

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-540888

(P2023-540888A)

(43)公表日 令和5年9月27日(2023.9.27)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全55頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-512109(P2023-512109)	(71)出願人	000006677
(86)(22)出願日	令和3年8月18日(2021.8.18)		アステラス製薬株式会社
(85)翻訳文提出日	令和5年3月28日(2023.3.28)		東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号
(86)国際出願番号	PCT/IB2021/000556	(74)代理人	100102978
(87)国際公開番号	WO2022/038411		弁理士 清水 初志
(87)国際公開日	令和4年2月24日(2022.2.24)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	63/067,629		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和2年8月19日(2020.8.19)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74)代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光
		(74)代理人	100188433
			弁理士 梅村 幸輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非天然の改変 F c 受容体に特異的に結合する、ヒト I g G の非天然の改変 F c 領域

(57)【要約】

本発明は、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチド、該ポリペプチドに特異的に結合する改変Fcγ受容体、および免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドであって、
該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、かつ
該ポリペプチドが、野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合することができる、
ポリペプチド。

【請求項 2】

野生型または天然のFcγ受容体が、野生型または天然のCD16Aであり、かつ、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体が、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aである、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項 3】

野生型または天然のCD16Aが、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む、請求項2記載のポリペプチド。

【請求項 4】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、
(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、
(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および
(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)
より選択される少なくとも1つの変異を含む、請求項2または3記載のポリペプチド。

【請求項 5】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 6】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 7】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異を含み、かつ、
(iv)SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および
(v)SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)
より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 8】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む、請求項4記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、ヒトIgγ1の改変Fc領域を含み、
該改変Fc領域が、
(i)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、
(ii)(a)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(b)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される

、少なくとも1つの変異と

を含む、請求項1～8のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項10】

抗体である、請求項1～9のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項11】

がん抗原に結合する抗体である、請求項10記載のポリペプチド。

【請求項12】

免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防する方法であって、

請求項1～11のいずれか一項記載のポリペプチドと、野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現する細胞とを、患者に投与する段階を含み、

該ポリペプチドが、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む該非天然Fcγ受容体に結合することができる、方法。

【請求項13】

前記細胞がヒト免疫細胞である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

ヒト免疫細胞が、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

前記細胞が幹細胞に由来する、請求項12～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

幹細胞が、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される、請求項15記載の方法。

【請求項17】

幹細胞が多能性幹細胞である、請求項16記載の方法。

【請求項18】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊をβ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む、請求項12～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

前記細胞が、

HLA-1α鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合したB2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質

をコードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】

HLA-1α鎖が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む、請求項12～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

HLAクラスII関連遺伝子が、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α鎖)、HLA-DPB(β鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される、請求項22記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

前記細胞が、
単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする、1つまたは複数のポリヌクレオチド
を含む、請求項12～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項 25】

がんを治療または予防するための方法である、請求項12～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

請求項1～11のいずれか一項記載のポリペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

10

【請求項 27】

細胞が、野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現し、ポリペプチドが、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合することができる、免疫療法のために細胞と併用するための請求項26記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

前記細胞がヒト免疫細胞である、請求項27記載の薬学的組成物。

【請求項 29】

ヒト免疫細胞が、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である、請求項28記載の薬学的組成物。

20

【請求項 30】

前記細胞が幹細胞に由来する、請求項27～29のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 31】

幹細胞が、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される、請求項30記載の薬学的組成物。

【請求項 32】

幹細胞が多能性幹細胞である、請求項31記載の薬学的組成物。

30

【請求項 33】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である、請求項32記載の薬学的組成物。

【請求項 34】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊をβ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む、請求項27～33のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 35】

前記細胞が、

HLA-1α鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合したB2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質
をコードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む、請求項34記載の薬学的組成物。

40

【請求項 36】

HLA-1α鎖が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される、請求項35記載の薬学的組成物。

【請求項 37】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む、請求項27～36のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 38】

50

HLAクラスII関連遺伝子が、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される、請求項37記載の薬学的組成物。

【請求項39】

前記細胞が、

単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする、1つまたは複数のポリヌクレオチド

を含む、請求項27～38のいずれか一項記載の薬学的組成物。

10

【請求項40】

免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するためのキットであって、(i)請求項1～11のいずれか一項記載のポリペプチドと、(ii)野生型または天然のFc γ 受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fc γ 受容体を発現する細胞とを含み、

該ポリペプチドが、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む該非天然Fc γ 受容体に結合することができる、キット。

【請求項41】

前記細胞がヒト免疫細胞である、請求項40記載のキット。

【請求項42】

ヒト免疫細胞が、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である、請求項41記載のキット。

20

【請求項43】

前記細胞が幹細胞に由来する、請求項40～42のいずれか一項記載のキット。

【請求項44】

幹細胞が、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される、請求項43記載のキット。

【請求項45】

幹細胞が多能性幹細胞である、請求項44記載のキット。

30

【請求項46】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である、請求項45記載のキット。

【請求項47】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む、請求項40～46のいずれか一項記載のキット。

【請求項48】

前記細胞が、

HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合したB2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質

40

をコードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む、請求項47記載のキット。

【請求項49】

HLA-1 α 鎖が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される、請求項48記載のキット。

【請求項50】

前記細胞が、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む、請求項40～49のいずれか一項記載のキット。

【請求項51】

HLAクラスII関連遺伝子が、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、

50

調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される、請求項50記載のキット。

【請求項52】

前記細胞が、
単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする、1つまたは複数のポリヌクレオチド
を含む、請求項40～51のいずれか一項記載のキット。

【請求項53】

野生型または天然のCD16Aと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aを発現する細胞であって、

該少なくとも1つのアミノ酸変異が、(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択され、かつ

該非天然CD16Aが、SEQ ID NO: 78に対して90%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、
細胞。

【請求項54】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項53記載の細胞。

【請求項55】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項53記載の細胞。

【請求項56】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異を含み、かつ、

(iv)SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および

(v)SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)

より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項53記載の細胞。

【請求項57】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む、請求項53記載の細胞。

【請求項58】

ヒト免疫細胞である、請求項53～57のいずれか一項記載の細胞。

【請求項59】

ヒト免疫細胞が、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である、請求項58記載の細胞。

【請求項60】

幹細胞に由来する、請求項53～59のいずれか一項記載の細胞。

【請求項61】

幹細胞が、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される、請求項60記載の細胞。

【請求項62】

幹細胞が多能性幹細胞である、請求項61記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である、請求項62記載の細胞。

【請求項 6 4】

遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む、請求項53～63のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 6 5】

HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合したB2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質をコードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む、請求項64記載の細胞。

10

【請求項 6 6】

HLA-1 α 鎖が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される、請求項65記載の細胞。

【請求項 6 7】

遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む、請求項53～66のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 6 8】

HLAクラスII関連遺伝子が、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される、請求項67記載の細胞。

20

【請求項 6 9】

単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、請求項53～68のいずれか一項記載の細胞。

【請求項 7 0】

請求項53～69のいずれか一項記載の細胞および薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

30

【請求項 7 1】

改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、かつ

ポリペプチドが、野生型または天然のCD16Aに対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ細胞によって発現される少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aに結合することができる、

免疫療法のためにIgGの改変Fc領域を含むポリペプチドと併用するための、請求項70記載の薬学的組成物。

【請求項 7 2】

前記ポリペプチドが、ヒトIg γ 1の改変Fc領域を含み、
該改変Fc領域が、

40

(i)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、

(ii)(a)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(b)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される、少なくとも1つの変異と

を含む、請求項71記載の薬学的組成物。

【請求項 7 3】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項71または72記載の薬学的組成物。

50

【請求項 7 4】

前記ポリペプチドが、がん抗原に結合する抗体である、請求項73記載の薬学的組成物。

【請求項 7 5】

がんを治療するためのものである、請求項71～74のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 7 6】

IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを調製するための方法であって、

(1) IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを提供する段階であって、該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階;

10

(2) 野生型または天然のFcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階;

(3) 野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階;および

(4) 野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらずかつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合するポリペプチドを、(1)で得られたポリペプチドより選択する段階を含む、方法。

【請求項 7 7】

野生型または天然のFcγ受容体が、野生型または天然のCD16Aであり、かつ、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体が、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aである、請求項76記載の方法。

20

【請求項 7 8】

野生型または天然のCD16Aが、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む、請求項77記載の方法。

【請求項 7 9】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aが、

(i) SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、

(ii) SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および

30

(iii) SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)

より選択される少なくとも1つの変異を含む、請求項77または78記載の方法。

【請求項 8 0】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項79記載の方法。

【請求項 8 1】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む、請求項79記載の方法。

40

【請求項 8 2】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aが、K131D変異を含み、かつ、

(iv) SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および

(v) SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)

より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項79記載の方法。

【請求項 8 3】

IgGの改変Fc領域を含む非天然ポリペプチドが抗体である、請求項76～82のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 84】

抗体が、がん抗原に結合する抗体である、請求項83記載の方法。

【請求項 85】

IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドが抗体であり、
前記方法が、

該抗体を、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階

をさらに含む、

請求項83または84記載の方法。

10

【請求項 86】

非天然Fcγ受容体を調製するための方法であって、

(1)野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を提供する段階;

(2)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドとを提供する段階;

(3)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階;

(4)少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階;および

(5)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する結合活性を本質的に有しておらずかつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに結合する非天然Fcγ受容体を、(1)で得られた非天然Fcγ受容体より選択する段階を含む、方法。

20

【請求項 87】

Fcγ受容体がCD16Aである、請求項86記載の方法。

【請求項 88】

野生型または天然のFcγ受容体が、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aである、請求項87記載の方法。

30

【請求項 89】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域が、野生型または天然のヒトIgγ1と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含むヒトIgγ1のFc領域であり、かつ

(a)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、

(b)(i)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(ii)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される、少なくとも1つの変異と

を含む、請求項86～88のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 90】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドが、抗体である、請求項86～89のいずれか一項記載の方法。

【請求項 91】

抗体が、がん抗原に結合する抗体である、請求項90記載の方法。

【請求項 92】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドが抗体であり、
前記方法が、

(2)で得られた少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含む抗体を、(1)で得られた少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する免疫細胞および該

50

抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階

をさらに含む、

請求項90または91記載の方法。

【請求項93】

(a)IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドと、(b)非天然の改変Fcγ受容体とを含む結合対を調製するための方法であって、

(1)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドとを提供する段階であって、該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階;

(2)野生型または天然のFcγ受容体および非天然の改変Fcγ受容体を提供する段階であって、該改変Fcγ受容体が、野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階;

