つのアミノ酸置換で、本明細書で開示されるCDR b 1アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は、好ましくはアミノ酸27、28、29、37および38位のいずれか、より好ましくは27および38位にある。

【0167】

いくつかの実施形態では、CDR b 2は、少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換で、好ましくは1つまたは2つのアミノ酸置換、または1つのみのアミノ酸置換で、本明細書で開示されるCDR b 2アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は好ましくは56位にある。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、CDR b 3は、少なくとも1つのアミノ酸置換で、好ましくは1つ、2つ、3つのまたは4つのアミノ酸置換で、好ましくは1つまたは2つのアミノ酸置換で、または1つのみのアミノ酸置換で、本明細書で開示されるCDR b 3アミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、前記アミノ酸置換は、好ましくはアミノ酸105、106、107、108、109、113、114、115、116、117位のいずれかにある。

【0169】

本明細書で上に言及されるアミノ酸置換は、本明細書で上に「定義」の項で定義され、好ましくは、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。当業者であれば理解できるように、本明細書で定義されるCDRアミノ酸配列を含んでなる第1の可変ドメインと、明細書で定義されるCDRアミノ酸配列を含んでなる第2の可変ドメインは、一緒に抗原結合部位を形成し、その中では、前記抗原結合部位は、MHCタンパク質との複合体中の配列番号1のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドに結合する。3つの相補性決定領域(CDR)であるCDRa1、CDRa2、およびCDRa3は、TCRの可変ドメインに由来する。したがって、当業者であれば理解できるように、いくつかの実施形態では、第1の可変ドメインはまた、可変ドメインと称されることもある。同様に、3つの相補性決定領域(CDR)であるCDRb1、CDRb2、およびCDRb3は、前記TCRの可変ドメインに由来し、したがって、当業者によって理解されるように、第2の可変ドメインもまた、可変ドメインと称されることもある。より具体的には、配列(FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a)などの本発明の文脈で定義される可変フレームワークアミノ酸配列および可変CDRを含んでなる第1の可変ドメインは、可変ドメインおよび/またはと称されるかもしれない、および/または配列(FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b)などの本発明の文脈で定義される可変フレームワークアミノ酸配列および可変CDRを含んでなる第2の可変ドメインは、可変ドメインと称されるかもしれない。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、CDRは、抗体フレームワーク配列に移植されてもよい。したがって、一例では、第1の可変ドメインの文脈で定義されるCDRは、軽鎖可変ドメインに移植され得て、したがって、第1の可変ドメインは、配列(FR1-L)-(CDRa1)-(FR2-L)-(CDRa2)-(FR3-L)-(CDRa3)-(FR4-L)を含んでなるかまたはそれからなり、軽鎖可変ドメインと称されるかもしれない。同じ例では、第2の可変ドメインの文脈で定義されるCDRが、重鎖可変ドメインに移植されているかもしれない、したがって、第2の可変ドメインは、配列(FR1-H)-(CDRb1)-(FR2-H)-(CDRb2)-(FR3-H)-(CDRb3)-(FR4-H)を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインと称されるかもしれ

30

40

50

ない。しかし、第1の可変ドメインの文脈で定義されるCDRが、重鎖可変ドメインに移植されるかもしれません、第2の可変ドメインの文脈で定義されるCDRが、軽鎖可変ドメインに移植されるかもしれません、上記の考慮事項が、必要な変更を加えて適用できることもまた、当業者であれば理解できるであろう。

【0171】

本発明の文脈において、本発明の抗原結合タンパク質のCDRは、国際公開第2017/158103号パンフレットに開示されるように、少なくとも前記親TCR R7P1D5のCDRa3のアミノ酸配列において、天然および親TCR R7P1D5のCDRと異なる。当業者であれば理解できるように、本明細書で上に定義されるCDRa3は、親TCR R7P1D5のCDRa3であるアミノ酸配列「CAEYSSASKIIF」(配列番号7)を含まずまたはそれからならない。10

【0172】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質の文脈で本明細書に定義される第1の可変ドメインおよび第2の可変ドメインは、IMGT番号付けによる44位のアミノ酸置換を含んでなってもよい。好ましい実施形態では、対合を改善するために、44位の前記アミノ酸が別の適切なアミノ酸で置換される。特定の実施形態では、好ましくは、前記抗原結合タンパク質がTCRである場合、前記アミノ酸置換は、例えば、鎖の対合(すなわち、好ましい実施形態における、および鎖の対合またはおよびの対合)を改善し、第1の可変ドメイン(v₁44)の44位に存在するアミノ酸、第2の可変ドメインn(v₂44)の44位に存在するアミノ酸の一方または両方は、v₁44D/v₂44R、v₁44R/v₂44D、v₁44E/v₂44K、v₁44K/v₂44E、v₁44D/v₂44K、v₁44K/v₂44D、v₁44R/v₂44E; v₁44E/v₂44R、v₁44L/v₂44W、v₁44W/v₂44L、v₁44V/v₂44W、v₁44W/v₂44Vからなるアミノ酸対の群から選択されるアミノ酸対v₁44/v₂44中に置換される。20

【0173】

したがって、さらなる実施形態では、抗原結合タンパク質は、v₁Q44D/v₂Q44R; v₁Q44R/v₂Q44D; v₁Q44E/v₂Q44K; v₁Q44K/v₂Q44E; v₁Q44D/v₂Q44K; v₁Q44K/v₂Q44D; v₁Q44E/v₂Q44R; v₁Q44R/v₂Q44E; v₁Q44L/v₂Q44W; v₁Q44W/v₂Q44L; v₁Q44V/v₂Q44W; およびv₁Q44W/v₂Q44V; v₁W44D/v₂Q44R; v₁W44R/v₂Q44D; v₁W44E/v₂Q44K; v₁W44K/v₂Q44E; v₁W44D/v₂Q44K; v₁W44K/v₂Q44D; v₁W44E/v₂Q44R; v₁W44R/v₂Q44E; v₁W44L/v₂Q44W; v₁W44L/v₂Q44L; v₁W44V/v₂Q44W; およびv₁W44/v₂Q44V; v₁H44D/v₂Q44R; v₁H44R/v₂Q44D; v₁H44E/v₂Q44K; v₁H44K/v₂Q44E; v₁H44D/v₂Q44K; v₁H44K/v₂Q44D; v₁H44E/v₂Q44R; v₁H44R/v₂Q44E; v₁H44L/v₂Q44W; v₁H44W/v₂Q44L; v₁H44V/v₂Q44W; およびv₁H44W/v₂Q44V; v₁K44D/v₂Q44R; v₁K44R/v₂Q44D; v₁K44E/v₂Q44K; v₁K44K/v₂Q44D; v₁K44E/v₂Q44R; v₁K44R/v₂Q44E; v₁K44L/v₂Q44W; v₁K44W/v₂Q44L; v₁K44V/v₂Q44W; およびv₁K44W/v₂Q44V; v₁E44D/v₂Q44R; v₁E44R/v₂Q44D; v₁E44E/v₂Q44K; v₁E44K/v₂Q44E; v₁E44D/v₂Q44K; v₁E44K/v₂Q44D; v₁E44E/v₂Q44R; v₁E44R/v₂Q44E; v₁E44L/v₂Q44W; v₁E44W/v₂Q44L; v₁E44V/v₂Q44W; およびv₁E44W/v₂Q44V; v₁Q44D/v₂R44; v₁Q44R/v₂R44; v₁Q44E/v₂R44K; v₁Q44K/v₂R44E; v₁Q44D/v₂R44K; v₁Q44K/v₂R44D; v₁Q44E/v₂R44; v₁Q44R/v₂30

R44K; v₁Q44E/v₂R44D; v₁Q44D/v₂R44; v₁Q44R/v₂40

R44K; v₁Q44E/v₂R44D; v₁Q44D/v₂R44; v₁Q44R/v₂50

R 4 4 E ; v₁Q 4 4 L / v₂R 4 4 W ; v₁Q 4 4 W / v₂R 4 4 L ; v₁Q 4 4 V / v₂R 4 4 W ; および v₁Q 4 4 W / v₂R 4 4 V ; v₁W 4 4 D / v₂R 4 4 ; v₁W 4 4 R / v₂R 4 4 D ; v₁W 4 4 E / v₂R 4 4 K ; v₁W 4 4 K / v₂R 4 4 E ; v₁W 4 4 D / v₂R 4 4 K ; v₁W 4 4 K / v₂R 4 4 D ; v₁W 4 4 E / v₂R 4 4 ; v₁W 4 4 R / v₂R 4 4 E ; v₁W 4 4 L / v₂R 4 4 W ; v₁W 4 4 / v₂R 4 4 L ; v₁W 4 4 V / v₂R 4 4 W ; および v₁W 4 4 / v₂R 4 4 V ; v₁H 4 4 D / v₂R 4 4 ; v₁H 4 4 R / v₂R 4 4 D ; v₁H 4 4 E / v₂R 4 4 K ; v₁H 4 4 K / v₂R 4 4 E ; v₁H 4 4 D / v₂R 4 4 K ; v₁H 4 4 K / v₂R 4 4 D ; v₁H 4 4 E / v₂R 4 4 ; v₁H 4 4 R / v₂R 4 4 E ; v₁H 4 4 L / v₂R 4 4 W ; v₁H 4 4 W / v₂R 4 4 L ; v₁H 4 4 V / v₂R 4 4 W ; および v₁H 4 4 W / v₂R 4 4 V ; v₁K 4 4 D / v₂R 4 4 ; 10 v₁K 4 4 R / v₂R 4 4 D ; v₁K 4 4 E / v₂R 4 4 K ; v₁K 4 4 / v₂R 4 4 E ; v₁K 4 4 D / v₂R 4 4 K ; v₁K 4 4 / v₂R 4 4 ; v₁K 4 4 R / v₂R 4 4 E ; v₁K 4 4 L / v₂R 4 4 W ; v₁K 4 4 W / v₂R 4 4 L ; v₁K 4 4 R / v₂R 4 4 V ; および v₁K 4 4 W / v₂R 4 4 V ; v₁E 4 4 D / v₂R 4 4 ; v₁E 4 4 R / v₂R 4 4 D ; v₁E 4 4 / v₂R 4 4 K ; v₁E 4 4 K / v₂R 4 4 E ; v₁E 4 4 D / v₂R 4 4 K ; v₁E 4 4 / v₂R 4 4 ; v₁E 4 4 R / v₂R 4 4 D ; v₁E 4 4 L / v₂R 4 4 W ; v₁E 4 4 W / v₂R 4 4 L ; v₁E 4 4 V / v₂R 4 4 W ; および v₁E 4 4 W / v₂R 4 4 V ; v₁Q 4 4 D / v₂K 4 4 R ; v₁Q 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁Q 4 4 E / v₂K 4 4 D ; v₁Q 4 4 R / v₂K 4 4 E ; v₁Q 4 4 L / v₂K 4 4 W ; v₁Q 4 4 W / v₂K 4 4 L ; v₁Q 4 4 V / v₂K 4 4 W ; および v₁Q 4 4 W / v₂K 4 4 V ; v₁W 4 4 D / v₂K 4 4 ; v₁W 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁W 4 4 E / v₂K 4 4 K ; v₁W 4 4 K / v₂K 4 4 E ; v₁W 4 4 D / v₂K 4 4 E ; v₁W 4 4 / v₂K 4 4 K ; v₁W 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁W 4 4 L / v₂K 4 4 W ; v₁W 4 4 W / v₂K 4 4 L ; v₁W 4 4 V / v₂K 4 4 W ; および v₁W 4 4 / v₂K 4 4 V ; v₁H 4 4 D / v₂K 4 4 R ; v₁H 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁H 4 4 E / v₂K 4 4 K ; v₁H 4 4 K / v₂K 4 4 E ; v₁H 4 4 D / v₂K 4 4 K ; v₁H 4 4 / v₂K 4 4 ; v₁H 4 4 R / v₂K 4 4 E ; v₁H 4 4 L / v₂K 4 4 W ; v₁H 4 4 W / v₂K 4 4 L ; v₁H 4 4 V / v₂K 4 4 W ; および v₁H 4 4 W / v₂K 4 4 V ; v₁K 4 4 D / v₂K 4 4 R ; v₁K 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁K 4 4 E / v₂K 4 4 K ; v₁K 4 4 / v₂K 4 4 E ; v₁K 4 4 D / v₂K 4 4 R ; v₁K 4 4 R / v₂K 4 4 E ; v₁K 4 4 L / v₂K 4 4 W ; v₁K 4 4 W / v₂K 4 4 L ; v₁K 4 4 V / v₂K 4 4 W ; および v₁K 4 4 W / v₂K 4 4 V ; v₁E 4 4 D / v₂K 4 4 R ; v₁E 4 4 R / v₂K 4 4 D ; v₁E 4 4 / v₂K 4 4 K ; v₁E 4 4 K / v₂K 4 4 E ; v₁E 4 4 D / v₂K 4 4 E ; v₁E 4 4 / v₂K 4 4 R ; v₁E 4 4 R / v₂K 4 4 E ; v₁E 4 4 L / v₂K 4 4 W ; v₁E 4 4 W / v₂K 4 4 L ; v₁E 4 4 V / v₂K 4 4 W ; および v₁E 4 4 W / v₂K 4 4 V ; v₁Q 4 4 V からなる群から選択される、好ましい置換対 (v₁4 4 / v₂4 4) の 1 つをさらに含んでもよい。 30

【0174】

上記において、例えば、「v₁Q 4 4 R / v₂Q 4 4 D」とは、第1の可変ドメインではQ 4 4 がRで置換され、第2の可変ドメインではQ 4 4 がDで置換されていることを意味するものとする。追加的な置換および説明は、米国特許出願第2018-0162922号明細書に記載される。

【0175】

本発明の発明者らは、T C R および 可変ドメインから最初に得られたC D R が、天然のT C R とは異なる形態を有する抗原結合タンパク質で使用されてもよいことを実証した。例えば、実験の項では、本発明者らは、本明細書で以下に詳細に記載され、実施例（すなわち、実施例6）で示されるように、T C R E（商標）形態のT C R および 可変

10

20

30

40

50

ドメインの CDR を使用した。

【0176】

さらに、本発明者らは、scTCR を含んでなる二重特異性 TCR において、または VH(CD3) - CH1 - V - LZ - VL を含んでなる第1のポリペプチドと、VL(CD3) - CL を含んでなる第2のポリペプチドとを含んでなる Fab 安定化 scTCR などの一本鎖 TCR コンストラクトにおいて、本発明の文脈で定義される CDR を使用した。その中では、VH(CD3)、VL(CD3)、V、および VL は上記で定義され、LZ は、配列番号 108 のアミノ酸配列 GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGG からなるリンカーであり、CH1 は、重鎖の定常ドメインであり、CL は、軽鎖の定常領域である（実施例 4）。

10

【0177】

したがって、当業者はこれらの実験から、本発明の文脈で本明細書に定義される CDR が、本発明の異なる抗原結合タンパク質で使用されてもよく、したがって、本明細書に開示される異なる形態で使用されてもよいことを原理的な証明として理解している。当業者であれば、1つの抗原結合形態の文脈で実証された、本発明の抗原結合タンパク質の結合特性が、抗原結合タンパク質の形態が変化したときに少なくとも保存されることが好ましいことをさらに理解するであろう（すなわち、少なくとも第1および第2の可変ドメインの CDR アミノ酸配列、好ましくは第1および第2の可変ドメインのアミノ酸は同一である）。

【0178】

既に上述したように、本発明の文脈における CDR の結合機能性は、抗体のフレームワークにおいて提供されてもよい。例えば、おそらく 3、2 または 1 つの追加的な N および / または C 末端フレームワーク残基を含む、本発明の文脈で定義される CDR アミノ酸配列が、抗体可変重鎖 / 軽鎖配列に直接グラフトされてもよい。より具体的には、本発明の文脈で定義される CDRa1、CDRa2、および CDRa3 ドメインは、可変重鎖アミノ酸配列にグラフトされてもよく、本発明の文脈で定義される CDRb1、CDRb2、および CDRb3 は、可変軽鎖アミノ酸配列にグラフトされてもよく、逆もまた同様である。

20

【0179】

これもまた理解されるように、いくつかの実施形態では、抗体内において、抗体の可変軽鎖ドメインが本発明の文脈で定義される第1の可変ドメインによって置き換えられてもよく、可変重鎖ドメインが本発明の文脈で定義される第2の可変ドメインによって置き換えられてもよく、逆もまた同様である。

30

【0180】

しかし、好ましい実施形態では、抗原結合タンパク質は、フレームワーク領域およびフレームワーク領域をさらに含んでなる。

【0181】

一実施形態では、前記第1の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは FR1-a、FR2-a、FR3-a、および FR4-a からなる群から選択される、FR1-a、FR2-a、FR3-a、および FR4-a をさらに含んでなり、その中では、

40

- FR1-a は、「EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT」配列番号 83 のアミノ酸配列、または配列番号 83 と少なくとも 85 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- FR2-a は、「LYWYKQEPGAGLQLLTY」配列番号 84 のアミノ酸配列、または配列番号 84 と少なくとも 85 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- FR3-a は、「KQDQRLLTVLLNKDKHLSSLRIADTQTGDSAIYF」配列番号 85 のアミノ酸配列、または配列番号 85 と少なくとも 85 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

50

- F R 4 - a は、「G S G T R L S I R P」配列番号 8 6 のアミノ酸配列、または配列番号 8 6 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、前記第 2 の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b からなる群から選択される、F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b をさらに含んでなり、式中、

- F R 1 - b は、「D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I」配列番号 8 7 のアミノ酸配列、または配列番号 8 7 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 2 - b は、「L F W Y R Q T M M R G L E L L I Y」配列番号 8 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 8 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 3 - b は、「I D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F」配列番号 8 9 のアミノ酸配列、または配列番号 8 9 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または

- F R 4 - b は、「G E G S R L T V L」配列番号 9 0 のアミノ酸配列、または配列番号 9 0 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0182】

一実施形態では、前記第 1 の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a からなる群から選択される、F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a をさらに含んでなり、その中では、

- F R 1 - a は、「E D V E Q S L F L S V R E G D S S V I N C T Y T」配列番号 8 3 のアミノ酸配列、または配列番号 8 3 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

- F R 2 - a は、「L Y W Y K Q E P G A G L Q L L T Y」配列番号 8 4 のアミノ酸配列、または配列番号 8 4 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 3 - a は、「K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F」配列番号 8 5 のアミノ酸配列、または配列番号 8 5 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 4 - a は、「G S G T R L S I R P」配列番号 8 6 のアミノ酸配列、または配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、前記第 2 の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b からなる群から選択される、F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b をさらに含んでなり、その中では、

- F R 1 - b は、「D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I」配列番号 8 7 のアミノ酸配列、または配列番号 8 7 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 2 - b は、「L F W Y R Q T M M R G L E L L I Y」配列番号 8 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 8 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 3 - b は、「I D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F」配列番号 8 9 のアミノ酸配列、または配列番号 8 9 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり；または

- F R 4 - b は、「G E G S R L T V L」配列番号 9 0 のアミノ酸配列、または配列番号 9 0 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0183】

一実施形態では、前記第 1 の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a からなる群から選択される、F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a をさらに含んでなり、

10

20

30

40

50

その中では、

- F R 1 - a は、「 E D V E Q S L F L S V R E G D S S V I N C T Y T 」配列番号 8 3 のアミノ酸配列、または配列番号 8 3 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 2 - a は、「 L Y W Y K Q E P G A G L Q L L T Y 」配列番号 8 4 のアミノ酸配列、または配列番号 8 4 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 3 - a は、「 K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F 」配列番号 8 5 のアミノ酸配列、または配列番号 8 5 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 4 - a は、「 G S G T R L S I R P 」配列番号 8 6 のアミノ酸配列、または配列番号 8 6 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、前記第 2 の可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b からなる群から選択される、 F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b をさらに含んでなり、その中では、

- F R 1 - b は、「 D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I 」配列番号 8 7 のアミノ酸配列、または配列番号 8 7 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 2 - b は、「 L F W Y R Q T M M R G L E L L I Y 」配列番号 8 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 8 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

- F R 3 - b は、「 I D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F 」配列番号 8 9 のアミノ酸配列、または配列番号 8 9 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり；または

- F R 4 - b は、「 G E G S R L T V L 」配列番号 9 0 のアミノ酸配列、または配列番号 9 5 と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 8 4 】

したがって、本発明の抗原結合タンパク質は、好ましくは、例えば、本明細書で上に記載される 定常ドメインおよび / または 定常ドメイン、または および / または 定常ドメインなどの定常ドメインをさらに含んでなる。好ましくは、 および 定常ドメイン および / または および 定常ドメインは、天然 T C R には存在しないさらなる変異を含んでなり、2つの遺伝子組換え鎖、すなわち および 鎖の対合を増強する。例えば、 T R A C の 4 8 位および T R B C 1 または T R B C 2 の 5 7 位が、システイン残基によって置換されてもよい。このような修飾のさらなる例は、上に記載されている。本発明の抗原結合タンパク質に含まれる 定常ドメインおよび 定常ドメインの例は、配列番号 8 (T C R R 7 P 1 D 5 の 定常ドメイン) および配列番号 1 5 (T C R R 7 P 1 D 5 の 定常ドメイン) である。

【 0 1 8 5 】

一実施形態では、本発明の抗原結合分子は、例えば、少なくとも 1 つの 可変ドメイン および 1 つの 可変ドメインを含んでなる分子 (/ T C R) 、または少なくとも 1 つの 可変ドメインまたは 可変ドメインを含んでなる分子などの本明細書で上に定義される T C R 分子を含んでなる。換言すれば、このような T C R は、ヘテロ二量体分子、すなわち / および / ヘテロ二量体である。

【 0 1 8 6 】

養子細胞療法 (A C T) で使用するために、 / または / ヘテロ二量体 T C R は、細胞質ドメインと膜貫通ドメインの双方を有する完全長鎖として、患者の T 細胞に形質移入されてもよい。定常ドメインは、適切な変異、すなわちジスルフィド結合を含んでなつて、所望の遺伝子組換え / または / 鎖の対合を改善し、内在性 / または / とそれぞれの遺伝子組換え鎖との対合を低減してもよい。したがって、本発明の抗原結合タンパク質は、好ましくは、例えば、本明細書で上に記載される 定常ドメインおよ

10

20

30

40

50

び／または 定常ドメインなどの定常ドメインをさらに含んでなる。好ましくは、 および 定常ドメインは、天然 T C R には存在しないさらなる変異を含んでなって、 2 つの鎖、 すなわち、 それぞれ および 鎖、 または および 鎖の対合を増強する。例えば、 T R A C の 4 8 位および T R B C 1 または T R B C 2 の 5 7 位が、 システイン残基によって置換される。本発明の抗原結合タンパク質に含まれる 定常ドメインおよび 定常ドメインの例は、 配列番号 8 (T C R R 7 P 1 D 5 の 定常ドメイン) および配列番号 1 5 (T C R R 7 P 1 D 5 の 定常ドメイン) である。

【 0 1 8 7 】

好ましい実施形態では、 T C R は、 C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖と； C D R 1 、 C D R 2 、 C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖とを含んでなる。さらなる好ましい実施形態では、 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R a 1 、 C D R a 2 、 および C D R a 3 を含んでなり、 その中では、 C D R a 1 は、 配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 2 は、 配列番号 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 3 は、 配列番号 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 のアミノ酸配列、 好ましくは配列番号 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 のアミノ酸配列、 より好ましくは配列番号 3 5 などの配列番号 3 5 および 3 8 アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり； 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R b 1 、 C D R b 2 、 および C D R b 3 を含んでなり、 その中では、 C D R b 1 は、 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 2 は、 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 3 は、 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 8 8 】

好ましい実施形態では、 T C R は、 C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖と； C D R 1 、 C D R 2 、 C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖とを含んでなる。さらなる好ましい実施形態では、 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R a 1 、 C D R a 2 、 および C D R a 3 を含んでなり、 その中では、 C D R a 1 は、 配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 2 は、 配列番号 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 3 は、 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R b 1 、 C D R b 2 、 および C D R b 3 を含んでなり、 その中では、 C D R b 1 は、 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 2 は、 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 3 は、 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 8 9 】

別的好ましい実施形態では、 T C R は、 C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖と； C D R 1 、 C D R 2 、 C D R 3 を含んでなる、 可変ドメインを含んでなり、 定常ドメインをさらに含んでなる 鎖とを含んでなる。さらなる好ましい実施形態では、 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R a 1 、 C D R a 2 、 および C D R a 3 を含んでなり、 その中では、 C D R a 1 は、 配列番号 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 2 は、 配列番号 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R a 3 は、 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 可変ドメインは、 3 つの相補性決定領域 (C D R) である C D R b 1 、 C D R b 2 、 および C D R b 3 を含んでなり、 その中では、 C D R b 1 は、 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 2 は、 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 C D R b 3 は、 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0190】

別の好ましい実施形態では、 T C R の可変 および ドメインは、それぞれ、 フレームワーク領域および フレームワーク領域をさらに含んでなる。

【0191】

一実施形態では、前記第1の 可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域 、好ましくは F R 1 - a 、 F R 2 - a 、 F R 3 - a 、および F R 4 - a からなる群から選択される、 F R 1 - a 、 F R 2 - a 、 F R 3 - a 、および F R 4 - a をさらに含んでなり 、その中では、 F R 1 - a は、「 E D V E Q S L F L S V R E G D S S V I N C T Y T 」配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F R 2 - a は、「 L Y W Y K Q E P G A G L Q L L T Y 」配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F R 3 - a は、「 K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F 」配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F R 4 - a は、「 G S G T R L S I R P 」配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、

前記第2の 可変ドメインは、1つまたは複数のフレームワーク領域 、好ましくは F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b からなる群から選択される、 F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b をさらに含んでなり 、その中では、 F R 1 - b は、「 D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I 」配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F R 2 - b は、「 L F W Y R Q T M M R G L E L L I Y 」配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F R 3 - b は、「 I D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F 」配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または F R 4 - b は、「 G E G S R L T V L 」配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0192】

別の好ましい実施形態では、 T C R は、配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 と少なくとも 8 5 % 、 9 0 % または 9 5 % 同一である配列を含んでなるかまたはそれからなる定常ドメインをさらに含んでなる、上記で定義された可変ドメインのいずれかを含んでなり ; 定常ドメインは、配列番号 1 5 のアミノ酸配列、または配列番号 1 5 と少なくとも 8 5 % 、 9 0 % または 9 5 % 同一である配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0193】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質の変異型が想定され、本明細書で上に「定義」の項で定義される「参考配列と少なくとも 8 5 % 同一である」という表現を用いて、明示的に言及される。例えば、配列 F R 1 - a 、 F R 2 - a 、 F R 3 - a 、および F R 4 - a 、および F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b は、適切な場合は、少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって、特に少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換によって、および / またはカノニカル残基との置換によって、配列番号 8 3 、配列番号 8 4 、配列番号 8 5 、配列番号 8 6 配列番号 8 7 、配列番号 8 8 、配列番号 8 9 、および配列番号 9 0 の参考配列と異なってもよい。特に、第1および第2の可変ドメインの配列 F R 1 - a 、 F R 2 - a 、 F R 3 - a 、および F R 4 - a 、および F R 1 - b 、 F R 2 - b 、 F R 3 - b 、および F R 4 - b は、保存的アミノ酸置換のみによって、配列番号 8 3 、配列番号 8 4 、配列番号 8 5 、配列番号 8 6 ，配列番号 8 7 、配列番号 8 8 、配列番号 8 9 、および配列番号 9 0 の参考配列と異なってもよい。

【0194】

本発明の抗原結合タンパク質のアミノ酸配列、および対応する D N A 配列にそれぞれ修飾および変更が加えられてもよく、それでもなお、望ましい特性を有する機能的抗原結合タンパク質またはポリペプチドが帰結する。修飾は、第1または第2の可変ドメイン、特にフレームワーク領域、または各 C D R 、または第1および / または第2の可変ドメインに含まれる全ての C D R に加えられてもよい。

10

20

30

40

50

【0195】

本発明の発明者らはさらに、親 T C R R 7 P 1 D 5 のフレームワーク領域を使用することによって、抗原結合タンパク質のフレームワーク領域における特定のアミノ酸置換が有利な効果を有することを発見した。特に、アミノ酸置換 S 19 A または S 19 V、好ましくは S 19 V は、可溶性一本鎖 T C R コンストラクトの発現に決定的に重要であり、それに加えて、その第の 2 アミノ酸位置の Y (すなわち、IMGT によるアミノ酸 57) を含んでなる C D R a 2 アミノ酸配列は、C D R a 2 中の Y (57 Y) である。さらに、本発明者らは、F R 2 - a 中のアミノ酸置換 A 48 K、L 50 P、F R 2 - b 中のアミノ酸置換 M 46 P、M 47 G を単独または組み合わせて使用することで、本発明の可溶性抗原結合タンパク質の発現収量が増加することを発見した。本発明者らはまた、F R 2 - b 中の I 54 F が、可溶性抗原結合タンパク質の発現収量を増加させ、特に IMGT による 109 位に D を含んでなる C D R b 3 アミノ酸配列に加えて、可溶性抗原結合タンパク質の安定性を増加させることを示した。さらに、本発明者らは、F R 2 - b 中の I 54 F 置換が、可溶性抗原結合タンパク質の特異性を有意に改善することを見いたした。

10

【0196】

したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質のフレームワーク領域は、
- F R 1 - a の 19 位でのアミノ酸置換 (前記アミノ酸置換は、好ましくは S 19 A、S
19 V、より好ましくは S 19 V である) 、
- F R 2 - a の 48 および / または 50 位でのアミノ酸置換 (前記 48 位でのアミノ酸置
換は、好ましくは A 48 K であり、前記 50 位でのアミノ酸置換は、好ましくは L 50 P
である) 、
- F R 2 - b の 46、47 および / または 54 位でのアミノ酸置換 (前記 46、47 およ
び / または 54 位でのアミノ酸置換は、好ましくはそれぞれ M 46 P、M 47 G、および
I 54 F であり、上記で定義される C D R b 3 アミノ酸配列が 109 位のアミノ酸 109
D を含んでなる場合には、前記 54 位のアミノ酸は、好ましくは I 54 F である) 、
- F R 3 - b の 66 位でのアミノ酸置換 (前記 66 位でのアミノ酸置換は、好ましくは I
66 C であり、上記で定義される C D R b 2 アミノ酸配列が 57 位のアミノ酸 57 C を含
んでなる場合には、前記 66 位のアミノ酸は、好ましくは 66 C である)

20

を含んでなるアミノ酸置換の群から選択される、少なくとも 1 つのアミノ酸置換、好ましくは 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 など、より好ましくは 3 または 4 など
の 1 ~ 5、2 ~ 5 個のアミノ酸置換を含んでなり、
その中では、置換の位置は、IMGT 命名法に従って付与され、その中では、任意選択的
に、前記アミノ酸置換は、親 T C R R 7 P 1 D 5 の対応するフレームワークアミノ酸配
列のアミノ酸配列と比較して与えられる。

30

【0197】

好ましい実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質のフレームワーク領域は、アミノ
酸置換 S 19 V、A 48 K、および I 54 F または S 19 V、A 48 K、好ましくは S 1
9 V、A 48 K、および I 54 F を含んでなり、その中では、置換の位置は、IMGT の
命名法に従って付与される。一実施形態では、前記アミノ酸置換の組み合わせは、有利には、アミノ酸配列「C A S R A X₁ T G E L F F」配列番号 82 を含んでなるかまたはそれからなる C D R b 3 と、さらに組み合わされ、その中では、X₁ は D であり、または IMGT 番号付けによれば、その中では、C D R b 3 アミノ酸は、109 位にアミノ酸 109 D を含んでなる。さらなる好ましい実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質のフレ
ームワーク領域は、アミノ酸置換 I 66 C をさらに含んでなり、その中では、好ましくは
、F R 3 - b は、上記で定義される C D R b 2 アミノ酸配列が位置 57 にアミノ酸 57 C
を含んでなる場合、アミノ酸置換 I 66 C を含んでなる。

40

【0198】

したがって、一実施形態では、前記第 1 の可変ドメインは、1 つまたは複数のフレーム
ワーク領域、好ましくは F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a からなる
群から選択される全てのフレームワーク領域をさらに含んでなり、その中では、

50

- F R 1 - a が、「L Y W Y K Q E P G K G L Q L L T Y」配列番号 9 1 のアミノ酸配列、または配列番号 8 5 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、好ましくは配列番号 8 5 と少なくとも 9 1 % 同一である前記アミノ酸配列が、アミノ酸 1 9 V (配列番号 9 1 中で下線が引かれている) を含んでなり。

- F R 2 - a が、「L Y W Y K Q E P G K G L Q L L T Y」配列番号 9 2 のアミノ酸配列、または配列番号 8 5 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、好ましくは配列番号 8 5 と少なくとも 9 2 % 同一である前記アミノ酸配列が、アミノ酸 4 8 K (配列番号 9 2 中で下線が引かれている) と、任意選択的に 5 0 位でのアミノ酸置換、好ましくは L 5 0 P を含んでなり。

- F R 3 - a が、「K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F」配列番号 8 5 のアミノ酸配列、または配列番号 8 5 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり。

- F R 4 - a は、「G S G T R L S I R P」配列番号 8 6 のアミノ酸配列、または配列番号 8 6 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、前記第 2 の可変ドメインが、F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b からなる群から選択される 1 つまたは複数のフレームワーク領域、好ましくは複数のフレームワーク領域をさらに含んでなり。

- F R 1 - b は、「D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I」配列番号 8 7 のアミノ酸配列、または配列番号 8 7 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり。

- F R 2 - b は、「L F W Y R Q T M M R G L E L L F Y」配列番号 9 3 のアミノ酸配列、または配列番号 9 3 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、好ましくは前記アミノ酸配列は、アミノ酸 5 4 F と、任意選択的に 4 6 および / または 4 7 位でのアミノ酸置換とを含んでなる配列番号 9 3 と少なくとも 8 5 % 同一であり、その中では、前記 4 6 および / または 4 7 位でのアミノ酸置換は、好ましくはそれぞれ、M 4 6 P および / または M 4 7 G であり。