(3)(1)で得られた各ポリペプチドに対する、(2)で得られた各Fcγ受容体の結合活性を測定する段階;ならびに

(4)(a)改変Fcγ受容体に結合しかつ野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有していない、改変Fc領域を含むポリペプチドと、(b)改変Fc領域を含むポリペプチドに結合しかつ野生型または天然のIgGのFc領域に結合しない、改変Fcγ受容体とを選択する段階

を含む、方法。

【請求項94】

Fcγ受容体がCD16Aである、請求項93記載の方法。

【請求項95】

野生型または天然のCD16Aが、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む、請求項93または94記載の方法。

【請求項96】

IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドが、抗体である、請求項93～95のいずれか一項記載の方法。

【請求項97】

抗体が、がん抗原に結合する抗体である、請求項96記載の方法。

【請求項98】

(4)で選択されるIgGの改変Fc領域を含むポリペプチドが、抗体であり、前記方法が、

該抗体を、(4)で選択される改変Fcγ受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階

をさらに含む、

請求項93～97のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2020年8月19日に出願された米国特許仮出願第63/067,629号に対する優先権の恩典を主張する。前記出願の内容全体が、参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

近年、免疫系を利用することによってがん細胞を排除するがん免疫療法の研究および開発が進展した(Nature Reviews Drug Discovery (2019) 18, pp. 899-900 (非

10

20

30

40

50

特許文献1))。特に、抗原認識部位および活性化シグナル伝達部位が連結されているキメラ抗原受容体(CAR)を発現するキメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)が、単回投与後に著しい治療的効果を有することが報告されており(The New England Journal of Medicine (2017) 377, pp. 2545-2554 (非特許文献2))、新しいがん治療法が各方面で期待されている。

【0003】

様々ながん型を対象とする従来のCAR-T療法の開発において、いくつかの問題が発生している(Nature Reviews Clinical Oncology (2020) 17, pp. 147-167 (非特許文献3))。まず、免疫応答に基づく重大な副作用、例えばサイトカイン放出症候群が、CAR-Tを用いる免疫細胞療法において報告されているため、安全性に問題がある。従来のCAR-Tでは、CAR発現細胞を患者に移入した後に該細胞の活性を選択的に調節することができないため、副作用の発生に対処することが困難である。がん組織は、治療耐性を獲得するメカニズムを有しており、治療期間中にがん関連抗原を失ったがん細胞の出現(Cancer Discovery (2018) 8 (10), pp. 1219-1226 (非特許文献4))および多様な特性(異質性)を有する細胞集団などの問題もまた、発生している。単一の抗原を標的とする従来のCAR-Tを用いる現在の治療は、これらの問題を克服することができない。

【0004】

これらの問題を解決するために、がん標的分子とT細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞などの免疫エフェクター細胞とを用いる併用療法が研究されている。FITCなどのタグ分子を有する抗体分子およびこれらのタグ分子を認識するCAR-Tが、開発されている(WO 2012/082841、WO 2016/030414、およびWO 2017/091546 (特許文献1~3))。様々ながん標的分子とタグ認識CAR-Tとを組み合わせることにより、この技術は、複数種のがん抗原およびがん細胞に対する細胞障害活性を、1つのタイプのタグ認識CAR-Tに付与することができる。しかし、もともとはインビボに存在しないタグ分子を抗体に付与することにより、抗体分子の免疫原性が高まるリスクがある。

【0005】

一方で、エフェクター細胞と、タグ分子が付加されていない抗体分子それ自体とを利用する技術もまた、開発されている。抗体は、Fc領域を介してFc受容体に結合し、エフェクター細胞にシグナルを伝達することができる。がん抗原認識機能を有する抗体と共に使用するために作製された細胞には、IgGのFc断片の受容体IIIa(FcγRIIIa、CD16Aとして公知)をFc受容体として発現するNK細胞(JCI Insight. (2019) 4 (20): e130688 (非特許文献5))、ならびにCD16Aおよびシグナル伝達部位と融合されたCARを発現するT細胞(CD16A CAR-T)またはNK細胞(CD16A CAR-NK)(British Journal of Cancer (2019) 120 (1), pp. 79-87 (非特許文献6) 、Oncotarget. (2017) 8 (23), pp. 37128-37139 (非特許文献7))が含まれる。CD16Aを発現する1つのタイプのNK細胞およびT細胞は、がんを標的とする様々な抗体と組み合わせることが可能であるため、これらの細胞はまた、様々な抗原を発現する細胞に対する細胞障害活性を獲得することができる優れた治療的方法になる見込みがある。抗体分子それら自体が使用されるため、タグ付き抗体を用いる方法よりも免疫原性が低く、かつ安全性レベルがより高い、治療的方法を得ることができると考えられている。

【0006】

しかし、インビボでは血清中に多量の内因性免疫グロブリンが存在しており、これらもまたCD16Aに結合する。血清中に可溶性Fc受容体が存在することもまた、確認されており(Journal of Clinical Investigation (1990) 86, pp. 416-423 (非特許文献8))、これらは治療的抗体に結合する。言い換えると、エフェクター細胞上のCD16Aが体内の免疫グロブリンによって占有される場合または投与された抗体が可溶性Fc受容体によって占有される場合、投与された抗体は、活性化シグナルをエフェクター細胞に伝達することができず、薬物有効性の低下が予想される。また、CD16Aを発現するNK細胞、CD16A CAR-T細胞、またはCD16A CAR-NK細胞が、患者自身の組織を認識する抗体分子、例えば自己抗体と共に患者に投与される場合、これらの細胞は、患者自身の組織

に対して活性化され、組織損傷を引き起こす場合がある。アフコシル化抗体に結合するがアフコシル化されていない内因性免疫グロブリンには結合しないCD16A変異体が公知である(WO 2017/161333 (特許文献4))が、これらのアフコシル化抗体は、CD16A変異体だけでなく内因性CD16Aにもシグナルを伝達する。内因性免疫グロブリンに結合しないCD16A変異体と内因性CD16Aに結合しないFc変異体との組み合わせ、および互いに特異的に結合する変異体の組み合わせは、今のところ不明である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO 2012/082841

【特許文献2】WO 2016/030414

【特許文献3】WO 2017/091546

【特許文献4】WO 2017/161333

【0008】

【非特許文献1】Nature Reviews Drug Discovery (2019) 18, pp. 899-900

【非特許文献2】The New England Journal of Medicine (2017) 377, pp. 2545-2554

【非特許文献3】Nature Reviews Clinical Oncology (2020) 17, pp. 147-167

【非特許文献4】Cancer Discovery (2018) 8 (10), pp. 1219-1226

【非特許文献5】JCI Insight. (2019) 4 (20): e130688

【非特許文献6】British Journal of Cancer (2019) 120 (1), pp. 79-87

【非特許文献7】Oncotarget. (2017) 8 (23), pp. 37128-37139

【非特許文献8】Journal of Clinical Investigation (1990) 86, pp. 416-423

【発明の概要】

【0009】

本発明は、免疫療法として使用することができる、改変Fc領域を含むポリペプチドおよびこのポリペプチドに特異的に結合する改変Fcγ受容体に関する。本発明の目的は、内因性分子によって薬物有効性が低下しない免疫療法を提供することである。

【0010】

本発明は、内因性免疫グロブリンに結合しない非天然のFcγ受容体変異体と内因性Fcγ受容体に結合しない非天然のFc領域変異体との組み合わせの発見、対象を治療するための免疫療法としての、非天然のFcγ受容体変異体および非天然のFc領域変異体に特異的に結合するためのこれらの組み合わせの使用、ならびにこれらの組み合わせを作製するための方法に、少なくとも部分的に基づいている。例えば、本発明者らは、CD16Aと抗体のFc領域の間の結合活性に影響を及ぼすアミノ酸部位をインシリコで抽出し、CD16Aおよび抗体のFc領域に変異が導入された変異体を調製し、かつ野生型に対する結合活性の変化を評価して、野生型に対する結合活性が低下していることを発見した(実施例1~4)。この発見に基づいて、本発明者らは、野生型CD16Aに対する結合活性は示さないが、非天然の変異させたCD16Aに対する高い結合活性を維持している、非天然のFc領域変異体を特定した。本発明者らはまた、野生型CD16Aに結合しない非天然の改変Fc領域と野生型抗体Fc領域に結合しない非天然の変異させたCD16Aとの組み合わせも特定した。様々な抗原に対する複数種の抗体を用いた場合に同様の結果が得られたことから、これらの特徴が抗原に応じて変わるのではないことも明らかにされた(実施例5~8)。本発明者らはさらに、野生型CD16Aまたは非天然の変異させたCD16Aを発現するナチュラルキラー(NK)細胞株を樹立し、抗体依存性細胞障害(ADCC)が、実施例6で確認される結合活性を反映することを確認した(実施例10、11)。さらに、本発明者らは、過剰量のIgG1抗体の存在下で、実施例6における結合活性特徴を確認した(実施例9)。

【0011】

本発明は、医学および産業界において有用であると予想される組成物および方法として、以下の局面を提供する。

10

20

30

40

50

【0012】

1つの局面において、本発明は、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを提供し、該改変Fc領域は、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む。このポリペプチドは、野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合することができる。

【0013】

いくつかの態様において、野生型または天然のFcγ受容体は、野生型または天然のCD16Aであり、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aである。

10

【0014】

いくつかの態様において、野生型または天然のCD16Aは、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む。

【0015】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される、少なくとも1つの変異を含む。

20

【0016】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む。他の態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異を含み、かつ、(iv)SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および(v)SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む。他の態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0017】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1の改変Fc領域を含み、該改変Fc領域は、(i)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、(ii)(a)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(b)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0018】

いくつかの態様において、ポリペプチドは抗体である。他の態様において、ポリペプチドは、がん抗原に結合する抗体である。

40

【0019】

別の局面において、本発明は、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防する方法を提供する。この方法は、本明細書において説明されるポリペプチドと、野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現する細胞とを、患者に投与する段階を含み、該ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む該非天然Fcγ受容体に結合することができる。

【0020】

いくつかの態様において、前記細胞はヒト免疫細胞である。他の態様において、ヒト免疫細胞は、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破

50

骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である。いくつかの態様において、前記細胞は幹細胞に由来する。他の態様において、幹細胞は、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される。いくつかの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。他の態様において、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である。

【0021】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中を含む。

【0022】

いくつかの態様において、前記細胞は、HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、HLA-1 α 鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。

【0023】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中を含む。いくつかの態様において、HLAクラスII関連遺伝子は、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される。

【0024】

いくつかの態様において、前記細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

【0025】

いくつかの態様において、前記方法は、がんを治療または予防するための方法である。

【0026】

1つの局面において、本開示は、本明細書において説明されるポリペプチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。