- F R 3 - b は、「I D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F」配列番号 8 9 のアミノ酸配列、または配列番号 8 9 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列、または「C D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F」配列番号 9 4 のアミノ酸配列または配列番号 9 4 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、その中では、好ましくは前記アミノ酸配列は、アミノ酸 6 6 C を含んでなる配列番号 9 4 と少なくとも 8 5 % 同一であり、上記で定義される C D R b 2 アミノ酸配列が 5 7 位のアミノ酸 5 7 C を含んでなる場合には、好ましくは配列番号 9 4 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる F R 3 - b が、アミノ酸 6 6 C を含んでなり。

- F R 4 - b は、「G E G S R L T V L」配列番号 9 0 のアミノ酸配列、または配列番号 9 0 と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【 0 1 9 9 】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質の変異型が想定され、本明細書で上に「定義」の項で定義される「参照配列と少なくとも 8 5 % 同一である」という表現を用いて、明示的に言及される。例えば、配列 F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a、および F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b は、適切な場合は、少なくとも 1 つのアミノ酸置換によって、特に少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換によって、および / またはカノニカル残基との置換によって、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 9 3 および配列番号 8 9 または配列番号 9 4、配列番号 9 0 の参考配列と異なってもよい。特に、第 1 および第 2 の可変ドメインの配列 F R 1 - a、F R 2 - a、F R 3 - a、および F R 4 - a、および F R 1 - b、F R 2 - b、F R 3 - b、および F R 4 - b は、保存的アミノ酸置換のみによって、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 9 3 および配列番号 8 9 または配列番号 9 4、配列番号 9 0 の参考配列と異なってもよい。

10

20

30

40

50

【0200】

本発明の抗原結合タンパク質のアミノ酸配列、および対応するそれらをコード化するDNA配列に、修飾および変更が加えられてもよく、それでもなお、望ましい特性を有する機能的抗原結合タンパク質またはポリペプチドが帰結する。

【0201】

したがって、一実施形態では、本発明は、以下を含んでなる抗原結合タンパク質に言及する：

(i) 「EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
EPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP」配列番号11
10
8、「EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
PGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEFTSESKIIFGSGTRLSIRP」配列番号119
、「EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
GAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEFNSESKIIFGSGTRLSIRP」配列番号120、
「EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
AGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRP」配列番号121、「
EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
GLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEATSESKIIFGSGTRLSIRP」配列番号122、好ましくは配列番号118および配列番号121、より好ましくは配列番号118、または配列番号118～122からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列（式中、配列番号118～122からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%同一の前記アミノ酸配列が、配列番号118～122の場合には、好ましくは、配列番号5のCDR a1、配列番号6のCDR a2、および配列番号35、36、37、38、39のCDR a3のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、

(ii) 配列番号11のアミノ酸配列、または配列番号11と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる、第2のポリペプチド鎖（式中、配列番号11のアミノ酸配列と少なくとも85%同一である前記アミノ酸配列は、好ましくは配列番号12、13、および14のCDR b1、CDR b2、およびCDR b3のアミノ酸配列をそれぞれ含んでなる）、または

(iii) 好ましくは、アミノ酸配列「EDVEQSLFLSVREGDSSV
VINCTYTDSSSTYLYWYKQE
PGKGQLLTYIYSSQDQKQDQRLL
TVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEMTSESKII
FGSGTRLSIRP」配列番号151または「EDVEQSLFLSVREGDSSV
VINCTYTESSSTYLYWYKQE
PGKGQLLTYIYSSQDQKQDQRLL
TVLLNKKDKHLSLRIA
DTQTDGDSAIYFCAEMTSESKII
FGSGTRLSIRP」配列番号152を含んでなる、第1の可変ドメインを含んでなる第1のポリペプチド鎖、または配列番号151または152のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列（式中、好ましくは、配列番号151のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列は、好ましくは配列番号5のCDR a1、配列番号56のCDR a2、および配列番号35のCDR a3のアミノ酸配列を含んでなり、式中、好ましくは、配列番号152のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列は、好ましくは配列番号55のCDR a1、配列番号56のCDR a2、および配列番号35のCDR a3のアミノ酸配列を含んでなり、好ましくはアミノ酸19Vおよび/または48Kをさらに含んでなる）、

10

20

30

40

50

(iv) アミノ酸配列「DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKP₁PGH
DYLFWYRQTMMRGLELL₂EYFCYGTP₃CDDSGMPEDRFSAKM
PNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGE₄LFFGEGSRL
TVL」配列番号149または「DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKP₁
IPGH₂DYLFWYRQTMMRGLELL₃EYFCYGTP₄CDDSGMPEDRF
SAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTGE₅LFFGE
GSRLTVL」配列番号150を含んでなる、第2の可変ドメインを含んでなる第2の
ポリペプチド鎖（式中、好ましくは、配列番号149のアミノ酸配列と少なくとも85%
同一であるアミノ酸配列は、好ましくは配列番号62のCDR_b1、配列番号65のCD
R_b2、および配列番号14のCDR_b3のアミノ酸配列を含んでなり、式中、好ましく
は、配列番号150のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列は、配列
番号62のCDR_b1、配列番号65のCDR_b2、および配列番号71のCDR_b3の
アミノ酸配列を含んでなり、好ましくはアミノ酸54Fおよび/または66Cをさらに含
んでなる）。

【0202】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、抗体またはその断片、または二重特異性抗体
またはその断片、またはT細胞受容体（TCR）またはその断片、または二重特異性T細
胞受容体（TCR）またはその断片である。抗体、TCR、およびそれぞれの断片は、本
明細書で上に「定義」の項で定義される。

【0203】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、ヒト起源であり、これは、ヒト抗原遺伝子座
から生成され、したがって、ヒト配列、特にヒトTCRまたは抗体配列を含んでなるもの
と理解される。

【0204】

一実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、特に共有結合を介
して共に連結される。

【0205】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、可溶性タンパク質である。

【0206】

「共有結合」、「リンカー配列」または「ポリペプチドリンカー」は、本明細書で上に
「定義」の項で定義される（「リンカー」を参照されたい）。

【0207】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、以下の1つまたは複数をさらに含ん
でなる：

- (i) 1つまたは複数のさらなる抗原結合部位；
- (ii) 任意選択的に細胞質シグナル伝達領域を含む膜貫通領域、
- (iii) 診断薬；
- (iv) 治療薬；または
- (v) PK修飾部分。

【0208】

当業者に知られているように、例えば、抗体の文脈における抗原結合部位は、典型的には、抗原に結合する6つのCDRによって形成される。

【0209】

本発明の文脈において、本明細書で上に(i)で言及される1つまたは複数のさらなる
抗原結合部位は、好ましくは、抗原CD0(CD1、CD2、およびCD2鎖など)
、CD2、CD4、CD5、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16
、CD18、CD22、CD25、CD28、CD32a、CD32b、CD33、CD
41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD
55、CD56、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、C
D123、CD125、CD134、CD137、CD152、CD163、CD193

10

20

30

40

50

、 C D 2 0 3 c 、 C D 2 3 5 a 、 C D 2 7 8 、 C D 2 7 9 、 C D 2 8 7 、 N k p 4 6 、 N K G 7 D 、 G I T R 、 F c R I 、 T C R / および T C R / 、 H L A - D R からなる群から選択される抗原に、またはエフェクター細胞の抗原、好ましくは C D 3 、 T C R / または C D 2 8 、より好ましくは C D 3 および T C R / に、結合する結合部位から選択される。

【 0 2 1 0 】

「 C D 3 」および「 C D 2 8 」は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【 0 2 1 1 】

いくつかの実施形態では、(i)で言及される 1 つまたは複数のさらなる抗原結合部位の 1 つは、T 細胞特異的受容体分子および / またはナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) 特異的受容体分子に結合できる。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、C D 3 T 細胞共受容体との複合体中にある。

10

【 0 2 1 2 】

好ましい実施形態では、(i)で言及される 1 つまたは複数のさらなる抗原結合部位の 1 つは、T C R / に結合できる。

【 0 2 1 3 】

いくつかの実施形態では、T 細胞特異的受容体は、C D 3 T 細胞共受容体である。

【 0 2 1 4 】

いくつかの実施形態では、T 細胞特異的受容体は、C D 2 8 、 C D 1 3 4 、 4 - 1 B B 、 C D 5 または C D 9 5 である。

20

【 0 2 1 5 】

「 C D 1 3 4 」、「 4 - 1 B B 」、「 C D 5 」、「 C D 9 5 」、および「 N K 細胞特異的受容体分子」は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。「膜貫通領域」、「細胞質シグナル伝達領域」、「診断薬」、「治療薬」、および「 P K 修飾部分」は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【 0 2 1 6 】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、直接、または切断可能または切断不能なリンカーを介して、少なくとも 1 つの増殖阻害剤に共有結合する。このような少なくとも 1 つの増殖阻害剤が付着する抗原結合タンパク質はまた、コンジュゲートと称されることもある。

30

【 0 2 1 7 】

例えば、免疫コンジュゲートなどのこのようなコンジュゲートの調製は、国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 1 6 6 8 号パンフレット、または H u d e c z , F . , M e t h o d s M o l . B i o l . 2 9 8 : 2 0 9 - 2 2 3 (2 0 0 5) 、および K i r i n e t a l . , I n o r g C h e m . 4 4 (1 5) : 5 4 0 5 - 5 4 1 5 (2 0 0 5) に記載され、当業者によって、このような少なくとも 1 つの増殖阻害剤が付着した本発明の抗原結合タンパク質の調製に移行されてもよい。

【 0 2 1 8 】

少なくとも 1 つの増殖阻害剤の付着の文脈における「リンカー」は、ポリペプチドを薬物部分に共有結合的に付着させる、共有結合または原子の鎖を含んでなる化学部分を意味する。

40

【 0 2 1 9 】

コンジュゲートは、インビトロ法によって調製されてもよい。結合基を使用して、薬物またはプロドラッグが抗体に結合される。適切な連結基は当該技術分野で周知であり、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基、およびエステラーゼ不安定基が挙げられる。本発明の抗原結合タンパク質と細胞傷害剤または増殖阻害剤との結合は、N - スクシンイミジルピリジルジチオブチレート (S P D B) 、ブタン酸 4 - [(5 - ニトロ - 2 - ピリジニル) ジチオ] - 2 , 5 - ジオキソ - 1 - ピロリジニルエステル (ニトロ - S P D B) 、 4 - (ピリジン - 2 - イルジスルファニル) - 2 - スルホ - 酪酸 (スルホ - S P D B) 、 N - スクシンイミジル (2 - ピリジルジチオ)

50

プロピオネート (S P D P) 、スクシンイミジル (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) 、イミノチオラン (I T) 、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート H C L など) 、活性エステル (ジスクシンイミジルスペレートなど) 、アルデヒド (グルタルアルデヒドなど) 、ビス - アジド化合物 (ビス (p - アジドベンゾイル) - ヘキサンジアミンなど) 、ビス - ジアゾニウム誘導体 (ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンなど) 、ジイソシアネート (トルエン 2 , 6 - ジイソシアネートなど) 、およびビス活性フッ素化合物 (1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンなど) をはじめとするが、これらに限定されるものではない、様々な二機能性タンパク質結合剤を使用して行われてもよい。例えば、リシン免疫毒素は、V i t e t t a e t a l (1987) に記載されたように調製され得る。炭素標識された 1 - イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、放射性ヌクレオチドを抗体に結合させるための例示的なキレート剤である (国際公開第 94 / 11026 号パンフレット)。

【0220】

リンカーは、細胞内の細胞傷害剤または増殖阻害剤の放出を促進する「切断可なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、エステラーゼ不安定リンカー、光不安定リンカー、またはジスルフィド含有リンカー（例えば、米国特許第 5 , 208 , 020 号明細書を参照されたい）が使用されてもよい。リンカーはまた、場合によっては、より良好な耐性をもたらすかもしれない「切断不能リンカー」（例えば、S M C C リンカー）であってもよい。

【0221】

代案としては、本発明の抗体および細胞傷害性または増殖阻害ポリペプチドを含んでなる融合タンパク質は、組換え技術またはペプチド合成によって生成されてもよい。D N A の長さは、互いに隣接するか、またはコンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコード化する領域によって分離されている、コンジュゲートの 2 つの部分をコードする、それぞれの領域を含んでなってもよい。

【0222】

本発明の抗原結合タンパク質はまた、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤、国際公開第 81 / 01145 号パンフレットを参照されたい）を活性抗がん剤に変換するプロドラッグ活性化酵素に、ポリペプチドをコンジュゲートすることによって、依存性酵素媒介プロドラッグ療法で使用されてもよい（例えば、国際公開第 88 / 07378 号パンフレットおよび米国特許第 4 , 975 , 278 号明細書を参照されたい）。

【0223】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、酵素、サイトカイン（ヒト I L - 2 、I L - 7 または I L - 15 などの）、ナノキャリア、または核酸の 1 つまたは複数をさらに含んでなる。

【0224】

好みの一実施形態では、抗原結合タンパク質は二重特異性である。二重特異性抗原結合タンパク質はまた、本明細書で「二重特異性分子」と称される。

【0225】

多くの異なる二重特異性形態が当該技術分野で記載され、本明細書で上に「形態」の下の「定義」の項に記載される。異なる形態のタンパク質を生成するための技術もまた、対応する項で引用される当該技術分野で開示されており、したがって当業者は、本発明の文脈で定義される C D R または可変ドメインを本明細書で開示された形態で容易に使用できる。S C T C R などの抗原結合タンパク質または T C E R (商標) などの可溶性二重特異性結合タンパク質の生成は、本明細書の実施例の項でも開示される。D V D 形態の場合のように、軽鎖および重鎖可変ドメインが平行配向であってもよく、および 可変ドメインが平行配向であってもよく、または C O D V 形態の場合のように、軽鎖および重鎖の可変ドメインが交差配向であってもよく、および 可変ドメインが交差配向であってもよいことは、当業者であれば理解できるであろう。

10

20

30

40

50

【0226】

したがって、本発明は、2つの抗原結合部位（AおよびB）を形成する2つのポリペプチド鎖を含んでなる抗原結合タンパク質にさらに言及し、

その中では、第1のポリペプチド鎖は、式、

$V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L [I]$

によって表される構造を有し、

式中、 V_3 は第3の可変ドメインであり； V_4 は第4の可変ドメインであり； L_1 および L_2 はリンカーであり； L_2 は存在してもまたは存在しなくてもよく； C_L は軽鎖定常ドメインまたはその一部であって存在しましたは存在せず；

その中では、第2のポリペプチド鎖は、式、

$V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} [II]$

によって表わされる構造を有し、

式中、 V_5 は第5の可変ドメインであり； V_6 は第6の可変ドメインであり；

L_3 および L_4 はリンカーであり； L_4 は存在してもまたは存在しなくてもよく； C_{H1} は重鎖定常ドメイン1またはその一部であって存在しましたは存在せず；式中、

V_3 または V_4 は、本明細書で上に定義される第1の可変ドメインであって V_5 または V_6 は、本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであり、または

V_5 または V_6 は本発明の文脈で定義される第1の可変ドメインであって V_3 または V_4 は本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであり、式中、

V_3 は本明細書で上に定義される第1の可変ドメインであって V_5 は第2の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_6 は重鎖可変ドメインであり、または V_4 は重鎖可変ドメインであって V_6 は軽鎖可変ドメインであり、または

V_3 は本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであって V_5 は第1の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_6 は重鎖可変ドメインであり、または V_4 は重鎖可変ドメインであって V_6 は軽鎖可変ドメインであり、または

V_3 は本明細書で上に定義される第1の可変ドメインであって V_6 は第2の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_5 は重鎖可変ドメインであり、または V_4 は重鎖可変ドメインであって V_5 は軽鎖可変ドメインであり、または

V_3 は本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであって V_6 は第1の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_5 は重鎖可変ドメインであり、または V_4 は重鎖可変ドメインであって V_5 は軽鎖可変ドメインであり、または

V_4 は本明細書で上に定義される第1の可変ドメインであって V_5 は第2の可変ドメインであり、 V_3 は軽鎖可変ドメインであって V_6 は重鎖可変ドメインであり、または V_3 は重鎖可変ドメインであって V_6 は軽鎖可変ドメインであり、または

V_4 は本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであって V_5 は第1の可変ドメインであり、 V_3 は軽鎖可変ドメインであって V_6 は重鎖可変ドメインであり、または

V_3 は重鎖可変ドメインであって V_6 は軽鎖可変ドメインであり、

その中では、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインは一緒に1つの抗原結合部位Bを形成し、その中では、本明細書で上に定義される第1および第2の可変ドメインは、1つの抗原結合部位Aを形成する。リンカー L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。しかしいくつかの実施形態では、いくつかのリンカーの長さは、特定の形態にとって好ましいかもしれない。しかし、リンカーの長さおよびそれらのアミノ酸配列に関する知識は、当該技術分野の一般知識に属し、異なる形態のリンカー、ならびにリンカーおよびアミノ酸の配列は、最新技術の一部であり、本明細書で上記に引用した開示に開示される。

【0227】

本明細書で上に定義される第1および第2の可変ドメインを形成する抗原結合部位Aが、本発明の文脈で本明細書に記載されるようなMAGE-Aペプチド/MHC複合体に特異的に結合することは、当業者であれば理解できるであろう。

【0228】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、 V_3 は本発明の文脈で定義される第1の可変ドメインであって V_6 は第2の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_5 は重鎖可変ドメインであり、または

V_3 は本発明の文脈で定義される第1の可変ドメインであって V_6 は第2の可変ドメインであり、 V_4 は重鎖可変ドメインであって V_5 は軽鎖可変ドメインである。

【0229】

一実施形態では、式[I]のポリペプチドは、C末端に式[I]のポリペプチド、リンクー(L_5)、および F_c ドメインまたはその一部をさらに含んでなり、および/またはその中では、式[II]のポリペプチドは、C末端に式[II]のポリペプチド、リンクー(L_6)、および F_c ドメインまたはその一部をさらに含んでなる。

10

【0230】

F_c ドメインは、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【0231】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、2つの抗原結合部位(AおよびB)を形成する2つのポリペプチド鎖を含んでなり、

その中では、1つのポリペプチド鎖は、式[III]、

$V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{c1}$ [III]

によって表わされる構造を有し、

その中では、1つのポリペプチド鎖は、式[IV]、

$V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_H1 - L_6 - F_{c2}$ [IV]

によって表わされる構造を有し、

20

式中、 V_3 、 L_1 、 V_4 、 L_2 、 C_L 、 V_5 、 L_3 、 V_6 、 L_4 、 C_H1 は、本明細書で上に定義されるようであり、式中、 L_5 および L_6 は存在するかまたは存在しないリンクーであり、式中、 F_{c1} および F_{c2} は、 F_c ドメインであり、式中、 F_{c1} および F_{c2} は、同じかまたは異なり、好ましくは異なる。 F_c ドメインは、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【0232】

一実施形態では、 F_{c1} は、配列番号113(ホール)のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F_{c2} は、配列番号112(ノブ)のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、逆もまた同様であり、

30

より好ましくは V_4 または V_3 が重鎖可変ドメインである場合、 F_{c1} は、配列番号113のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、それに応じて V_5 または V_6 が軽鎖可変ドメインである場合、 F_{c2} は、配列番号112のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または

V_4 または V_3 が軽鎖可変ドメインである場合、 F_{c1} は、配列番号112のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、それに応じて、 V_5 または V_6 が重鎖可変ドメインである場合、 F_{c2} は配列番号113のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

【0233】

一実施形態では、重鎖可変ドメイン(V_H)と軽鎖可変ドメイン(V_L)は、CD3(CD3、CD3_a、およびCD3_b鎖など)、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD18、CD22、CD25、CD28、CD32a、CD32b、CD33、CD41、CD41b、CD42a、CD42b、CD44、CD45RA、CD49、CD55、CD56、CD61、CD64、CD68、CD94、CD90、CD117、CD123、CD125、CD134、CD137、CD152、CD163、CD193、CD203c、CD235a、CD278、CD279、CD287、NKp46、NKG2D、GITR、FcRI、TCR/およびTCR/、HLA-DRからなる群から選択される抗原に結合する1つの結合部位Bと一緒に形成し、および/またはエフェクター細胞に結合する。

40

【0234】

さらなる実施形態では、重鎖可変ドメイン(V_H)と軽鎖可変ドメイン(V_L)は、T

50

細胞特異的受容体分子および / またはナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 特異的受容体分子に結合する 1 つの結合部位を一緒に形成し、その中では、T 細胞特異的受容体分子およびナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 特異的受容体分子は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【 0 2 3 5 】

一実施形態では、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 154 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 156 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、軽鎖可変ドメインは配列番号 157 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 158 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 159 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 160 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 162 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 164 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

10

【 0 2 3 6 】

好ましくは、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 154 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 156 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 159 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 160 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 162 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、または、軽鎖可変ドメインは配列番号 153 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 164 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、より好ましくは、軽鎖可変ドメインは配列番号 159 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、重鎖可変ドメインは配列番号 160 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる。

20

実施例から分かるように、本発明の発明者は、本発明の文脈で定義される CDR、より具体的には本明細書で上に定義される可変ドメインを TCR (商標) 形態で使用することを原理の証明として実証した (実施例)。

30

【 0 2 3 7 】

したがって、好ましい一実施形態では、抗原結合タンパク質は、2 つの抗原結合部位を形成する 2 つのポリペプチド鎖を含んでなり、

その中では、1 つのポリペプチド鎖は、式 [I I I] 、

$V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1} [I I I]$

40

によって表わされる構造を有し、

1 つのポリペプチド鎖は、式 [I V] 、

$V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{C2} [I V]$

によって表わされる構造を有し、

式中、 L_2 、 C_L 、 L_5 および L_4 、 C_{H1} 、 L_6 は存在せず

式中、 V_3 、 L_1 、 V_4 、 V_5 、 L_3 、 V_6 は本明細書で上に定義されるようであり、

好ましくは、 V_3 は本発明の文脈で定義される第 1 の可変ドメインであって V_6 は第 2 の可変ドメインであり、 V_4 は軽鎖可変ドメインであって V_5 は重鎖可変ドメインであり、または好ましくは、 V_3 は本発明の文脈で定義される第 1 の可変ドメインであって V_6 は第 2 の可変ドメインであり、 V_4 は重鎖可変ドメインであって V_5 は軽鎖可変ドメインで

50

あり、

好ましくは、 L_1 および L_3 は、(配列番号96)のアミノ酸配列「G G G S G G G G」を含んでなるかまたはそれからなり。

好ましくは F_{c1} は配列番号113のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、 F_{c2} は配列番号112のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、逆もまた同様であり。

より好ましくは、 V_4 が重鎖可変ドメインである場合、 F_{c1} は配列番号113のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、それに応じて、 V_5 が軽鎖可変ドメインである場合、 F_{c2} は配列番号112のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、またはより好ましくは、 V_4 が軽鎖可変ドメインである場合、 F_{c1} は配列番号112のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、それに応じて、 V_5 が重鎖可変ドメインである場合、 F_{c2} は配列番号113のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり。

軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインは、好ましくは、CD3、TCR / またはCD28、より好ましくはCD3またはTCR / である、本明細書で上に定義される抗原に結合する1つの抗原結合部位を一緒に形成し、

その中では、第1および第2の可変ドメインは、本発明の文脈で定義されるMAGE-A抗原ペプチドに特異的に結合する、1つの抗原結合部位を形成する。

【0238】

この実施形態の抗原結合タンパク質は、二重特異性TCR、または F_c 含有二重特異性TCR / mAb二重特異性抗体と称されることもある。この実施形態の抗原結合タンパク質はまた、TCER(商標)と称されることもある。

【0239】

「TCER(商標)」は、本発明の文脈で定義される第1および第2の可変ドメインの2つの抗原結合ドメインと、リクルーターとも称される抗体の重鎖および軽鎖可変ドメインによって形成されるさらなる抗原結合ドメインとを含んでなる、可溶性抗原結合タンパク質である、二重特異性T細胞受容体(TCR)であり、CD3に対する、およびTCR / 对する、可変軽鎖および重鎖可変ドメインなどがある。

【0240】

好ましい一実施形態では、TCER(商標)などの抗原結合タンパク質は、以下を含んでなる：

- アミノ酸配列(配列番号135)：E D V E Q S L F L S V R E G D S V V I N C T Y
 T D S S S T Y L Y W Y K Q E P G K G L Q L L T Y I Y S S Q D S K Q D Q R L T V L
 L N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F C A E M T S E S K I I F G S G T
 R L S I R P G G G S G G G E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G
 Y K F T S Y V M H W V R Q A P G Q G L E W M G Y I N P Y N D V T K Y A E K F Q G
 R V T L T S D T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V H Y C A R G S Y Y D Y E G
 F V Y W G Q G T L V T V S S E P K S S D K T H T C P P C P A P P V A G P S V F L
 F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V
 E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K
 V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q
 V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
 S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
L S P

の式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{c1}$ [III]の1つの第1のポリペプチド(式中、 L_2 、 C_L 、 L_5 は存在せず、配列番号138の V_3 (可変ドメインに由来する成熟TCR)(配列番号5、配列番号59、および配列番号35のCDRa1、CDRa2、CDRa3を太字で示す)、配列番号96の L_1 (下線付き)、配列番号160の V_4 (抗TCR VH)、および配列番号113の F_{c1} (斜体および下線付き)を含んでなる)；

- アミノ酸配列(配列番号136)：

10

20

30

40

50

Q I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A T S S V S Y M H W Y Q Q K P G
 K A P K R W I Y D T S K L A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E
 D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G G G T K V E I K G G G S G G G G D A G V I Q
 S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I P G H D Y L F W Y R Q T M M R G L E L L
 F Y F C Y G T P C D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D
 S A V Y F C A S R A D T G E L F F G E G S R L T V L E P K S S D K T H T C P P C
P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E
A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆ - F_{C2} [I V] の 1 つ の 第 2 の ポリペプチド
 (式中、 L₄、 C_{H1}、 L₆ は 存在 せ ず 、 配列 番号 159 の V₅ (抗 T C R V L) 、 配
 列 番号 96 の L₃ (下線 付 き) 、 配列 番号 150 (配列 番号 62 、 配列 番号 65 、 配列 番
 号 71 の C D R a 1 、 C D R a 2 、 C D R a 3 を 太字 で 示す) の V₆ (可変 ドメイン に
 由来 す る T C R) 、 お よび 配列 番号 112 の F_{C2} (斜体 お よび 下線 付 き) を 含んで な り
 、 式中、 F_{C1} お よび F_{C2} 配列 は 、 システイン を 介して 軽鎖 を 連結 す る 必要 が ない ため
 、 システイン から セリン へ の アミノ酸 置換 (太字 で 示さ れる S) 、 F_C 受容 体 相互作用 を
 無効 化 す る I g G 2 ヒンジ に類似 した I g G 1 ヒンジ 領域 の アミノ酸 置換 (P V A は 23
 3 ~ 235 お よび 331S の 位置 に 太字 で 示さ れる) 、 F_C 部分 の N - グリコシル化 部位
 を 除 そ し て F_C 受容 体 間 の 相互作用 を 無効 化 す る N 297Q アミノ酸 置換 (太字 の Q)
 、 さ らに F_{C1} の 場合 は ホール 变異 (Y 349C 、 T 366S 、 L 368A 、 お よび Y 4
 07V) 、 お よび F_{C2} の 場合 は ノブ 变異 (S 354C お よび T 366W) を 含んで な る
) 。 し た が って 、 好ま し い 実施 形態 で は 、 F_{C1} は 配列 番号 113 で あ り 、 F_{C2} は 配列
 番号 112 で あ る 。

【 0 2 4 1 】

別 の 好ま し い 実施 形態 で は 、 T C E R (商標) など の 抗原 結合 タンパク質 は 、 以下 を 含
 んで な る :

アミノ酸 配列 (配列 番号 136) :

Q I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A T S S V S Y M H W Y Q Q K P G
 K A P K R W I Y D T S K L A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E
 D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G G G T K V E I K G G G S G G G G D A G V I Q
 S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I P G H D Y L F W Y R Q T M M R G L E L L
 F Y F C Y G T P C D D S G M P E D R F S A K M P N A S F S T L K I Q P S E P R D
 S A V Y F C A S R A D T G E L F F G E G S R L T V L E P K S S D K T H T C P P C
P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E
A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{C1} [I I I] の 1 つ の 第 1 の ポリペプチド
 (式中、 L₂ 、 C_L 、 L₅ は 存在 せ ず 、 配列 番号 159 の V₃ (抗 T C R V L) 、 配
 列 番号 96 の L₁ (下線 付 き) 、 配列 番号 150 の V₄ (可変 ドメイン に 由来 す る T C R
) (配列 番号 62 、 配列 番号 65 、 配列 番号 71 の C D R b 1 、 C D R b 2 、 C D R b 3
 を 太字 で 示す) 、 お よび 配列 番号 112 の F_{C1} (斜体 お よび 下線 付 き) を 含んで な る) ;
 アミノ酸 配列 (配列 番号 137) :

E D V E Q S L F L S V R E G D S V V I N C T Y T D S S S T Y L Y W Y K Q E P G K
 G L Q L L T Y I Y S S Q D Q K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T

10

20

30

40

50

G D S A I Y F C A E M T S E S K I I F G S G T R L S I R P G G G S G G G G E V Q
 L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y K F T S Y V M H W V R Q A P G Q
 G L E W M G Y I N P Y N D V T K Y A E K F Q G R V T L T S D T S T S T A Y M E L
S S L R S E D T A V H Y C A R G S Y Y D Y E G F V Y W G Q G T L V T V S S E P K
S S D K T H T C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V
T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T
Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A
K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_1 - F_{C2}$ [IV] の 1 つの第 2 のポリペプチド（式中、 L_4 、 C_{H1} 、 L_6 は存在せず、配列番号 151 の V_5 （可変ドメインに由来する成熟 TCR）（配列番号 5、配列番号 56、および配列番号 35 の CDRa1、CDR a2、CDR a3 を太字で示す）、配列番号 96 の L_3 （下線付き）、配列番号 160 の V_6 （抗 TCR VH）、および配列番号 113 の F_{C2} （斜体および下線付き）を含んでなり、

式中、 F_{C1} および F_{C2} 配列は、システインを介して軽鎖を連結する必要がないため、システインからセリンへのアミノ酸置換（太字で示される S）、 F_{C} 受容体相互作用を無効化する IgG2 ヒンジに類似した IgG1 ヒンジ領域のアミノ酸置換（PVA は 233 ~ 235 および 331S の位置に太字で示される）、 F_{C} 部分の N-グリコシル化部位を除去して F_{C} 受容体間の相互作用を無効化する N297Q アミノ酸置換（太字の Q）、さらに F_{C2} の場合はホール変異（Y349C、T366S、L368A、および Y407V）、および F_{C1} の場合はノブ変異（S354C および T366W）を含んでなる）。したがって、好ましい一実施形態では、 F_{C1} は配列番号 112 であり、 F_{C2} は配列番号 113 である。

【0242】

別の好ましい実施形態では、TCER（商標）などの抗原結合タンパク質は、以下を含んでなる：

アミノ酸配列（配列番号 131）：

E D V E Q S L F L S V R E G D S V V I N C T Y T D S S S T Y L Y W Y K Q E P G K
 G L Q L L T Y I Y S S Q D Q K Q D Q R L T V L L N K K D K H L S L R I A D T Q T
G D S A I Y F C A E M T S E S K I I F G S G T R L S I R P G G G S G G G G D I Q
M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I R N Y L N W Y Q Q K P G K A
P K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E D I
A T Y F C Q Q G Q T L P W T F G Q G T K V E I K E P K S S D K T H T C P P C P A
P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E
V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H Q D
W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P
P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L
H N H Y T Q K S L S L S P

の式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の 1 つの第 1 のポリペプチド（式中、 L_2 、 C_L 、 L_5 は存在せず、配列番号 151 の V_3 （可変ドメインに由来する成熟 TCR）（配列番号 5、配列番号 56、および配列番号 35 の CDRa1、CDR a2、CDR a3 を太字で示す）、配列番号 96 の L_1 （下線付き）、配列番号 153 の V_4 （抗 TCR VL）、および配列番号 112 の F_{C1} （斜体および下線付き）；

アミノ酸配列（配列番号 130）：

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y T M N W V R Q A
 P G Q G L E W M G L I N P Y K G V S T Y A Q K F Q D R V T L T V D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S G Y Y G D S D W Y F D V W G Q G T L V T V

10

20

30

40

50

S S G G G G S G G G G D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I P G H D
 Y L F W Y R Q T M M R G L E L L F Y F C Y G T P C D D S G M P E D R F S A K M P
 N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F C A S R A D T G E L F F G E G S R L T
 V L E P K S S D K T H T C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S
 R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K
 T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V K G F Y P
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K
 S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆ - F_{C2} [IV] の 1 つの第 2 のポリペプチド
 (式中、L₄、C_{H1}、L₆ は存在せず、配列番号 154 の V₅ (抗 TCR VL)、配
 列番号 96 の L₃ (下線付き)、配列番号 151 の V₆ (可変ドメインに由来する TCR) (配列番号 62、配列番号 65、配列番号 71 の CDRb1、CDRb2、CDRb
 3 を太字で示す)、および配列番号 113 の F_{C2} (斜体および下線付き) を含んでなり、
 式中、F_{C1} および F_{C2} 配列は、システインを介して軽鎖を連結する必要がないため、シ
 ステインからセリンへのアミノ酸置換 (太字で示される S)、F_C 受容体相互作用を無
 効化する IgG2 ヒンジに類似した IgG1 ヒンジ領域のアミノ酸置換 (PVA は 233
 ~ 235 および 331S の位置に太字で示される)、F_C 部分の N - グリコシル化部位を
 除去して F_C 受容体間の相互作用を無効化する N297Q アミノ酸置換 (太字の Q)、
 さらに F_{C2} の場合はホール変異 (Y349C、T366S、L368A、および Y40
 7V)、および F_{C1} の場合はノブ変異 (S354C および T366W) を含んでなる)
 。したがって、好ましい実施形態では、F_{C1} は配列番号 112 であり、F_{C2} は配列番
 号 113 である。

【0243】

別の好ましい実施形態では、TCER (商標) などの抗原結合タンパク質は、以下を含
 んでなる：

アミノ酸配列 (配列番号 133) : E D V E Q S L F L S V R E G D S V V I N C T Y T
 E S S S T Y L Y W Y K Q E P G K G L Q L L T Y I Y S S Q D Q K Q D Q R L T V L L
 N K K D K H L S L R I A D T Q T G D S A I Y F C A E M T S E S K I I F G S G T R
 L S I R P G G G S G G G G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q
 D I R N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G S
 G T D Y T L T I S S L Q P E D I A T Y F C Q Q G Q T L P W T F G Q G T K V E I K
 E P K S S D K T H T C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T
 P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{C1} [III] の第 1 のポリペプチド
 (式中、L₂、C_L、L₅ は存在せず、配列番号 152 の V₃ (可変ドメインに由来する
 成熟 TCR) (配列番号 55、配列番号 56、および配列番号 35 の CDRa1、CDR
 a2、CDRa3 を太字で示す)、配列番号 96 の L₁ (下線付き)、配列番号 154 の
 V₄ (抗 TCR VL)、および配列番号 112 の F_{C1} (斜体および下線付き) を含
 んでなる)；

アミノ酸配列 (配列番号 130) :

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y T M N W V R Q A
 P G Q G L E W M G L I N P Y K G V S T Y A Q K F Q D R V T L T V D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S G Y Y G D S D W Y F D V W G Q G T L V T V
 S S G G G S G G G G D A G V I Q S P R H E V T E M G Q E V T L R C K P I P G H D
 Y L F W Y R Q T M M R G L E L L F Y F C Y G T P C D D S G M P E D R F S A K M P

10

20

30

40

50

N A S F S T L K I Q P S E P R D S A V Y F C A S R A D T G E L F F G E G S R L T
 V L E P K S S D K T H T C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S
 R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 Q Y Q S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K
 T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V K G F Y P
 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K
 S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

の式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{C2}$ [IV] の 1 つの第 2 のポリペプチド (式中、 L_4 、 C_{H1} 、 L_6 は存在せず、配列番号 154 の V_5 (抗 TCR VL)、配列番号 96 の L_3 (下線付き)、配列番号 151 の V_6 (可変ドメインに由来する TCR) (配列番号 62、配列番号 65、配列番号 71 の CDRb1、CDRb2、CDRb3 を太字で示す)、および配列番号 113 の F_{C2} (斜体および下線付き) を含んでなり、式中、 F_{C1} および F_{C2} 配列は、システインを介して軽鎖を連結する必要がないため、システインからセリンへのアミノ酸置換 (太字で示される S)、 F_c 受容体相互作用を無効化する IgG2 ヒンジに類似した IgG1 ヒンジ領域のアミノ酸置換 (PVA は 233 ~ 235 および 331S の位置に太字で示される)、 F_c 部分の N-グリコシル化部位を除去して F_c 受容体間の相互作用を無効化する N297Q アミノ酸置換 (太字の Q)、さらに F_{C2} の場合はホール変異 (Y349C、T366S、L368A、および Y407V)、および F_{C1} の場合はノブ変異 (S354C および T366W) を含んでなる)。したがって、好ましい一実施形態では、 F_{C1} は配列番号 112 であり、 F_{C2} は配列番号 113 である。

【0244】

- 一実施形態では、本発明は、以下を含んでなる、抗原結合タンパク質に言及する：
- i) 配列番号 127 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 128 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - i i) 配列番号 127 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 130 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_1 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - i i i) 配列番号 131 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 130 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - i v) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 130 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_6 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - v) 配列番号 135 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 136 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_1 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - v i) 配列番号 137 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 136 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1} - L_1 - F_{C2}$ [IV] の第 2 のポリペプチド、
 - v i i) 配列番号 139 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_3 - L_1 - V_4 - L_2 - C_L - L_5 - F_{C1}$ [III] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 136 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 $V_5 - L_3 - V_6 - L_4 - C_{H1}$

10

20

30

40

50

- L₁ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 v i i i) 配列番号 131 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₃ -
 L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号
 142 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C
 H₁ - L₁ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 i x) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₃ - L₁
 - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 14
 2 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1}
 - L₆ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 x) 配列番号 131 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₃ - L₁ - V
 4 - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 136 の
 アミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L
 1 - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 x i) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₃ - L₁
 - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 13
 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1}
 - L₁ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 x i i) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる式 V₃ - L₁
 - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 16
 6 のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1}
 - L₆ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチド、
 好ましくは i i i) ~ x i) 、より好ましくは i i i) および i v) である。

【 0 2 4 5 】

本発明のなおもより好ましい実施形態では、配列番号 131 のアミノ酸配列からなる、
 式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および
 配列番号 130 のアミノ酸配列からなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆ - F_{c2}
 [I V] の第 2 のポリペプチドを含んでなる抗原結合タンパク質に言及し；または本発明
 は、配列番号 133 のアミノ酸配列からなる、式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F
 c₁ [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 130 のアミノ酸配列からなる、
 式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチドを含んで
 なる抗原結合タンパク質に言及し；または本発明は、配列番号 135 のアミノ酸配列から
 なる、式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、
 および配列番号 136 のアミノ酸配列からなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆
 - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチドを含んでなる抗原結合タンパク質に言及し；または本発明は、配列番号 137 のアミノ酸配列からなる、式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L
 - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペプチド、および配列番号 136 のアミノ酸配列から
 なる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1} - L₆ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチドを
 含んでなる抗原結合タンパク質に言及し；または本発明は、配列番号 139 のアミノ酸配
 列からなる、式 V₃ - L₁ - V₄ - L₂ - C_L - L₅ - F_{c1} [I I I] の第 1 のポリペ
 チド、および配列番号 136 のアミノ酸配列からなる、式 V₅ - L₃ - V₆ - L₄ - C_{H1}
 - L₆ - F_{c2} [I V] の第 2 のポリペプチドを含んでなる抗原結合タンパク質に言及する。
 。

【 0 2 4 6 】

また、エフェクター機能に関して、例えば、抗原結合タンパク質の抗原依存性細胞媒介
 性細胞傷害性 (A D C C) および / または補体依存性細胞傷害性 (C D C) を増強または
 低減するように、本発明の抗原結合タンパク質を修飾することが望ましくあってもよい。
 これは、本発明の抗原結合タンパク質との関連で、本明細書では F_c 変異型とも称される
 、抗原結合タンパク質の F_c 領域に、1つまたは複数のアミノ酸置換を導入することによ
 って達成されてもよい。代案としては、またはそれに加えて、F_c 領域にシステイン残基
 が導入されて、この領域での鎖間ジスルフィド結合の形成が可能になってもよい。このよ

10

20

30

40

50

うに生成されたヘテロ二量体抗原結合タンパク質は、内部移行能力の改善または減少、および／または補体媒介性細胞滅殺および／または抗体依存性細胞傷害性（A D C C）の増加を有してもよい（Caron P C . e t a l . 1 9 9 2；およびShopes B . 1 9 9 2）。

【0247】

本発明の抗原結合タンパク質の別のタイプのアミノ酸修飾、すなわち抗原結合タンパク質に見られる1つまたは複数の炭水化物部分を削除すること、および／または抗原結合タンパク質中に存在しない1つまたは複数のグリコシリ化部位を付加することによって、抗原結合タンパク質の元来のグリコシリ化パターンを変化させるのに有用であってもよい。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン、およびアスパラギン-X-スレオニン（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）のどちらかの存在は、潜在的なグリコシリ化部位を生成する。抗原結合タンパク質へのグリコシリ化部位の付加または欠失は、好都合には、アミノ酸配列を改変して（N結合型グリコシリ化部位の場合）、それが上記のトリペプチド配列の1つまたは複数を含有することによって達成される。10

【0248】

別のタイプの修飾は、潜在的に分解産物または抗原結合タンパク質調製物の不均一性をもたらすものとして、インシリコまたは実験的に同定された配列の除去を伴う。例として、アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミド化は、pHおよび表面露出などの要因に応じて生じ得る。アスパラギン残基は、主にAsn-Glyの配列で存在する場合に特に脱アミドの影響を受けやすく、Asn-Alaなどの他のジペプチド配列ではその影響より少ない。したがって、このような脱アミド化部位、特にAsn-Glyが、本発明の抗原結合タンパク質中に存在する場合、典型的には保存的置換によってその部位が除去され、関与する残基の1つを除去することが望ましくあってもよい。1つまたは複数の関与する残基を除去するための、配列中のこのような置換もまた、本発明に包含されることが意図される。20

【0249】

別のタイプの共有結合修飾は、グリコシドを抗原結合タンパク質に化学的または酵素的に共役させることを伴うこれらの手順は、N-またはO-結合グリコシリ化のためのグリコシリ化能力を有する宿主細胞における、抗原結合タンパク質の產生を必要としないという点で有利である。使用されるカップリングモード次第で、糖は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのものなどの遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシル群、（e）フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのものなどの芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に付着してもよい。例えば、このような方法は、国際公開第87/05330号パンフレットに記載される。30

【0250】

抗原結合タンパク質上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成されてもよい。化学的脱グリコシリ化には、抗原結合タンパク質を化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物に曝露せらるる必要がある。この処理は、結合糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたは全ての糖の切断をもたらすが、抗原結合タンパク質は無傷のままにする。化学的脱グリコシリ化は、S o j a h r H . e t a l . (1 9 8 7) およびE d g e , A S . e t a l . (1 9 8 1) によって記載される。抗体の炭水化物部分の酵素的切断は、T h o t a k u r a , N R . e t a l . (1 9 8 7) によって記載されたように、様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。40

【0251】

抗原結合タンパク質の別のタイプの共有結合修飾は、米国特許第4,640,835号明細書、米国特許第4,496,689号明細書、米国特許第4,301,144号明細書、米国特許第4,670,417号明細書、米国特許第4,791,192号明細書、または米国特許第4,179,337号明細書に記載されている様式で、例えば、ポリエ

10

20

30

40

50

チレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンなどの様々な非タンパク質性ポリマーの1つに抗原結合タンパク質を結合させることを含んでなる。

【0252】

特定の一実施形態では、抗原結合タンパク質はTCRである。特定の一実施形態では、TCRはヒトTCRである。したがって、一実施形態では、前記第1の可変ドメインはTCRまたは鎖に含まれ；および／または式中、前記第2の可変ドメインはTCRまたは鎖に含まれる。一実施形態では、前記TCRは-ヘテロ二量体であり、鎖TRAC定常ドメイン配列と、鎖TRBC1またはTRBC2定常ドメイン配列とを含んでなる。

【0253】

以下の鎖TRAC定常ドメイン配列および鎖TRBC1またはTRBC2定常ドメインは、TCR定常ドメイン配列とも称される。一実施形態では、TCR定常ドメイン配列は、例えば、ヒト、ラット、サル、ウサギ、ロバ、またはマウス、好ましくはヒトなどの任意の哺乳類などの任意の好適な生物種に由来してもよい。いくつか的好ましい実施形態では、TCR定常ドメイン配列は、例えば、異種配列、好ましくはマウス配列の導入によって、わずかに修飾されてもよく、それはTCRの発現と安定性を高めてもよい。また、可変領域の好ましくないアミノ酸の置換および／またはTCR-Cドメイン間のジスルフィド架橋の導入、および不対システインの除去など、現状技術（例えば、国際公開第2018/104407号パンフレット、PCT/EP2018/069151号明細書、国際公開第2011/044186号パンフレット、国際公開第2014/018863号パンフレット）から知られている、さらなる安定化変異が導入されてもよい。

10

【0254】

特に、TCR定常ドメイン配列をトランケーションまたは置換によって修飾し、TRA Cのエクソン2のCys4と、TRBC1またはTRBC2のエクソン2のCys2との間の天然ジスルフィド結合が削除されてもよい。また、TRACのThr48と、TRBC1またはTRBC2のSer57とをシステイン残基で置換することによって、および／または鎖の定常ドメイン配列が修飾されてもよく、前記システインは、TCRおよび定常ドメイン間にジスルフィド結合を形成する。TRBC1またはTRBC2は、定常ドメインの75位でのシステインからアラニンへの変異、89位でのアスパラギンからアスパラギン酸への変異をさらに含んでもよい。定常ドメインは、それに加えてまたは代案として、天然TRACおよび／またはTRBC1／2配列に対する、さらなる変異、置換または欠失を含有してもよい。TRBC1／2という用語は、例えば、TRACの4位でのNからKなどの天然多型変異型を包含する(Bragado et al. in Immunol. 1994 Feb; 6(2): 223-30)。

20

【0255】

一実施形態では、TCRはキメラである。

【0256】

本明細書における「キメラTCR」はTCRを指し、その中では、TCR鎖は複数の生物種からの配列を含んでなる。好ましくは、本発明の文脈におけるTCRは、例えば、鎖のヒト可変領域と、マウスTCR鎖のマウス定常領域とを含んでなる、鎖を含んでなってもよい。

30

【0257】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、一本鎖TCR(sCTCR)または一本鎖二重特異性抗体である。この実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドが共に共有結合し、共有結合は本明細書で上に「定義」の項で定義される。

40

【0258】

sCTCRは、第1のTCR鎖（例えば、鎖）の可変領域のポリペプチドと、全（完全長）第2のTCR鎖（例えば、鎖）のポリペプチドとを含んでなり得て、または逆もまた然りである。さらに、sCTCRは、任意選択的に、2つ以上のポリペプチドを主に連結する、1つまたは複数のリンカーを含んでなり得る。リンカーは、例えば、本明細書

50

に記載されるように、2つの一本鎖を共に結合するペプチドであり得る。また、IL-2、IL-7またはIL-15などのヒトサイトカインに融合された本発明のscTCRも提供される。

【0259】

一実施形態では、前記一本鎖TCRは、V-L_t-V、V-L_t-V、V-C_a-L_t-V、V-C_b-L_t-V、V-L_t-V-C_b、V-L_t-V-C_a、V-C_a-L_t-V-C_b、V-C_b-L_t-V-C_a、好ましくはV-L_t-V、V-L_t-Vからなる群から選択される一本鎖形態の1つである。その中では、Vは本明細書で上に定義される第1の可変ドメインであり、Vは本明細書で上に定義される第2の可変ドメインであり、C_aおよびC_bはそれぞれ存在するかまたは存在しないTCRおよび定常領域であり、L_tは存在するかまたは存在しないリンクマークであり、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

【0260】

一実施形態では、このような一本鎖TCRは、C末端またはN末端のどちらかで連結された、少なくとも1つのさらなる可変ドメイン、好ましくは1つまたは2つのさらなる可変ドメインをさらに含んでもよい。

【0261】

一実施形態ではこのようなさらなる可変ドメインは、さらなるリンクマークL_kを介して連結されてもよい。好ましい一実施形態では、リンクマークL_kは、本明細書で上に定義されるリンクマークまたは配列番号114のアミノ酸配列のC_{H1}ヒンジ配列である。

【0262】

本発明はまた、本発明の抗原結合タンパク質、特にTCRを提示する粒子、および前記粒子を粒子のライブラリ内に含めることを含む。このような粒子としては、ファージ、酵母、リボソーム、または哺乳類細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このような粒子およびライブラリーを生成する方法は、当該技術分野で公知である（例えば、国際公開第2004/044004号パンフレット；国際公開第01/48145号パンフレット；Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2:175-184を参照されたい）。

【0263】

さらに、本発明の発明者らは、実施例、特に実施例3において、本発明の抗原結合タンパク質が標的抗原に結合することを実証し、すなわち、MHCタンパク質との複合体中の、好ましくはHLA-A*02との複合体中の、高い特異性を有するMAGE-A抗原ペプチド、すなわち、抗原結合タンパク質は、同定されたエピトープに特異的に結合する。

【0264】

したがって、本発明の抗原結合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列「KVLEHVVRV」を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドに特異的に結合し、その中では、前記抗原ペプチドは、MHCタンパク質との複合体中にあり、好ましくはHLA-A*02との複合体中にある。より詳細には、一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号1のMAGE-A抗原ペプチドの少なくとも3つまたは少なくとも4つのアミノ酸位置、好ましくは配列番号1のアミノ酸配列の1、5、7、および8つまたは1、3、5、7、および8つ、特に1、5、および7つからなる群から選択される、少なくとも3または4つ、好ましくは3または4つ、好ましくは3のアミノ酸位置を含んでなるかまたはそれからなる、エピトープに特異的に結合する。正確なエピトープの判定は、使用される方法と選択されたカットオフ値によってわずかに異なるかもしれない。主にアミノ酸位置1、5、および7に結合する特性のために、本発明の抗原結合タンパク質は、類似ペプチドNOMAP-1-0320、NOMAP-1-1223、およびODC-001に有意に結合しない。

【0265】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチド変異型に有意に結合せず、その中で

10

20

30

40

50

は、位置 1、5、および 7 の少なくとも 1 つ、位置 1、5、7、および 8 の少なくとも 1 つ、または位置 1、3、5、7、および 8 の少なくとも 1 つが置換され、好ましくはアラニンで置換される。

【0266】

T 細胞発現抗原結合タンパク質などの本発明の抗原結合タンパク質、特に T C R またはそれらの断片または二重特異性 T C R およびそれらの断片の文脈における、「有意に結合しない」とは、典型的には、機能アッセイ、例えば、上記の I F N - 放出などの T C R 活性化アッセイにおける、好ましくは同じ実験条件において、配列番号 1 のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」からなる M A G E - A ペプチドから得られた、応答、すなわちシグナルの 30% 未満、25% 未満、20% 未満、15% 未満、好ましくは 30% 未満である、例えば、抗原ペプチド変異型について検出されたシグナルなどの応答を意味する。抗原ペプチド変異型の文脈における、および本発明の抗原結合タンパク質、特に本発明の可溶性抗原結合タンパク質の文脈における、「有意に結合しない」とは、典型的には、好ましくは同じ実験条件において、配列番号 1 のアミノ酸配列「K V L E H V V R V」からなる M A G E - A ペプチドについて判定された K_D の 3 ~ 10 倍など、3 倍を超える、3.5 倍を超える、4 倍を超える、4.5 倍を超える、5 倍を超える、好ましくは 3 を超えて増加している、例えば、バイオレイヤー干渉法などの結合アッセイにおける、抗原ペプチド変異型について判定された K_D を意味し、その中では、抗原ペプチド変異型について得られるシグナルは、好ましくはバックグラウンドシグナルであり、抗原ペプチド変異型または M A G E - A ペプチドは、M H C 分子との複合体中にある。

10

【0267】

上記によれば、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質、特に可溶性抗原結合タンパク質は、特異的抗原に対する親和性と比較して低下した親和性で、M H C タンパク質との複合体中の、好ましくは H L A - A * 02 との複合体中の、本明細書で上に記載される M A G E - A 抗原ペプチド変異型に結合する、すなわち、M H C タンパク質との複合体、好ましくは H L A - A * 02 との複合体中の本発明の文脈で記載される M A G E - A 抗原ペプチドに結合し、M A G E - A 抗原性ペプチド変異型複合体のそれぞれの K_D は、3 ~ 10 倍など、3 倍を超える、3.5 倍を超える、4 倍を超える、4.5 倍を超える、5 倍を超える、好ましくは 3 倍を超えて増加する。「親和性」および「K_D」という用語は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

20

【0268】

M H C タンパク質、特に M H C クラス I および H L A - A * 02 タンパク質は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。

30

【0269】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、M A G E - A 抗原ペプチド / M H C 複合体に特異的かつ任意選択的に結合できる、親和性成熟抗原結合タンパク質として特徴付けられる。

【0270】

本発明の抗原結合タンパク質は、本明細書で上に特定されるような M A G E - A 抗原ペプチド複合体に、より具体的には本明細書で上に定義される配列番号 1 のエピトープに、特異的に結合し、そのそれぞれの標的、すなわち M A G E - A 抗原ペプチドと、それが有意に結合しない他の類似ペプチドとが区別され得る。

40

【0271】

「特異性」または「特異的に結合する」という用語は、その結合する標的ペプチド配列（「エピトープ」）を類似したエピトープ、ペプチドまたはタンパク質から区別する、すなわち抗原結合タンパク質は、第 2 の抗原に有意に交差反応性でない場合、第 1 の抗原に「特異的に結合」する、抗原結合タンパク質の能力を示す。

【0272】

本発明の文脈における「類似ペプチド」は、「オフターゲット」ともまたと称されることもあり、典型的には 8 ~ 16 アミノ酸長を含んでなるペプチドに関する。本発明の文脈

50

における類似のペプチドは、典型的にはMHC提示である。さらに、本発明の文脈における類似ペプチドは、MAGE-A抗原ペプチドのアミノ酸配列に類似したアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなり、より具体的には、MAGE-A抗原ペプチドのエピトープと比較して、対応するMAGE-Aペプチドのエピトープを構成するアミノ酸と比較して、アミノ酸の生化学的/生物物理学的特性が同一および/または類似しているエピトープを含んでなる。この配列類似性のために、類似ペプチドは抗原結合タンパク質によって結合されるかもしれない、このシナリオでは、例えば、類似ペプチドがMHCタンパク質によって提示され、したがって、例えば、TCRなどの抗原結合タンパク質によって結合される場合、TCRなどの所与の抗原結合タンパク質が類似ペプチドに結合する能力は、望ましいT細胞応答をもたらさず、有害反応をもたらすこともある。このような有害反応は、2018年12月4日に出版されたされ、Lowdell et al., Cytotoxic therapyの7ページで報告されたように、健常組織でペプチドと交差反応する、特異的TCRの交差反応性などの「腫瘍外」の副作用であってもよい。本発明の文脈における類似ペプチドは、例えば、MAG-003に対する高い配列類似性（類似性BLAST検索）に基づいて、例えば、正常組織提示HLA-A^{*}02結合ペプチドのデータベース（XPRISIDENTデータベース）から選択された。したがって、これらの有害反応のために、本発明の抗原結合タンパク質は、類似ペプチド、特に本明細書で下に列挙される類似ペプチドへの結合を回避するように操作される。

【0273】

したがって、本発明の文脈における類似ペプチドは配列番号23のアミノ酸配列からなるRABGAP1L-001、配列番号24のアミノ酸配列からなるAXIN1-001、配列番号25のアミノ酸配列からなるANO5-001、配列番号26のアミノ酸配列からなるTPX2-001、配列番号27のアミノ酸配列からなるSYNE3-001、配列番号28のアミノ酸配列からなるMIA3-001、配列番号29のアミノ酸配列からなるHERC4-001、配列番号30のアミノ酸配列からなるPSME2-001、配列番号31のアミノ酸配列からなるHEATR5A-001、配列番号32のアミノ酸配列からなるCNOT1-003、配列番号33のアミノ酸配列からなるTEP1-003、配列番号34のアミノ酸配列からなるPITPNM3-001、配列番号129のアミノ酸配列からなるZFC-001、配列番号171のアミノ酸配列からなるINTS4-002、配列番号172のアミノ酸配列からなるSAMH-001、配列番号173のアミノ酸配列からなるPPP1CA-006、配列番号174のアミノ酸配列からなるRPL-007、配列番号175のアミノ酸配列からなるSETD1A-001、配列番号176のアミノ酸配列からなるNOMAP-1-0320、配列番号177のアミノ酸配列からなるNOMAP-1-1223、および配列番号178のアミノ酸配列からなるODC-001、配列番号179のアミノ酸配列からなるCOL6A3-010、配列番号180のアミノ酸配列からなるFAM115A-001、配列番号181のアミノ酸配列からなるPHTF2-001、および配列番号181のアミノ酸配列からなるRPP1-001のペプチドからなるリストから選択される。

【0274】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質、特にT細胞発現抗原結合タンパク質などのTCRまたはそれらの断片、または二重特異性TCRおよびそれらの断片は、前記類似ペプチドがMHCタンパク質との複合体中にある場合、好ましくはHLA-A^{*}02との複合体中にある場合、RABGAP1L-001、AXIN1-001、ANO5-001、TPX2-001、SYNE3-001、MIA3-001、HERC4-001、PSME2-001、HEATR5A-001、CNOT1-003、TEP1-003、およびCNOT1-003からなるリストから選択される、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5など、1、2、3、4、5など、好ましくは少なくとも3または全ての類似ペプチドに結合せずまたはに有意に結合しない。類似ペプチド、すなわちオフターゲットへの結合は副作用のリスクを増加させるかもしれない

10

20

30

40

50

ので、これは本発明の文脈における重要な利点であり、したがって、本発明の抗原結合タンパク質が、本明細書で列挙される類似ペプチドと交差反応しないという事実は、本発明を有望な抗がん剤にする。

【0275】

「有意に結合しない」は、類似ペプチドの文脈において、および本発明の抗原結合タンパク質、特にT細胞発現抗原結合タンパク質などのTCRまたはそれらの断片、または二重特異性TCRおよびそれらの断片の文脈において、「交差反応しない」と称されることもあり、本明細書で、例えば、MAGE-Aと比較した類似ペプチド/MHCへの抗原結合タンパク質について機能アッセイで測定される機能応答を指し、その中では、類似ペプチド/MHCに対する抗原結合タンパク質の応答は、同じ実験設定において、MAGE-A抗原ペプチド/MHC複合体に対する同じ抗原結合タンパク質の応答の8%、6%、5%など、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、好ましくは5%である。一例では、応答は、前記抗原結合タンパク質を発現するT細胞の機能的応答であり、本明細書で上に記載され、類似ペプチドの文脈で実施例3および図5に記載されるように、IFN- γ 放出アッセイを用いて決定される。

【0276】

さらに、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質、特に本発明の可溶性抗原結合タンパク質は、前記類似ペプチドがMHCタンパク質との複合体中にある場合、好ましくはHLA-A^{*}02との複合体中にある場合、RABGAP1L-001、AXIN1-001、ANO5-001、TPX2-001、SYNE3-001、MIA3-001、HERC4-001、PSME2-001、HEATR5A-001、CNOT1-003、TEP1-003、PITPNM3-001、INTS4-002、SAMH-001、PPP1CA-006、RPL-007、SETD1A-001、NOMAP-1-0320、NOMAP-1-1223、ODC-001、COL6A3-010、FAM115A-001、PHTF2-001およびRPP1-001好ましくはCNOT1-003、SYNE3-001、TPX2-001、PSME2-001、より好ましくはSYNE3-001、TPX2-001、PSME2-001からなるペプチド群から選択される、少なくとも1つの類似ペプチド、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5など、1、2、3、4、5など、好ましくは少なくとも3または全ての類似ペプチドに結合せずまたは有意に結合しない。

【0277】

一例では、本発明の抗原結合タンパク質、特に本発明の可溶性抗原結合タンパク質は、前記類似ペプチドがMHCタンパク質との複合体中にある場合、好ましくはHLA-A^{*}02との複合体中にある場合、INTS4-002、SAMH-001、PPP1CA-006、RPL-007、SETD1A-001、NOMAP-1-0320、NOMAP-1-1223およびODC-001、INTS4-002、SAMH-001、PPP1CA-006、RPL-007、SETD1A-001またはNOMAP-1-0320、NOMAP-1-1223、ODC-001、COL6A3-010、FAM115A-001、PHTF2-001およびRPP1-001など、PPP1CA-006、RPL-007およびSETD1A-001などに結合せずまたは有意に結合しない。

【0278】

類似ペプチドの文脈において、また、本発明の可溶性抗原結合タンパク質などの抗原結合タンパク質の文脈において、「有意に結合しない」は、本明細書で、親和性の低下、より速い解離速度および/または低い結合シグナル、特により速い解離速度および/または低い結合シグナルによって特徴付けられる。例えば、本発明の文脈において、抗原結合タンパク質は、同一実験環境および同一抗原結合タンパク質濃度で、MAGE-A抗原ペプチド/MHC複合体に対する同じ抗原結合タンパク質結合の応答の50%未満、45%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、4%未満または3%未満の少なくとも1つの類似ペプチド/MHC複合体に対する結合応答を有し、および/または、例えば、本発明の文脈において、抗原結合タンパク質は、特異的抗原、すなわち

10

20

30

40

50

本明細書に記載されるMAGE-A抗原ペプチド/MHC複合体に対する親和性と比較して低下した親和性で、少なくとも1つの類似ペプチド/MHC複合体に結合し、その中では、それぞれの類似に対するペプチドそれぞれの K_D は、5、7、10、15、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000倍、好ましくは5、7、10、15、20、30、40、50、100倍、好ましくは20～100倍、より好ましくは30～100倍、40～100倍など、典型的には40～50倍増加する。例えば、抗原結合タンパク質がMAG-003/MHCの複合体に1nMの K_D で結合し、抗原結合タンパク質が例えば、RABGAP1L-001/MHCの複合体に100nMの K_D で結合する場合、抗原結合タンパク質は100倍に増加した K_D で、したがって100分の1に減少した親和性で、RABGAP1L-001/MHCに結合する。これらの例において、結合応答、解離定数、および結合親和性は、好ましくは、例えば、実施例4および5に記載されるように、バイオレイヤー干渉法を用いて測定される。いくつかのさらなる例では、抗原結合タンパク質は、特異的抗原、すなわち本明細書に記載のMAGE-A抗原ペプチド/MHC複合体に対する親和性と比較して減少した親和性で、少なくとも1つの類似ペプチド/MHC複合体に結合し、その中では、例えば、 K_D 値が典型的には、実施例5に記載されるようにバイオレイヤー干渉法によって測定された場合、特異的抗原、すなわちMAGE-A抗原ペプチド/MHC複合体に対する親和性と比較して、CNOT1-003、INTS4-002、およびSAMH-001に対するそれぞれの K_D は1000倍を超えて増加し、COL6A3-010、PHTF2-001、RPP1-001、およびFAM115A-001では500倍を超えて増加する。10
20

【0279】

さらなる例では、MHC複合体中では、114-is01-BMA(36)または114-is02-UCHT1(17)などの抗原結合タンパク質は、ODC-001、NOMAP-1-0320、およびNOMAP-1-1223に対して、実施例5に記載されるようにバイオレイヤー干渉法によって測定された場合、例えば、1.5%未満など、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満の結合応答を有する。

【0280】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と、HLA分子、好ましくはHLA-A*02とを含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドに、100μM未満、50μM未満、30μM未満、25μM未満、1μM未満、500nM未満、100nM未満、50nM未満、10nM未満、好ましくは50pM～100μM、50pM～10μM、50pM～1μM、より好ましくは、50pM～500nM、50pM～100nM、50pM～50nM、および50pM～10nMの K_D で特異的に結合する。したがって、本発明の抗原結合タンパク質は、HLA分子、好ましくはHLA-A*02との複合体中の配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるかまたはそれからなるMAGE-A抗原ペプチドに対する、200nM未満、150nM未満、120nM未満、110nM、好ましくは100nM未満、特に50pM～100nM、100pM～100nM、1nM～100nMの親和性(K_D)を有する。「 K_D 」および「親和性」は、本明細書で上に「定義」の項で定義される。30
40

【0281】

K_D などの親和性を測定する方法は当業者に知られており、例えば、表面プラズモン共鳴およびバイオレイヤー干渉法が挙げられる。当業者に知られているように、使用される緩衝液、タンパク質の濃度など、それらの実験に使用される実験条件は、結果に影響を与えてよい。

【0282】

関連する実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質、特にT細胞発現抗原結合タンパク質などのTCRまたはそれらの断片または二重特異性TCRまたはそれらの断片は、配列番号1のアミノ酸配列と、HLA分子、好ましくはHLA-A*02とを含んでなるかまたはそれからなる、MAGE-A抗原ペプチドの複合体に対する、100μM未満、5

10

20

30

40

50

0 μM未満、30 μM未満、25 μM未満、1 μM未満、好ましくは25 μM未満、例えば、500 nM～100 μM、500 nM～50 μM、500 nM～25 μMの親和性(K_D)を有する。

【0283】

特定の一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は可溶性である。可溶性抗原結合タンパク質としては、例えば、制限なしに、抗体またはまたはその断片、または二重特異性抗体またはその断片、TCR断片または二重特異性TCRまたはsCTCRが挙げられてもよい。関連する実施形態では、好ましくは可溶性である抗原結合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列と、HLA分子、好ましくはHLA-A^{*}02とを含んでなるかまたはそれからなる、MAGE-A抗原ペプチドの複合体に、100 nM未満、50 nM未満、10 nM未満、1 nM未満、1 nM未満、例えば、10 pM～100 nM、10 pM～50 nM、10 pM～10 nM、特に50 pM～100 nM、100 pM～50 nM、100 pM～10 nMの K_D で結合する。

10

【0284】

したがって、一例では、本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、本明細書で上に記載される可溶性TCER(商標)として発現され、HLA-A^{*}02/MAG-003単量体に対するそれらの結合親和性について分析された。典型的には、測定は、例えば、Octet RED384システムで、典型的には、製造業者によって推奨される設定を用いて実施される簡潔に述べると、結合動態は、典型的には、例えば、PBS、0.05% Tween-20、0.1%BSAを緩衝剤として使用して、30で、例えば、1000 rpmの振盪速度で測定された。抗原結合タンパク質は、FAB2GまたはAHCなどのバイオセンサー上に負荷され、または溶液中で分析された。

20

【0285】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、任意選択的に、参照タンパク質と比較して増加した親和性を有する。

【0286】

本明細書における「参照タンパク質」は、本発明の抗原結合タンパク質がそれと比較されるタンパク質を指す。一実施形態では、参照タンパク質は、本タンパク質と同じ標的、すなわちMHCタンパク質との複合体中のMAGE-A抗原ペプチドに対して向けられ、より好ましくは、前記参照タンパク質は、それが比較される抗原結合タンパク質と同じ形態である。特定の一実施形態では、参照タンパク質は、それが比較される抗原結合タンパク質と同じ形態であり、参照タンパク質は、親TCR R7P1D5のCDRまたはおよび可変ドメインを含んでなる。

30

【0287】

本明細書で開示されるように、本発明の抗原結合タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列「KVLEHVVRV」と、HLA分子、好ましくはHLA-A^{*}02を含んでなるかまたはそれからなる、MAGE-A抗原ペプチドの複合体を認識しおよび/またはそれに結合する。したがって、MAG-003およびHLA分子は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIに存在し、前記複合体への抗原結合タンパク質の結合は、結合時に免疫応答を惹起してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、参照タンパク質によって誘導される免疫応答と比較して増加した免疫応答を誘導する。

40

【0288】

したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、免疫応答を誘導し、好ましくは、免疫応答は、インターフェロン(IFN)レベルの増加によって特徴付けられる。したがって、一例では、免疫応答は、好ましくはIFN-放出アッセイで判定されるEC₅₀値によって特徴付けられるかもしれない。