【0027】

いくつかの態様において、この薬学的組成物は、免疫療法のために細胞と併用するためのものであり、該細胞は、野生型または天然のFc γ 受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fc γ 受容体を発現し、ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fc γ 受容体に結合することができる。

【0028】

いくつかの態様において、前記細胞はヒト免疫細胞である。いくつかの態様において、ヒト免疫細胞は、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である。いくつかの態様において、前記細胞は幹細胞に由来する。いくつかの態様において、幹細胞は、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される。いくつかの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。いくつかの態様において、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である。

【0029】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中を含む。

【0030】

いくつかの態様において、前記細胞は、HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1

10

20

30

40

50

つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、HLA-1 α 鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。

【0031】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む。いくつかの態様において、HLAクラスII関連遺伝子は、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される。

10

【0032】

いくつかの態様において、前記細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

【0033】

別の局面において、本発明は、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するためのキットを提供する。このキットは、(i)本明細書において説明されるポリペプチドと(ii)野生型または天然のFc γ 受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fc γ 受容体を発現する細胞とを含み、該ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む該非天然Fc γ 受容体に結合することができる。

【0034】

20

いくつかの態様において、前記細胞はヒト免疫細胞である。いくつかの態様において、ヒト免疫細胞は、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である。いくつかの態様において、前記細胞は幹細胞に由来する。いくつかの態様において、幹細胞は、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される。いくつかの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。いくつかの態様において、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である。

【0035】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む。

30

【0036】

いくつかの態様において、前記細胞は、HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、HLA-1 α 鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。

【0037】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む。いくつかの態様において、HLAクラスII関連遺伝子は、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される。

40

【0038】

いくつかの態様において、前記細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

【0039】

1つの局面において、本発明は、野生型または天然のCD16Aと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aを発現する細胞を提供し、該少なくとも1つのアミノ

50

酸変異は、(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択され、かつ、該非天然CD16Aは、SEQ ID NO: 78に対して90%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0040】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む。

【0041】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む。

【0042】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異を含み、かつ、(iv)SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および(v)SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む。

【0043】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む。

【0044】

いくつかの態様において、前記細胞はヒト免疫細胞である。いくつかの態様において、ヒト免疫細胞は、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NKT細胞、NK細胞、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球、単球、および自然免疫細胞より選択される細胞である。いくつかの態様において、前記細胞は幹細胞に由来する。いくつかの態様において、幹細胞は、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、および胚性生殖細胞より選択される。いくつかの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。いくつかの態様において、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)または胚性幹細胞(ES細胞)である。

【0045】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊をβ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含む。

【0046】

いくつかの態様において、前記細胞は、HLA-1α鎖の少なくとも1つの部分に直接的またはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、HLA-1α鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。

【0047】

いくつかの態様において、前記細胞は、遺伝子操作による破壊をヒト白血球抗原(HLA)クラスII関連遺伝子中に含む。いくつかの態様において、HLAクラスII関連遺伝子は、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α鎖)、HLA-DPB(β鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBより選択される。

【0048】

いくつかの態様において、前記細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0049】

1つの局面において、本発明は、本明細書において説明される細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。

【0050】

いくつかの態様において、この薬学的組成物は、免疫療法のためにIgGの改変Fc領域を含むポリペプチドと併用するためのものであり、該改変Fc領域は、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、かつ、該ポリペプチドは、野生型または天然のCD16Aに対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ細胞によって発現される少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aに結合することができる。

10

【0051】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1の改変Fc領域を含み、該改変Fc領域は、(i)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、(ii)(a)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(b)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0052】

いくつかの態様において、ポリペプチドは抗体である。いくつかの態様において、ポリペプチドは、がん抗原に結合する抗体である。

20

【0053】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、がんを治療するためのものである。

【0054】

1つの局面において、本発明は、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを調製するための方法を提供する。この方法は、以下の段階を含む：(1)IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを提供する段階であって、該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；(2)野生型または天然のFcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階；(3)野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階；および(4)野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合するポリペプチドを、(1)で得られたポリペプチドより選択する段階。

30

【0055】

いくつかの態様において、野生型または天然のFcγ受容体は、野生型または天然のCD16Aであり、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aである。

【0056】

いくつかの態様において、野生型または天然のCD16Aは、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0057】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aは、(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される少なくとも1つの変異を含む。

【0058】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む。

50

【0059】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む。

【0060】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異を含み、かつ、(iv)SEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)および(v)SEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む。

【0061】

いくつかの態様において、IgGの改変Fc領域を含む非天然ポリペプチドは抗体である。いくつかの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。

【0062】

いくつかの態様において、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドは抗体であり、前記方法は、該抗体を、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階をさらに含む。

【0063】

別の局面において、本発明は、非天然Fcγ受容体を調製するための方法を提供する。この方法は、以下の段階を含む：(1)野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を提供する段階；(2)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドとを提供する段階；(3)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階；(4)少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階；および(5)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに結合する非天然Fcγ受容体を、(1)で得られた非天然Fcγ受容体より選択する段階。

【0064】

いくつかの態様において、Fcγ受容体はCD16Aである。

【0065】

いくつかの態様において、野生型または天然のFcγ受容体は、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aである。

【0066】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、IgGのFc領域は、野生型または天然のヒトIgγ1と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、ヒトIgγ1のFc領域であり、かつ(a)EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、(b)(i)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)および(ii)EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0067】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドは、抗体である。いくつかの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。

【0068】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドは抗体であり、前記方法は、(2)で得られた少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含む抗体を、(1)で得られた少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc

10

20

30

40

50

γ 受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階をさらに含む。

【0069】

別の局面において、本発明は、(a)IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドと、(b)非天然の改変Fcγ 受容体とを含む結合対を調製するための方法を提供する。この方法は、以下の段階を含む：(1)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドとを提供する段階であって、該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；(2)野生型または天然のFcγ 受容体および非天然の改変Fcγ 受容体を提供する段階であって、該改変Fcγ 受容体が、野生型または天然のFcγ 受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；(3)(1)で得られた各ポリペプチドに対する、(2)で得られた各Fcγ 受容体の結合活性を測定する段階；ならびに(4)(a)改変Fcγ 受容体に結合し、かつ野生型または天然のFcγ 受容体に対する結合活性を本質的に有していない改変Fc領域を含む、ポリペプチドと、(b)改変Fc領域を含むポリペプチドに結合しかつ野生型または天然のIgGのFc領域に結合しない、改変Fcγ 受容体とを選択する段階。

【0070】

いくつかの態様において、Fcγ 受容体はCD16Aである。

【0071】

いくつかの態様において、野生型または天然のCD16Aは、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む。

【0072】

いくつかの態様において、IgGの改変Fcを含むポリペプチドは、抗体である。いくつかの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。

【0073】

いくつかの態様において、(4)で選択されるIgGの改変Fc領域を含むポリペプチドは、抗体であり、前記方法は、該抗体を、(4)で選択される改変Fcγ 受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を測定する段階をさらに含む。

【0074】

特異的結合パターンを示す、変異誘発されたFcγ 受容体と変異誘発されたFc領域との組み合わせ、および内因性分子によって薬物有効性が低下しない、これらの組み合わせを用いる免疫療法を本発明が提供できることが、予想される。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】CD16VまたはCD16V変異体に対する野生型Fc型抗HER2抗体または変異Fc型抗HER2抗体の結合活性を示す。縦軸は、450nmでの吸光度と参照波長570nmでの吸光度との差を表し、横軸は、CD16VまたはCD16V変異体の濃度(ng/mL)を表す。

【図2】CD16VまたはCD16V変異体に対する野生型Fc型抗HER2抗体または変異Fc型抗HER2抗体の結合活性を示す。縦軸は、450nmでの吸光度と参照波長650nmでの吸光度との差を表し、横軸は、CD16VまたはCD16V変異体の濃度(ng/mL)を表す。

【図3】CD16VまたはCD16V変異体に対する野生型Fc型抗EGFR抗体または変異Fc型抗EGFR抗体の結合活性を示す。縦軸は、450nmでの吸光度と参照波長650nmでの吸光度との差を表し、横軸は、CD16VまたはCD16V変異体の濃度(ng/mL)を表す。

【図4】CD16VまたはCD16V変異体に対する野生型Fc型抗EpCAM抗体または変異Fc型抗EpCAM抗体の結合活性を示す。縦軸は、450nmでの吸光度と参照波長650nmでの吸光度との差を表し、横軸は、CD16VまたはCD16V変異体の濃度(ng/mL)を表す。

【図5】抗KLH抗体と競合する条件下での、CD16VまたはCD16V変異体に対する野生型Fc型抗HER2抗体または変異Fc型抗HER2抗体の結合活性を示す。縦軸は、450nmでの吸光度と参照波長650nmでの吸光度との差を表し、横軸は、CD16VまたはCD16V変異体の濃度(ng/mL)を表す。

【図6】フローサイトメトリーによって解析した、CD16Vを発現するKHYG-1細胞またはCD16V変異体を発現するKHYG-1細胞におけるCD16VまたはCD16V変異体の発現レベルを示す。縦軸が細胞数を表し、横軸が蛍光強度(CD16V発現レベル)を表す。図内の数字は、CD16VまたはCD16V変異体を発現している細胞の比率を示す。

【図7】抗HER2抗体の存在下での、HER2陽性SK-BR-3細胞に対するKHYG-1細胞のADCC活性を示す。縦軸は細胞障害活性(%)を表し、横軸は抗体濃度(ng/mL)を表す。

【図8】ヒト血清の存在下での、抗HER2抗体によって誘導された、HER2陽性SK-BR-3細胞に対するKHYG-1細胞のADCC活性を示す。縦軸は細胞障害活性(%)を表す。

【図9】抗HER2抗体の存在下での、HER2陽性SK-BR-3細胞に対するCD16V CAR-Tの細胞障害活性を示す。縦軸は細胞障害活性(%)を表し、横軸は抗体濃度(ng/mL)を表す。

10

【発明を実施するための形態】

【0076】

発明の詳細な説明

以下は、本発明の詳細な説明である。本発明はこの説明に限定されないことに留意されたい。本明細書において、本発明に関連して使用される科学用語および技術用語は、他に規定されない限り、当業者によって一般に理解される意味を有する。