【0289】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、参照タンパク質のEC₅₀よりも低い、好ましくはIFN-放出によって判定されるEC₅₀[nM]値を有し、好ましくは、抗原結合タンパク質は、参照タンパク質のEC₅₀[nM]値の2分の1、好ましくは2、3

50

、4、5、6、7、8分の1、例えば、2~9分の1のEC₅₀ [nM]を有し、この中で、EC₅₀値は、MHC、好ましくはHLA-A*02発現細胞、好ましくは配列番号1の抗原ペプチドが負荷された細胞上で判定された最大半量IFN-γ放出濃度 [nM]である。一例では、言及されるEC₅₀は、例えば、電気穿孔されたCD8+T細胞と、MAGE-A抗原ペプチド、好ましくは配列番号1のMAGE-A抗原ペプチドの連続希釈液が負荷されたT2細胞とを共培養した後に、典型的には、ELISAによって判定される。好ましくは、参照タンパク質は、それが比較される抗原結合タンパク質と同じ形態であり、参照タンパク質は、親TCR R7P1D5のCDRまたはおよび可変ドメインを含んでなり、EC₅₀は、好ましくは同じ実験設定で判定されている。

【0290】

10

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対する、好ましくはIFN-γ放出アッセイまたはLDH放出アッセイによって判定される、100nM未満、50nM、10nM未満、900pM未満、500pM未満、300pM未満、200pM未満、150pM未満、100pM未満、50pM未満、20pM未満、10pM未満、0.1nM~20nMの間などの、0.5nM~15nM、0.8nM~12nM、0.8nM~10nM、0.8nM~10nM、0.8nM~10nMなどの、または1pM~150pM、1~100pM、1~50pM、1~20pM、1~20pMなどのEC₅₀値を有する。

【0291】

20

一実施形態では、抗原結合タンパク質はTCRであり、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対する、好ましくはIFN-γ放出によって判定される、12未満nM未満、10nM未満、9nM未満、8nM未満、6nM未満、4nM未満、0.1nM~20nMの間など、0.5nM~15nM、0.8nM~12nM、0.8nM~10nM、0.8nM~10nM、0.8nM~10nMなどのEC₅₀を有する。

【0292】

この実施形態では、EC₅₀は、本発明の異なる抗原結合タンパク質を発現するCD8+T細胞(20,000個の細胞/ウェル)を使用して、MAG-003(配列番号1)の希釈系列が負荷されたT2細胞(20,000個の細胞/ウェル)との共培養時に放出される、IFN-γのレベルを判定することによって判定される。

【0293】

30

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、TCER(商標)などの可溶性分子であり、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対する、200pM未満、150pM未満、100pM未満、50pM未満、20pM未満、10pM未満、1pM~150pM、1~100pM、1~50pM、1~20pM、1~20pMのEC₅₀を有する。この実施形態では、EC₅₀は、本発明の異なる抗原結合タンパク質を発現するCD8+T細胞(20,000細胞/ウェル)を使用して、MAG-003を内在性レベルで提示する腫瘍細胞株との共培養時に放出されるLDHのレベルを判定することにより判定され、好ましくは、細胞株は、MHCタンパク質との複合体中の約1071個のMAG-003ペプチドをその表面上に提示するHS695Tであり、好ましくは、細胞株は、MHCタンパク質との複合体中の約3918個のMAG-003ペプチドをその表面上に提示するNCI-H1755であり、または好ましくは、細胞株は、MHCタンパク質との複合体中の約125個のMAG-003ペプチドをその表面上に提示するU2OSである。

40

【0294】

本発明の抗原結合タンパク質は、高い安全性プロファイルを有する。

【0295】

本明細書における「安全性プロファイル」は、腫瘍細胞を健常組織細胞から区別する能力を指し、これは、しばしば安全域を判定することによって判定される。

【0296】

本明細書における「安全域」または「治療域」は、腫瘍細胞株に100%の細胞傷害性を誘導するのに必要な化合物の最大半量濃度と、健常組織細胞に100%の細胞傷害性を

50

誘導するのに必要な化合物の最大半量濃度とを比較した場合の係数を指す。目的の抗原結合タンパク質について、腫瘍細胞株について判定された EC₅₀ が 1 pM であり、例えば、初代細胞について判定された EC₅₀ 値が 1000 pM である場合、腫瘍細胞株に対する EC₅₀ は初代細胞に対する EC₅₀ の 1000 分の 1 であるので、安全域は 1000 である。

【 0 2 9 7 】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、健常細胞に対する EC₅₀ 値よりも 500 ~ 12000、好ましくは 1000 ~ 10000 高い、MAGE-A / MHC 複合体提示細胞に対する EC₅₀ など、健常細胞に対する EC₅₀ 値よりも 100 以上、500 以上、1000 以上、2000 以上、3000 以上、4000 以上、5000 以上、6000 以上、8000 以上、10000 以上高い、MAGE-A / MHC 複合体提示細胞に対する EC₅₀ を有する。10

【 0 2 9 8 】

「MAGE-A / MHC 複合体提示細胞」は、本明細書では、MAGE-A ペプチド / MHC 複合体をその表面上に提示する細胞を指し、その中では、前記 MAGE-A / MHC 複合体のコピー数は、典型的には当業者に知られた方法で判定され得る。一実施形態では、MAGE-A / MHC 複合体は、がん細胞などの標的細胞であり、その中では、がんは、本明細書の下で「治療法および使用」の項で定義される。本発明の文脈において、MAGE-A ペプチド / MHC 複合体は、正常（健常）組織の細胞表面上の前記複合体のレベルと比較して、MAGE-A / MHC 複合体提示細胞、特にがん細胞の細胞表面上に過剰に提示される。「過剰に提示される」とは、MAGE-A / MHC 複合体が、健常組織における提示レベルの少なくとも 1.2 倍のレベル、好ましくは健常組織または細胞における提示レベルの少なくとも 2 倍、およびより好ましくは 5 倍 ~ 10 倍で、提示されることを意味する。20

【 0 2 9 9 】

一実施形態では、MAGE-A / MHC 複合体提示細胞は、50 を超え、80 を超え、100 を超え、120 を超え、150 を超え、300 を超え、400 を超え、600 を超え、800 を超え、1000 を超え、1500 を超え、2000 を超える、MAGE-A / MHC 複合体コピー数、好ましくは 50 ~ 2000、80 ~ 2000 など、100 ~ 2000 など、例えば 120 ~ 2000 の MAGE-A / MHC コピー数を有する。30

【 0 3 0 0 】

本明細書における「コピー数」は、例えば、がん細胞、または健常細胞のような MAGE-A / MHC 提示細胞などの細胞の細胞表面上に存在する、本発明の文脈で定義される MAGE-A / MHC 複合体の数を指す。タンパク質のコピー数は、蛍光標識された抗原結合タンパク質を用いた罹患細胞の FACS 分析をはじめとする、様々な当該技術分野で知られている方法によって判定され得る。

【 0 3 0 1 】

本明細書の「健常細胞」は、がん細胞ではない細胞を指し、好ましくは、本明細書の健常細胞は、MAGE-A / MHC 提示細胞周囲の組織の細胞、がん細胞を提示する MAGE-A / MHC 複合体周囲の組織の細胞を指す。しかし、場合によっては、健常細胞もまた MAGE-A / MHC 複合体を発現してその表面に提示するかもしれない。典型的には、本発明の文脈における健常細胞中では、当業者であれば理解できるように、MAGE-A / MHC 複合体が、がん細胞よりも少ない量（コピー数）で存在する。40

【 0 3 0 2 】

健常細胞は、好ましくは、星状細胞、GABA 神経細胞、心筋細胞、心臓微小血管内皮細胞、軟骨細胞、冠動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、間葉系幹細胞、鼻上皮細胞、末梢血单核細胞、肺動脈平滑筋細胞、好ましくは GABA 神経細胞、心筋細胞、心臓微小血管内皮細胞、軟骨細胞、冠動脈内皮細胞、鼻上皮細胞、末梢血单核細胞、肺動脈平滑筋細胞からなる群から選択される。

【 0 3 0 3 】

50

20

30

40

50

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、健常細胞、好ましくは、星状細胞、GABA神経細胞、心筋細胞、心臓微小血管内皮細胞、軟骨細胞、冠状動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、間葉系幹細胞、鼻上皮細胞、末梢血単核細胞、肺線維芽細胞、気管平滑筋細胞、表皮ケラチノサイト、腎皮質内皮細胞、および肺動脈平滑筋細胞、好ましくは、星状細胞、GABA神経細胞、心筋細胞、心臓微小血管内皮細胞、軟骨細胞、冠動脈内皮細胞、皮膚微小血管内皮細胞、間葉系幹細胞、鼻上皮細胞、末梢血単核細胞、および肺動脈平滑筋細胞、より好ましくはGABA神経細胞、心筋細胞、心臓微小血管内皮細胞、軟骨細胞、冠動脈内皮細胞、鼻上皮細胞、末梢血単核細胞、肺動脈平滑筋細胞からなる群から選択される健常細胞に対するEC₅₀値よりも1000倍以上、15000倍以上、9000倍以上高い、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対するEC₅₀を有する。

10

【0304】

好ましい一実施形態では、抗原結合タンパク質は、健常細胞に対するEC₅₀値よりも9000倍以上または10000倍以上高いMAGE-A/MHC複合体提示細胞に対する、EC₅₀を有し、その中では、好ましくは、前記健常細胞は、iPSC由来星状細胞、iGABA神経細胞、i心筋細胞、骨芽細胞、肺線維芽細胞、気管平滑筋細胞および表皮ケラチノサイトおよび腎皮質上皮細胞からなる群から選択される。

【0305】

したがって、一実施形態では、健常細胞は、50未満、20未満、10未満、好ましくは10未満のMAGE-A/MHC複合体コピー数、好ましくは0~10のMAGE-A/MHC複合体コピー数の、MAGE-A/MHC複合体コピー数を有する。

20

【0306】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、類似ペプチド/MHC提示細胞に対するEC₅₀値よりも500~12000、好ましくは1000~12000高い、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対するEC₅₀など、類似ペプチド/MHC提示細胞に対するEC₅₀値よりも100以上、500以上、1000以上、2000以上、3000以上、4000以上、5000以上、6000以上高い、MAGE-A/MHC複合体提示細胞に対するEC₅₀を有する。

【0307】

「類似ペプチド」は、本明細書で上記に定義される。

【0308】

30

したがって類似ペプチド/MHC提示細胞は、その細胞表面上に類似ペプチド/MHC複合体を提示する細胞である。一実施形態では、類似ペプチド/MHC提示細胞は、10を超える、20を超える、40を超える、50を超える、80を超える、100を超える、120を超える、150を超える、300を超える、400を超える、500を超える、800を超えて、好ましくは、50~1000、50~8000など、50~500など、100~500などの類似のペプチド/MHCコピー数である、類似ペプチド/MHCのコピー数を有する。

【0309】

本発明は、生体内で腫瘍退縮、より具体的には試験条件下での完全な退縮を誘導できる抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質が調製され、ヒトPBM Cが移植された雌のNOGマウスに移植された測定可能HS695T腫瘍異種移植片に対して、異なる用量で評価された（実施例7を参照されたい）。MAG-003を標的化するTCER（商標）（配列番号127および130、グループ3；配列番号135および136、グループ4）は、全てのマウスにおいて、無作為化した日の86mm³（グループ3）および80mm³（グループ4）の基底レベルと比較して、18日目から試験終了の25日目までにHS695T腫瘍の完全な寛解を誘導した。

40

【0310】

したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、腫瘍増殖を阻害または低減し、より具体的には、本発明の抗原結合タンパク質は、腫瘍の平均腫瘍体積を80%を超える、85%を超える、90%を超える、92%を超える、94%を超える、96%を超える、98%を超える、99%を超えて、95%~100%、96%~100%、98%~100%

50

など、98%、99%または100%など、好ましくは100%低減し、その中では、前記腫瘍は、本明細書の「治療法および使用」の項で以下に定義されるがんである。一例では、抗原結合タンパク質は、がん腫瘍において完全寛解を誘導し、その中では、がんは、例えば、ヒト腫瘍細胞株H S 6 9 5 Tにおいて、本明細書で以下に定義される。

【0311】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質の半減期($T_{1/2}$)は、6または7日などの6~7日である。

【0312】

実施例、特に実施例1および図1からさらに分かるように、天然T C R R 7 P 1 D 5などの天然T C Rは、酵母またはC H O細胞のどちらでも可溶性形態で発現され得なかつた。これとは逆に、本発明の抗原結合タンパク質、特にT C E R(商標)分子、好ましくは本明細書で記述される好ましいT C E R(商標)分子は、可溶性であるだけでなく、C H O細胞で一過性に発現させることができ、その量は10m g / Lを超える(細胞培養)、20m g / Lを超える、さらには40m g / Lである。したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、宿主細胞において高収率で発現され得て、ここで、好ましくは宿主細胞はC H O細胞であり、その中では、好ましくは収率は、5~50、5, ~45、5~40、5~35、10~35、10~30、10~25、10~20m g / L(細胞培養物)など、10を超える、15、18、20、22、24、26、28、30、35、40、45m g / L(細胞培養物)を超える。一例では、抗原結合タンパク質は一過性に形質移入されたC H O-S細胞で発現され、その中では、細胞は、 $T = 0$ において、 $4 \times 10^6 / mL$ の密度で、37で、総容量320m LのG E Health care(商標)の培地の中で培養された。1日後、供給液(C e l l B o o s t 7 aおよびb)が添加され、温度が32に低下された。細胞、したがって抗原結合タンパク質は、合計12日間の培養時間と合計3回の栄養供給後に収穫された。

10

20

30

【0313】

実施例からさらに分かるように、本発明者らは、例えば実施例4および5において、本発明の抗原結合タンパク質が、参照タンパク質と比較して、例えば、天然T C R R 7 P 1 D 5のC D Rと、好ましくは前記天然T C R R 7 P 1 D 5のフレームワーク領域とを含んでなる抗原結合タンパク質と比較して、改善された安定性を有することを実証した。

【0314】

したがって一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、任意選択的に、参照タンパク質と比較して改善された安定性を有する。本発明の文脈において、改善された安定性は、例えば、温度ストレスに曝された場合の物理的安定性の増加を指す。したがって、本発明の新たに開発された抗原結合タンパク質は、参照抗原結合タンパク質よりもストレス条件、特に温度ストレスにより良く耐え得る。

40

【0315】

本発明の文脈における「安定性」という用語は、物理的安定性を指し、当該技術分野で記載される様々な分析技術を使用して定性的および/または定量的に評価され得て、例えば、Pept ide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991); およびJones, A. A d v . D r u g D e l i v e r y R e v . 1 0 : 2 9 - 9 0 (1993)で概説される。本発明の文脈において、これらの方法は、特に、(例えば、サイズ排除クロマトグラフィーの使用、濁度の測定、および/または目視検査による)凝集体形成の評価を指す。安定性を測定するために、本発明の抗原結合タンパク質を含んでなるサンプルは、安定性試験で試験されてもよく、その中では、サンプルは選択された期間ストレス条件に曝され、適切な分析技術を使用した化学的および物理的安定性の定量的および任意選択的に定性的な分析がそれに続いた。

【0316】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、40の温度に例えば、1

50

4日間曝された場合など、特定の期間にわたりストレス条件に曝された場合に、物理的に安定している。

【0317】

「物理的安定性」は、本発明の文脈において、実質的に、凝集、沈殿および／または変性の兆候を有さない抗原結合タンパク質を指す。

【0318】

物理的安定性にアクセスする方法は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）、動的光散乱（D L S）、光掩蔽（L O）、および色と透明度であり、例えば、目視検査によって判定される。

【0319】

「凝集の兆候がない」とは、例えば、P B Sなどの緩衝液中で14日にわたる40°Cの温度などのストレス条件に曝された後に、抗原結合タンパク質を含んでなるサンプルが、P B Sなどの緩衝液中でS E C - H P L CなどのS E Cによって測定された場合、単量体含有量の94%～99%、95%～99%、96%～99%、97%～99%の単量体含有量などの、80%を超える、86%を超える、88%を超える、90%を超える、92%を超える、94%を超える、96%，を超える97%を超える、98%を超える、99%を超える単量体含有量を有することを意味する。

【0320】

したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、ストレス条件に曝された場合の参照タンパク質と比較して、凝集が減少している。

【0321】

サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）では、使用されるカラム、操作圧力、および緩衝液の速度に応じて、試験された条件下で、単量体含量の1%、2%、3%、4%、好みしくは2%などの1または2%の差が、本発明の文脈では有意差があると見なされる。

【0322】

これは、参照抗原結合タンパク質が96%の単量体含有量を有し、本発明の抗原結合タンパク質が97%の単量体含有量を有する場合、本発明の抗原結合タンパク質の単量体含有量は、同じ条件で測定した場合、参照抗原結合タンパク質と比較して有意に異なり、したがって有意に増加していることを意味する。

【0323】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、ストレス条件に曝された場合、凝集の減少を有し、より具体的には、ストレスによって誘発された凝集体が、前記ストレス条件への曝露の前後に測定された場合、本発明の抗原結合タンパク質は、10%未満、4%未満、3%未満、2%未満の凝集を有する。

【0324】

核酸、ベクター、および組換え宿主細胞

本発明のさらなる目的は、本明細書で上に定義される本発明の抗原結合タンパク質をコードする配列を含んでなるかまたはそれからなる単離核酸配列に関する。

【0325】

典型的には、前記核酸は、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージまたはウイルスベクターなどの任意の適切なベクターに含まれてもよいD N AまたはR N A分子である。

【0326】

「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」は、それによってD N AやR N Aの配列（例えば、外来遺伝子）を宿主細胞に導入し、宿主を形質転換し、導入された配列の発現（例えば、転写または翻訳）を促進するためのビヒクルを意味する。

【0327】

したがって、本発明のさらなる目的は、本発明の核酸を含んでなるベクターに関する。

【0328】

このようなベクターは、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどの調節エレ

10

20

30

40

50

メントを含んでなり、対象への投与時に前記ポリペプチドの発現を引き起こし、または指示してもよい。動物細胞のための発現ベクターで使用されるプロモーターおよびエンハンサーの例としては、SV40の初期プロモーターおよびエンハンサー(Mizukami T. et al. 1987)、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびエンハンサー(Kuwana Y et al. 1987)、免疫グロブリンH鎖などのプロモーター(Mason JO et al. 1985)およびエンハンサー(Gillies SD et al. 1983)が挙げられる。

【0329】

ヒト抗体C領域をコード化する遺伝子を挿入して発現させることができる限り、動物細胞のための任意の発現ベクターが使用され得る。適切なベクターの例としては、pAGE 107(Miyaji H et al. 1990)、pAGE103(Mizukami T et al. 1987)、pHSG274(Brady G et al. 1984)、pKCR(O'Hare K et al. 1981)、pSG1 d2-4-(Miyaji H et al. 1990)などが挙げられる。プラスミドのその他の例としては、複製起点を含んでなる自己複製プラスミド、または例えば、pUC、pcDNA、pBRなどの統合プラスミドが挙げられる。

10

【0330】

ウイルスベクターのその他の例としては、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、およびAAVベクターが挙げられる。このような組換えウイルスは、パッケージング細胞への形質移入によって、またはヘルバープラスミドまたはウイルスを用いた一過性形質移入によって、当該技術分野で公知の技術によって生成されてもよい。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例としては、PA317細胞、PsiCRII細胞、GPenv+細胞、293細胞などが挙げられる。このような複製欠損組換えウイルスを生成するための詳細なプロトコルは、例えば、国際公開第95/14785号パンフレット、国際公開第96/22378号パンフレット、米国特許第5,882,877号明細書、米国特許第6,013,516号明細書、米国特許第4,861,719号明細書、米国特許第5,278,056号明細書、および国際公開第94/19478号パンフレットにある。

20

【0331】

「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージ化される能力を有し、少なくとも外因性核酸をコード化する、核酸ベクターコンストラクトを指す。ベクターおよび/または粒子は、生体外または生体内のどちらかで、任意の核酸を細胞に移し入れる目的で用いられ得る。多数の形態のウイルスベクターが、当該技術分野で公知である。

30

【0332】

「ビリオン」という用語は、単一の感染性ウイルス粒子を指すために使用される。「ウイルスベクター」、「ウイルスベクター粒子」、および「ウイルス粒子」はまた、細胞外に存在する、DNAまたはRNAコアとタンパク質コートを有する完全なウイルス粒子を指す。例えば、ウイルスベクターは、アデノウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、アレナウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、またはピコルナウイルスから選択されてもよい。

40

【0333】

ウイルスは、天然に存在するウイルスならびに人工ウイルスを指してもよい。本発明のいくつかの実施形態によるウイルスは、エンベロープウイルスまたは非エンベロープウイルスのどちらであってもよい。パルボウイルス(AAVなど)は、非エンベロープウイルスの例である。好ましい実施形態では、ウイルスは、エンベロープウイルスであってもよい。好ましい実施形態では、ウイルスは、レトロウイルス、特にレンチウイルスであってもよい。真核細胞のウイルス感染を促進し得るウイルス外被タンパク質は、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)、変形ネコ内在性レトロウイルス(RD114TR)、および修

50

飾テナガザル白血病ウイルス (G A L V T R) からのエンベロープ糖タンパク質 (G P) で偽型化された H I V - 1 由来レンチウイルスペクター (L V) を含んでもよい。これらのエンベロープタンパク質は、アデノ隨伴ウイルス (A A V) をはじめとするパルボウイルスなどのその他のウイルスの侵入を効率的に促進し得て、それによってそれらの広範な効率を実証する。例えば、モロニーマウス白血病ウイルス (M L V) 4 0 7 0 e n v (その内容が参照により本明細書に援用される、M e r t e n e t a l . , J . V i r o l . 7 9 : 8 3 4 - 8 4 0 , 2 0 0 5 に記載されるような) R D 1 1 4 e n v 、キメラエンベロープタンパク質 R D 1 1 4 p r o または R D p r o (その内容が参照により本明細書に援用される B e l l e t a l . E x p e r i m e n t a l B i o l o g y a n d M e d i c i n e 2 0 1 0 ; 2 3 5 : 1 2 6 9 - 1 2 7 6 に記載されるような、R D 1 1 4 の R ペプチド切断配列を H I V - 1 マトリックス / カブシド (M A / C A) 切断配列で置換することによって構築された R D 1 1 4 - H I V キメラ) 、バキュロウイルス G P 6 4 e n v (その内容が参照により本明細書に援用される W a n g e t a l . J . V i r o l . 8 1 : 1 0 8 6 9 - 1 0 8 7 8 , 2 0 0 7 に記載されるような) 、または G A L V e n v (その内容が参照により本明細書に援用される、M e r t e n e t a l . , J . V i r o l . 7 9 : 8 3 4 - 8 4 0 , 2 0 0 5 に記載されるような) またはそれらの誘導体をはじめとする、その他のウイルスエンベロープタンパク質が使用されてもよい。

【 0 3 3 4 】

本発明のさらなる目的は、本発明による核酸および / またはベクターで形質転換、形質導入、または形質移入された宿主細胞に関する。

【 0 3 3 5 】

「形質転換」という用語は、元来、宿主細胞への遺伝子移入の自然発生プロセスを指し、これは、細胞による細胞膜を介した、例えば、D N A または R N A などの核酸などの遺伝物質の吸収を伴い、その結果、宿主細胞は、導入された遺伝子または配列を発現し、所望の物質、典型的には、導入された遺伝子または配列によってコード化されるタンパク質または酵素を産生する。自然形質転換および人工または誘導形質転換と称される、2つのタイプがある。人工または誘導形質転換法は実験室条件下で行われ、典型的には形質移入と称される。

【 0 3 3 6 】

形質転換の過程において、D N A または R N A などの外来核酸を受け取って発現する宿主細胞は、「形質転換」されている。

【 0 3 3 7 】

「形質移入」という用語は、宿主細胞が外来遺伝物質を受け取ることを可能にする、宿主細胞の細胞膜上の細孔の生成を伴う遺伝子移入の様式を指す。典型的には形質移入は、昆虫または哺乳類の細胞などの真核細胞の形質転換を指す。化学薬品媒介形質移入は、例えば、リン酸カルシウムまたはカチオン性ポリマーまたはリポソームの使用を伴う。非化学薬品媒介形質移入法は、典型的には、電気穿孔、ソノ波レーション、インペールフェクション、光形質移入、または流体力学的送達である。粒子ベースの形質移入には、ナノ粒子を使用して核酸を宿主細胞に移入する遺伝子銃技術、またはマグネットフェクションと称される別の方法が使用される。又クレオフェクションおよび熱ショックの使用は、形質移入を成功させるためのその他の進化した方法である。形質移入法を介して外来核酸を受け取る宿主細胞は、「形質移入」されている。

【 0 3 3 8 】

「形質導入」という用語は、一般に、ウイルスまたはウイルスペクターによる細胞へのD N A または R N A などの外来核酸の移入に関連すると理解される。ウイルスまたはウイルスペクターによって、D N A や R N A などの外来核酸を受け取って発現する宿主細胞は、「形質導入」されている。

【 0 3 3 9 】

いくつかの実施形態では、細胞は、その内容全体が本明細書に参照により援用される、

10

20

30

40

50

米国特許第 2 0 1 9 0 2 1 6 8 5 2 号明細書に記載された方法を使用して形質導入されてもよい。

【 0 3 4 0 】

本発明の核酸を使用して、適切な発現系において本発明の組換え抗原結合タンパク質が生成されてもよい。

【 0 3 4 1 】

「発現系」という用語は、例えば、ベクターによって運ばれ、宿主細胞に導入される外来DNAによってコード化されるタンパク質の発現のための適切な条件下にある、宿主細胞および適合性ベクターを意味する。

【 0 3 4 2 】

一般的な発現系としては、大腸菌 (E. coli) 宿主細胞とプラスミドベクター、昆虫宿主細胞とバキュロウイルスベクター、および哺乳類宿主細胞とベクターが挙げられる。その他の宿主細胞の例としては、限定されることなく、原核生物細胞（細菌など）および真核細胞（酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞など）が挙げられる特定の例としては、大腸菌 (E. coli)、クルイペロミセス属 (Kluyveromyces) 属またはサッカロミセス属 (Saccharomyces) の酵母、哺乳類細胞株（例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など）、初代または確立された哺乳類細胞培養物（例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚性細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから生成される）が挙げられる。例としてはまた、マウスSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、「DHFR遺伝子」と称される）が欠損したCHO細胞 (Urlaub Get al; 1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (ATCC CRL1662、以下、「YB2/0細胞」と称する）なども挙げられる。いくつかの実施形態では、キメラまたはヒト化抗体のADC活性は、YB2/0細胞で発現させると増強されることから、この細胞が好ましくあってもよい。

10

20

30

40

【 0 3 4 3 】

本発明はまた、本発明による抗原認識コンストラクトを含んでなる宿主細胞にも関する。具体的には、本発明の宿主細胞は、本明細書で上に記載される核酸またはベクターを含んでなる。宿主細胞は、例えば、植物、動物、真菌、または藻類などの真核細胞であり得て、または例えば、細菌または原虫など原核細胞であり得る。宿主細胞は、培養細胞または初代細胞、すなわち、例えばヒトなどの生物から直接単離された細胞であり得る。宿主細胞は、接着細胞または懸濁細胞、すなわち、懸濁状態で増殖する細胞であり得る。組換えTCR、ポリペプチド、またはタンパク質などの抗原結合タンパク質を生成する目的のために、宿主細胞は好ましくは哺乳類細胞である。最も好ましくは、宿主細胞はヒト細胞である。宿主細胞は任意の細胞タイプであり得て、任意の組織型に由来し得て、任意の発達段階であり得て、宿主細胞は好ましくは、末梢血白血球 (PBL) または末梢血単核細胞 (PBMC) である。より好ましくは、宿主細胞はT細胞である。T細胞は、例えば、初代T細胞などの培養T細胞などの任意のT細胞；または例えば、ジャーカット、SupT1などの培養T細胞株由来のT細胞；または哺乳類から得られたT細胞、好ましくは、ヒト患者由来のT細胞またはT細胞前駆体であり得る。哺乳類から得られる場合、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺、またはその他の組織または体液をはじめとするが、これに限定されるものではない、多数の起源から得られ得る。T細胞はまた、富化または精製され得る。好ましくは、T細胞はヒトT細胞である。より好ましくは、T細胞はヒトから単離されたT細胞である。T細胞は、CD4陽性および/またはCD8陽性、CD4陽性のヘルパーT細胞、例えば、Th1およびTh2細胞、CD8陽性T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、腫瘍浸潤性細胞 (TIL)、記憶T細胞、未感作T細胞などをはじめとするが、これに限定されるものではない、任意のT細胞型であり得て、任意の発達段階のものであり得る。好ましくは、T細胞は、CD8陽性T細胞またはCD4陽性T細胞である。宿主細胞は、好ましくは、MAGEA4および/またはMAGEA8を発現する腫

50

癌細胞に特異的な腫瘍反応性T細胞である。

【0344】

上記によれば、一実施形態では、本発明は、本明細書で上に定義される本発明の抗原結合タンパク質、または核酸、または本発明のベクターを含んでなる宿主細胞に言及する。その中では、前記宿主細胞は、好ましくは、a) リンパ球、例えばTリンパ球またはTリンパ球前駆細胞、例えばCD4またはCD8陽性T細胞、またはb) チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの組換え発現のための細胞である。

【0345】

特に、本発明のいくつかの抗原結合タンパク質の発現では、発現ベクターは、どちらのタイプであってもよく、その中では、抗体重鎖および鎖などの第1のポリペプチドをコードする遺伝子と、抗体軽鎖や鎖などの第2のポリペプチドをコードする遺伝子が別々のベクター上に存在するタイプと、双方の遺伝子が同じベクター上に存在するタイプ(タンデム型)がある。抗原結合タンパク質発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、および動物細胞における抗体HとL鎖の発現レベル間のバランスに関して、タンデム型のヒト化抗体発現ベクターが好ましい(Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3; 167(1-2): 271-8)。タンデム型ヒト化抗体発現ベクターとの例としては、pKANTEX93(国際公開第97/10354号パンフレット)、pEE18などが挙げられる。

10

【0346】

一実施形態では、このような組換え宿主細胞は、本発明の少なくとも1つの抗原結合タンパク質の生成に使用され得る。

20

本発明の抗原結合タンパク質を生成する方法

本発明はまた、

- a. 適切な宿主細胞を提供するステップと、
- b. 本発明の抗原結合タンパク質をコード化するコード配列を含んでなる遺伝子コンストラクトを提供するステップと、
- c. 前記遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するステップと、
- d. 前記適切な宿主細胞によって前記遺伝子コンストラクトを発現させるステップと、任意選択的に

e. 前記抗体を発現および/または分泌する細胞を選択するステップと

30

を含んでなる本明細書で上に定義される抗原結合タンパク質を生成する方法にも関する。

【0347】

本発明の抗原結合タンパク質は、本明細書で上に対応する項で定義される。

【0348】

本明細書の「遺伝子コンストラクト」は、宿主におけるコード領域の発現を可能にする核酸を示し、したがって、上記のベクターまたはRNAなどの核酸を指す。

【0349】

一実施形態では、方法はさらに、前記適切な宿主細胞上で、前記抗原認識コンストラクトを細胞表面提示させるステップをさらに含んでなってよい。

【0350】

その他の好ましい実施形態では、b)の遺伝子コンストラクトは、本発明の抗原結合タンパク質をコード化する核酸を含んでなる。このような核酸は、本明細書で上に「核酸、ベクター、および組換え宿主細胞」の項で定義される。

40

【0351】

関連する実施形態では、遺伝子コンストラクトは、前記コード配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含んでなる、発現コンストラクトである。

【0352】

関連する実施形態では、遺伝子コンストラクトは、形質転換、形質導入または形質移入を用いて、適切な宿主中に導入される。形質転換、形質導入または形質移入は、本明細書で上の項に定義される。

50

【 0 3 5 3 】

望ましくは、遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するための形質移入システムは、本明細書で上に、核酸、ベクター、および組換え宿主細胞の項に記載されるレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターシステムである。このようなシステムは、当業者に周知である。

【 0 3 5 4 】

一実施形態では、方法は、宿主細胞からの抗原結合タンパク質の単離と精製、および任意選択的に、T細胞における抗原結合タンパク質の再構成をさらに含んでなる。

【 0 3 5 5 】

本発明の抗原結合タンパク質は、限定されることなく、化学的、生物学的、遺伝が的または酵素的技術のいずれか単独または組み合わせなど、当該技術分野で公知の任意の技術によって生成されてもよい。

10

【 0 3 5 6 】

いくつかの特定の実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、抗体または免疫グロブリン様フレームワークを有する。

【 0 3 5 7 】

抗体またはそれらの断片およびT C R またはそれらの断片などのポリペプチドを生成するための標準技術は当該技術分野で公知であり、これらの技術は、当業者によって本発明の抗原結合タンパク質に移行され得る。例えば、それらは、周知の固相法を使用して、特に市販のペプチド合成装置（カリフォルニア州フォスター・シティーのApp lie d Bi o s y s t e m s によって製造されたものなど）を使用して、製造業者の指示に従って合成され得る。代案としては、抗体またはそれらの断片およびT C R またはそれらの断片などの本発明の抗原結合タンパク質は、当該技術分野で周知の組換えDNA技術によって合成され得る。例えば、所望の（ポリ）ペプチドをコード化するDNA配列を発現ベクターに組み込み、このようなベクターを所望のポリペプチドを発現する適当な真核生物または原核生物の宿主に導入した後に、DNA発現産物として断片を得ることができ、その後、周知の技術を用いてそれから断片が分離され得る。

20

【 0 3 5 8 】

一例では、すなわち、T C E R (商標)二重特異性分子の場合、V H とV L 、および可変(V)と可変(V)の様々な組み合わせをコードするDNA配列、ならびにリンカーをコードする配列が、例えば、遺伝子合成によって得られてもよい。得られたDNA配列は、例えば、ヒトIgG4 [受入番号: K01316] およびIgG1 [受入番号: P01857] に由来するヒンジ領域、C_H2、およびC_H3ドメインをそれぞれコードする発現ベクターに、フレーム内でクローン化され、さらに操作されてもよい。追加的な鎖間ジスルフィド結合の安定化ありまたはなしで、C_H3ドメインに「ノブ・インツー・ホール」の変異を組み込むため；C_H2のN-グリコシル化部位を除去する（例えば、N297Q変異）ため；F_c-サイレンシング変異を導入するため；またはReiter et al. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. Biochemistry, 1994, 33, 5451-5459) によって記述された方法に従って、V L とV H にそれぞれ追加的なジスルフィド結合安定化を導入するため；安定性または製造可能性を高める変異を含めるための操作が実施されてもよい。