【0077】

I 定義

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリンを意味し、ジスルフィド結合によって安定化された2本の重鎖(H鎖)および2本の軽鎖(L鎖)を含む生体分子を指す。重鎖は、重鎖可変領域(VH)、重鎖定常領域(CH1、CH2、CH3)、およびCH1とCH2の間に位置するヒンジ領域からなり、軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)および軽鎖定常領域(CL)からなる。これらのうちで、VHおよびVLから構成される可変領域断片(Fv)が、抗原結合に直接的に関与し、抗体に多様性を与える領域である。可変領域のうちで、抗原と直接的に接触する領域は、特に変化が大きく、相補性決定領域(CDR)として公知である。CDR以外の相対的に変異が少ない部分は、フレームワーク領域(FR)として公知である。軽鎖可変領域および重鎖可変領域はそれぞれ、3つのCDRを有しており、N末端側から順番に重鎖CDR1~CDR3および軽鎖CDR1~CDR3としてそれぞれ公知である。

20

【0078】

本明細書において使用される場合、「IgG」という用語は、5つのクラスの免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgE)のうちの1つを指す。IgGには、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4があり、これらの対応する重鎖は、Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、およびIg γ 4と呼ばれる。

30

【0079】

本明細書において使用される場合、「Fc領域」という用語は、抗体の重鎖中のヒンジ領域、CH2、およびCH3からなる領域、または抗体の重鎖中のCH2およびCH3からなる領域を意味する。Fc領域は、遺伝的多型を含み得る。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, NIH Publication No. 91-3242)。

40

【0080】

本明細書において使用される場合、「抗原結合断片」という用語は、抗原に結合することができる、抗体の断片を意味する。抗原結合断片の具体的な例には、VL領域、VH領域、CL領域、およびCH1領域からなるFab;2つのFabがヒンジ領域中のジスルフィド結合によって連結されているF(ab')₂;VLおよびVHからなるFv;VLとVHが人工ポリペプチドリンカーによって連結された単鎖抗体であるscFv;ならびにダイアボディ、単鎖ダイアボディ(scDb)、タンデムscFv、およびロイシンジッパーなどの二重特異性抗体が含まれる。

【0081】

本明細書において使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンア

50

ミノ酸配列を有する抗体を意味する。本明細書において、「ヒト化抗体」とは、CDR以外のアミノ酸残基の一部、大半、または全部が、ヒト免疫グロブリン分子に由来するアミノ酸残基によって置換されている、抗体を意味する。ヒト化の方法に対する特別な制限はなく、ヒト化抗体は、例えば米国特許第5225539号または米国特許第6180370号を参照して調製することができる。前述の各特許の内容全体が、参照により本明細書に組み入れられる。

【0082】

通常、完全長抗体のほかに、抗体には、完全長抗体、抗原結合断片、および/またはFc領域を組み合わせることによって構築される一アーム抗体(Proceedings of the National Academy of Sciences, (2013) 110 (32), pp. E2987-2996)、ならびに二重特異性抗体(Nature Reviews Drug Discovery, (2019) 18, pp. 585-608)など様々な形態の抗体が含まれる。

【0083】

本明細書において使用される抗体のアミノ酸残基の番号は、EU指標番号付与を用いて指定されており(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, NIH Publication No. 91-3242)、この番号付与方式に従って定めることができる。

【0084】

本明細書において使用される場合、「Fcγ受容体(FcγR)」という用語は、多くの免疫細胞において発現される、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質を意味する。FcγRは、IgGのFc領域に対する受容体タンパク質であり、IgGのFc領域に対する結合活性を有する。FcγRには、FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、FcγRIIIA(CD16A)、およびFcγRIIIB(CD16B)が含まれる。マクロファージおよび樹状細胞において発現されるFcγRI(CD64)は、IgGのFc領域に強い力で結合することが公知であり、単球および好中球上で発現されるFcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、およびFcγRIIC(CD32C)、ならびにマクロファージおよびNK細胞において発現されるFcγRIIIA(CD16A)およびFcγRIIIB(CD16B)は、IgGのFc領域に弱い力で結合することが公知である。CD16Aは、IgGのFc領域に結合することによってADCC(後述)の開始に関与していることが公知である。

【0085】

本明細書において使用される場合、「抗体依存性細胞障害(ADCC)作用」という用語は、抗体のFc領域に帰することができるエフェクター作用のうちの1つを意味する。ADCCは、標的細胞上の抗原ならびにマクロファージおよびNK細胞などの免疫細胞への抗体の結合を介して免疫細胞が標的細胞を破壊する作用である。免疫細胞への抗体の結合は、抗体のFc領域と免疫細胞のFcγ受容体とを介して起こる。ADCCは、Fcγ受容体IIIA(CD16A)へのFc領域の結合によって誘導される。

【0086】

本明細書において使用される場合、「併用」という用語は、様々な種類の活性な薬学的成分を治療のために同一対象に同時投与または個別投与することを意味する。併用する間、該様々な種類の活性な薬学的成分は、同じ組成物中に含まれてもよく、または異なる組成物中に別々に含まれてもよい。

【0087】

本明細書において使用される場合、「薬学的組成物」という用語は、1種または複数種の薬学的活性成分を含む単一の組成物を意味する。「複合薬」とは、異なる活性な薬学的成分が異なる組成物中に別々に含まれている、薬学的組成物の組み合わせを意味する。

【0088】

本明細書において使用される場合、「天然の」という用語は、いかなる人工的改変も人為的改変も伴わずに自然界に存在することを意味する。「天然の」および「野生型」は、同義的に使用されてよい。本明細書において、「非天然の」とは、自然界にもともとは存在しない人工的生成物または人為的生成物、例えば、その野生型または天然の生成物と比

10

20

30

40

50

べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む本発明の生成物を意味する。本発明の非天然のポリペプチドおよびFcγ受容体という文脈において、「非天然の」はまた、その野生型または天然の対応物に本質的に結合しないが、野生型または天然の対応物と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然の対応物には結合することも意味し得る。

【0089】

II 本発明のポリペプチド

本発明は、IgGのFc領域を含むポリペプチドであって、該Fc領域が、少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、かつ、該ポリペプチドが、野生型Fcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体に結合する、該ポリペプチドを提供する。

【0090】

このポリペプチドは、IgGのFc領域を含む。いくつかの態様において、IgGのFc領域は、ヒトIgGのFc領域であり、遺伝的多型を含み得る。いくつかの態様において、IgGのFc領域は、ヒトIgγ1のFc領域である。当業者は、UniProtなどの公的データベースからFc領域のアミノ酸配列を容易に入手することができる。本発明のポリペプチドは、IgGのFc領域を含む限り、任意の形態のポリペプチドであってよい。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体、および生体分子またはその断片とFc領域とのFc融合タンパク質であってよい。

【0091】

いくつかの態様において、ポリペプチドは抗体である。いくつかの態様において、ポリペプチドは、ヒト抗体およびヒト化抗体である。本発明において、「抗体」は、普通のIgG型抗体ならびに様々な形態の抗体、例えば、一アーム抗体および二重特異性抗体を、それらがFc領域を有している限り、含む。

【0092】

いくつかの態様において、Fc領域はIgGの改変Fc領域であり、かつ、Fc領域は、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む。本発明において、Fc領域中の「アミノ酸変異」とは、Fc領域中の所定のアミノ酸位置におけるアミノ酸の置換、欠失、または挿入を意味する。本発明において、ポリペプチドは、野生型Fcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体に結合する。本発明のポリペプチドのFc領域中のアミノ酸変異は、これらの結合特性を本発明のポリペプチドが示す限り、任意のアミノ酸変異であってよい。本発明の1つの態様において、Fc領域中のアミノ酸変異は、野生型Fcγ受容体へのFc領域の結合に関与しているFc領域内のアミノ酸残基におけるアミノ酸変異である。本発明の1つの態様において、Fc領域はヒトIgγ1のFc領域であり、かつ、Fc領域中のアミノ酸変異は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸233位、234位、235位、236位、237位、239位、265位、269位、294位、297位、299位、328位、および329位のアミノ酸より選択される少なくとも1つまたは複数のアミノ酸位置におけるアミノ酸変異である(Nature (2000) 406, pp. 267-273, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2015) 112, pp. 833-838)。本発明の1つの態様において、Fc領域はヒトIgγ1のFc領域であり、かつ、Fc領域中のアミノ酸変異は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸269位および294位のアミノ酸より選択される少なくとも1つまたは複数のアミノ酸位置におけるアミノ酸変異である。本発明の1つの態様において、Fc領域はヒトIgγ1のFc領域であり、かつ、Fc領域中のアミノ酸変異は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸269位および294位のアミノ酸より選択される1つまたは2つのアミノ酸位置におけるアミノ酸変異である。本発明の1つの態様において、変異を導入する前のヒトIgγ1定常領域は、SEQ ID NO: 24に示されるアミノ酸配列を含む。本発明の1つの態様において、変異を導入する前のヒトIgγ1 Fc領域は、SEQ ID NO: 24に示されるアミノ酸配列の配列1~330を含む。

10

20

30

40

50

【0093】

本発明のポリペプチドにおいて、標的Fcγ受容体中の「アミノ酸変異」とは、対応する野生型Fcγ受容体中の所定のアミノ酸位置におけるアミノ酸の置換、欠失、または挿入を意味する。野生型Fcγ受容体とは、遺伝的多型を含み得る天然のFcγ受容体を意味する。

【0094】

少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体は、野生型Fcγ受容体のアミノ酸配列と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含むアミノ酸配列を含む。本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体は、野生型Fcγ受容体のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体は、野生型Fcγ受容体のアミノ酸配列と比べて5個、4個、3個、2個、または1個のアミノ酸変異を含む。

10

【0095】

本明細書において使用される場合、「同一性」という用語は、初期設定において提供されるパラメーターを用いてEMBOSS Needle(Nucleic Acids Res. (2015) 43, pp. W580-W584)によって得られる同一性の値を意味する。

これらのパラメーターは、以下のとおりである。

ギャップ開始ペナルティ=10

ギャップ伸長ペナルティ=0.5

マトリックス=EBLOSUM62

20

【0096】

本発明のポリペプチドとFcγ受容体との結合特性は、任意の公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。例えば、結合活性は、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて測定することができる。1つの実施例において、以下の段階を実施して、本発明のポリペプチドとFcγ受容体との結合特性を確認することができる。野生型Fcγ受容体および少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を、本発明のポリペプチドが標的とするFcγ受容体として調製する。少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc領域を含むポリペプチド(例えば抗体)を、調製する。該ポリペプチドが標的とするタンパク質(例えば抗原タンパク質)をELISAプレート上に固定し、該ポリペプチドを添加し、これと反応させる。該ポリペプチドと反応させた後に、各Fcγ受容体を添加し反応させる。これらの反応後、二次抗体、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などの酵素で標識された抗Fcγ受容体抗体を反応させる。これらの反応後、洗浄作業を実施し、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc領域を含む抗体が野生型Fcγ受容体および1つまたは複数のアミノ酸変異を含むFcγ受容体に結合するか否かを評価できるように、この活性を検出する試薬(例えば、HRP標識の場合はTMB試薬(DAKO、カタログS1599))を用いて活性を測定することにより、二次抗体の結合を確認する。使用される具体的な評価方法は、下記の実施例4で説明する方法であってよい。