30

【 0 3 5 9 】

本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、プロテインA-セファロース、プロテインL-セファロース、プロテインG-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーなどの免疫グロブリン精製手順によって培地から適切に分離される。

40

【 0 3 6 0 】

50

一実施形態では、本明細書において、発現した抗原結合タンパク質またはポリペプチドを回収することは、プロテインAクロマトグラフィー、プロテインLクロマトグラフィー、選択クロマトグラフィー、および／またはサイズ排除クロマトグラフィー、好ましくはプロテインLクロマトグラフィーおよび／またはサイズ排除クロマトグラフィー、より好ましくはプロテインL - クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを実施することを指す。

【0361】

組換えDNAを伴う本発明の抗原結合タンパク質を生成するための方法、および遺伝子形質移入技術は、当該技術分野で周知である(Morrison S L . et al . (1984) および特許文献米国特許第5,202,238号明細書；および米国特許第5,204、244号明細書を参照されたい)。 10

【0362】

さらに、従来の組換えDNAに基づいてヒト化抗体を生成するための方法、および遺伝子形質移入技術は、当該技術分野で周知であり(例えば、Riechmann L . et al . 1988 ; Neuberger M S . et al . 1985を参照されたい)、本発明の抗原結合タンパク質の生成に容易に適用され得る。

【0363】

一例では、本発明の組換え抗原結合タンパク質の発現のためのベクターは、例えば、HCMV由来のプロモーター要素であるpUC19誘導体によって制御される、単シストロン性として設計された。プラスミドDNAは、例えば、標準的な培養方法に従って大腸菌(E. coli)中で増幅され、引き続いて、市販のキット(Macherey & Nagel)を使用して精製された。精製されたプラスミドDNAは、例えば、製造業者の指示に従って(Exp CHO(商標)システム；Thermo Fisher Scientific)、または電気穿孔システム(MaxCyte STX)を使用して、CHO-S細胞の一過性形質移入に使用された。形質移入されたCHO-細胞は、例えば、32～37で6～14日間培養され、Exp CHO(商標)FeedまたはCellbost 7aおよび7b(GE Healthcare(商標))溶液が1～2回供給された。 20

【0364】

調整された細胞上清は、例えば、Sartoclear Dynamics(登録商標)Lab Filter Aid(Sartorius社)を使用した濾過(0.22μm)によって清澄化された。二重特異性抗原結合タンパク質は、例えば、親和性およびサイズ排除クロマトグラフィーをオンラインで実行するように装備された、Aktak Pure 25 L FPLCシステム(GE Lifesciences)を使用して精製された。アフィニティーコロマトグラフィーは、例えば、プロテインAまたはLカラム(GE Lifesciences)上で、標準的なアフィニティーコロマトグラフィープロトコルに従って実施された。例えば、Superdex 200 pg 16/600カラム(GE Lifesciences社)を用いて、アフィニティカラムからの溶出(pH 2.8)直後に、サイズ排除クロマトグラフィーが実施され、標準的なプロトコルに従って高純度の単量体タンパク質が得られた。タンパク質濃度は、例えば、NanoDropシステム(Thermo Scientific)上で、予測されたタンパク質配列に従って計算された吸光係数を用いて判定された。必要に応じて、Vivaspinデバイス(Sartorius)を使用して、濃度が調節された。最後に、精製された分子は、例えば、2～8の温度で約1mg/mLの濃度のリン酸緩衝生理食塩水中に保存された。 30 40

【0365】

精製された二重特異性抗原結合タンパク質の品質は、例えば、Vanquish HPLC-System内で、300mMのNaClを含有する50mMのリン酸ナトリウム、pH 6.8で実行される、MabPac SEC-1カラム(5μm、4×300mm)上で、HPLC-SECによって判定された。

【0366】

特定の一実施形態では、上記で定義される T 細胞がステップ a)において提供され、抗原結合タンパク質は、T C R またはその断片である。したがって、抗原結合タンパク質は、T 細胞の細胞表面上で発現される。したがって、方法は、本発明の文脈で定義されるように、がん細胞に特異的な T C R などの抗原結合タンパク質をその表面上に発現する T 細胞を生成する。

【 0 3 6 7 】

医薬組成物

本発明は、本発明の抗原結合タンパク質、本発明の核酸、本発明のベクター、または本発明の宿主細胞と、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる、医薬組成物にさらに言及する。

【 0 3 6 8 】

本発明はまた、薬剤として使用するための本発明による抗原結合タンパク質にも関する。本発明はまた、薬剤として使用するための本発明の医薬組成物にも関する。

【 0 3 6 9 】

本発明はまた、薬剤の製造における、本発明による抗原結合タンパク質または / および本発明の医薬組成物の使用にも関する。

【 0 3 7 0 】

「医薬組成物」または「治療用組成物」という用語は、本明細書の用法では、対象に適切に投与され場合に、望ましい治療的効果誘導できる化合物または組成物を指す。

【 0 3 7 1 】

いくつかの実施形態では、対象はまた、患者と称されることもある。

【 0 3 7 2 】

このような医薬組成物は、投与様式との適合性のために選択された薬学的または生理学的に許容される調合剤と混合された、本発明の抗原結合タンパク質、または治療薬をさらに含んでなる抗原結合タンパク質の治療的有効量を含んでなってもよい。

【 0 3 7 3 】

本発明の抗原結合タンパク質は、通常、無菌の医薬組成物の一部として供給され、これは、通常、薬学的に許容可能な担体を含む。

【 0 3 7 4 】

「薬学的に」または「薬学的に許容可能な」とは、哺乳類、特にヒトに投与したときに、適宜、有害反応、アレルギー反応、その他の不都合な反応を生じない分子体および組成物を指す。薬学的に許容可能な担体または賦形剤とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、または任意のタイプの製剤助剤を指す。

【 0 3 7 5 】

「薬理的に許容可能な担体」はまた、「薬学的に許容可能な希釈剤」または「薬学的に許容可能なビヒクリ」と称されることもあり、生理学的適合性である、溶剤、增量剤、安定剤、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれてもよい。したがって、一実施形態では担体は、水性担体である。

【 0 3 7 6 】

別の態様では、水性担体は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質と組み合わされた場合、例えば、改善された溶解性、効力、および / または改善された免疫療法などの、改善された特性を付与できる。

【 0 3 7 7 】

医薬組成物の形態、投与経路、投与量、およびレジメンは、必然的に、治療される病状、疾患の重症度、患者の年齢、体重、および性別、所望の治療期間などに依存する。この医薬組成物は、(それを患者に投与する所望の方法に応じて)任意の適切な形態であってもよい。それは、単位用量剤形で提供されてもよく、一般に密封容器内に提供され、キットの一部として提供されてもよい。このようなキットには、通常、(必ずしも必要ではないが)使用説明書が含まれる。それは、複数の前記単位用量剤形を含んでもよい。

【 0 3 7 8 】

生物学的半減期などの経験的考察事項は、一般的に投与量の決定に寄与する。投与の頻

10

20

30

40

50

度は、治療の過程で判定および調整されてもよく、がん細胞の数を低減すること、がん細胞の減少を維持すること、がん細胞の増殖を低減すること、またはがん細胞を滅殺することに基づいている。代案としては、抗原結合タンパク質の持続的な徐放性製剤が適切であってもよい。徐放を達成するための様々な製剤および装置が当該技術分野で公知である。

【0379】

一実施形態では、抗原結合タンパク質の投与量は、1回または複数回の投与を受けた個人において経験的に決定され得る。個人には、抗原結合タンパク質の漸増投与量が与えられる。抗原結合タンパク質の有効性を評価するために、がん細胞の状態のマーカーが追跡され得る。これらとしては、F A C S、その他の画像技術によるがん細胞増殖および細胞死の直接測定；およびこのような測定によって評価される健康の改善、または認められた試験または生存期間の延長によって測定される生活の質の向上が挙げられる。投与量は、個人、疾患の病期、および使用されている過去および並行治療に応じて変動することが当業者には明らかであろう。

10

【0380】

特に、医薬組成物は、注射できる製剤に薬学的に許容可能なビヒクルを含有する。これらは、特に等張性、滅菌、生理食塩水（リン酸一ナトリウムまたは二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウムなど、またはこのような塩の混合物）、または乾燥した、特に凍結乾燥した組成物であってもよく、これは滅菌水または生理食塩水の添加時に、注射液の構成が可能になる。

【0381】

20

医薬組成物を調製するために、本発明の有効量の抗原結合タンパク質は、薬学的に許容可能な担体または水性媒体に溶解または分散されてもよい。

【0382】

注入用途に適した医薬品形態としては、滅菌水溶液または分散液；ゴマ油、落花生油または水性プロピレンジコールを含む製剤；および無菌の注射液または分散液の即時調合のための無菌粉末が挙げられる。全ての場合において、形態は無菌でなければならず、容易に注射できる程度に流動性でなければならない。それは、製造および保管の条件下で安定している必要があり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用から保護されている必要がある。

【0383】

30

遊離塩基または薬理学的に許容可能な塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で、調製され得る。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレンジコール、およびそれらの混合物、および油中で調製され得る。通常の貯蔵および使用条件下で、これらの製剤は、微生物の増殖を防ぐ保存料を含有する。

【0384】

本発明の抗原結合タンパク質は、薬学的に許容可能な塩を使用して、中性または塩の形態の組成物に調合され得る。

【0385】

40

滅菌注射液は、必要に応じて、上に列挙されるその他の様々な成分と共に、適切な溶媒に必要な量の活性化合物を組み込んだ後、濾過滅菌によって調製される。一般に、分散液は、様々な滅菌された活性成分を、基礎的分散媒および上に列挙されたものからの必要なその他の成分を含有する、滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製法としては、活性成分と、あらかじめ滅菌濾過された溶液からの任意の追加的な所望の成分との粉末をもたらす、真空乾燥および凍結乾燥技術が挙げられる。

【0386】

直接注射のためのより濃縮された、または高度に濃縮された溶液の調製もまた想定され、その中では、溶媒としてのD M S Oの使用は、非常に迅速な浸透をもたらし、小さな腫瘍領域に高濃度の活性剤を送達することが想定される。

50

【 0 3 8 7 】

製剤化されると、溶液は、投与剤形と適合性のある様式で、治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、上記の注射液のタイプなどの様々な剤形で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなどもまた使用され得る。

【 0 3 8 8 】**治療法および使用**

本発明者らは、本発明のいくつかの抗原結合タンパク質、特に可溶性 T C E R (商標) 分子 # 1 1 4 - i s o 0 - U C H T 1 (17)、# 1 1 4 - i s o 1 - U C H T 1 (17) 10)、# 1 1 4 - i s o 2 - U C H T 1 (17)、# 1 1 4 - i s o 0 - B M A 0 3 1 (3 6)、# 1 1 4 - i s o 1 - B M A 0 3 1 (3 6)、および # 1 1 4 - i s o 2 - B M A 0 3 1 (3 6) などの本発明の T C E R (商標) 分子について、H s 6 9 5 T、A 3 7 5 、および U 2 0 S などの M A G - 0 0 3 陽性がん細胞株に対するこれらの分子の細胞傷害性活性を生体外実験の項の実施例 6 で示した。本発明者らは、H L A - A * 0 2 を発現するがペプチド M A G - 0 0 3 を提示しない細胞株において、二重特異性抗原結合タンパク質によってわずかな溶解のみが誘導されたことから、前記細胞傷害活性が非常に特異的であり、M A G - 0 0 3 陽性細胞に限定されることをさらに実証した。

【 0 3 8 9 】

さらに、本発明者らは、実施例 7 に詳細に記載され、図 1 1 に示されるように、N O G マウスの H S 6 9 5 T 腫瘍を完全寛解に導く、M A G - 0 0 3 (配列番号 1 2 7 および 1 3 0 、グループ 3 ; 配列番号 1 3 5 および 1 3 6 、グループ 4) を標的化する T C E R (商標) などの本発明の抗原結合タンパク質の生体内効力を実証した。

【 0 3 9 0 】

本発明者らによって実証されるように、本発明の抗原結合タンパク質は、対象、好ましくは患者において免疫応答を生じさせるのに有用であり、その中では、腫瘍細胞はこの免疫応答によって破壊され得る。ペプチド K V L E H V V R V (配列番号 1) は、同等のコピー数で正常組織上に提示または過剰提示されないことから、このような治療的ワクチン接種に由来する免疫応答は、腫瘍細胞に対して非常に特異的であると予想され得て、患者の正常細胞に対する望まれない自己免疫反応のリスクを防ぐ。さらに、本明細書の導入部で示したように、本発明の抗原結合タンパク質は、K V L E H V V R V 、特に本明細書で定義された前記ペプチド M A G - 0 0 3 中のエピトープに特異的に結合し、したがって、正常組織上に存在するその他の関連ペプチド抗原 (類似ペプチド) を認識したり、または交差反応したりすることはない。したがって、本発明の抗原結合タンパク質は、免疫療法に有用である。

【 0 3 9 1 】

したがって、本発明の抗原結合タンパク質、特に T C E R (商標) 分子などの二重特異性抗原結合タンパク質を使用して、がんが治療されてもよい。

【 0 3 9 2 】

本発明の抗原結合タンパク質は、ヒトおよび / または非ヒト哺乳類の動物、特にヒトにおける治療目的で使用されてもよい。

【 0 3 9 3 】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、腫瘍細胞に結合し、それらの細胞表面上にペプチド K V L E H V V R V (配列番号 1) / M H C 複合体提示する、腫瘍細胞の増殖を低減しあり / または殺滅し得る。抗原結合タンパク質は、生理学的 (例えば、生体内) 条件での結合を促進する濃度で投与されることが理解される。

【 0 3 9 4 】

したがって、一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、結腸、肺、乳房、前立腺、卵巣、臍臓、腎臓などの異なる組織の腫瘍細胞に対する免疫療法に使用され得る。別の実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、腫瘍細胞に結合し、その増殖を低減しあり / または殺滅し得る。

【 0 3 9 5 】

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、それを必要とする対象に、本発明に従って、本明細書で上に「抗原結合タンパク質」、「核酸」または「医薬組成物」の項で定義される、治療有効量の抗原結合タンパク質、核酸またはベクター、宿主細胞または医薬組成物を投与することを含んでなる、増殖性疾患または障害を治療または予防する方法に関する。

【0396】

特定の実施形態では、本発明は、細胞表面上に本発明の抗原結合タンパク質を発現するT細胞を前記対象に投与することを含んでなる、増殖性疾患有する対象を治療する方法に関する。

【0397】

さらなる実施形態では、本発明は、細胞表面上に本発明の抗原認識コンストラクトを発現するT細胞を含んでなる組成物を前記対象に投与することを含んでなる、増殖性疾患有する対象において免疫応答を惹起する方法に言及する。

【0398】

一実施形態では、前記方法で言及される免疫応答は、細胞傷害性T細胞応答である。

【0399】

本発明はさらに、増殖性疾患の診断、予防、および／または治療で使用するための、本発明の抗原結合タンパク質、本発明の核酸または本発明のベクター、本発明の宿主細胞または本発明の医薬組成物に言及する。

【0400】

本発明はさらに、増殖性疾患の診断、予防、および／または治療のための薬剤の製造における、本発明の抗原結合タンパク質、本発明の核酸または本発明のベクター、本発明の宿主細胞、または本発明の医薬組成物の使用にさらに言及する。

【0401】

一実施形態では、本発明は、対象における増殖性疾患または障害を治療または予防するための、本発明による抗原結合タンパク質、核酸またはベクター、宿主細胞または医薬組成物の使用に言及する。

【0402】

好ましい実施形態では、T細胞は、対象に対して自系であるか、または対象に対して同種異系であり、好ましくは自系である。好ましくは、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球または末梢血単核細胞から得られ得る。好ましくは、T細胞は、組成物の形態で投与される。好ましい関連する一実施形態において、前記組成物は、アジュバントをさらに含んでなり、その中では、アジュバントは、本明細書で上に医薬組成物の項で定義される。

【0403】

「対象」または「個体」という用語は同義的に使用され、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳類、好ましくはヒトであってもよい。

【0404】

本発明の文脈において、「治療する」または「治療」という用語は、治療的使用（すなわち、所与の疾患有する対象における）を指し、このような障害または病状の1つまたは複数の症状の進行を逆転させ、緩和し、阻害することを意味する。したがって、治療は、疾患の完全な治癒をもたらす治療だけでなく、疾患の進行を遅らせ、および／または対象の生存を延長する治療も指す。

【0405】

「予防する」とは、予防的使用（すなわち、所与の疾患に罹り易い対象における）を意味する。

【0406】

一実施形態では、「疾患」または「障害」は、本発明の抗原結合タンパク質による治療から利益を得るであろう任意の病状である。一実施形態では、これは、対象を問題の障害に罹り易くする病的状態も含めた、慢性および急性の障害または疾患を含む。

【0407】

「治療を必要とする」という用語は、既に障害を有する対象、ならびに障害が予防され

10

20

30

40

50

るべき対象を指す。したがって、一実施形態では、対象は患者である。

【0408】

がんなどの「増殖性疾患」は、細胞の無制御および／または不適切な増殖を伴う。

【0409】

一実施形態では、増殖性障害または疾患は、例えば、前記腫瘍疾患のがんまたは腫瘍細胞における、MAGEA4および／またはMAGEA8の発現によって特徴付けられる腫瘍疾患である。

【0410】

したがって、特に好ましいがんは、MAGEA4および／またはMAGEA8陽性がんである。

10

【0411】

本発明の文脈において、例えば、MAG-003ペプチドなどの関連ペプチドが、NCIによるガイドラインに従って全てのがんの98%以上で提示される場合、がんは「MAGEA4および／またはMAGEA8「陽性」」であると見なされる。ここで挙げられているあらゆるその他の適応症では、これらのがんの治療における標準であることから生検が実施され得て、ペプチドはX President（登録商標）および関連方法に従って同定され得る（それぞれの内容全体が参照により本明細書に援用される、国際公開第03/100432号パンフレット；国際公開第2005/076009号パンフレット；国際公開第2011/128448号パンフレット；国際公開第2016/107740号パンフレット；米国特許第7,811,828号明細書、米国特許第9,791,444号明細書、および米国特許第2016/0187351号明細書による）。一実施形態では、がんは、例えば、本発明の抗原結合タンパク質を使用することによって、容易にアッセイされる（すなわち、診断される）。抗原結合タンパク質を使用してがんを発現する抗原を同定する方法は、当業者に知られている。がん腫は、皮膚、または体器官を覆う組織に発生する特定タイプのがんであるため、「がん」および「がん腫」という用語は、本明細書では互換的に使用されないことが理解されるべきである。しかし、実施例11で使用される組織サンプルは腫瘍患者に由来し、サンプルは患者の疾患に割り当てられる。

20

【0412】

一実施形態では、MAGEA4および／またはMAGEA8「陽性」がん、すなわち標的ペプチドを提示するものは、非小細胞肺がんや小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、頭頸部がん、皮膚がん、腎細胞がん、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん腫、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、骨肉腫、および食道がんからなる群から選択される。

30

【0413】

一実施形態では、MAGEA4および／またはMAGEA8「陽性」がん、すなわち標的ペプチドを提示するものは、非小細胞肺がんや小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、頭頸部がん、皮膚がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、乳がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんからなる群から選択される。

40

【0414】

別の実施形態では、肺がんが非小細胞肺がん（NSCLC）、好ましくは非小細胞肺がん腺がんまたは扁平上皮細胞非小細胞肺がん（SNSCLC）；または小細胞肺がん（SCLC）である。別の実施形態では、がんは、皮膚がん、好ましくは黒色腫である。別の実施形態では、がんは、頭頸部がん、好ましくは頭頸部扁平上皮がん腫（HNSSCC）である。別の実施形態では、がんは肝臓がん、好ましくは肝細胞がん（HCC）である。別の実施形態では、がんは食道がん、好ましくは胃食道接合部がんである。

【0415】

がん治療の指針を提供するテキストとしては、Cancer Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al., Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia

50

h i a , P a . (1 9 9 3) がある。適切な治療アプローチは、特定のタイプのがん、および関連分野で認識されているように、患者の全身状態などのその他の要因に応じて選択される。本発明の抗原結合タンパク質は、それ自体で使用され得て、またはがん患者の治療に典型的に使用されるその他の抗がん剤を使用する治療レジメンに加え得る。

【 0 4 1 6 】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、化学療法剤、非化学療法剤、抗腫瘍剤、および／または放射線、好ましくは化学療法剤など、がん治療に広く使用されている様々な薬剤および治療法と同時に、その前に、またはその後に投与され得る。

【 0 4 1 7 】

本明細書における「診断」は、医学的診断を指し、いずれの疾患または病状が人の症状および徴候を説明するかを判定することを指す。

【 0 4 1 8 】

抗原結合タンパク質またはその医薬組成物の「治療有効量」とは、任意の医学的治療に適用可能な合理的な利益／リスク比で、前記増殖性疾患を治療するのに十分な量の抗原結合タンパク質を意味する。しかし、本発明の抗原結合タンパク質、核酸またはベクター、宿主細胞または医薬組成物の毎日または毎月の総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることが理解されるであろう。任意の特定の患者に対する特定の治療有効量レベルは、治療される障害または疾患、および障害の重症度；使用される特定の抗原結合タンパク質の活性；用いられる特定の組成物、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食生活；投与時間、投与経路、および用いられる特定のポリペプチドの排泄速度；治療持続期間；用いられる特定のポリペプチドと組み合わせてまたは同時に使用される薬物；および医学分野で周知の同様の要因をはじめとする様々な要因に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルで化合物の投与を開始し、所望の効果が達成されるまで用量を徐々に増加させることは、当業者の技術の範囲内で周知である。

【 0 4 1 9 】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質による治療の有効性は、例えば、がんのマウスモデルにおいて、生体内で、例えば、治療群と対照群との間の腫瘍体積の変化を測定することによってアッセイされる。

【 0 4 2 0 】

例えば、本発明の医薬組成物、ベクター、核酸、および細胞は、例えば、実質的に純粋な形態で提供されてもよく、その中では、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % または 1 0 0 重量 % の同じタイプの抗原結合タンパク質が存在する。

【 0 4 2 1 】

本発明の抗原結合タンパク質、本発明の核酸または本発明のベクター、本発明の宿主細胞または本発明の医薬組成物は、任意の実行可能な方法によって投与され得る。

【 0 4 2 2 】

本明細書で開示されるように、いくつかの実施形態では、宿主細胞、好ましくは T リンパ球または T リンパ球前駆細胞などのリンパ球、例えば C D 4 または C D 8 陽性 T 細胞、最も好ましくは T 細胞が、本明細書に記載の医学的使用または治療方法で使用される。

【 0 4 2 3 】

したがって、本発明の宿主細胞、好ましくは T 細胞は、治療用組成物の活性成分として使用されてもよい。したがって、本発明はまた、患者において標的細胞を滅殺する方法を提供し、方法は、上記で定義される有効数の宿主細胞、好ましくは T 細胞を患者に投与することを含んでなる。この方法の文脈において、宿主細胞は、ひとたび対象に投与されると、好ましくは免疫応答を惹起する。

【 0 4 2 4 】

10

20

30

40

50

宿主細胞または細胞の集団が対象に投与される本発明の方法の目的のために、宿主細胞は、（別の対象からの）同種異系であるか、または対象に対して自系である細胞であり得る。好ましくは、細胞は対象にとって自系である。

【0425】

宿主細胞が同種異系であり、したがって別の対象からのものである場合、前記別の対象は健康である。

【0426】

いくつかの実施形態では、T細胞は、その内容全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第20190175650号明細書、米国特許出願第16/271,393号明細書、および米国特許出願第16/361,043号明細書に記載される方法に従って製造されてもよい。

10

【0427】

「健康」とは、対象が概して健康良好であり、好ましくは有能な免疫系を有して、より好ましくは容易に検査され検出され得るいかなる疾患にも罹患していないことを意味する。

【0428】

特定の例では、宿主細胞はT細胞である。したがって、本発明の文脈において、本明細書で上に定義されるT細胞が薬剤として使用される場合、通常、T細胞は、アフェレーシスによって対象から採取される。次に、T細胞は、それらの細胞表面上に本発明の抗原結合タンパク質を発現するように遺伝子操作され、次に、遺伝子操作されたT細胞は増殖され、次に、対象に再注入される。この例では、抗原結合タンパク質は好ましくはTCRである。

20

【0429】

別のアプローチでは、宿主細胞は、間葉系幹細胞などの幹細胞であってもよく、本発明の抗原結合タンパク質を発現するように操作される。この例では、抗原結合タンパク質は、抗体、scTCRなどの可溶性タンパク質、または本明細書で定義される可溶性抗原結合タンパク質、より好ましくは、本明細書に記載のTCER（商標）などの二重特異性可溶性抗原結合タンパク質である。

【0430】

したがって、宿主細胞は、本明細書で上に「核酸、ベクター、および組換え宿主細胞」の項に記載されるように、本発明による核酸および／またはベクターで形質転換、形質導入、または形質移入されている。

30

【0431】

本発明の抗原結合タンパク質を発現するために宿主細胞が形質転換、形質導入または形質移入される場合、好ましくは、細胞は、抗原結合タンパク質を発現できる発現ベクターを含んでなる。宿主細胞が本発明の抗原結合タンパク質を発現すると、宿主細胞は、活性化宿主細胞と称されてもよい。

【0432】

T細胞のこのいわゆる養子免疫伝達のためのプロトコルは、当該技術分野で周知である。概説は、Gattion et al. and Morgan et al. (Gattionni, L. et al., Nat. Rev. Immunol. 6 (2006) : 383-393; Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006) : 126-129)にある。

40

【0433】

生体外でT細胞を生成するために、いくつかの方法が使用されてもよい。例えば、自己由来腫瘍浸潤性リンパ球が、CTLを生成するために使用され得る。Plebanski et al. (Plebanski, M. et al., Eur. J. Immunol. 25 (1995) : 1783-1787)は、T細胞の調製において自系末梢血リンパ球(PLB)を利用した。B細胞もまた、自己由来T細胞の生成において使用され得る。

【0434】

T細胞の調製では、同種異系細胞もまた使用されてもよく、方法は、参照によって本明

50

細書に援用される、米国特許第 6 8 0 5 8 6 1 号明細書で詳細に記載されている。

一態様では、T C R 惹起免疫応答またはT細胞応答は、生体外または生体内で、M A G - 0 0 3 / M H C 複合体への結合によって誘導されるエフェクター機能の増殖および活性化を指してもよい。例えば、M H C クラス I 拘束性細胞傷害性 T 細胞では、エフェクター機能は、ペプチドパルスされた、ペプチド前駆体パルスされた、または天然にペプチドを提示する、標的細胞の溶解；好ましくはペプチドによって誘導されるインターフェロン - 、T N F - 、またはI L - 2 であるサイトカインの分泌；例えば、ペプチドによって誘導されるグランザイムまたはパーカリンであるエフェクター分子の分泌；または脱顆粒であってもよい。

【 0 4 3 5 】

本明細書で上に記載されるように、M A G - 0 0 3 / M H C 複合体に特異的に結合する本発明の抗原結合タンパク質を発現する T 細胞などの宿主細胞は、治療において有用である。したがって、本発明のさらなる態様は、前述の本発明の方法によって入手可能な活性化宿主細胞を提供する。

【 0 4 3 6 】

上記方法によって生成される活性化宿主細胞は、標的細胞を選択的に認識してもよい。

【 0 4 3 7 】

本明細書の「標的細胞」は、上記の提示細胞本明細書で上に「抗原結合タンパク質」の項で定義されるM A G E - A / M H C 提示細胞を指す。

【 0 4 3 8 】

一実施形態では、標的細胞好ましくはがん細胞であり、その中では、がんは本明細書で上に定義される。

【 0 4 3 9 】

生体内で、本発明によるC D 8 陽性 T 細胞の標的細胞は、(時にM H C クラス I I を発現する)腫瘍細胞であり得て、および / または腫瘍(腫瘍細胞)周囲の間質細胞であり得る(時にM H C クラス I I もまた発現する；(D e n g j e l , J . e t a l . , C l i n C a n c e r R e s 1 2 (2 0 0 6) : 4 1 6 3 - 4 1 7 0)。

【 0 4 4 0 】

キット

最後に、本発明はまた、本発明の少なくとも 1 つの抗原結合タンパク質を含んでなるキットを提供する。

【 0 4 4 1 】

一実施形態では、キットは、

- a) 本明細書で上に「抗原結合タンパク質」の項で定義される 少なくとも 1 つの本発明の抗原結合タンパク質；
- b) 任意選択的に包装材料、および
- c) 任意選択的に、がんを治療するのに、またはがんの治療で使用するのに、前記抗原結合タンパク質が有効であることを示す、前記包装材料内に含まれるラベルまたは包装挿入物を含んでなる。

【 0 4 4 2 】

関連する実施形態では、本発明の少なくとも 1 つの抗原結合タンパク質は、単一および / または複数チャンバーのプレフィルドシリンジ(例えば、液体シリンジおよび溶解シリンジ)に含有されている。

【 0 4 4 3 】

一実施形態では、本発明は、単回投与投与ユニットを製造するためのキットを包含する。

【 0 4 4 4 】

したがって、一実施形態では、本発明のキットの a) で言及される本発明の少なくとも 1 つの抗原結合タンパク質は、第 1 の容器に含有される本発明の乾燥抗原結合タンパク質である。次に、キットは、水性製剤を有する第 2 の容器をさらに含む。

【 0 4 4 5 】

10

20

30

40

50

したがって、キットは、

- a) 本明細書で上に「抗原結合タンパク質」の項で定義される本発明の少なくとも 1 つの乾燥抗原結合タンパク質を含んでなる第 1 の容器、
- b) 水性製剤を含んでなる第 2 の容器；
- c) 任意選択的に包装材料、および
- d) 任意選択的に、がんを治療するのに、またはがんの治療で使用するのに、前記抗原結合タンパク質が有効であることを示す、前記包装材料内に含まれるラベルまたは包装挿入物を含んでなる。

【 0 4 4 6 】

水性製剤は、典型的には、本明細書で上に「医薬組成物」の項で定義される、薬理的に許容可能な担体を含んでなる水溶液である。 10

【 0 4 4 7 】

関連する実施形態では、「第 1 の容器」および「第 2 の」容器は、複数チャンバーのプレフィルドシリンジ（例えば、溶解シリンジ）のチャンバーを指す。

【 0 4 4 8 】

がんは、本発明の文脈において本明細書で上に定義される。

【 0 4 4 9 】

本出願を通して、「および／または」という用語は、それが接続する 1 つまたは複数の状況が発生してもよいことを包含すると解釈されるべき文法的接続詞である。例えば、「このような天然配列タンパク質は、標準的な組換えおよび／または合成方法を使用して調製され得る」という表現は、天然配列タンパク質が、標準的な組換え法と合成法とを使用して調製され得ること、天然配列タンパク質が、標準組換え法を使用して調製され得ること、または天然配列タンパクが、質合成法を使用してが調製され得ることを示す。 20

【 0 4 5 0 】

さらに、本出願を通して、「含んでなる」という用語は、具体的に言及された全ての機能、ならびに任意選択的で、追加的な、特定されていない機能を包含すると解釈されるべきである。本明細書で使用される場合、「含んでなる」という用語の使用はまた、具体的に言及された特徴以外の特徴が存在しない（すなわち、「からなる」）実施形態も開示する。

【 0 4 5 1 】

さらに、不定冠詞「 a 」または「 a n 」は、複数を除外しない。特定の措置が相互に異なる從属請求項に記載されているという単なる事実は、これらの措置の組み合わせを有利に使用できることを示すものではない。 30

【 0 4 5 2 】

次に、以下の図および実施例を参照して、本発明をより詳細に説明する。本明細書で引用される全ての資料および特許文献は、それらの内容全体が本明細書に参照により援用される。本発明を図示し、前述の説明で詳細に説明してきたが、実施例は例示的または模範的なものであり、制限的なものではないと見なされるべきである。

【 0 4 5 3 】

配列の説明 40

【表 3】

SEQ ID NO:	Name	Amino Acid Sequence
1	MAG-003	KVLEHVVRV
2	R7P1D5 TCR alpha chain – full length	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLLTLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKII FGSGTRGLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSVDVYTDTKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKVAGFNLLMTRLWSS
3	R7P1D5 TCR alpha leader peptide	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR
4	R7P1D5 alpha variable domain	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEP GAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTLLNKKDKHLSLRIADT QTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRGLSIRP
5	R7P1D5 CDRA1	DSSSTY
6	R7P1D5 CDRA2	IFSNMDM
7	R7P1D5 CDRA3	CAEYSSASKIIF
8	R7P1D5 – alpha constant domain	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSQKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLKVAGFNLLMTRLWSS
9	R7P1D5 TCR beta chain – full length	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVT LRCKPISGHDLFWYRQTMGRGELLIYFNNNVPIDDG MPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANT GELFFGEGSRLTVLEDLKVNFPPEAVFEPSEAEISHTQK ATLVLCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPL EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
10	R7P1D5 TCR beta leader peptide	MGSWTLCCVSLCILVAKHT
11	R7P1D5 beta variable domain	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDLFWYRQTM MRGELLIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVL
12	R7P1D5 CDRb1	SGHDY
13	R7P1D5 CDRb2	FNNNVP
14	R7P1D5 CDRb3	CASRANTGELFF
15	R7P1D5 beta constant domain	EDLKNVFPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPD VELSWWWNGKEVHSGVSTDPLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
16	Aga2p fusion protein with scTv R7P1D5 and tags	MQLLRCFSIHSVIAVLAQELTTICEQIPSPTELSTPYSLST TTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPIN TQYVFGGGGSDYKDDDDKGGGASGEDVEQSLFLSVRE GDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMD MKQDQRLLTLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSS ASKIIFGSGTRGLSIRPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDLFWYR QTMMRGELELIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAKMPNASFS TLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLAAA GGSGGEQKLISEEDL
17	Leader sequence and Aga2p	MQLLRCFSIHSVIAVLAQELTTICEQIPSPTELSTPYSLST TTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPIN TQYVF