30

【0097】

本明細書において使用される場合、野生型Fcγ受容体に対する「結合活性を本質的に有していない」という表現は、野生型Fcγ受容体に対する本発明のポリペプチドの結合活性が、本発明のポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体に対する本発明のポリペプチドの結合活性より有意に高くはないことを意味する。本発明の1つの態様において、野生型Fcγ受容体に対する「結合活性を本質的に有していない」状態が、ELISA方法を用いて測定される場合、これは、対照として使用される、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体に対する結合活性の10%もしくはそれ未満、5%もしくはそれ未満、3%もしくはそれ未満、2%もしくはそれ未満、1%もしくはそれ未満、0.5%もしくはそれ未満、0.1%もしくはそれ未満、または0.05%もしくはそれ未満である。

40

【0098】

50

本発明のポリペプチドが標的とするFcγ受容体は、本発明のポリペプチドの意図される用途および他の因子に基づいて当業者によって選択され得る。本発明の1つの態様において、Fcγ受容体は、FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、FcγRIIIA(CD16A)、またはFcγRIIIB(CD16B)であり得る。本発明の1つの態様において、本発明のポリペプチドが標的とするFcγ受容体はCD16である。本発明の1つの態様において、Fcγ受容体はCD16Aである。野生型CD16Aには、2つの遺伝的多型、すなわちCD16A V158 およびCD16A F158が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本発明の1つの態様において、野生型CD16AはCD16A V158である。

【0099】

本発明のポリペプチドについての1つの態様において、標的Fcγ受容体はCD16Aであり、野生型CD16Aは、SEQ ID NO: 78に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0100】

本発明のポリペプチドについての1つの態様において、標的Fcγ受容体は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aであり、該少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、およびSEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される少なくとも1つの変異を含む。本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む。本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む。本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、K131D変異とSEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)およびSEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

20

【0101】

本明細書において使用される場合、SEQ ID NO: 78中のある位置「に対応する位置」という用語は、BLASTなどの配列アラインメントプログラムを用いてCD16Aのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 78のアミノ酸配列とアラインした場合に、CD16A中のそのアミノ酸位置が、SEQ ID NO: 78中のそのアミノ酸位置と同じ位置に合っていることを意味する。

30

【0102】

本発明の1つの態様において、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aは、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む。

【0103】

本発明の1つの態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO: 78のアミノ酸配列を含むCD16Aに対する結合活性を本質的に有しておらず、かつSEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aに結合する。

40

【0104】

本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1のFc領域を含み、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸269位および294位のアミノ酸より選択される少なくとも1つまたは複数のアミノ酸位置に、アミノ酸変異を含む。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1のFc領域を含み、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸269位および294位のアミノ酸より選択される1つまたは2つのアミノ酸位置に、アミノ酸変異を含む。

【0105】

50

本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1のFc領域を含み、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところの269位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところの294位に対応する位置におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0106】

本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドが標的とするFcγ受容体に関するアミノ酸配列情報は、UniProtなどの公的データベースから入手することができ、かつ、当業者に公知である任意の方法を用いるか、または本明細書において説明される方法を用いて、このアミノ酸配列情報に基づいてそれらを容易に調製することができる。

10

【0107】

本発明のポリペプチドが抗体である場合、任意の抗原に対する抗体を使用することができる。本発明のポリペプチドが抗体である場合、該抗体は、当業者に公知である任意の抗体調製方法に従い、標的抗原を用いて免疫化することによって得ることができ、または、公知の抗体のFc領域にアミノ酸変異を導入することによって調製することができる。

【0108】

本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、がん抗原に結合する抗体である。本発明のポリペプチドを調製するために使用できる公知の抗体には、抗CD19抗体(タファシタマブ、Drug Bankアクセション番号:DB15044)、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体が含まれる。

20

【0109】

本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1のFc領域を含む、抗CD19抗体、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体であり、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0110】

30

III アミノ酸変異を含むCD16Aを発現する細胞

本発明はまた、本発明のポリペプチドと組み合わせて使用できるCD16A発現細胞も提供する。

【0111】

1つの局面において、本発明は、野生型または天然のCD16Aと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然CD16Aを発現する細胞を提供し、該少なくとも1つのアミノ酸変異は、(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(ii)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(iii)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択され、かつ、該非天然CD16Aは、SEQ ID NO: 78に対して90%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0112】

本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞によって発現されるCD16Aは、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含む。本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞によって発現されるCD16Aは、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含む。本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞によって発現されるCD16Aは、K131D変異とSEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)およびSEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択

50

される少なくとも1つの変異とを含む。

【0113】

本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞によって発現されるCD16Aは、SEQ ID NO: 78のアミノ酸配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0114】

本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞によって発現されるCD16Aは、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含む。

【0115】

本発明のCD16A発現細胞として使用される細胞は、本発明のポリペプチドと共に使用することによって免疫応答を調節(例えば、誘導または抑制)することができる限り、任意の細胞であり得る。細胞は、自然免疫系または獲得免疫系の免疫細胞であってよく、例には、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球(好中球、好酸球、および好塩基球を含む)、単球、樹状細胞、T細胞、ならびにB細胞などが含まれる。本発明の1つの態様において、細胞は、ヒト起源の細胞である。本発明の1つの態様において、細胞はヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、ヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

【0116】

本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞として使用される細胞は、限定されるわけではないが、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、もしくは胚性生殖細胞を含む、幹細胞、またはそのような幹細胞に由来する細胞、例えば、前述の免疫細胞であってよい。本発明の1つの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)もしくは胚性幹細胞(ES細胞)であってよく、かつヒト起源のものであってよい。iPS細胞またはES細胞は、当業者が任意の公知の方法を用いて調製することができる。iPS細胞またはES細胞などの幹細胞を本発明のCD16A発現細胞に分化させるために使用する方法は、当業者に公知である任意の方法であり得る。本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞は、多能性幹細胞に由来するヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、多能性幹細胞に由来するヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

【0117】

本発明の1つの態様において、幹細胞は、NK細胞による同種応答および溶解を回避するように幹細胞が遺伝子編集されているユニバーサルドナー細胞であってよい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2012/145384において説明されているように、HLAクラスI分子の発現をなくすために、遺伝子操作による破壊をβ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含んでよい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、HLA-1α鎖の少なくとも1つの部分に直接的にまたはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。1つの態様において、HLA-1α鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。WO 2012/145384も参照されたい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、例えば、同じくその全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2013/158292において説明されているように、HLAクラスII遺伝子の発現に必要とされる転写因子、例えば、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α鎖)、HLA-DPB(β鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBのうちの1つまたは複数をノックアウト

10

20

30

40

50

トすることによる、遺伝子操作による破壊を、HLAクラスII関連遺伝子中に付加的に含んでよい。細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドも、さらに含んでよい。WO 2013/158292も参照されたい。本発明の1つの態様において、ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aを発現する。本発明の1つの態様において、ユニバーサルドナー細胞は、iPS細胞またはES細胞であり、CD16A発現細胞は、そのようなユニバーサルドナー細胞に由来する細胞、例えば、前述の免疫細胞である。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、ユニバーサルドナー細胞に由来するヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、ユニバーサルドナー細胞に由来するヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

10

【0118】

本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞を、単離および/または精製することができる。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、不死化細胞または樹立細胞株であり、当業者は、公知である任意の方法を用いて、この不死化細胞または樹立細胞株を調製することができる。本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞として使用される細胞は、ヒト起源の不死化細胞または樹立細胞株である。本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞として使用される細胞は、患者に由来する細胞である。

【0119】

本発明の1つの態様において、本発明のCD16A発現細胞は、CD16Aを外因的に発現する細胞である。本発明のCD16A発現細胞は、所望のアミノ酸変異を含むCD16Aをコードする遺伝子を細胞中に導入することにより、調製することができる。例えば、遺伝子は、ヌクレオチド配列に基づき、ホスホロアミダイト法を用いて合成することができ、または、cDNAライブラリーから得たDNA断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて組み合わせることによって調製することができる。標的遺伝子は、cDNAの形態の該遺伝子を含む発現ベクターを用いて、細胞中に導入することができる。該遺伝子はまた、mRNAの形態のポリヌクレオチドを用いて細胞中に導入することもできる。あるいは、標的遺伝子は、エレクトロポレーションまたはリポフェクションなどの方法を用いて、細胞中に直接的に導入してもよい。標的遺伝子を細胞中に導入した後、この細胞を培養し増殖させてよい。

20

30

【0120】

本発明のCD16A発現細胞を調製するために使用される発現ベクターは、アミノ酸変異を含むCD16Aなどの標的タンパク質を標的細胞中で発現することができる限り、特に制限されない。使用され得る発現ベクターの例には、プラスミドベクター(例えば、Thermo Fisher ScientificのpcDNAシリーズ、PromegaのpALTER(登録商標)-MAXベクター、およびTakaraのpHEK293 Ultra発現ベクター)またはウイルスベクター(例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルス)が含まれる。ウイルスベクターの作製では、レンチウイルスの作製で使用されるpLVSIIN-CMV/EF1 α ベクター(Takara Bio)またはpLentiベクター(Thermo Fisher Scientific)を使用することができる。

40

【0121】

発現ベクターは、開始コドンおよび停止コドンを含むことができる。この場合、発現ベクターは、エンハンサー配列、非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニル化部位、または複製可能な単位を含んでよい。発現ベクターは、標的遺伝子の発現を確認するためのマーカーとして働くことができる遺伝子(例えば、薬物耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、または蛍光タンパク質をコードする遺伝子)を含んでよい。

【0122】

本発明のCD16A発現細胞を得るかまたは維持するために、公知の方法によって培養を実施することができる。使用できる基本培地の例には、MEM培地(Science (1955) 1