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

18	FLAG tag plus linkers	GGGGSDYKDDDDKGGSAS
19	Single chain variable domains of R7P1D5 with linker	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEP GAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLVLLNKKDKHLSLRIADT QTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGGGGGGG SGGGGSGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVT RCKPISGHDYLFWYRQTMRRGLELLIYFNNNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVIDFCASRANTG ELFFGEGRSLTVL
20	Linker and Myc tag	AAAGGSGGEQKLISEEDL
21	CDRa2 mutant 1 (aF57Y)	IYSNMDM
22	scTv R7P1D5S (stabilized)	GEDVEQSLFLSVREGDSAVINCTYTDSSSTLYWYKQEP GAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLVLLNKKDKHLSLRIADT QTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPGGGGGGGGG SGGGGSGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHEVTEMGQEVT RCKPISGHDYLFWYRQTMRRGLELLIYFNNNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVIDFCASRANTG ELFFGEGRSLTVL
23	RABGAP1L-001	FLLETVVRV
24	AXIN1-001	ILDEHVQRV
25	ANO5-001	IVMEHVVFL
26	TPX2-001	KILEDVVGV
27	SYNE3-001	KLLDLQVRV
28	MIA3-001	KVLDFKFRA
29	HERC4-001	KVLEILHRV
30	PSME2-001	KVLERVNAV
31	HEATR5A-001	KVLETLVTV
32	CNOT1-003	KVLGIVVGV
33	TEP1-003	AVEEHVVSV
34	PITPNM3-001	SVLEKVTRA
35	CDRa3 mutant 1	CAEMTSESKIIIF
36	CDRa3 mutant 2	CAEFTESESKIIIF
37	CDRa3 mutant 3	CAEFNSESKIIIF
38	CDRa3 mutant 4	CAEFSSASKIIIF
39	CDRa3 mutant 5	CAEATSESKIIIF
40	R7P1D5_amTSE (R7P1D5 - alpha chain variant 1)	MKTAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLLVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKII IFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWS KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT DTNLNFQNLSVGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
41	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 - alpha chain variant 2)	MKTAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLLVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFTSESKII FGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
42	R7P1D5_afNSE ((R7P1D5 - alpha chain variant 3)	MKTAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQ DQRLLVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFNSESKII FGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

		KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLNVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
43	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 - alpha chain variant 4)	MKTFLAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTIFYFSNMDMKQ DQRLLTVLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEFSSASKII FGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLNVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
44	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 - alpha chain variant 5)	MKTFLAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTIFYFSNMDMKQ DQRLLTVLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEATSESKII FGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLNVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
45	NYESO1-001	SLLMWITQV
46	MAG-003_A1	AVLEHVVVRV
47	MAG-003_A2	KALEHVVVRV
48	MAG-003_A3	KVAEHVVVRV
49	MAG-003_A4	KVLAHVVRV
50	MAG-003_A5	KVLEAVVVRV
51	MAG-003_A6	KVLEHAVRV
52	MAG-003_A7	KVLEHVARV
53	MAG-003_A8	KVLEHVVAV
54	MAG-003_A9	KVLEHVRA
55	CDRa1 mutant 1	ESSSTY
56	CDRa2 mutant 2	IYSSQDQ
57	CDRa2 mutant 3	IYSSQDV
58	75-NU(17)-R7P1D5#1 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLDKST STAYMELSSLRSED TAVYYCARS GYYGDS DWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGT AALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGL YSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTH TS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDS A VINC TYTDSS S TYLYWYKQEPGAGLQLLT IYSSQDQK QDQRLTVLLNK K DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSE SKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIP GH DYLFWYRQ TM RGLELLIYFN NNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLK IQPSEPRDSA V YFCASRANTGELFFGE GS RLT V L
59	CDRa2 mutant 4	IYSSQDS
60	75-NU(17)-R7P1D5#20 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLDKST STAYMELSSLRSED TAVYYCARS GYYGDS DWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGT AALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGL YSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTH TS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDS A VINC TYTDSS S TYLYWYKQEPGAGLQLLT IYSSQDQK QDQRLTVLLNK K DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSE SKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIP GH DYLFWYRQ TM RGLELLIYFC

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

		YGT ^P CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRADTGEFFGEGSRLTVL
61	75-NU(17)-R7P1D5#21 (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGWQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADIQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGRHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFC YGT ^P CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRADTGEFFGEGSRLTVL
62	CDRb1 mutant 1	PGHDY
63	CDRb2 mutant 1	FCYGHP
64	CDRb2 mutant 2	FCYGVP
65	CDRb2 mutant 3	FCYGTP
66	CDRb2 mutant 4	FCYGAP
67	75-NU(17)-R7P1D5#29 (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGWQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADIQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGRHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGEFFGEGSRLTVL
68	75-NU(17)-R7P1D5#30 (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGWQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADIQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGRHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGEFFGEGSRLTVL
69	75-NU(17)-R7P1D5#31 (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGWQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYYIYSSQDSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRADIQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGSGGGGGSGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE

10

20

30

40

50

【表3 - 4】

		VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA YFCASRANTGELFFGEGRSLTVL
70	CDRb2 mutant 5	FCYGMP
71	CDRb3 mutant 1 (bN109D)	CASRADTGEFF
72	CDRa1 consensus - ACT + TCER	X ₁ SSSTY
73	CDRa2 consensus - ACT + TCER	IX ₁ SX ₂ X ₃ DX ₄
74	CDRa2 consensus p1 - TCER	IYSSQDX1
75	75-NU(17)-R7P1D5#32 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGFTGYTMNW QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDATAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSVINVCTYTDSS TYLYWYKQEPGAGPQLLTYIYSSQDQKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAE MTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG DAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTPGRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA YFCASRANTGELFFGEGRSLTVL
76	75-NU(17)-R7P1D5#2 (HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGFTGYTMNW QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDATAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINVCTYTDSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIYSSQDQSKQDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAE MTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG DAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA YFCASRANTGELFFGEGRSLTVL
77	CDRa3 consensus ACT + TCER	CAEX ₁ X ₂ SX ₃ SKIIF
78	CDRb1 consensus - ACT + TCER	X ₁ GHDY
79	CDRb2 consensus - ACT + TCER	FX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ P
80	75-NU(17)-R7P1D5x (common LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAKPLLIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDTLTISSLQ PEDIATYFCQQGQQLPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSYLSSTTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
81	CDRb2 consensus p3 - TCER	FCYGX ₁ P
82	CDRb3 consensus ACT + TCER	CASRAX ₁ TGEFF
83	FR1-a	EDVEQSLFLSVREGDSSVINVCTYT
84	FR2-a	LYWYKQEPGAGLQLLTY
85	FR3-a	KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

86	FR4-a	GSGTRLSIRP
87	FR1-b	DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI
88	FR2-b	LFWYRQTMNRGLELLIY
89	FR3-b	IDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
90	FR4-b	GEGRSLTTL
91	FR1-a (19V)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYT
92	FR2-a (48K)	LYWYKQEPGKGLQLLTY
93	FR2-b (54F)	LFWYRQTMNRGLELLFY
94	FR3-b (66C)	CDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF
95	MUM-001	KLVEYIVKA
96	preferred linker	GGGGGGGG
97	MAGEA4 as accessible under Uniprot accession number P43358	MSSEQKSQHCKPEEGVEAQEEALGLVGAQAPTTEEQEA AVSSSPLVPGTLEEVPAAES GPPQSPQGASALPTTISFTCWRQPNEGSSSQEEGPST SPDAESLFREALSNKVDELAHF LLRKYRAKELVTKAEMLERVIKNYKRCFPVIFGKASESLK MIFGIDVKVEVDPASNNTYTLV TCLGLSYDGLLGNNQIFPKTGLLIILGTIAEGDSASEEEI WEELGVGMGVYDGREHTVY GEPRKLLTQDWVQENYLEYRQVPGSNPARYEFLWGPR LAETSYVKVLEHVVRVNARVRI AYPSLREAALLEEEGV
98	MAGEA8 as accessible under Uniprot accession number P43361	MLLGQKSQRYKAEGLQAQGEAPGLMDVQIPTAEEQKA ASSSSTLIMGTLEEVTDGSFPS PPQSPEGASSSLTVTDSTLWSQSDEGSSNNEEGPSTS PDPAHLESLFREALDEKVAELV RFLLRKYQIKEPVTKAEMLESVIKNYKNHFPDIFSKASECM QVIFGIDVKVEVDPAGHSYI LVTCLGLSYDGLLGDDQSTPKTGLLIILGMILMEGSRAPE EAIWEALSVMLGKYDGREHS VYWKLRKLLTQEWWQENYLEYRQAPGSVPVYEFWLGP RALAETSYVKVLEHVVRVNARV RISYPSLHEEALGEEKGV
99	Linker	TVAAP
100	Linker	GGGS
101	Linker	GGGGS
102	Linker	TVLRT
103	Linker	TVSSAS
104	Linker	GGGGGGGGGS
105	Linker	GGGGSAAA
106	Linker	GGGGGGGGGGGGGGGG
107	Linker	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
108	Linker	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
109	Linker	TVLSSAS
110	Linker	GGGGGGGGGGGGGGGGGG
111	native Fc amino acid sequence of IGHG1*01	EPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKDKTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	Fc with knob mutation [S354C and T366W]	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDKTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREE QYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

		KTISKAKGQPREPQVTLLPCRDELTQNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
113	Fc with hole mutation [(Y349C, T366S, L368A and Y407V +	EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREE QYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVTLLPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
114	IgG1-hinge	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
115	IgG2-hinge	ERKCCVECPCCPAPPVAGP
116	IgG3-hinge	ELKTPPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEP LLG
117	IgG4-hinge	ESKYGPPCPSCPAPEFLG
118	R7P1D5_aMTSE (R7P1D5 - alpha variable domain var. 1)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNSMDMKQDQRRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
119	R7P1D5_aFTSE (R7P1D5 - alpha variable domain var. 2)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNSMDMKQDQRRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFTESESKIIFGSGTRLSIRP
120	R7P1D5_aFNSE (R7P1D5 - alpha variable domain var. 3)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNSMDMKQDQRRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFNSESESKIIFGSGTRLSIRP
121	R7P1D5_aFSSA (R7P1D5 - alpha variable domain var. 4)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNSMDMKQDQRRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEFSSASKIIFGSGTRLSIRP
122	R7P1D5_aATSE (R7P1D5 - alpha variable domain var. 5)	EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQEPG AGLQLLTYIFSNSMDMKQDQRRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQ TGDSAIYFCAEATSESKIIFGSGTRLSIRP
123	75-NU (V9) light chain for CR7P1D5S- common LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYTSRLESQVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSLQ PEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNPFREAKVQWVNDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSNLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGECE
124	75-NU(V9)-CR7P1D5S (HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSGTGYTMNWWR QAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN TAYLQMSNLRRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGG GTLTVVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSSTY LYWYKQEPGAGLQLLTYYIYSNMDMKQDQRRLTVLLNKKDK HLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EMGQEVTLRCKPISGHDLFWYRQTMMRGLELLYFNNNN VPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYF CASRANTGELFFGEQGSRLTVL
125	75-NU(Var17)- CR7P1D5#19 (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKSCKASGYSGTGYTMNWWR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGG GTLTVVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSSTY LYWYKQEPGAGLQLLTYYIYSSQDSKQDQRRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG VTEMGQEVTLRCKPIP GHDLFWYRQTMMRGLELLFYFC

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

		YGTPCDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGRSLTTL
126	75-NU(Var17)-CR7P1D5I (HC)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDATAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEPVTVSWSNGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSV/T VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTS PPSPAPPVAGGEDVEQSLFLSVREGDSAVINCYTDSSS TYLYWYKQEPGAGLQLLTYYIYSSQDSKQDQRLLT VLLNKK DKHLSLRADIADTQTGDSAIYFCAE MTSES KIIFGSGTRLSIRP GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDAGVIQSPRHE VTEMGQEVTLRCKPIPGHDYLFWYRQTM MRG LLELLIYFC YGT PCD DSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGRSLTTL
127	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-iso0- dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCYTDSSSTLYWYKQEPG KGLQLLTYIYSSQDSKQDQRLLT VLLNKKDKHLSLRADIADTQ TGDSAIYFCAE MTSES KIIFGSGTRLSIRP GGGGGGGDI QMTQSPSSL SASVGDRVTT CRAS QD IRNLYLNWYQQKPG KAPKLLI YYT SRLH SGVPSR FSGSGSGT DY TLISS LQPE DIAT YFC QQG QTL PWTF GQGT KVEIKEPKSSDKTHTCPP CP APPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DV SHE DPEV KFNWYV DG VEV HNAK TKPREEQY QSTY RVV SVLT VLHQ DWL NGKEY KCKV SNS KAL PASIEKTISKAK GQ PREP QVYTLPPCRDELT K NQV SLC AV KGF YPSDIA VEWE SNG Q PENNY KTT PPV LD SDGS FF L YSKL TV DK SRW QQGN VF SCS VMHE ALHN HYT QKSL SLSP
128	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#112-dsFcKO- GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDATAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLTVSSGGGGGGGGDAGV IQSPRHE VTEM GQE VT LR CKPIPGHDYLFWYRQTM MRG L ELLFYFCYGT P CDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTG ELFFGEGRSLTVLEPKSSDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLF PPPKD TLMISRTPEVTCVV DV SHEDPEV KFNWYV DG EV HNAK TKPREEQY QSTY RVV SVLT VLHQ DWL NGKEY K CKV SNK AL PASIEKTISKAK GQ PREP QVCTL PPSR DELTK NQV SLC AV KGF YPSDIA VEWE SNG QPEN NY KTT PPV LD SDGS FF L VS KL TV DK SRW QQGN VF SC S VMHE ALHN HYT QKSL SLSP
129	ZFC-001	KLOEQIHRV
130	100(A)-NU(V17)- R7P1D5#114-dsFcKO- GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDATAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLTVSSGGGGGGDAGV IQSPRHE VTEM GQE VT LR CKPIPGHDYLFWYRQTM MRG L ELLFYFCYGT P CDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTG ELFFGEGRSLTVLEPKSSDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLF PPPKD TLMISRTPEVTCVV DV SHEDPEV KFNWYV DG EV HNAK TKPREEQY QSTY RVV SVLT VLHQ DWL NGKEY K CKV SNK AL PASIEKTISKAK GQ PREP QVCTL PPSR DELTK NQV SLC AV KGF YPSDIA VEWE SNG QPEN NY KTT PPV LD SDGS FF L VS KL TV DK SRW QQGN VF SC S VMHE ALHN HYT QKSL SLSP

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

131	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso1-dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEKGQLLLTYIYSSQDKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCACMTSESKEIFGSGTRLSIRPGGGSGGGDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLWPWTFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
132	1G4 alpha chain	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGRTSILVHPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFPPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
133	100(A)-NU(V17)-R7P1D5#114-iso2-dsFcKO-GK (alpha-VL)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTYLWYKQEKGQLLLTYIYSSQDKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCACMTSESKEIFGSGTRLSIRPGGGSGGGDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDTLTISSLQPEDIATYFCQQGQTLWPWTFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
134	1G4 beta chain	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNSRSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGRSLTVLEDLKNVFPPPEVAFFEPSEAEISHTQATLVCLATGFYPDHVVELSWWWNGKEVHSGVSTDQPQLKEQPALNDSRYCLSSRLLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMMVKRKDSRG
135	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-iso0-dsFcKO-GK (alpha-VH)	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTYLWYKQEKGQLLLTYIYSSQDKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCACMTSESKEIFGSGTRLSIRPGGGSGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASKGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLSTDSTA YMELSSLRSEDTAVHYCARGSYDDYEGFVYWGQGTLVTVSSEPKSSDKHTCCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
136	100(D)-NB(V36)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VL-beta)	QIQMTQSPSSLASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGSGGGGDA GVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIPQHDLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTCPDCDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRADTGELFFGEGRSLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK

10

20

30

40

50

【表 3 - 9】

10

20

30

40

50

【表 3 - 10】

151	R7P1D5#114-iso1-Valpha	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTDSSSTLYWYKQPEG KGLQLLTYYSSQDQKQDQRLLTLLNKKDKHLSRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
152	R7P1D5#114-iso2-Valpha	EDVEQSLFLSVREGDSVVINCTYTESSSTLYWYKQPEG KGLQLLTYYSSQDQKQDQRLLTLLNKKDKHLSRIADTQ TGDSAIYFCAEMTSESKIIFGSGTRLSIRP
153	UCHT1(17) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAKPLIYYTSRLLHSGVPSPRSFGSGSGTDYTLTISSLQ PEDIATYFCQQGQQLPWTFGQQGTKEIK
154	UCHT1(17) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYGSFTGYTMNWR QAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYGGDSDWYFDVWGQ GTLTVSS
155	Linker	GGGGSGGGGGSGT
156	UCHT1(23) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYGSFTGYTMNWR QAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYGGDSDWYFDVWGQ GTLTVSS
157	BMA(10) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQQK GKAPKRWYIDTSKLASGVPSRSFGSGSGTDYTLTISSLQ EDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIK
158	BMA(10) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYKFTSYVMHWWR QAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTST STAYMELSSLRSEDTAVHYCARSGYYDYDFVYWGQQT LTVSS
159	BMA(36) VL	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHWYQQK GKAPKRWYIDTSKLASGVPSRSFGSGSGTDYTLTISSLQ EDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIK
160	BMA(36) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYKFTSYVMHWWR QAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTST STAYMELSSLRSEDTAVHYCARSGYYDYEGFVYWGQQT LTVSS
161	Linker	GGGGSGGGGGSGGGGGSGT
162	UCHT1(17opt) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYGSFTGYTMNWR QAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYGGDSDWYFDVWGQ GTLTVSS
163	Linker	GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGT
164	UCHT1(21) VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYGSFTGYTMNWR QAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYGGDSDWYFDVWGQ GTLTVSS
165	Linker	GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGT
166	100(A)-NU(V21)-R7P1D5#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYGSFTGYTMNWR QAPGQGLEWMGLINPQKGVSTYAQKFQDRVTLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYGGDSDWYFDVWGQ GTLTVSSGGGGSGGGDGAVIQSPRHEVTEMQEVTLR CKPIPCHDYLFWYRQTMMRGELLFYFCYGTCPCCDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKQPSEPRDSAVIDFCASRADTG ELFFGEGRSLTVLEPKSSDKHTCPPCPAPPVAGPSVFLF PPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMIHEALHNHYT QKSLSLSP

10

20

30

40

50

【表 3 - 11】

167	100(A)-NU(V17opt)-R7P1D#114-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCAKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGESDWYFDVVGQ GTLVTSSGGGGGGGGDAGVQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPIPGHDYLFWYRQTMMRGLELLFYFCYGTGCPDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRADTG ELFFGEGRSLTVLEPKSSDKTHTCPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVG EVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPASIEKTISAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
168	PRAME-004	SLLQHLIGL
169	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (alpha-VL)	QKEVEQNNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGQSFSFWYRQ YSGKSPLEMISIYQEGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRD SQPDSATLYLCAAVIDNDQGGILTFGTGTRLTIIPNIQNGG GSGGGGDIQMTQSPSSLASASVDRVTITCRASQDIRNLYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDIATYFCQQGQTLWPWTFGQGKTKEIKEPKSS DKTHTCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVVG EVHNAKTKPREEQYQST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
170	100(A)-NU(17)-PRAME-dsFcKO-GK (VH-beta)	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCAKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYAQKFQDRVLTVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVVGQ GTLVTSSGGGGGGKAGVTQTPGQGLQFLFEYVHGEERNKGNF PGRFSGRQFSNSSEMNSNLELGDSALYLCASSPWDSNVQYFCPGTRLTVTEDLKNEPKSSDKTHTCPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
171	INTS4-002	KLLDLMPRL
172	SAMH-001	KLLSYIQRL
173	PPP1CA-006	SIIGRLLEV
174	RPL-007	KIYEGQVEV
175	SETD1A-001	ILLEHNYAL
176	NOMAP-1-0320	ALSNLEVKL
177	NOMAP-1-1223	LLDVPTAAV
178	ODC-001	ILDQKINEV
179	COL6A3-010	KLLPYIVGV
180	FAM115A-001	KLGSVPVT
181	PHTF2-001	KLFGHLTSA
182	RPP1-001	KTLSAILRI

【図面の簡単な説明】

【0454】

図1～18は、本明細書に記載される実施形態を示す。

【図1】酵母表面提示を介して、TCRを安定化されたscTCRに変換した結果を示す。形質転換されたサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)EBY100の表面上に提示されたScTCR分子は、FITC標識抗V8抗体およびPE標識HLA-A*02/MAG-003四量体で染色された。非修飾のscTCR-R7P1D5(左側パネル、配列番号19)と、ランダム変異scTCRライプラリの選択に由来する、2つの安定化単一点変異を保有するscTCR変異型(右側パネル、配列番号22)とが比較される。2つの安定化単一点変異を保有するscTCR変異型は、HLA-A*02/MAG-003四量体染色の増加を示すことが分かる。

【図2】図2A:CDR3のscTCR親和性成熟に関する、酵母表面提示の結果を示す。非修飾および成熟CDR3を含んでなる安定化されたscTCRは、15nMの濃度のHLA-A*02/MAG-003单量体で染色された。MAG-003(配列番号1)との高い配列類似性を有するペプチド(配列番号23～32)を含有する、それぞれ

10

20

30

40

50

10 nMの濃度で適用された10個のHLA-A*02四量体の混合物による対比染色。非修飾鎖CDR3配列CAEYSSASKIIF(配列番号7)を含む安定化されたscTCR(配列番号22)は、親和性成熟鎖CDR3配列CAEFSSASKIIF(配列番号38)、CAEMTSESKIIF(配列番号35)、CAEFTSESKIIF(配列番号36)、CAEFNSESKIIF(配列番号37)、およびCAEATS ESKIIF(配列番号39)を含んでなるscTCR変異型と、それぞれ比較された。CDRの2(配列番号56、57、59)、1(配列番号62)、2(配列番号63、64、65、66、70)が変異している酵母クローンもまた、HLA-A*02/MAG-003に対する特異性が主に維持される一方で、結合性が強く向上していることが分かる。
 図2B: それぞれ、CDR2、CDR3、CDR1、およびCDR2

のscTCR親和性成熟の酵母表面提示の結果を示す。非修飾および成熟CDRを含んでなる安定化scTCRは、HLA-A*02/MAG-003単量体(標的化pHLA単量体)で染色され、MAG-003(配列番号1)と高い配列類似性を有するペプチド(配列番号23~32)を含有する、それぞれ10nMの濃度で適用された10個のHLA-A*02テトラマーの混合物で対比染色された。(a) それぞれ40nMのHLA-A*02/MAG-003単量体で染色された、非修飾(配列番号6)、および成熟鎖CDR2配列IYSQDQ(配列番号56)、IYSQDV(配列番号57)、およびIYSQDS(配列番号59)を含む、scTCR変異型の比較。(b) それぞれ15nMのHLA-A*02/MAG-003単量体で染色された、非修飾(配列番号7)、および成熟鎖CDR3配列CAEFSSASKIIF(配列番号38)、CAEMTSESKIIF(配列番号35)、CAEFTSESKIIF(配列番号36)、CAEFNSESKIIF(配列番号37)およびCAEATSESKIIF(配列番号39)を含むscTCR変異型の比較。(c) それぞれ40nMのHLA-A*02/MAG-003単量体で染色された、非修飾(配列番号12)、および成熟鎖CDR1配列PGHDY(配列番号62)を含む、scTCR変異型の比較。(d) それぞれ5nMのHLA-A*02/MAG-003単量体で染色された、非修飾(配列番号13)、および成熟鎖CDR2配列FCYGH(配列番号63)、FCYGV(配列番号64)、FCYGTP(配列番号65)、FCYGA(配列番号66)、FCYGM(配列番号70)を含む、scTCR変異型の比較。HLA-A*02/MAG-003四量体による染色は、親TCR R7P1D5と比較した場合、全てのR7P1D5 CDRα3変異体で有意に増加し、変異体変種のペプチド-HLA結合が改善されたことを示す。

【図3】PE標識HLA-A*02/MAG-003四量体およびFITC標識抗V8抗体による、ヒトCD8+T細胞を発現する成熟R7P1D5 TCR変異型の染色を示す。対照の目的で、TCR(MOCK)またはNYESO1-001に特異的な1G4 TCRを発現させず、PEで標識したHLA-A*02/NYESO1-0014量体を用いて染色した。

【図4】MAG-003に応答してヒトCD8+T細胞を発現する、成熟R7P1D5 TCR変異型のIFN- γ 放出を示す。対照の目的で、TCR(MOCK)またはNYESO1-001に特異的な1G4 TCRを発現させなかった。IFN- γ 放出は、電気穿孔されたCD8+T細胞と、MAG-003の連続希釈液が負荷されたT2細胞との共培養後に、ELISAによって判定された。(それぞれ負荷されたT2細胞との共培養時に、模擬電気穿孔されたCD8+T細胞によって放出された) IFN- γ のベースラインレベルが差し引かれた。親TCR R7P1D5と比較して、成熟R7P1D5 CDRα3変異体1~5は、MAG-003に応答してIFN- γ 放出の増加を示した。

【図5】MAG-003および異なる類似ペプチドに応答してヒトCD8+T細胞を発現する、成熟R7P1D5 TCR変異型のIFN- γ 放出を示す。対照の目的で、TCR(MOCK)またはNYESO1-001に特異的な1G4 TCRを発現させなかった。IFN- γ 放出は、電気穿孔されCD8+T細胞と、10 μ Mのペプチドが負荷されたT2細胞との共培養後に、ELISAによって判定された。(それぞれ負荷されたT2細胞との共培養時に、模擬電気穿孔されたCD8+T細胞によって放出された) IFN-

10

20

30

40

50

のベースラインレベルが差し引かれた。親 T C R R 7 P 1 D 5 と比較して、成熟した R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 1 ~ 5 は、M A G - 0 0 3 に応答して I F N - 放出の増加を示し、試験された類似ペプチドでは I F N - 放出を示さなかった。

【図 6】M A G - 0 0 3 およびそれぞれのアラニン置換ペプチドに応答してヒト C D 8 + T 細胞を発現する、成熟 R 7 P 1 D 5 T C R 変異型の I F N - 放出を示す。対照的目的で、T C R (M O C K) または N Y E S O 1 - 0 0 1 に特異的な 1 G 4 T C R を発現させなかった。I F N - 放出は、電気穿孔され C D 8 + T 細胞と、10 μ M のペプチドが負荷された T 2 細胞との共培養後に、E L I S A によって判定された。（それぞれ負荷された T 2 細胞との共培養時に、模擬電気穿孔された C D 8 + T 細胞によって放出された）I F N - のベースラインレベルが差し引かれた。

【図 7】図 7 A : 異なる親和性成熟 C D R および / またはフレームワーク変異を有する T C R 可変ドメインを含んでなる、可溶性 s c T C R - F a b 抗原結合タンパク質の生産収率および熱ストレス安定性データを示す。 図 7 B : バイオレイヤー干渉法によって測定された、H L A - A * 0 2 との複合体中の M A G - 0 0 3 に対する可溶性 s c T C R - F a b 抗原結合タンパク質 S 、 # 1 、 # 2 、および I の結合曲線を示す。溶液中の H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 単量体の濃度を上げながら各相互作用測定に使用し、単位は n M で示される。 図 7 C : それぞれ H L A - A * 0 2 との複合体中にある、M A G - 0 0 3 、および正常組織由来のオフターゲットペプチド S Y N E 3 - 0 0 1 、T P X 2 - 0 0 1 、P S M E 2 - 0 0 1 に対する、可溶性 s c T C R - F a b 抗原結合タンパク質 I (灰色の曲線) および # 1 9 (黒色の曲線) の結合曲線を示す。測定にはバイオレイヤー干渉法が用いられ、溶液中の s c T C R - F a b の濃度は 1 μ M とした。

【図 8】図 8 A : ヒト化 T 細胞動員抗型 B M A 0 3 1 (3 6) の異なる V H / V L 配列、ならびにヒト化 T 細胞動員抗体 U C H T 1 の異なる変異型 1 7 、 1 7 o p t 、 2 1 、 2 3 と組み合わされた、選択された親和性成熟 C D R を有する T C R 可変ドメインを含んでなる、可溶性 T C E R (商標) 抗原結合タンパク質の生産収率および熱ストレス安定性データを示す。 図 8 B : H L A - A * 0 2 との複合体中の M A G - 0 0 3 の U C H T 1 (1 7) および B M A 0 3 1 (3 6) と組み合わされた、T C R 可変ドメイン変異型 1 1 4 - i s o 0 、 1 1 4 - i s o 1 、および 1 1 4 - i s o 2 を含んでなる T C E R (商標) 抗原結合タンパク質の結合曲線を示す。測定にはバイオレイヤー干渉法が用いられ、溶液中の T C E R (商標) 分子の濃度を上げながら適用し、単位は n M で示される。 図 8 C : それぞれジスルフィド安定化 H L A - A * 0 2 との複合体中にある、M A G - 0 0 3 および正常組織由来のオフターゲットペプチド N O M A P - 1 - 0 3 2 0 、 N O M A P - 1 - 1 2 2 3 、 O D C - 0 0 1 に対する、 1 1 4 - i s o 1 - B M A (3 6) および 1 1 4 - i s o 2 - U C H T 1 (1 7) T C E R (商標) 分子の結合曲線を示す。測定にはバイオレイヤー干渉法が用いられ、溶液中の T C E R (商標) の濃度は 1 μ M とした。

【図 9】検出可能な M A G - 0 0 3 発現があった (H s 6 9 5 T および A 3 7 5) および検出可能な M A G - 0 0 3 発現がなかった (B V 1 7 3) 、 H L A - A * 0 2 陽性腫瘍細胞株の T C E R (商標) 媒介殺滅の生体外効率データを示す。T C R 変異型 # 1 1 4 - i s o 0 (配列番号 1 2 7 および 1 3 0) 、 # 1 1 4 - i s o 1 (配列番号 1 3 1 および 1 3 0) 、および # 1 1 4 - i s o 2 (配列番号 1 3 3 および 1 3 0) の可変ドメインを有する、U C H T 1 (1 7) 抗体可変ドメインを含んでなる、T C E R (商標) 分子が試験された（上部パネル）。さらに、T C R 変異型 # 1 1 4 - i s o 0 (配列番号 1 3 5 および 1 3 6) および # 1 1 4 - i s o 2 (配列番号 1 3 9 および 1 3 6) の可変ドメインを有する、B M A 0 3 1 (3 6) 抗体可変ドメインを含んでなる、T C E R (商標) 分子が試験された（下部パネル）。腫瘍細胞と、健康な H L A - A * 0 2 + ドナー (H B C - 7 2 0) のヒト P B M C とを 1 : 1 0 の比率で同時インキュベートし、T C E R (商標) 分子の濃度を上げながら細胞傷害活性を L D H - 放出アッセイで分析した。4 8 時間後、C y t o T o x 9 6 N o n - R a d i o a c t i v e C y t o t o x i c i t y A s s a y キット (P R O M E G A) を使用して、標的細胞株の溶解を測定した。 U C H T 1 (1 7) および B M A 0 3 1 (3 6) 抗体を含んでなる T C E R (商標) 分子の効率的な

10

20

30

40

50

細胞溶解が示される。

【図10】検出可能なMAG-003発現を伴うHLA-A^{*}02陽性腫瘍細胞株(Hs 695T、A375、およびU2OS)のTCER(商標)を介した生体外での滅殺を示す。TCR変異型#114-iso1(配列番号131および130)および#114-iso2(配列番号133および130)の可変ドメインを有する、UCHT1(17)抗体可変ドメインを含んでなる、TCER(商標)分子、ならびにTCR変異型#114-iso1(配列番号137および136)の可変ドメインを有するBMA031(36)抗体の可変ドメインを含んでなるTCER(商標)分子が試験された。腫瘍細胞と、健康なHLA-A^{*}02+ドナー(HBC-982)のヒトPBMCとを1:10の比率で同時インキュベートし、TCER(商標)分子の濃度を上げながら細胞傷害活性をLDH-放出アッセイで分析した。48時間後、Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assayキット(PROMEGA)を使用して、腫瘍細胞株の溶解を測定した。UCHT1(17)およびBMA031(36)抗体を含んでなるTCER(商標)分子の効率的な腫瘍細胞溶解が示される。

【図11】MAG-003(配列番号1)およびPRAME-004(配列番号168)の検出可能な提示を有する、HLA-A^{*}02陽性腫瘍細胞株であるHs 695T細胞の腫瘍異種移植片に対する、ヒトPBMCを移植した免疫不全NOGマウスにおける。TCER(商標)媒介生体内の有効性を示す。TCR変異型#114-iso0(配列番号127および130、グループ3)の可変ドメインを有する、UCHT1(17)抗体可変ドメインを含んでなるTCER(商標)が、TCR変異型#114-iso0(配列番号135および136、グループ4)の可変ドメインを有する、BMA031(36)抗体可変ドメインを含んでなるTCER(商標)と比較された。対照として、PRAME-004を標的化するTCER(配列番号169および170、グループ2)が使用された。グループ1はビヒクル処置対照群に相当し、その中では11日目に腫瘍潰瘍のために1匹の動物が殺処分された。線で結ばれた各記号は個々の動物をに相当し、治療日は矢印で示される。T細胞動員のためのUCHT1(17)抗体とBMA031(36)抗体とを含んでなるTCER(商標)について、完全寛解が示される。

【図12】TCER(商標)分子114-iso1-BMA(36)(配列番号137および136)の生体外安全性データが、異なる臓器からの11のヒトHLA-A^{*}02陽性正常組織初代細胞を用いたLDH殺滅実験で評価される。異なる細胞は、TCER(商標)濃度を上げながら、健康なHLA-A^{*}02+ドナーからのPBMCエフェクター細胞と1:10の比率で共培養された。細胞は、初代組織細胞特異的培地とT細胞培地との50%混合物中で同時インキュベートされた。安全域を判定するために、TCER(商標)分子が、MAG-003陽性腫瘍細胞株Hs 695Tと同じ設定で同時インキュベートされた。安全域は、カットオフ値を超える応答を示す最初のTCER(商標)濃度として判定された、最小影響量(LOEL)に基づいて定義された。カットオフは([全ての三連からの標準偏差×3]+TCERなしの対照正常組織サンプル)として定義され、各細胞傷害性プロットに点線で示される。各正常組織細胞タイプについて、LOELに基づいて判定された安全値は1,000倍または10,000倍より大きく、114-iso1-BMA(36)TCER(商標)分子の良好な安全性プロファイルが示唆された。