50

22, pp.501-504)、DMEM培地(Virology (1959) 8, pp. 396-397)、RPMI1640培地(The Journal of the American Medical Association (1967) 199, pp. 519-524)、199培地(Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (1950) 73, pp. 1-8)、FreeStyle(商標)293発現培地(Thermo Fisher Scientific、カタログ12338026)、CD293培地(Thermo Fisher Scientific、カタログ11913019)、またはExpi293(商標)発現培地(Thermo Fisher Scientific、カタログA1435101)が含まれる。培地は、血清(例えばウシ胎児血清:FBS)、血清代替品(例えばノックアウト血清代替品:KSR)、脂肪酸または脂質、アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、および抗生物質もまた含んでよい。本発明の1つの態様において、培地は、無血清培地または合成培地である。培養条件(培養時間、温度、培地のpH、およびCO₂濃度など)は、当業者が適宜選択することができる。培地のpHは、好ましくは約6~8である。培養温度に特別な制限はないが、約30~40℃、好ましくは約37℃の培養物を使用することができる。CO₂濃度は、約1~10%、および好ましくは約5%であり得る。培養時間に特別な制限はないが、約15~336時間であり得る。必要に応じて、培養物に通気するか、または培養物を攪拌することができる。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどの薬物によって誘導される誘導性プロモーターが使用される場合は、該薬物を含む培地中で細胞を培養し、次いで、がん抗原など、誘導性プロモーターに機能的に連結された遺伝子の発現を誘導する段階が、含まれてよい。この段階は、一般的な遺伝子導入系を用いる遺伝子誘導方法に従って実施することができる。

10

20

【0123】

IV 免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療および予防するための方法

本発明はまた、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するための方法も提供する。この方法は、本発明のポリペプチドと少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を発現する細胞とを患者に投与する段階を含み、該ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む該非天然Fcγ受容体に結合することができる。

【0124】

本明細書において、「免疫療法」という用語は、外来性の細菌、ウイルス、およびがん細胞などの外来物質を排除するために自己/非自己認識免疫細胞の機能を用いて、自己免疫疾患、がん、および様々な細菌またはウイルスによって引き起こされる感染症を予防または治療するための方法を意味する。

30

【0125】

本発明の治療方法で使用される細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞であり、該Fcγ受容体は、本発明のポリペプチドに結合することができる。Fcγ受容体を発現する細胞は、本発明のポリペプチドと共に使用することによって免疫応答を調節(例えば、誘導または抑制)することができる限り、任意の細胞であり得る。細胞は、自然免疫系または獲得免疫系の免疫細胞であってよく、例には、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、ミクログリア、破骨細胞、顆粒球(好中球、好酸球、および好塩基球を含む)、単球、樹状細胞、T細胞、ならびにB細胞などが含まれる。本発明の1つの態様において、細胞は、ヒト起源の細胞である。本発明の1つの態様において、細胞はヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、ヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

40

【0126】

本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞、例えば前述の免疫細胞は、限定されるわけではないが、多能性幹細胞、造血幹細胞、成体幹細胞、胎児幹細胞、間葉系幹細胞、分娩後幹細胞、複能性幹細胞、または胚性生殖細胞を含む、幹細胞に由来してよい。本発明の1つの態様において、幹細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現するように操作され、該Fcγ受容体は、本発明のポリペプチドに結合することができる。本発明の1つの態様において、幹細胞は多能性幹細胞である。多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)もしくは胚性幹細胞(ES細胞)であってよく

50

、かつヒト起源のものであってよい。iPS細胞またはES細胞は、当業者が任意の公知の方法を用いて調製することができる。iPS細胞またはES細胞などの幹細胞を、本発明の治療方法で使用される細胞に分化させるために使用する方法は、当業者に公知である任意の方法であり得る。本発明の1つの態様において、細胞は、多能性幹細胞に由来するヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、多能性幹細胞に由来するヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

【0127】

本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、NK細胞による同種応答および溶解を回避するように幹細胞が遺伝子編集されているユニバーサルドナー細胞に由来してよい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2012/145384において説明されているように、HLAクラスI分子の発現をなくすために、遺伝子操作による破壊を β -2ミクログロブリン(B2M)遺伝子中に含んでよい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、HLA-1 α 鎖の少なくとも1つの部分に直接的にまたはリンカー配列を介してのいずれかで共有結合した、B2Mタンパク質の少なくとも1つの部分を含む、単鎖融合ヒト白血球抗原(HLA)クラスIタンパク質を、コードすることができるポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。1つの態様において、HLA-1 α 鎖は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、およびHLA-Gより選択される。WO 2012/145384も参照されたい。ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、例えば、同じくその全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2013/158292において説明されているように、HLAクラスII遺伝子の発現に必要とされる転写因子、例えば、調節因子X関連アンキリン含有タンパク質(RFXANK)、調節因子5(RFX5)、調節因子X関連タンパク質(RFXAP)、クラスIIトランス活性化因子(CIITA)、HLA-DPA(α 鎖)、HLA-DPB(β 鎖)、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DRA、HLA-DRB、HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、およびHLA-DOBのうちの1つまたは複数をノックアウトすることによる、遺伝子操作による破壊を、HLAクラスII関連遺伝子中に付加的に含んでよい。細胞は、単鎖融合HLAクラスIIタンパク質またはHLAクラスIIタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドも、さらに含んでよい。WO 2013/158292も参照されたい。別の態様において、ユニバーサルドナー細胞および該ユニバーサルドナー細胞に由来する細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc γ 受容体を発現するように操作され、該Fc γ 受容体は、本発明のポリペプチドに結合することができる。本発明の1つの態様において、ユニバーサルドナー細胞は、iPS細胞またはES細胞である。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、ユニバーサルドナー細胞に由来するヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、ユニバーサルドナー細胞に由来するヒトNK細胞またはヒトT細胞である。

【0128】

本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞を、単離および/または精製することができる。ここで、「単離」とは、生体組織からの分離を意味し、「精製」とは、細胞が由来する組織中の1種または複数種の付加的な構成要素から該細胞を分離することを意味する。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、不死化細胞または樹立細胞株であり、当業者は、公知である任意の方法を用いて、この不死化細胞または樹立細胞株を調製することができる。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、ヒト起源の不死化細胞または樹立細胞株である。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞は、患者に由来する細胞である。

【0129】

本発明の治療方法で使用される細胞において発現されるFc γ 受容体は、本発明のポリペプチドが標的とするFc γ 受容体であり、本発明のポリペプチドの意図される用途および他の因子に基づいて当業者によって選択され得る。本発明の1つの態様において、Fc γ

受容体は、FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、FcγRIIIA(CD16A)、またはFcγRIIIB(CD16B)であり得る。本発明の1つの態様において、本発明のポリペプチドが標的とするFcγ受容体はCD16である。本発明の1つの態様において、Fcγ受容体はCD16Aである。CD16Aには、2つの遺伝的多型、すなわちCD16A V158およびCD16A F158が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本発明の1つの態様において、CD16AはCD16A V158である。

【0130】

本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞によって発現されるFcγ受容体は、SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、およびSEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aである。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞によって発現されるFcγ受容体は、K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含むCD16Aである。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞によって発現されるFcγ受容体は、K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含むCD16Aである。本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞によって発現されるFcγ受容体は、K131D変異とSEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)およびSEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含むCD16Aである。

【0131】

本発明の1つの態様において、本発明の治療方法で使用される細胞によって発現されるFcγ受容体は、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aである。

【0132】

本発明の1つの態様において、治療方法は、(A)ヒトIgγ1のFc領域を含むポリペプチドであって、該Fc領域が、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む、該ポリペプチドと；(B)(i)(a)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、(b)SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、および(c)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される少なくとも1つの変異を含むCD16Aを発現する細胞；(ii)K131D変異およびK128E変異の一方または両方を含むCD16Aを発現する細胞；(iii)K131E変異およびK128E変異の一方または両方を含むCD16Aを発現する細胞；ならびに(iv)K131D変異とSEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)およびSEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含むCD16Aを発現する細胞より選択される細胞とを、患者に投与する段階を含む。

【0133】

本発明の1つの態様において、治療方法は、(A)ヒトIgγ1のFc領域を含むポリペプチドであって、該Fc領域が、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変

異とを含む、該ポリペプチドと、(B)SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aを発現する細胞とを、患者に投与する段階を含む。

【0134】

本発明の1つの態様において、治療方法で使用されるポリペプチドは、抗体である。本発明の1つの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。本発明の1つの態様において、治療方法で使用されるポリペプチドは、Fc領域を有する、抗CD19抗体、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体であり、該Fc領域は、ヒトIgγ1のFc領域であり、かつEU指標番号付与によるヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0135】

本発明の治療方法で使用される少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞は、目的とするアミノ酸変異を含むFcγ受容体をコードする遺伝子を細胞中に導入することにより、調製することができる。アミノ酸変異を含むFcγ受容体をコードする遺伝子は、標準的な分子生物学および/または化学的技術を用いて調製することができ、その際、標的Fcγ受容体のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をNCBI参照配列IDまたはGenBankアクセッション番号から取得し、このヌクレオチド配列を用いて、目的とするアミノ酸変異を含むFcγ受容体をコードする遺伝子の配列を設計する。細胞への該遺伝子の導入および該細胞の培養は、当業者に公知である任意の方法および本明細書において説明する方法を用いて実施することができる。

【0136】

本発明の治療方法の対象となる疾患に特別な制限はなく、細菌感染症、ウイルス感染症、自己免疫疾患、およびがんであり得る。本発明の1つの態様において、治療方法は、がんを治療または予防するために使用される。本発明の1つの態様において、治療方法は、がん免疫療法を用いる、患者に対する治療方法または予防方法である。本明細書において、「がん免疫療法」とは、体内に存在するがん細胞を免疫によって外来物質であると特定し、かつそれらを排除するのに関与する免疫細胞を、活性化するかまたは増殖させることによって、がんを予防または治療するための方法を意味する。

【0137】

本発明の方法において、本発明のポリペプチドと、該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞とを、当業者に公知である任意の方法を用いて、免疫療法を必要とする対象に投与することができる。本発明のポリペプチドを対象に投与する場合、本発明のポリペプチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物の形態で、それらを対象に投与することができる。該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞を対象に投与する場合、該細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物の形態で、それらを対象に投与することができる。本発明の治療方法において、本発明のポリペプチド、該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を、対象に投与することができる。本明細書において説明される薬学的組成物を、使用することができる。

【0138】

対象に投与される、本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞の用量および投与回数は、標的疾患、治療される対象の年齢、体重、および状態、剤形、本発明のポリペプチドの種類および力価、ならびに本発明の治療方法において使用される細胞の種類に応じて、適宜調整することができる。本発明のポリペプチドの用量は、例えば、約0.001mg/kg～100mg/kg

であり得る。本方法で使用される細胞の用量は、例えば、対象への投与1回につき 1×10^3 細胞/kg $\sim 1 \times 10^9$ 細胞/kgであり得る。

【0139】

本発明のポリペプチドおよび方法において使用される細胞は、任意の適切な投与経路によって、例えば、静脈内注射、腫瘍内注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または動脈内注射によって、対象に投与することができる。

【0140】

本発明の方法において、対象に投与される、本発明のポリペプチドおよび該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc γ 受容体を発現する細胞は、同時に、連続的に、または逐次的に投与することができる。本発明の1つの態様において、対象への本発明のポリペプチドの投与が開始され、次いで、本発明の治療方法で使用される細胞の投与が開始される。本発明の1つの態様において、対象への本発明の治療方法で使用される細胞の投与が開始され、次いで、本発明のポリペプチドの投与が開始される。本発明の1つの態様において、対象への本発明のポリペプチドの投与が完了し、次いで、本発明の治療方法で使用される細胞の投与が開始される。本発明の1つの態様において、対象への本発明の治療方法で使用される細胞の投与が完了し、次いで、本発明のポリペプチドの投与が開始される。

【0141】

V 本発明の薬学的組成物および複合薬

本発明はさらに、以下の薬学的組成物および複合薬も提供する：

- (1)本発明のポリペプチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物；
 - (2)本発明のCD16A発現細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物；
 - (3)本発明のポリペプチド、該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc γ 受容体を発現する細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物；
- ならびに
- (4)本発明のポリペプチドと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物、および該ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc γ 受容体を発現する細胞と薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物の、複合薬。

【0142】

本発明の複合薬は、構成要素である各薬学的組成物が単一の包装容器中に含まれているキットの形態であってよい。

【0143】

本発明の薬学的組成物は、当技術分野において一般的な賦形剤、すなわち薬学的に許容される賦形剤、または薬学的に許容される担体を用いて、当技術分野において一般的な方法によって調製することができる。これらの薬学的組成物の剤形は、注射剤または輸液などの非経口薬剤であり得る。製剤化の間、剤形に適切な賦形剤、担体、および添加剤は、薬学的に許容される範囲内で使用することができる。

【0144】

(1)の薬学的組成物についての1つの態様において、(1)の薬学的組成物は、免疫療法による患者に対する治療方法または予防方法において細胞と併用するための薬学的組成物であり、該細胞は、ポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFc γ 受容体を発現する細胞である。本発明の1つの態様において、細胞はヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、ヒト免疫細胞は、ヒトT細胞またはヒトNK細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16A発現細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、本発明のCD16A発現細胞である。

【0145】

本発明の1つの態様において、(1)の薬学的組成物は、ヒトIg γ 1のFc領域を含むポリペプチドを含む薬学的組成物であってよく、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIg γ 1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIg γ 1定常領域内の294位におけるグルタ

ミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異を含み、かつ、該薬学的組成物は、以下より選択される細胞と併用するための薬学的組成物である：

(i)SEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからアスパラギン酸への変異(K131D変異)、SEQ ID NO: 78の128位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K128E変異)、およびSEQ ID NO: 78の131位に対応する位置におけるリジンからグルタミン酸への変異(K131E変異)より選択される少なくとも1つの変異を含むCD16Aを発現する細胞；

(ii)K131D変異およびK128E変異の一方もしくは両方を含むCD16Aを発現する細胞；

(iii)K131E変異およびK128E変異の一方もしくは両方を含むCD16Aを発現する細胞；または

(iv)K131D変異とSEQ ID NO: 78の38位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N38Q変異)およびSEQ ID NO: 78の74位に対応する位置におけるアスパラギンからグルタミンへの変異(N74Q変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含むCD16Aを発現する細胞。

【0146】

本発明の1つの態様において、(1)の薬学的組成物は、ヒトIgγ1のFc領域を含むポリペプチドを含む薬学的組成物であり、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含み、かつ、該薬学的組成物は、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、またはSEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCD16Aを発現する細胞と併用するための薬学的組成物である。

【0147】

本発明の1つの態様において、(1)の薬学的組成物中で使用されるポリペプチドは、抗体である。本発明の1つの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。本発明の1つの態様において、(1)の薬学的組成物中で使用されるポリペプチドは、Fc領域を有する、抗CD19抗体、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体であり、該Fc領域は、ヒトIgγ1のFc領域であり、かつEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0148】

(2)の薬学的組成物についての1つの態様において、(2)の薬学的組成物は、免疫療法によって患者の疾患または障害を治療または予防する際にポリペプチドと併用するための薬学的組成物であり、該ペプチドはIgGのFc領域を含むポリペプチドであり、該Fc領域は少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、かつ、該ポリペプチドは、野生型CD16Aに対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ細胞において発現される少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aに結合する。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、ヒトIgγ1のFc領域を含み、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは抗体である。本

発明の1つの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、Fc領域を有する、抗CD19抗体、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体であり、該Fc領域は、ヒトIgY1のFc領域であり、かつEU指標番号付与によるところの269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0149】

(3)の薬学的組成物についての1つの態様において、(3)の薬学的組成物は、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を予防および治療するための薬学的組成物である。(4)の複合薬についての1つの態様において、(4)の複合薬は、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を予防および治療するための複合薬である。

【0150】

(3)の薬学的組成物および(4)の複合薬についての1つの態様において、本発明のポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞は、ヒト免疫細胞である。本発明の1つの態様において、ヒト免疫細胞は、ヒトT細胞またはヒトNK細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aを発現する細胞である。本発明の1つの態様において、細胞は、本発明のCD16A発現細胞である。

【0151】

(3)の薬学的組成物および(4)の複合薬についての1つの態様において、本発明のポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞が本発明のCD16A発現細胞である場合、本発明のポリペプチドはIgGのFc領域を含み、該Fc領域は、EU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、EU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは抗体である。本発明の1つの態様において、抗体は、がん抗原に結合する抗体である。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、Fc領域を有する、抗CD19抗体、抗HER2抗体、抗EpCAM抗体、または抗EGFR抗体であり、該Fc領域は、ヒトIgY1のFc領域であり、かつEU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の269位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E269R変異)と、ヒトIgY1定常領域におけるヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からアルギニンへの変異(E294R変異)およびEU指標番号付与によるところのヒトIgY1定常領域内の294位におけるグルタミン酸からリジンへの変異(E294K変異)より選択される少なくとも1つの変異とを含む。

【0152】

特別な制限はないが、本発明の薬学的組成物または複合薬は、細菌感染症、ウイルス感染症、自己免疫疾患、およびがんを治療または予防するために使用することができる。

【0153】

本発明はまた、CD16A発現細胞と本明細書において説明されるポリペプチドとの以下の組み合わせも提供する。

(1)本発明のポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞と併用される、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するための、本発明のポリペプチド。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、がんを治療または予防するために使用される。

(2)野生型CD16Aに対する結合活性を本質的に有していないが、本発明のCD16A発現細胞において発現される少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aに結合することが

10

20

30

40

50

できるIgGのFc領域を含むポリペプチドと併用される、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するための、本発明のCD16A発現細胞。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、がんを治療または予防するために使用される。

(3)本発明のポリペプチドが結合する少なくとも1つのアミノ酸変異を含むFcγ受容体を発現する細胞と併用される、免疫療法を用いて患者の疾患または障害を治療または予防するための薬学的組成物の生産における、本発明のポリペプチドの使用。本発明の1つの態様において、ポリペプチドは、がんを治療または予防するために使用される。

(4)野生型CD16Aに対する結合活性を本質的に有していないが、本発明のCD16A発現細胞において発現される少なくとも1つのアミノ酸変異を含むCD16Aに結合することができるIgGのFc領域を含むポリペプチドと併用される、免疫療法を用いて患者の障害を治療または予防するための薬学的組成物の生産における、本発明のCD16A発現細胞の使用。本発明の1つの態様において、CD16A発現細胞は、細菌感染症、ウイルス感染症、自己免疫疾患、および/またはがんを治療または予防するために使用される。

10

【0154】

本発明のポリペプチドおよび本発明のCD16A発現細胞に関する態様は、本発明の薬学的組成物および複合薬についてのこの説明に、同様に当てはまる。

【0155】

VI IgGの改変Fc領域、改変Fcγ受容体、およびそれらの組み合わせを調製する方法

本発明はまた、1つの局面において、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを得るための方法も提供し、該方法は、以下の段階を含む：

20

(1)IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドを提供する段階であって、該改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；

(2)野生型または天然のFcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階；

(3)野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に対する、(1)で得られたポリペプチドの結合活性を測定する段階；および

(4)野生型または天然のFcγ受容体に対する結合活性を本質的に有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体に結合するポリペプチドを、(1)で得られたポリペプチドより選択する段階。

30

【0156】

いくつかの態様において、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドは、抗体である。段階(4)は、抗体を、Fcγ受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ次いで、ADCC活性を測定する段階をさらに含んでよい。

【0157】

本発明のポリペプチドおよび方法で使用される本発明のCD16A発現細胞に関する態様は、本発明のポリペプチドについてのこの説明に、同様に当てはまる。

【0158】

別の局面において、本発明は、非天然Fcγ受容体を調製するための方法を提供する。この方法は、以下の段階を含む：

40

(1)野生型または天然のFcγ受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む非天然Fcγ受容体を提供する段階；

(2)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、野生型または天然のIgGと比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドとを提供する段階；

(3)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階；

(4)少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する、(1)で得られた非天然Fcγ受容体の結合活性を測定する段階；および

(5)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドに対する結合活性を本質的に

50

有しておらず、かつ少なくとも1つのアミノ酸変異を含むIgGのFc領域を含むポリペプチドに結合する非天然Fc γ 受容体を、(1)で得られた非天然Fc γ 受容体より選択する段階。

【0159】

本発明のポリペプチドおよび方法で使用する本発明のCD16A発現細胞に関する態様は、本発明のポリペプチドについてのこの説明に、同様に当てはまる。

【0160】

1つの局面において、本発明は、(a)IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドと(b)非天然の改変Fc γ 受容体とを含む結合対を調製するための方法を提供する。この方法は、以下の段階を含む：

(1)野生型または天然のIgGのFc領域を含むポリペプチドと、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドとを提供する段階であって、該IgGの改変Fc領域が、非天然であり、かつ野生型または天然のIgGのFc領域と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；

(2)野生型または天然のFc γ 受容体および非天然の改変Fc γ 受容体を提供する段階であって、該改変Fc γ 受容体が、野生型または天然のFc γ 受容体と比べて少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、段階；

(3)(1)で得られた各ポリペプチドに対する、(2)で得られた各Fc γ 受容体の結合活性を測定する段階；ならびに

(4)(a)改変Fc γ 受容体に結合し、かつ野生型または天然のFc γ 受容体に対する結合活性を本質的に有していない改変Fc領域を含む、ポリペプチド、および(b)改変Fc領域を含むポリペプチドに結合し、かつ野生型または天然のIgGのFc領域に結合しない改変Fc γ 受容体を選択する段階。