【図13】MAG-003(配列番号1)の検出可能な提示を有する、HLA-A^{*}02陽性腫瘍細胞株であるHs 695T細胞の腫瘍異種移植片に対する、ヒトPBMCを移植した免疫不全NOGマウスにおける、TCER(商標)媒介生体内の有効性を示す。TCR変異型#114-iso1(配列番号131および167、グループ3)の可変ドメインを有する、UCHT1(17)抗体可変ドメインを含んでなるTCER(商標)が、TCR変異型#114-iso1(配列番号137および136、グループ2)の可変ドメインを有する、BMA031(36)抗体可変ドメインを含んでなるTCER(商標)と比較された。グループ1は、ビヒクル処置された対照群に相当する。グラフは、グループあたり6匹(グループ2および3)から10匹(ビヒクル)のマウスに由来する平均腫瘍体積を示す。UCHT1(17opt)抗体とT細胞を動員するBMA031(36)抗

10

20

30

40

50

体とを含んでなる T C E R (商標) 分子を週1回 0.01 mg / kg 体重で i.v. 投与したところ、完全寛解が示された。

【図14】NOGマウスにおける 114-is o 1 - U C H T 1 (17) T C E R (商標) 分子の薬物動態プロファイルを示す。マウスは、2 mg / kg 体重の単回静脈内注射を受けた。異なる時点での採取されたサンプルの T C E R (商標) の血漿中濃度は、特定のタンパク質ドメインの存在 (F_c-V_L アッセイ) または二重特異的結合活性 (CD3-pMHC アッセイ) のどちらかを検出する E L I S A によって判定された。

【図15】T C E R (商標) 分子の設計が示される。二重特異性 T 細胞結合受容体 (T C E R (商標)) は、親和性成熟 T C R の可変ドメイン (V_c、V_l) と、ヒト化 T 細胞動員抗体の可変ドメイン (V_H、V_L) とを含有する、融合タンパク質である。分子は、エフェクター機能が抑制された F_c 部分を使用し、これは、半減期の延長および安定性 / 製造可能性特性改善もたらす。

【図16】T C E R (商標) 分子 114-is o 1 - B M A (36) (配列番号 137 および 136) の生体外安全性データが、異なる臓器からの 12 のヒト H L A - A * 0 2 陽性正常組織初代細胞を用いた L D H 殺滅実験で評価される。異なる細胞は、T C E R (商標) 濃度を上げながら、健康な H L A - A * 0 2 + ドナーからの P B M C エフェクター細胞と 1 : 10 の比率で共培養された。細胞は、初代組織細胞特異的培地と T 細胞培地との 50 % 混合物中で同時インキュベートされた。安全域を判定するために、T C E R (商標) 分子が、M A G - 0 0 3 陽性腫瘍細胞株 H s 6 9 5 T と同じ設定で同時インキュベートされた。安全域は、カットオフ値を超える応答を示す最初の T C E R (商標) 濃度として判定された、最小影響量 (L O E L) に基づいて定義された。カットオフは ([全ての三連からの標準偏差 × 3] + T C E R なしの対照正常組織サンプル) として定義され、各細胞傷害性プロットに点線で示される。各正常組織細胞タイプについて、L O E L に基づいて判定された安全枠は 1,000 倍または 10,000 倍より大きく、114-is o 1 - B M A (36) T C E R (商標) 分子の良好な安全性プロファイルが示唆された。

【図17】H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 の異なるコピー数を示す腫瘍細胞株に応答した、ヒト C D 8 + T 細胞を発現する成熟 R 7 P 1 D 5 T C R 変異型の細胞傷害性および I F N - 放出を示す。対照の目的で、T C R (M O C K) または N Y E S O 1 - 0 0 1 に特異的な 1 G 4 T C R を発現させなかった。電気穿孔された C D 8 + T 細胞を腫瘍細胞株と共に培養した後、上清中の L D H および I F N - レベルが判定された。

【図18】ペプチド提示について分析された正常組織および腫瘍サンプルは、それらの起源の臓器に従ってグループ化される。上部：技術的反復測定およびアリコート測定からの M S シグナル強度の中央値は、ペプチドが検出された単一の H L A - A * 0 2 陽性正常 (図の左側) および腫瘍サンプル (図の右側) の点としてプロットされる。箱ひげ図は、複数のサンプルにわたる正規化されたシグナル強度を表し、対数空間で定義されている。箱は、中央値、25パーセンタイル値、および 75 パーセンタイル値を示す。ひげは、下位四分位数の 1.5 四分位間範囲 (I Q R) 内にある最低データポイントまで伸び、上位四分位数の 1.5 I Q R 内にある最高データポイントまで伸びる。下部：各臓器中の相対ペプチド検出頻度が、棒グラフとして示される。パネルの下の数字は、各臓器のこの分析について評価されたサンプルの総数のうち、ペプチドが検出されたサンプルの数を示す (N = 581 の正常サンプル、N = 771 の腫瘍サンプル)。ペプチドがサンプル上で検出されたが、技術的理由で定量化され得なかった場合、サンプルは、この検出頻度表示に含まれるが、図の上部に点は示されない。

【0455】

使用された略語：ad i pose : 脂肪組織；ad r e n a l g l : 副腎；bl a d der : 膀胱；bl o o d vess : 血管；es o ph : 食道；g a l l bl : 胆囊；intest . la : 大腸；intest . sm : 小腸；n e r v e cent : 中枢神経；n e r v e periph : 末梢神経；par a th y r : 副甲状腺；per it : 腹膜；pituit : 下垂体；sk e l . mus : 骨格筋；A M L : 急性骨髓性白血病；B R C A : 乳がん；C C C : 胆管細胞がん腫；C L L : 慢性リンパ球性白血病；C R C :

10

20

30

40

50

結腸直腸がん；GBC：胆嚢がん；GBM：神経膠芽腫；GC：胃がん；GEJC：胃食道接合部がん；HCC：肝細胞がん腫；HNSSC：頭頸部扁上皮がん腫；MEL：黒色腫；NHL：非ホジキンリンパ腫；NSCLC_{adeno}：非小細胞肺がん腺がん；NSCLC_{other}：NSCLC_{adeno}またはNSCLC_{squamous}に明確に割り当てることができなかつたNSCLCサンプル；NSCLC_{squamous}：扁平上皮細胞非小細胞肺がん；OC：卵巣がん；OSCAR：食道がん；PACA：膵臓がん；PRCA：前立腺がん；RCC：腎細胞がん腫；SCLC：小細胞肺がん；UBC：膀胱がん腫；UCE：子宮および子宮内膜がん。

【実施例】

【0456】

がん抗原に対する細胞受容体（TCR）は、ウイルス抗原を標的化するTCRと比較した場合に、親和性がより低いことが多く、これは腫瘍の免疫逃避の1つの可能な説明であつてもよい（Aleksic et al. 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec; 42(12): 3174-9）。したがって、養子細胞療法におけるがん抗原標的化コンストラクトとして、または可溶性治療薬、すなわち二重特異性分子の認識モジュールとしての使用のために、より高い親和性を有するTCR変異型を生成することが望ましい（Hickman et al. 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep; 21(8): 769-85）。したがって、本発明は、腫瘍関連ペプチドMAG-003（配列番号1）に対する高い結合力および選択性に基づいて、ヒト天然TCRレパートリーから同定されたT細胞受容体R7P1D5の修飾および最適化に関する。TCR R7P1D5は、国際公開第2017/158103号パンフレットで開示されている、配列番号4のアミノ酸配列を有する可変ドメインと、配列番号11のアミノ酸配列を有する可変ドメインとを含んでなる。

10

【0457】

実施例1：安定したscTCRの生成

本発明では、TCR R7P1D5（配列番号2および9、全長）を、可変（配列番号4）および（配列番号11）ドメインと、適切なグリシン-セリンリンカー配列を使用して、一本鎖TCRコンストラクト（scTCR R7P1D5、配列番号19）に変換した。酵母表面提示を介したTCR成熟のために、対応する配列のDNAを合成し、リーダー配列とAgap酵母交配タンパク質（SEQ ID NO: 19）とを含有する、pCT302ベースの酵母提示ベクター（Boder and Witttrup, Methods Enzymol. 2000; 328: 430-44）と一緒に、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）EBY100に形質転換した（MATaAGA1::GAL1→AGA1::URA3ura3-52trp11eu2-200his3-200pep4::HIS3prbd1.6Rcan1GAL）（ATCC（登録商標）MYA-4941（商標））。酵母中での相同組換え後に得られた融合タンパク質（配列番号16）は、目的のタンパク質の提示に関与するAgapタンパク質のN末端にあるリーダーペプチド（Boder and Witttrup, Nat Biotechnol. 1997 Jun; 15(6): 553-7）、発現制御のためのリンカー配列（配列番号18および20）を含む短鎖ペプチド、および目的のタンパク質、すなわち、scTCR R7P1D5（配列番号19）またはその変異型を含有する。scTCR変異型のライプラリは、scTCR R7P1D5の全遺伝子配列にわたるランダム変異PCRアプローチを介して生成した。国際公開第2018/091396号パンフレットに記載されるように、酵母細胞の形質転換を実施し、ライプラリ-あたり最大10⁹の酵母クローンを得た。HLA-A*02の文脈でMAG-003への結合が改善された変異体scTCR変種を保有する酵母クローンの選択プロセスは、基本的にSmith et al.（Methods Mol Biol. 2015; 1319: 95-141）に記載されるように実施した。酵母表面に提示されたR7P1D5 scTCR変異型の高発現と正しいコンフォメーションを確認するために、HLA-A*02/MAG-003四量体染色と共に、抗V8（Life Technology

20

30

40

50

s、クローン 1 C 1) 抗体による染色を使用した(図 1)。酵母表面提示による s c T C R 変換は、細胞表面上の s c T C R の適切な提示のための 2 つの決定的に重要な安定化変異を明らかにし、1つは s c T C R 鎖のフレームワーク領域 F R 1 - a (配列番号 83)にあり、もう 1 つは 鎖の C D R 2 (配列番号 6)にあり、これにより、安定化バージョン s c T C R R 7 P 1 D 5 S (配列番号 22)が得られ、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 四量体結合の改善がもたらされた。

【 0 4 5 8 】

実施例 2 : 安定化 s c T C R の親和性成熟

H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 に対するより高い結合親和性を有する s c T C R 分子を生成するために、以前に同定された安定化 s c T C R R 7 P 1 D 5 S (配列番号 22)を使用して、全ての C D R を個別に成熟させた。C D R 残基は、本質的に以前記載されたように、縮重DNAオリゴプライマーを使用して無作為化した(Smith et al., Methods Mol Biol. 2015; 1319: 95 - 141)。得られたDNAライブラリーを実施例 1 で説明したように形質転換した。結合特異性を維持するために、M A G - 0 0 3 ペプチド(配列番号 1)と、高度な配列類似性を示す正常組織由来ペプチド(配列番号 23 ~ 32)とを含んでなる、H L A - A * 0 2 四量体の混合物に対する、負の選択を採用した。

【 0 4 5 9 】

親和性が強化された選択的な R 7 P 1 D 5 S s c T C R 変異型を選択するために、各選択ラウンドで、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 四量体または単量体を濃度を下げながら使用した。3回の選択ラウンドの後、単一の s c T C R クローニングが分離および配列決定され、その結果、異なる親和性成熟 C D R 配列が得られた。成熟 C D R a 3 配列(配列番号 35 ~ 39)を有する s c T C R について例示的に示されるように、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 単量体結合の強力な改善を実証できた。M A G - 0 0 3 ペプチド(配列番号 1)との高度な配列類似性を有する正常組織由来ペプチドを含有する、10個の H L A - A * 0 2 四量体の混合物への低い結合によって確認されたように、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 結合の選択性は保持された。C D R a 3 変異体 5 (配列番号 39)は、四量体 H L A - A * 0 2 / 類似ペプチドのわずかに増加した交差結合を示した(図 2A)。さらに、変異した C D R (配列番号 56 、 57 、 59)、 1 (配列番号 62)または 2 (配列番号 63 、 64 、 65 、 66 、 70)を有する酵母クローニングからは、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 の特異性が主に保持されながら、結合が大幅に改善されたことが明らかになった(図 2B)。

【 0 4 6 0 】

実施例 3 : 細胞発現のための成熟 T C R の使用

腫瘍特異的ペプチド M H C を認識する T C R を発現するための T 細胞の修飾は、T 細胞をがん細胞にリダイレクトする有望なストラテジーである。成熟した C D R 3 配列を使用することで、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 に対する細胞結合 T C R の反応性を向上させることができ、同定された C D R a 3 変異体配列(配列番号 35 ~ 39)を親 T C R R 7 P 1 D 5 鎖(配列番号 2)上にグラフトし、親 T C R R 7 P 1 D 5 鎖(配列番号 9)と組み合わせた。得られた変異体 T C R 変種(それぞれ、鎖変異型配列配列番号 40 ~ 44 を含んでなる、R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 1 ~ 5)は、P C R 増幅されたDNAコンストラクトの生体外転写によって生成された、それぞれの m R N A の電気穿孔後に、ヒト C D 8 + T 細胞で発現させた。対照の目的で、H L A - A * 0 2 との複合体中の N Y E S O 1 - 0 0 1 ペプチド(配列番号 45)に対して向けられた、1 G 4 T C R (配列番号 132 および 134)を発現させた。R N A が電気穿孔された C D 8 + T 細胞を一晩インキュベートした後、P E 標識ペプチド - H L A - A * 0 2 四量体および F I T C 標識抗 V 8 抗体で染色することによって、導入された T C R 変異型の発現を分析した。親 T C R R 7 P 1 D 5 およびそれに由来する全ての変異型は模擬電気穿孔サンプルおよび V 8 陰性 N Y E S O 1 T C R 対照からのバックグラウンドレベルと比較して、同様の抗 V 8 染色を示したことから、発現効率が類似していることが示唆された。対照

10

20

30

40

50

的に H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 四量体による染色は、親 T C R R 7 P 1 D 5 (図 3) と比較した場合、全ての R 1 P 5 D 3 C D R a 3 変異体で有意に増加し、変異体変種のペプチド - H L A 結合が改善されたことが示された。M A G - 0 0 3 の希釈系列 (図 4) または M A G - 0 0 3 と潜在的なオフターゲットペプチドの 10 μM のいずれかを負荷した T 2 標的細胞 (20,000 細胞 / ウェル) に対する T 細胞媒介 I F N - 放出を測定することによって、異なる R 7 P 1 D 5 T C R 変異型を発現する C D 8 + T 細胞 (20,000 細胞 / ウェル) の機能的活性化を調べた (図 5)。潜在的なオフターゲットペプチドは、M A G - 0 0 3 との高い配列類似性 (類似性 B L A S T 検索) に基づいて、正常組織に提示された H L A - A * 0 2 結合ペプチドのデータベース (X P R E S I D E N T データベース) から選択した。親 T C R R 7 P 1 D 5 と比較して、成熟 R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 1 ~ 5 は増加した反応性を示し (図 4)、最大半量 I F N - 放出を誘発するのに必要な濃度 (E C 50 値、表 4) が 3 ~ 9 分の 1 であることが示された。
予測されたように、追加的な T C R (M O C K) または N Y E S O 1 - 0 0 1 に特異的な 1 G 4 対照 T C R を発現しない T 細胞では、バックグラウンド I F N - 放出のみが観察された。成熟 R 7 P 1 D 5 T C R 変異型の M A G - 0 0 3 認識の選択性を分析するために、異なる類似ペプチド (配列番号 2 3 ~ 3 4) が負荷された T 2 細胞に応答した I F N - 放出を分析した。データは、それぞれ負荷された T 2 細胞との共培養時に、模擬電気穿孔された C D 8 + T 細胞によって放出された I F N - レベルを差し引くことによって、バックグラウンド I F N - 放出について補正した。R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 5 がいくつかの類似ペプチドに対してわずかにシグナルが増加したことと、R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 2 が M I A 3 - 0 0 1 に対して低いシグナルを示したことを除いて、全てのその他の成熟 R 7 P 1 D 5 T C R 変異型は、試験された類似ペプチドに対して交差反応性を示さず、高度に選択的であった (図 5)。全ての T C R 変異体変種は、親 T C R と比較して大幅に高い M A G - 0 0 3 特異的 I F N - 放出を誘導したことから、R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 4、1、および 3 (および潜在的に 2) は、細胞 T C R ベースの腫瘍標的化の最も有望な候補である。R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 1 ~ 5 は、変異解析によって、結合エピトープに関してさらに特性決定した。1、5、7、および 8 位におけるアラニン置換が応答を抑止することから、R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 1 ~ 4 は、これらの位置におけるストリンジメントな認識を有する広範な結合エピトープを示した。変異体 1 などの一部の R 7 P 1 D 5 変異型では、3 位のアラニン置換についてもわずかな影響が観察された。類似ペプチドで示されるより低い特異性に一致して、R 7 P 1 D 5 C D R a 3 変異体 5 T C R は、変異体変種 1 ~ 4 と比較した場合に、ストリンジエンシーが低下した位置 7 および 8 を認識した (図 6)。C D R a 3 変異体 T C R 変種の機能的活性は、H L A - A * 0 2 / M A G - 0 0 3 の異なるコピー数を提示する腫瘍細胞株上でさらに評価した。RNA 電気穿孔 C D 8 + T 細胞は、3 : 1 のエフェクター対ターゲット比で (N C I - H 1 7 5 5、M C F - 7 : 2 5, 0 0 0 細胞 / ウェル、H s 6 9 5 T、A 3 7 5、U 2 O : 1 2, 5 0 0 細胞 / ウェル)、腫瘍細胞株と共に培養した。C D 8 + T 細胞に導入された T C R 変異型の発現は、上記のように検証した。エフェクター細胞と標的細胞を 24 時間共培養した後、上清中に放出された L D H と I F N - のレベルを定量化した。L D H レベルは、C y t o T o x 9 6 N o n - R a d i o a c t i v e C y t o t o x i c i t y A s s a y キット (P R O M E G A) を使用して測定し、細胞傷害性は、エフェクター細胞とターゲット細胞の自発的な L D H 放出を差し引いた後、完全溶解対照に対する百分率として計算した。全ての C D R a 3 変異体 T C R 変種は、親 T C R と比較して、全ての分析された腫瘍細胞株のより強力な殺滅を誘発した一方で、標的陰性 M C F - 7 細胞では殺滅は観察されなかった。より少ない標的コピー数を提示する腫瘍細胞株 (A 3 7 5、U 2 O S) では、野生型 T C R に対して最小限の細胞傷害性のみが認められた一方で、特に、成熟変異型 1 ~ 4 は実質的な滅殺を誘導でき、これはこれらの変異型が低い標的コピー数の患者集団の治療を可能にすることを示す。細胞傷害性データと一致して、野生型との比較で、成熟 T C R 変異型を発現する T 細胞でも I F N - 放出の増強が観察された。

10

20

30

40

50

【0461】

表4：親R7P1D5およびCDRa3変異型変異1～5の最大半量IFN- γ 放出の濃度[nM]。親TCR R7P1D5は配列番号2および11に基づき、変異型変種TCR 1～5はそれぞれ配列番号40～44、および配列番号11に基づく。

【表4】

Variant	EC ₅₀ [nM]
R7P1D5	9.5
R7P1D5 CDRa3 mutant 4	1.4
R7P1D5 CDRa3 mutant 1	2.1
R7P1D5 CDRa3 mutant 2	1.4
R7P1D5 CDRa3 mutant 3	1.1
R7P1D5 CDRa3 mutant 5	3.7

10

【0462】

実施例4：scTCR変異型の生成、精製、および特性評価

V_HおよびV_LドメインからなるTCRを設計し、一本鎖(scTCR)形態で生成し、ヒト化CD3特異的T細胞誘導抗体UCHT1由来のFab断片と組み合わせて試験した。したがって、HCMV由来のプロモーター要素によって制御される、ヒト化UCHT1抗体(変異型Sでは配列番号123、S以外のその他の変異型では配列番号80)の軽鎖か、またはヒト化UCHT1抗体のV_H-C_H1のC末端に結合したそれぞれのscTCR配列のどちらかを含有するプラスミドを生成した。

20

【0463】

表5：Fab断片との組み合わせで発現されるscTCR変異型を生成するための配列の組み合わせ。形質移入のために、軽鎖配列を含有するプラスミドはそれぞれのFab重鎖配列を含有するプラスミドと混合された。

【表5】

30

Variant	Light Chain (SEQ ID No:)	Heavy chain (SEQ ID No:)
S	123	124
I	80	126
#1	80	58
#2	80	76
#19	80	125
#20	80	60
#21	80	61
#29	80	67
#30	80	68
#31	80	69
#32	80	75

40

【0464】

50

プラスミドDNAを標準的な培養方法に従って大腸菌(*E. coli*)中で増幅し、引き続いて、市販のキット(Macherey & Nagel)を使用して精製した。精製されたプラスミドDNAは、製造業者(Exp i CHO(商標)システム; Thermo Fisher Scientific)の指示に従って、CHO-S細胞の一過性形質移入に使用した。形質移入されたCHO細胞を32～37で10～12日間培養し、Exp i CHO(商標)Feedを1回供給した。

【0465】

調整された細胞上清は、Sartoclear Dynamics(登録商標)Lab Filter Aid(Sartorius)を利用して濾過(0.22μm)によって清澄化した。二重特異性抗原結合タンパク質は、親和性およびサイズ排除クロマトグラフィーをオンラインで実行するように装備された、Akta Pure 25 L FPLCシステム(GE Lifesciences)を使用して精製した。アフィニティーコロマトグラフィーは、標準的なアフィニティーコロマトグラフィープロトコルに従って、プロテインLカラム(GE Lifesciences)上で実施した。Superdex 200 pg 16/600カラム(GE Lifesciences社)を用いて、アフィニティカラムからの酸性溶出(pH 2.8)直後に、サイズ排除クロマトグラフィーを実施して、標準的なプロトコルに従って高純度の単量体タンパク質を得た。タンパク質濃度は、NanoDropシステム(Thermo Scientific)上で、予測されたタンパク質配列に従って計算された吸光係数を用いて判定した。必要に応じて、Vivaspinデバイス(Sartorius)を使用して、濃度を調節した。最後に、精製された分子を2～8の温度で約7.2mg/mLの濃度のリン酸緩衝生理食塩水(DPBS、pH 7.2)中に保存した。各分子の生産性は、[ミリグラムタンパク質精製/リットル細胞上清]として、収率を計算することによって評価した。

【0466】

精製されたscTCR-Fab抗原結合タンパク質の品質は、Vanquish HPLC-System内で、300mMのNaClを含有する50mMのリン酸ナトリウム、pH 6.8で実行される、MabPac SEC-1カラム(5μm、7.8×300mm)上で、HPLC-SECによって判定した。検出器波長は、214nmに設定した。同じ方法を用いて、それぞれの分子の熱ストレスを受けたサンプル(1mg/mLのDPBS中、40で7日間または14日間保存した後)を分析した。誘導された凝集体は、[凝集体%(ストレス後)]-[凝集体%(開始時)]として計算した。単量体回収率は、[単量体ピーク面積(ストレス後)]/[単量体ピーク面積(開始)]×100%として計算した。図7Aに示されるように、異なるscTCR変異型間で、生産収率(左側パネル)と熱ストレス安定性に顕著な違いが観察された。2つのフレームワーク変異(aS19A、aF57Y)と組み合わされた野生型CDR配列を含有する安定化されたscTCR変異型S(配列番号124)は、低レベルでのみ発現された。隣接するフレームワーク変異bI66C(変異型I)と組み合わされた親和性成熟CDRb2配列と一緒に、親和性成熟CDRa2、CDRa3、およびCDRb1配列(変異型#1)および親和性成熟CDRa2、CDRa3、およびCDRb1配列を組み込んだ後に、発現レベルの増加および熱ストレス安定性の増加を達成できた。CDR-成熟scTCR変異型Iおよび#1の双方を使用して、フレームワーク領域のさらなる修飾を試験し、発現収量ヒートストレス安定性を改善した。変異型体#1への3つのフレームワーク変異(aL50P、bM46P、およびbM47G)の組み込みによって、生産収率が向上した変異型#30が生成し、それは、フレームワーク変異aS19AをaS19Vに置き換えることでさらに改善され得た(変異型#32)。aS19AまたはS19V変異の影響は、aS19復帰変異を有する変異型32に相当する変異型29によって強調され、その結果、生産性が大幅に低下し、凝集レベルが上昇する。特に、生産収率に対するaS19の復帰変異の後者の悪影響は、フレームワーク変異aA48Kの導入によって逆転され得た(変異型#31)。CDR成熟scTCR変異型Iの文脈で、追加的なフレームワーク変異bI54F(変異型19)および鎖CDR3(変異型20)のbN109D変異を単独で、また

10

20

30

40

50

は組み合わせて（変異型 21）試験した。CDRb3 の変異 bN109D は、Asn 残基の脱アミド化を起こしやすいNTモチーフをDTモチーフに変換し、これは、CDR配列内の配列の不利益を除去する設計アプローチの観点から、有利であり得た。変異型 I（変異型 #19）に bI54F フレームワーク変異を導入したところ、収量が向上し、scTCR の熱ストレス安定性が向上した。CDRb3 変異 bN109D の変異型 #19への追加的な導入は、さらに大幅に改善された熱ストレス安定性を有する scTCR 変異型 #21 を生成したが、bN109D の変異のみの場合（変異型 #20）は、変異型 I と比較して生産性がわずかに向上し、安定性も同程度であった。

【0467】

scTCR - Fab 抗原結合タンパク質は、バイオレイヤー干渉法を介して、HLA-A*02との複合体中の配列番号1のMAGE-A抗原ペプチドに対する、それらの結合親和性について分析した。製造業者によって推奨される設定を使用して、Octet RED384システムで測定を実施した。簡潔に述べると、緩衝液としてPBS、0.05%ツイーン-20、0.1%BSAを使用し、30°、1000 rpmの振盪速度で結合動態を測定した。ペプチド - HLA - A*02 複合体の連続希釈液を分析する前に、二重特異性分子をバイオセンサー（FAB2G）上に負荷した。安定化されたscTCR 変異型 S（配列番号123および124）を含んでなる二重特異性抗原結合タンパク質は、500 nMの濃度まで非常に弱い結合シグナルのみを示した（図7B、表6）。親和性成熟CDRa2、CDRa3 およびCDRb1配列（変異型 #1 および変異型 #2）を導入することで、標的ペプチド - MHCに対する結合が大幅に改善された。変異型 #1（配列番号80、58）および#2（配列番号80、76）のKD値は2から3 nMであること判定された。成熟CDRb2配列をフレームワーク変異 bI66Cと一緒にscTCR 変異型 #2 にさらに加えることで、結合親和性のさらなる改善がもたらされ、変異型 I のKDの測定値は150 pMとなった（配列番号80、126）。

10

20

【0468】

表6：変異体S（配列番号123、124）、#1、#2、およびI（それぞれ配列番号58、76または126と組み合わされた配列番号80）のフレームワーク変異、CDRの組み合わせ、およびKD値。KD値は、バイオレイヤー干渉法によって測定された。

【表6】

TCR variant	CDRa1	CDRa2	CDRa3	CDRb1	CDRb2	CDRb3	K _D [M]
S aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSNMDM SEQ ID NO 21	CAEYSSASKIIF SEQ ID NO 7	SGHDY SEQ ID NO 12	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	-*
#1 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSSQDQ SEQ ID NO 56	CAEMTSESKIIF SEQ ID NO 35	PGHDY SEQ ID NO 62	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	2.35E-09
#2 aS19A	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSSQDS SEQ ID NO 59	CAEMTSESKIIF SEQ ID NO 35	PGHDY SEQ ID NO 62	FNNNVP SEQ ID NO 13	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	2.69E-09
I aS19A bI66C	DSSSTY SEQ ID NO 5	IYSSQDS SEQ ID NO 59	CAEMTSESKIIF SEQ ID NO 35	PGHDY SEQ ID NO 62	FCYGTP SEQ ID NO 65	CASRANTGELFF SEQ ID NO 14	1.53E-10

30

40

*500 nMに至るまでの関連する結合シグナルなし

【0469】

scTCR - Fab 抗原結合タンパク質は、HLA - A*02との複合体中の潜在的なオフターゲットペプチドへの結合を分析することにより、その特異性に関してさらに特性決

50

定した。類似性BLAST検索によって判定された配列類似性に基づいて、正常組織に提示されたHLA-A^{*}02結合ペプチドのデータベース(XPRESIDENTデータベース)から、潜在的なオフターゲットペプチドを選択した。結合は、本質的に上記のように、バイオレイヤー干渉法を介して分析した。全ての相互作用の結合シグナルは、ペプチド-HLA-A^{*}02複合体を負荷するためのHIS1Kバイオセンサー使用して、1 μMの二重特異性scTCR-Fabの濃度で判定した。潜在的なオフターゲットペプチドは、結合期終了時の結合応答に関して分析した。scTCR変異型I(配列番号80、126)と比較して、追加的なフレームワーク変異bI54Fを含んでなる変異型#19(配列番号80、125)は、上に示す改善された生産収率と安定性に加えて、改善された結合特異性を示した(図7C、表7)。MAG-003(配列番号1)に対する結合曲線はどちらの変異型も類似していた(図7C)一方で、変異型#19は、結合シグナルの欠如によって示されるように、オフターゲットペプチドSYNE3-001(配列番号27)、TPX2-001(配列番号26)、およびPSME2-001(配列番号30)に対する結合の抑止を示した(表7)。

【0470】

表7: scTCR変異型I(配列番号80、126)および変異型19(配列番号80、125)を有するscTCR-Fab抗原結合タンパク質の特異性。1 & micro;M二重特異性の結合動態は、バイオレイヤー干渉法を介して測定された。結合期の終了時の応答(MAG-003信号のnmまたは%として)が示される。

【表7】

	I	#19		
Loading Sample ID	Response	Response (% of MAG-003)	Response	Response (% of MAG-003)
MAG-003	0.738	100.0	0.719	100.0
SYNE3-001	0.226	30.6	-0.006	-0.9
TPX2-001	0.136	18.4	-0.003	-0.3
PSME2-001	0.074	10.0	-0.010	-1.4

【0471】

実施例5:二重特異性TCER(商標)分子の生成、精製、および特性評価

図15は、本開示の一実施形態による二重特異性TCER(商標)分子を示す。二重特異性T細胞結合受容体(TCER(商標))は、親和性成熟TCRの可変ドメイン(V、V')と、ヒト化T細胞動員抗体の可変ドメイン(VH、VL)とを含有する、融合タンパク質である。分子は、エフェクター機能が抑制されたFc部分を使用し、これにより、延長された半減期、改善された安定性/製造可能性の特性がもたらされる。

【0472】

二重特異性TCER(商標)分子は、実施例4に記載されるように、好みのCDRおよびフレームワーク変異を有する、選択されたTCRおよび鎖可変ドメインに基づいて設計した。scTCR変異型#21のそれぞれのTCR可変ドメインは、有益なフレームワーク変異aS19VおよびaA48Kと組み合わされ、TCR変異型#114-is00(配列番号138および配列番号150)がもたらされた。CR#114-is00の可変ドメイン配列をさらに最適化するために、CDRa1(aD27E)とCDRa2(aS65Q)にある2つの潜在的な異性化部位(DS-モチーフ)をそれぞれ置換し、CDR内に1つまたは皆無の翻訳後修飾コンセンサス配列を有する、TCR変異型#114-is01(配列番号151および配列番号150)および#114-is02(配列番号152および配列番号150)をもたらした。上述のTCR変異型#114-is00、#114-is01、および#114-is02の可変ドメインは、2つの新たにヒト化されたT細胞動員抗体BMA031(36)(配列番号159および160)、UCHT1(17)(配列番号153および154)、および異なるUCHT1(17)変異型

U C H T 1 (1 7) (1 7 o p t) (配列番号 1 5 3 および 1 6 2) 、 U C H T 1 (2 1) (配列番号 1 5 3 および 1 6 4) および U C H T 1 (2 3) (配列番号 1 5 3 および 1 5 6) に由来する変異型に由来する V L - および V H - ドメインとそれぞれ組み合わせた。

【 0 4 7 3 】

T C R / 抗体二重特異性抗体 - F_c 形態を使用して、本発明者らは、T C E R (商標) 分子 (表 8 に示される例示的な完全長配列) と、H C M V 由来のプロモーター要素 p U C 1 9 誘導体によって制御される単シストロン性のそれぞれのベクターとを設計した。プラスミド D N A を標準的な培養方法に従って大腸菌 (E . c o l i) 中で増幅し、引き続いて、市販のキット (M a c h e r e y & N a g e l) を使用して精製した。電気穿孔システム (M a x C y t e S T X) を使用する C H O - S 細胞の一過性形質移入のために、精製したプラスミド D N A を使用した。形質移入された C H O 細胞を 3 2 ~ 3 7 で 1 0 ~ 1 2 日間培養し、 C e l l b o o s t 7 a および 7 b (G E H e a l t h c a r e (商標)) 溶液を 1 ~ 3 回供給した。

10

【 0 4 7 4 】

表 8 : T C E R (商標) 分子のそれぞれの変異型を生成するための T C R 可変ドメイン配列と T 細胞動員抗体可変ドメイン配列との組み合わせ。形質移入のために、鎖 A を含有するプラスミドは鎖 B を含有するプラスミドと混合された。

【 表 8 】

TCER™ molecule	Chain A SEQ ID No:	Chain B SEQ ID No:
114-iso0-UCHT1(17)	127	130
114-iso1-UCHT1(17)	131	130
114-iso2-UCHT1(17)	133	130
114-iso0-BMA(36)	135	136
114-iso1-BMA(36)	137	136
114-iso2-BMA(36)	139	136

20

【 0 4 7 5 】

30

調整された細胞上清は、 S a r t o c l e a r D y n a m i c s (登録商標) L a b F i l t e r A i d (S a r t o r i u s) を利用した濾過 (0 . 2 2 μ m) によって清澄化した。二重特異性抗原結合タンパク質は、親和性およびサイズ排除クロマトグラフィーをオンラインで実行するように装備された、 A k t a P u r e 2 5 L F P L C システム (G E L i f e s c i e n c e s) を使用して精製した。アフィニティーコロマトグラフィーは、標準的なアフィニティクロマトグラフィープロトコルに従って、 M A b S e l e c t S u R E またはプロテイン L カラム (G E L i f e s c i e n c e s) 上で実施した。 S u p e r d e x 2 0 0 p g 2 6 / 6 0 0 カラム (G E L i f e s c i e n c e s 社) を用いて、アフィニティカラムからの溶出 (p H 2 . 8) 直後に、サイズ排除クロマトグラフィーが実施され、標準的なプロトコルに従って高純度の単量体タンパク質を得た。タンパク質濃度は、 N a n o D r o p システム (T h e r m o S c i e n t i f i c) 上で、予測されたタンパク質配列に従って計算された吸光係数を用いて判定した。必要に応じて、 V i v a s p i n デバイス (S a r t o r i u s) を使用して、濃度を調節した。最後に、精製された分子を 2 ~ 8 の温度で約 1 m g / m L の濃度のリン酸緩衝生理食塩水中に保存した。

40

【 0 4 7 6 】

精製された二重特異性抗原結合タンパク質の品質は、 V a n q u i s h u H P L C - S y s t e m 内で、 3 0 0 m M の N a C l を含有する 5 0 m M のリン酸ナトリウム、 p H 6 . 8 で実行される、 M a b P a c S E C - 1 カラム (5 μ m 、 4 × 3 0 0 m m) 上で、 H P L C - S E C によって判定した。検出器波長は、 2 1 4 n m に設定した。誘導され

50

た凝集体は、[凝集体% (ストレス後)] - [凝集体% (開始時)]として計算した。単量体回収率は、[単量体ピーク面積 (ストレス後)] / [単量体ピーク面積 (開始)] × 100 %として計算した。

【0477】

異なるTCER (商標) 分子の生産性およびストレス安定性データーは、図8Aに示される。変異型114-is01-UCHT1(17)(17opt)以外の全ての変異型は、10mg/1を超える生産収率を示した(図8、左側パネル)。40°Cでの分子の熱ストレス試験からは、14日間の熱ストレスで10%未満の凝集体形成を示す、全ての生成されたTCER (商標) 分子に対して非常に良好~許容可能な安定性が明らかになった(図8A、右側パネル)。

10

【0478】

バイオレイヤー干渉法を用いて、それぞれ(表8に示されるように)、UCHT1(17)およびBMA031(36)と組み合わされた、TCR変異型114-is00、114-is01、および114-is02を含んでなる、二重特異性TCER (商標) 抗原結合タンパク質を、HLA-A*02との複合体中のMAGE-A抗原ペプチド(配列番号1)に対するそれらの結合親和性について特性決定した(図8A、表9)。製造業者によって推奨される設定を使用して、Octet RED384システムで測定を実施した。簡潔に述べると、緩衝液としてPBS、0.05%ツイーン-20、0.1%BSAを使用し、30、1000rpmの振盪速度で結合動態を測定した。二重特異性TCER (商標) 分子の連続希釈液を分析する前に、ペプチド-HLA-A*02複合体をバイオセンサー(HIS1K)上に負荷した。TCER (商標) 変異型114-is00、114-is01、および114-is02は、それぞれ、1.8nM、2.0nM、および2.3nMの同等のKD値で、HLA-A*02との複合体中のMAG-003と強く結合し、HLA-A*02/MAG-003結合が、TCR可変ドメインのCDRa1(aD27E)およびCDRa2(aS65Q)中の2つの異性化部位の除去によって影響を受けないことが示唆された。

20

【0479】

表9：表8に示されるCHT1(17)およびBMA031(36)と組み合わされたTCER (商標) 変異型114-is00、114-is01、および114-is02の親和性分析。KD値は、バイオレイヤー干渉法によって測定された。

30

【表9】

	UCHT1(17)			BMA031(36)		
	114-is00	114-is01	114-is02	114-is00	114-is01	114-is02
K _D (MAG-003) [M]	1.79E-09	1.97E-09	2.32E-09	1.79E-09	1.97E-09	2.42E-09

【0480】

TCR変異型114-is00、114-is01、および114-is02は、バイオレイヤー干渉法を用いて正常組織由来のオフターゲットペプチドへの結合を分析することによって、それらの特異性に関してさらに特性決定した。測定は、上述したように実施した。HLA-A*02との複合体中の、MAG-003(配列番号1)に対する、およびオフターゲットペプチドCNOT1-003(配列番号32)、COL6A3-010(配列番号179)、FAM115A-001(配列番号180)、HEATR5A-001(配列番号31)、HERC4-001(配列番号29)、INTS4-002(配列番号171)、PHTF2-001(配列番号181)、PPP1CA-006(配列番号173)、RPL-007(配列番号174)、RPP1-001(配列番号182)、SAMH-001(配列番号172)、SETD1A-001(配列番号175)に対する、114-is00-UCHT1(17)の結合親和性を判定し、親和性ウィンドウを計算した。親和性ウィンドウは、オフターゲット結合が200倍を超える~皆無の範

40

50

図であった(表10)。114-isoo1-BMA(36)および114-isoo2-UCHT1(17)の特異性は、 $1\mu M$ のTCER(商標)の濃度のHLA-A*02との複合体中の、MAG-003(配列番号1)およびオフターゲットペプチドODC-001(配列番号178)、NOMAP-1-0320(配列番号176)、およびNOMAP-1-1223(配列番号177)に対する結合シグナルを測定することによって分析した(図8C、表11)。MAG-003シグナルの1%以下の結合応答が検出され、MAG-003に対するTCR変異型の高い特異性が実証された。

【0481】

表10: TCER(商標);分子114-isoo1-UCHT1(17)の特異性 K_{NS} 値は、114-isoo1-UCHT1(17)(500nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM)の連続希釈液を分析するバイオレイヤー干渉法によって測定された。親和性ウィンドウは、 K_D (類似ペプチド)/ K_D (MAG-003)として計算された。

【表10】

	K_D [M]	K_D (similar peptide)/ K_D (MAG-003)
MAG-003	1.56E-09	-
CNOT1-003	1.64E-06	1050
COL6A3-010	9.03E-07	579
FAM115A-001	7.84E-07	503
HEATR5A-001	3.70E-07	238
HERC4-001	4.91E-07	315
INTS4-002	1.98E-06	1273
PHTF2-001	1.02E-06	656
PPP1CA-006	no binding	no binding
RPL-007	no binding	no binding
RPP1-001	8.97E-07	576
SAMH-001	2.11E-06	1356
SETD1A-001	no binding	no binding

【0482】

表11: TCER(商標)分子114-isoo1-BMA(36)および114-isoo2-UCHT1(17)の特異性。 $1\mu M$ TCER(商標)の結合動態は、バイオレイヤー干渉法を介して測定された。結合期の終了時の応答(MAG-003信号のnmまたは%として)が示される。

【表11】

	114-isoo1-BMA(36)		114-isoo2-UCHT1(17)	
Loading Sample ID	Response	Response (% of MAG-003)	Response	Response (% of MAG-003)
MAG-003	0.8246	100.0	0.8233	100.0
ODC-001	0.0061	0.7	0.0104	1.3
NOMAP-1-0320	0.0025	0.3	0.0025	0.3
NOMAP-1-1223	0.0005	0.1	0.0057	0.7

【0483】

10

20

30

40

50

実施例 6 : MAG - 003陽性および腫瘍細胞株のTCEER(商標)媒介性殺滅

成熟TCR変異型は、TCR/antiCD3二重特異性抗体-Fc形態を使用して、可溶性TCEER(商標)分子#114-iso0-UCHT1(17)、#114-iso1-UCHT1(17)、#114-iso2-UCHT1(17)、#114-iso0-BMA031(36)、#114-iso1-BMA031(36)および#114-iso2-BMA031(36)として発現させた(表8もまた参照されたい)。MAG-003陽性腫瘍細胞株とMAG-003陰性腫瘍細胞株に対する、二重特異性TCEER(商標)分子の細胞傷害活性をそれぞれLDH放出アッセイで分析した。したがって、細胞表面上に異なる量のHLA-A*02/MAG-003分子を提示する腫瘍細胞株と、健康なHLA-A*02+ドナーからのPBMCとをTCEER(商標)分子の濃度を増加させながら同時インキュベートした。48時間後、Cytotoxicity Assayキット(PROMEGA)を使用して、標的細胞株の溶解を測定した。図9および図10に示されるように、TCEER(商標)分子は、HLA-A*02/MAG-003複合体の質量分析による定量化によって判定されるように、それぞれ、腫瘍細胞あたり1100コピー、230コピー、および120コピーを提示するMAG-003陽性腫瘍細胞株HS695T、A375、およびU2OSを効率的に溶解した。殺滅アッセイでは、2人の健常なドナー(図9のHBC-720および図10のHBC-982)からのPBMCを使用した。同じ実験内で、HLA-A*02を発現するが、MAG-003を検出可能なレベルで提示しない細胞株BV-173では、二重特異性TCEER(商標)分子によって細胞の溶解が誘導されないか、わずかしか誘導されなかったことから、TCRドメインの特異性が示された。

【0484】

実施例7：腫瘍異種移植片を保有するOGマウスにおける生体内効力

薬力学的研究を高免疫欠損NOGマウス系統で実施し、T細胞抗原に特異的に結合することによって、およびヒトがん細胞上のヒト腫瘍特異的HLA-ペプチド複合体に特異的に結合することによって、ヒト免疫T細胞の活性を動員する、TCEER(商標)分子の能力を試験した。皮下注射されたヒト腫瘍細胞株HS695Tを保有するNOGマウス系統に、ヒト末梢血単核球(PBMC)の異種移植片を静脈内注射した。ヒトPBMC(1×10⁷細胞/マウス)は、キャリバー測定後に、個々のHS695T腫瘍の体積が50mm³に達した時点で、24時間以内に移植した。ヒト血液細胞の移植後1時間以内に、処置を開始した。グループあたり8~10匹の雌マウス(腫瘍サイズに応じて無作為化)に、尾静脈への静脈内ボーラス注射(5mL/kg体重、週2回投与、6回投与)を与えた。TCEER(商標)分子の注射用量は、0.5(グループ2)および0.05(グループ3および4)mg/kg体重×注射であり、ビヒクル対照群(グループ1)ではPBSを使用した。個々のマウスについて図11に示されるように、TCEER(商標)分子による治療は、顕著な抗腫瘍反応を誘発した。25日目の基底レベルの74mm³~1081mm³へのビヒクル対照群1で観察された増加と比較して、90mm³の基底レベル(無作為化の開始)から25日目の209mm³への平均腫瘍体積の増加の減少によって示されるように、PRAME-004(配列番号168、グループ2)を標的化するTCEER(商標)(配列番号169および170)による治療は、腫瘍増殖を強く抑制した。MAG-003を標的化するTCEER(商標)(配列番号127および130、グループ3;配列番号135および136、グループ4)による処置は、全てのマウスにおいて、無作為化した日の86mm³(グループ3)および80mm³(グループ4)の基底レベルと比較して、18日目から試験終了の25日目までにHS695T腫瘍の完全な寛解を誘導した。

【0485】

実施例8：初代健常細胞の生体外安全性

TCEER(商標)分子114-iso1-BMA(36)の安全性プロファイルは、異なる臓器のヒト正常組織初代細胞を用いたLDH殺滅実験で評価した。図12は、増加するTCEER(商標)濃度の存在下で、11の異なる初代健常組織細胞(HLA-A*02

10

20

30

40

50

+) と、健康な H L A - A * 0 2 + ドナーからの P B M C エフェクター細胞とを 1 : 1 0 の比率で共培養した結果を示す。細胞は、正常組織初代細胞特異的培地と、T 細胞培地との 1 : 1 混合物中で同時インキュベートした。安全域を判決定するために、正常組織初代細胞のそれぞれの培地の組み合わせで、M A G - 0 0 3 陽性腫瘍細胞株 H s 6 9 5 T と同じ設定で、T C E R (商標) 分子を同時インキュベートした。共培養の 4 8 時間後、上清を採取し、L D H - G l o (商標) キット (P r o m e g a) を使用して L D H 放出を測定することによって、腫瘍細胞溶解を分析した。

【 0 4 8 6 】

図 1 2 では、各細胞傷害性プロットによって、P B M C と T C E R 分子の濃度を増加させながら同時インキュベーション養した後の、同じ培地の組み合わせにおける正常組織初代細胞タイプ (白塗り円) の L D H 放出を、対照腫瘍細胞株 H s 6 9 5 T (黒塗り円) と比較して示す。全ての場合において、正常組織の初代細胞に対する応答は、E C 5 0 を計算するには低すぎた。それに代えて、本発明者らは、カットオフ値を超える応答を伴う最初の T C E R (商標) 濃度として判定された最小影響量 (L O E L) に基づいて、安全域を定義した。カットオフは ([全ての三連からの標準偏差 × 3] + T C E R (商標) なしの対照正常組織サンプル) として定義され、各細胞傷害性プロットに点線で示される。正常な組織細胞タイプ毎に、L O E L ベースの安全域は 1 , 0 0 0 倍よりも大きいと判断された。

【 0 4 8 7 】

T C E R (商標) 分子 1 1 4 - i s o 1 - B M A (3 6) の安全性プロファイルは、1 2 の異なる初代健常組織細胞 (H L A - A * 0 2 +) を使用した 2 回目の L D H 殺滅実験で評価し、そのいくつかは 1 回目の実験と重複した。上記のような実験条件を使用した。

【 0 4 8 8 】

図 1 6 では、各細胞傷害性プロットによって、P B M C と T C E R 分子の濃度を増加させながら同時インキュベーションした後の、同じ培地の組み合わせにおける正常組織初代細胞タイプ (白塗り円) の L D H 放出を、対照腫瘍細胞株 H s 6 9 5 T (黒塗り円) と比較して示す。全ての場合において、正常組織の初代細胞に対する応答は、E C 5 0 を計算するには低すぎた。それに代えて、本発明者らは、カットオフ値を超える応答を伴う最初の T C E R (商標) 濃度として判定された最小影響量 (L O E L) に基づいて、安全域を定義した。カットオフは ([全ての三連からの標準偏差 × 3] + T C E R (商標) なしの対照正常組織サンプル) として定義され、各細胞傷害性プロットに点線で示される。正常な組織細胞タイプ毎に、L O E L ベースの安全域は 1 , 0 0 0 倍よりも大きいと判断された。

【 0 4 8 9 】

実施例 9 : 腫瘍異種移植片を保有する N O G マウスにおける週 1 回の治療による生体内効力
薬力学的研究を高免疫欠損 N O G マウス系統で実施し、T 細胞抗原に特異的に結合することによって、およびヒトがん細胞上のヒト腫瘍特異的 H L A - ペプチド複合体に特異的に結合することによって、ヒト免疫 T 細胞の活性を動員する、T C E R (商標) 分子の能力を試験した。皮下注射されたヒト腫瘍細胞株 H s 6 9 5 T 保有する N O G マウス系統に、ヒト末梢血単核球 (P B M C) の異種移植片を静脈内注射した。ヒト P B M C (1 × 1 0 7 細胞 / マウス) は、キャリパー測定後に、個々の H s 6 9 5 T 腫瘍の体積が 5 0 m m 3 に達した時点で、2 4 時間以内に移植した。ヒト血液細胞の移植後 1 時間以内に、処置を開始した。グループあたり 6 ~ 1 0 匹の雌マウス (腫瘍サイズに応じて無作為化された) に、尾静脈への静脈内ボーラス注射 (5 m L / k g 体重、週 1 回投与、3 回投与) を与えた。T C E R (商標) 分子の注射用量は、0 . 0 1 m g / k g 体重 × 注射 (グループ 2 および 3) であり、ビヒクリ对照グループ (グループ 1) では P B S を使用した。図 1 3 に示されるように、T C E R (商標) 分子による治療は、顕著な抗腫瘍反応を誘発した。M A G - 0 0 3 T C E R (商標) 分子 1 1 4 - i s o 1 - B M A (3 6) (配列番号 1 3 7 および 1 3 6 、グループ 2) および 1 1 4 - i s o 1 - U C H T 1 (V 1 7 o p t) (配列番号 1 3 1 および 1 6 7 、グループ 3) による治療は、2 1 日目に全てのマウスで H s

10

20

30

40

50

695 T腫瘍の寛解を誘導した。85mm³の基底レベルから21日目の1024mm³へのビヒクル対照（グループ1）内で観察された増加と比較して、84mm³から8mm³へ（グループ2）、および83mm³から14mm³へ（グループ3）の基底レベル（無作為化の開始）から21日目への平均腫瘍体積の増加の減少によって示されるように、腫瘍増殖は強く抑制された。完全寛解は、グループ2の2匹のマウスとグループ3の2匹のマウスで観察された。

【0490】

実施例10：NOGマウスの生体内薬物動態

T C E R（商標）114-is01-UCHT1(17)（配列番号130および131）の薬物動態特性は、2mg/kg体重の単回静脈内注射を投与された高度免疫不全NOGマウスにおいて分析した。血漿サンプルは、0時間、0.1時間、2時間、8時間、24時間、48時間、120時間、240時間、および360時間の時点で後頭葉神経叢から採取した。114-is01-UCHT1(17)の血漿レベルは、2つの異なるアッセイ設定(Fc-VLアッセイおよびCD3-pMHCアッセイ)を用いたELISAによって判定した。Fc-VLアッセイの設定を用いて、それぞれのタンパク質サブユニットを検出することによって、T C E R（商標）血漿レベルを定量化した。簡潔に述べると、ヤギ抗ヒトIgGFcをPBS中2μg/mlの濃度で、4で一晩コーティングした。残りの結合部位は、2%BSAを含有するPBSを使用してブロッックした。ブロッック緩衝液で希釈されたサンプルは、プロテインL-HRPおよびTMB基質溶液で検出する前に、室温で1時間インキュベートした。CD3-pMHCアッセイを使用して、T C E R（商標）114-is01-UCHT1(17)の血漿レベルを、双方の標的分子に同時に結合できる分子のみを測定する、二重特異性結合活性を介して判定した。CD3-Fcは、ヒトCD3およびCD3の細胞外ドメインと、「ノブ・インツー・ホール」変異および追加的なC末端のHis-Tagを含有する)T C E R（商標）コンストラクトで用いられるFcドメインのN末端とを融合させることによって生成した。CD3-Fc分子をExpiCHO細胞で発現させ、上記のようにプロテインAアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。CD3-FcをPBS中の1μg/mlの濃度で、4で一晩コーティングした。ブロッキングおよびサンプルインキュベーションを上述したように実施し、HLA-A*02/MAG-003および抗b2m-HRPを使用した二段階検出がそれに続いた。サンプルの血漿中濃度は、それぞれの標準曲線からの内挿によって得た。どちらのアッセイの設定でも、同様のT C E R（商標）血漿濃度が測定され、タンパク質の完全性、ならびに分子の結合活性が血漿中で保持されていることが示される(図14)。24時間、48時間、120時間、240時間、および360時間の時点の線形回帰により、150時間の最終血漿半減期が明らかになった。結果は、114-is01-UCHT1(17)の半減期(T_{1/2})が約6~7日であることを示す。

【0491】

実施例11：質量分析法による初代組織上のMAG-003ペプチドの検出

衝撃凍結組織サンプルからのHLA分子を精製し、HLA関連ペプチドを単離した。単離ペプチドを分離して、オンラインナノエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)実験によって配列を同定した。複数の組織サンプルで同定されたMAG-003は、ラベルフリーLC-MSデータのイオンカウントを使用して定量化した。方法は、ペプチドのLC-MSシグナル面積が、サンプル中のその存在量と相関すると仮定する。様々なLC-MS実験におけるペプチドの全ての定量的シグナルを中心傾向に基づいて正規化し、サンプル当たりで平均化して、提示プロファイルと称されるプロットにマージさせた。提示プロファイルは、タンパク質データベース検索、スペクトルクラスタリング、電荷状態デコンボリューション(除電)、および滞留時間アライメントのような、異なる解析法を統合する。自動的に導出された全ての定量的および定性的データは、手動で検査した(図18を参照されたい)。

10

20

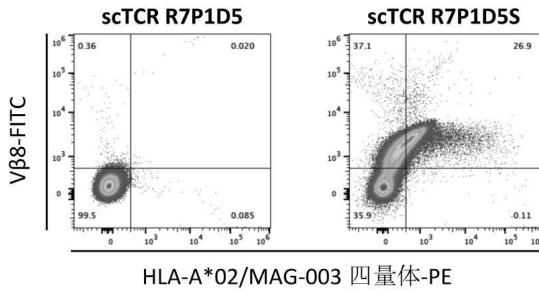
30

40

50

【図面】

【図 1】



HLA-A*02/MAG-003 四量体-PE

【図 2】

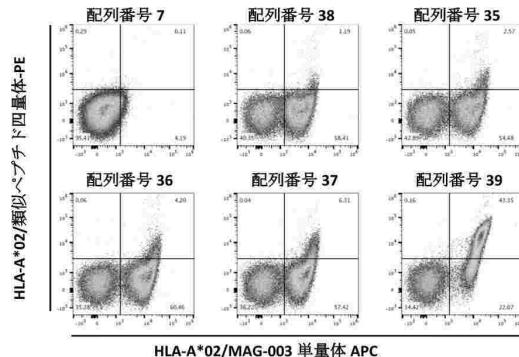
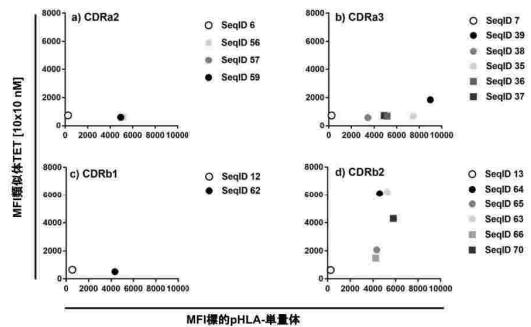


図2A

10

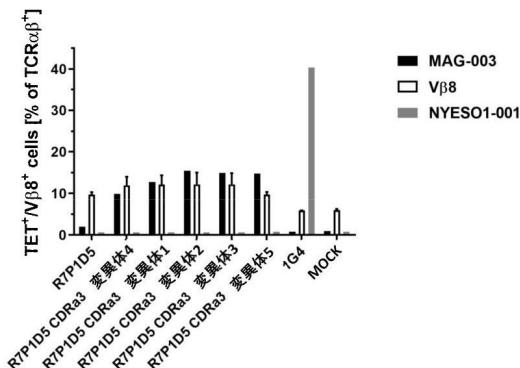


20

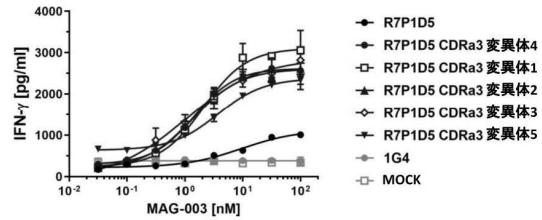
図2B

30

【図 3】



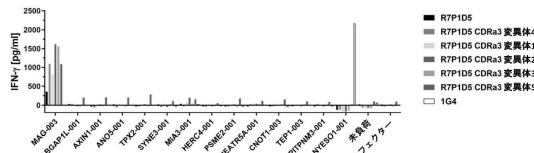
【図 4】



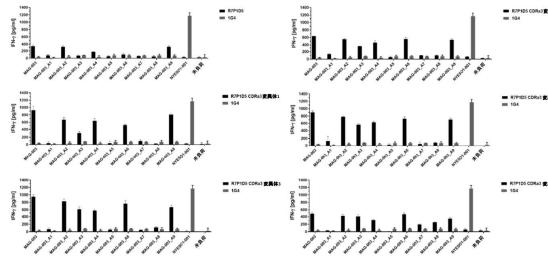
40

50

【図 5】

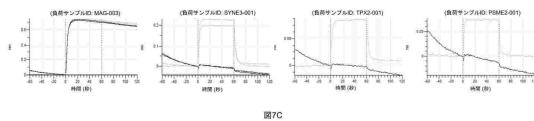
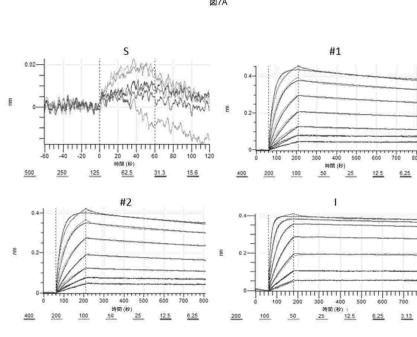
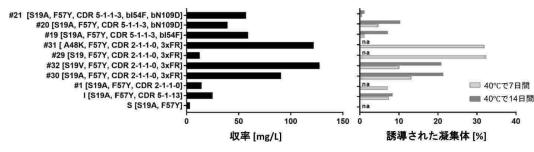


【図 6】

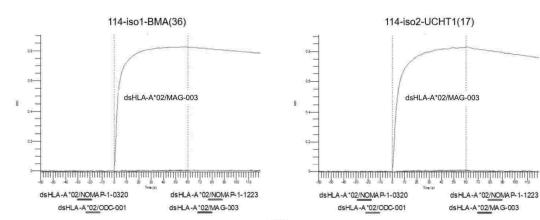
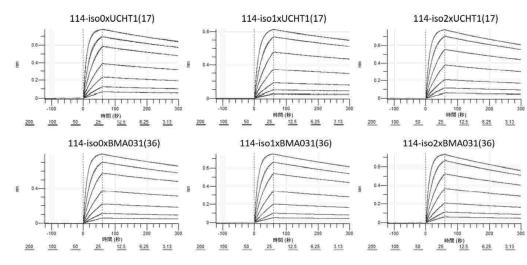
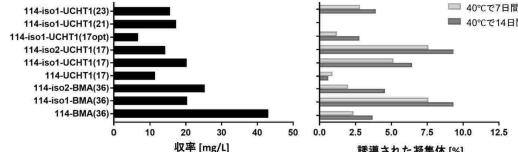


10

【図 7】



【図 8】



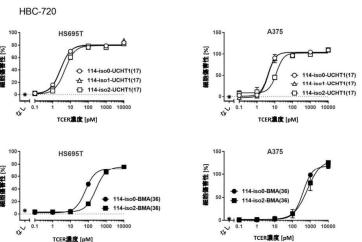
20

30

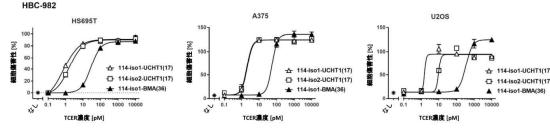
40

50

【図 9】

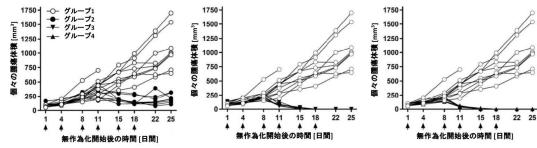


【図 10】

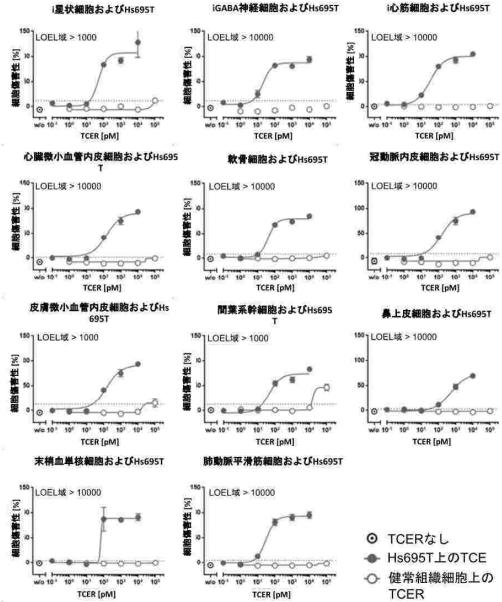


10

【図 11】



【図 12】



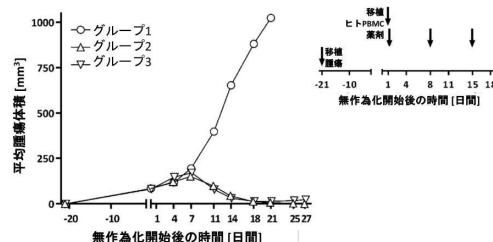
20

30

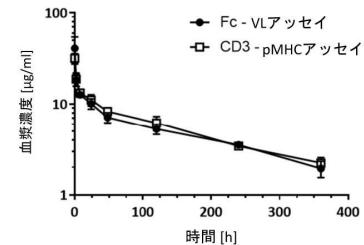
40

50

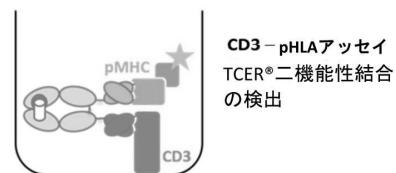
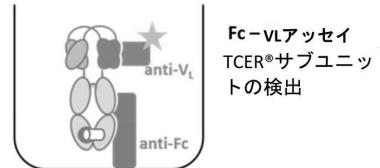
【図 1 3】



【図 1 4】

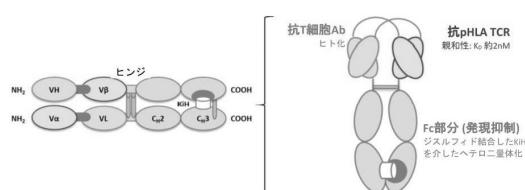


10

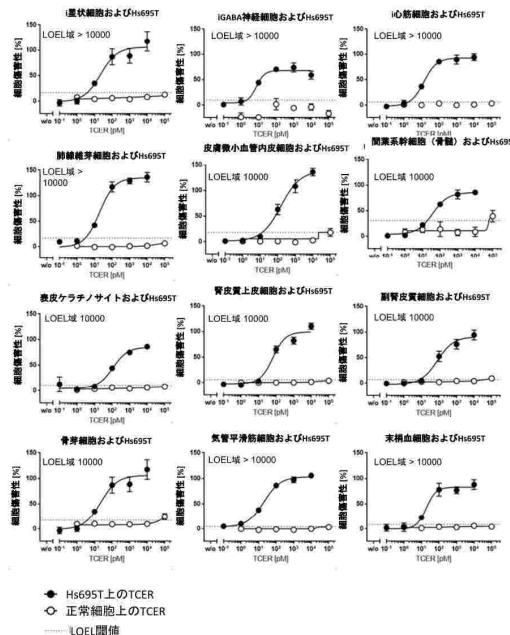


20

【図 1 5】



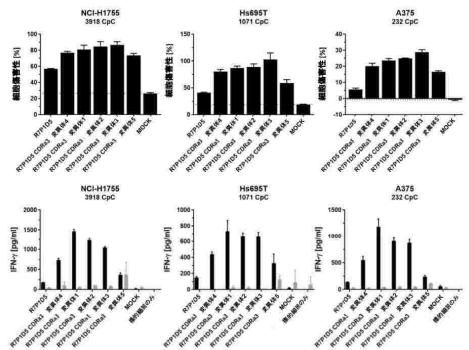
【図 1 6】



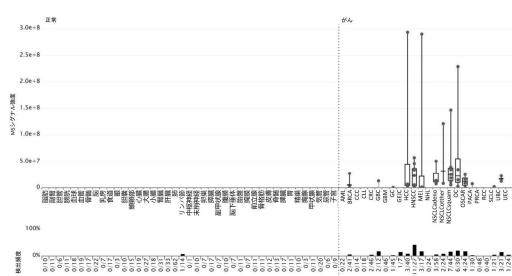
40

50

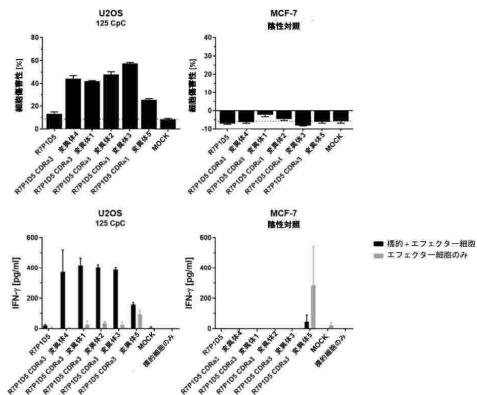
【図17】



【図18】



10



20

【配列表】

0007476298000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F	I			
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 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/905,782

(32)優先日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

早期審査対象出願

(74)代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100183656

弁理士 庄司 晃

(74)代理人 100224786

弁理士 大島 卓之

(74)代理人 100225015

弁理士 中島 彩夏

(72)発明者 ハット,マイケ

ドイツ, 7 0 5 6 5 シュトゥットガルト, ローラ ヘーエ 5 8

(72)発明者 ウンフェルドルベン, フィリックス

ドイツ, 7 0 1 9 9 シュトゥットガルト, メーリンガー エステーエル. 1 5 7

(72)発明者 ブンク,セバスティアン

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, ゲルトルート - ボイマー - エステーエル. 1 9 / 1

(72)発明者 マウラー, ドミニク

ドイツ, 7 2 1 1 6 メッシンゲン, フライナーウェーグ 7

(72)発明者 ホフマン, マーティン

ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, ゲイスウェーグ 2 0

(72)発明者 ポスゾラ, ガブリエーレ

ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, ハウサーエステーエル. 5 1

(72)発明者 ユスフ, サラ

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, エリゼベート - ケセマン - エステーエル. 1 2

(72)発明者 ワグナー, クラウディア

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, ニュルティンガー シュトラーセ 3 2

(72)発明者 シュヴェーベル, フランク

ドイツ, 1 3 4 6 5 ベルリン, ゴランウシュトラーセ 9 7

(72)発明者 シュスター, ヘイコ

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, ドルフアッカーシュトラーセ 2 2

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 特表 2 0 1 9 - 5 1 1 2 2 2 (J P , A)

JIA, Z.-C. et al., Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived fro

m MAGE-A4 , Clinical and Developmental Immunology , 2010年 , Vol. 2010, Article ID 56
7594 , P. 1-7

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

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)

U n i P r o t / G e n e S e q