【0161】

いくつかの態様において、IgGの改変Fc領域を含むポリペプチドは、抗体である。段階(4)は、抗体を、Fc γ 受容体を発現する免疫細胞および該抗体が結合する抗原を発現する細胞と接触させ、かつ次いで、ADCC活性を測定する段階をさらに含んでよい。

【0162】

本発明のポリペプチドおよび方法で使用する本発明のCD16A発現細胞に関する態様は、本発明のポリペプチドについてのこの説明に、同様に当てはまる。

【0163】

前述の方法において、各段階は、当業者に公知である任意の方法または本明細書において説明する方法を用いて当業者が実施することができる。

【0164】

次に、本発明をさらに理解するために、具体的な実施例を参照用に提供するが、これらは例示のみを目的として提供され、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例】

【0165】

ヒトCD16Aには、2つの遺伝的多型、すなわちCD16A V158 およびCD16A F158 がある。抗体Fcに対する結合活性が高い方のCD16A V158(以下「CD16V」)を用いて、以下の実施例を実施した。市販のキットまたは試薬を用いる実験は、方法が具体的に説明される場合を除いて、添付のプロトコールに従うことにより実施した。

【0166】

実施例1：コンピューターによる計算を用いるタンパク質設計

複合タンパク質の三次元構造を解析することにより、複合物形成に重要とみなされている荷電アミノ酸への変異の導入が複合物の結合活性および安定性に影響を及ぼすこと、ならびにコンピューターによる計算を用いて、荷電アミノ酸への変異の導入が結合活性に与える影響を予測できることが、報告されている(Scientific Reports (2019) 9, pp. 4482)。したがって、本発明者らは、CD16Vと抗体Fcの複合物の三次元構造(PDBコード 3ay4)をMOEソフトウェア(Chemical Computing Group)を用いて解析し、CD16Vと抗体Fcの結合境界面に存在する塩基性アミノ酸残基または酸性アミノ酸残基を抽出した。これらのアミノ酸残基のうちで、CD16V上の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸で

置換されるか、または抗体Fc上の酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸で置換された変異体を設計した(表1)。以下の実施例で説明するCD16V変異体の名称は、3ay4で登録されているCD16Aタンパク質のアミノ酸残基の番号に従った。これは、CD16Vタンパク質(GenBankアクセッション番号AAH17865.1)の1~18位のアミノ酸の配列を除いた配列に基づいている(SEQ ID NO: 78)(表中の「3ay4」)。1~18位のアミノ酸の配列を含むCD16Vタンパク質における、「3ay4」に示す変異に対応する変異を、表1の「AAH17865.1」の列に示している。

【0167】

表中のFcの下の数値は、EU指標番号付与によるところのヒトIgγ1定常領域内のアミノ酸位置を示す。

【0168】

(表1)

グループ	CD16V		Fc
	3ay4	AAH17865.1	EU指標
グループ1	K120D	K138D	D265K
	K120E	K138E	D265R
グループ2	K128D	K146D	E294K
	K128E	K146E	E294R
グループ3	K131D	K149D	E269K
	K131E	K149E	E269R
グループ4	K161D	K179D	S239K
	K161E	K179E	S239R

【0169】

実施例2：CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質の調製

本実施例において、CD16Vに変異が導入されたタンパク質は「CD16V_導入変異」と表記され、以下、まとめてCD16V変異体と呼ばれる。

【0170】

CD16Vタンパク質を得るために、FLAG配列(DYKDDDDK、SEQ ID NO: 91)がC末端に連結されている、CD16Vの細胞外部分中のポリペプチド(GenBankアクセッション番号AAH17865.1のアミノ酸1~208)をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 1)を、pcDNA3.4ベクター(Thermo Fisher Scientific、カタログA14697)中にサブクローニングした。次いで、構築したベクターをExp CHO-S細胞(Thermo Fisher Scientific、カタログA29133)中にトランスフェクトした。CD16V変異タンパク質を得るために、表1に示されるアミノ酸変異(CD16V_K120D、CD16V_K120E、CD16V_K128D、CD16V_K128E、CD16V_K131D、CD16V_K131E、CD16V_K161D、またはCD16V_K161E)およびC末端に連結されたFLAG配列を有するCD16Vの細胞外部分中のポリペプチドをコードする遺伝子(SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、またはSEQ ID NO: 17)を、pcDNA3.4ベクター中に導入した。次いで、構築したベクターをExp CHO-S細胞中にトランスフェクトした。抗FLAG(登録商標)M2抗体アフィニティゲル(SIGMA-ALDRICH、カタログA2220)を用いる標準的方法によって、Exp CHO-S細胞の培養上清からCD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質を精製した。AAH17865.1のCD16Vの1~18位のアミノ酸の配列は成熟型において切断されていることに留意されたい。本実施例で説明されるCD16Vタンパク質中に導入されるアミノ酸変異の位置は、

3ay4で登録されているアミノ酸番号に従っており、1～18位のアミノ酸の配列を除いたCD16Vに基づいて番号を付けられている。配列表に記載される各CD16V変異タンパク質のアミノ酸配列中の各変異は、表1の「AAH17865.1」列に示される変異に対応している。

【0171】

実施例3：Fc_{wt}型抗HER2抗体または変異Fc型抗HER2抗体の作製

下記の研究において、トラスツズマブ(Drug Bankアクセッション番号DB00072)を抗HER2抗体として使用した。

【0172】

野生型ヒトIgγ1定常領域のFc配列を有する抗体を、まとめてFc_{wt}と呼ぶ。Fc_{wt}型抗HER2抗体の作製のために使用される発現ベクターを、以下の様式で構築した。シグナル配列

(MEFGLSWVFLVAILKGVQC)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 19)が5'側に付加され、かつヒトIgγ1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 23)が3'側に付加された、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 21)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に挿入することにより、重鎖発現ベクターを構築した。シグナル配列

(MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 25)が5'側に付加された、トラスツズマブの軽鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 27)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に挿入することにより、軽鎖発現ベクターを構築した。この軽鎖発現ベクターを、以下、トラスツズマブ軽鎖発現ベクターと呼ぶ。これらのベクターをExp CHO-S細胞に同時トランスフェクトし、標準的方法に従って、野生型Fc領域を有する抗HER2抗体(以下、Fc_{wt}型と呼ぶ)を培養上清から調製した。

【0173】

Fc領域中に変異を有する抗体(以下、「Fc_{導入変異}」と呼び、以下、まとめて変異Fc型抗体と呼ぶ)を調製した。

【0174】

シグナル配列

(MEFGLSWVFLVAILKGVQC)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 19)が5'側に付加され、かつS239またはE294においてリジン(K)またはアルギニン(R)で置換するためのアミノ酸変異が導入されたヒトIgγ1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 29、およびSEQ ID NO: 31)が3'側に付加された、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 21)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、Fc_{S239K}、Fc_{S239R}、Fc_{E294K}、およびFc_{E294R}の作製において使用される重鎖発現ベクターを構築した。シグナル配列

(MEWSWVFLFFLSVTTGVHS)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 37)が5'側に付加され、かつD265またはE269においてリジン(K)またはアルギニン(R)で置換するためのアミノ酸変異が導入されたヒトIgγ1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、およびSEQ ID NO: 47)が3'側に付加された、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 39)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、Fc_{D265K}、Fc_{D265R}、Fc_{E269K}、およびFc_{E269R}の作製において使用される重鎖発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターのそれぞれを、トラスツズマブ軽鎖発現ベクターと共にExp CHO-S細胞に同時トランスフェクトし、標

準的方法に従って、変異Fc型抗HER2抗体を培養上清から調製した。

【0175】

実施例4：CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質に対するFc_wt型抗HER2抗体および変異Fc型抗HER2抗体の結合活性の評価

実施例3で得られたFc_wt型抗HER2抗体および変異Fc型抗HER2抗体に対する、実施例2で得られたCD16VおよびCD16V変異体の結合活性を、評価した。HER2タンパク質(Sino Biological、カタログ10004-H08H)を、リン酸緩衝生理塩水(PBS)で2 µg/mLに希釈し、希釈したHER2タンパク質20 µLを、Maxisorp 384ウェル透明プレート(Thermo Fisher Scientific、カタログ464718)の各ウェルに添加し、4℃で一晩インキュベートすることによって固定した。HER2タンパク質溶液を除去した後、Blocking One(Nacalai Tesque、カタログ03953-95)を含む50 µLのPBSを加えたプレートを、室温で1時間インキュベートし、次いで、0.05% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T、Nippon Gene、カタログ310-07375)で洗浄した。実施例3で得られた各抗HER2抗体を、5% Blocking Oneを含むTBS-T(以下、単に希釈剤と呼ぶ)で4 µg/mLに希釈し、希釈した抗体20 µLを各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。実施例2で得られた各CD16Vタンパク質を希釈剤で希釈して、最高濃度10 µg/mLから約3倍の公比で希釈系列を調製し、希釈したCD16Vタンパク質20 µLを各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。次に、希釈剤で希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗FLAG(登録商標)M2抗体(SIGMA-ALDRICH、カタログA8592)20 µLを、検出抗体として各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。TMB+基質-色素源(DAKO、カタログS1599)を添加しインキュベートした後、1M硫酸を添加することによって反応を停止させ、450nmおよび参照波長における吸光度をInfinite 200 PRO(TECAN)を用いて測定した。

10

20

30

【0176】

結果として、CD16V_K131DはFc_wtに結合せず、Fc_E269Rにのみ結合した。しかし、CD16V_K131DとFc_E269Rの間の結合活性は、Fc_wtとCD16Vの間の結合活性より低かった。また、Fc_E269Rは、CD16Vにも少し結合した。CD16V_K128EとCD16V_K131Eのどちらも変異Fcに結合することが確認されたが、Fc_wtへの結合は、いくらか確認されただけであった。一方では、CD16V_K128D、CD16V_K120D、CD16V_K120E、CD16V_K161D、およびCD16V_K161EがFc_wtまたは変異Fcのいずれかにまったく結合しないこと、または結合が極めて少ないことが、確認された(図1)。

【0177】

このことから、CD16V中の位置K128および位置K131ならびに抗体のFc領域中の位置E269および位置E294が、CD16V変異体と変異Fc型抗体の間の特異的結合活性のために重要なアミノ酸残基であることが示唆される。したがって、特定のアミノ酸変異が導入されており互いに特異的にのみ結合する変異FcおよびCD16V変異体を得るために、これらの変異の組み合わせおよびこれらの変異と結合活性を高めることが公知である変異との組み合わせを用いて、研究を行った。

【0178】

実施例5：変異Fc型抗HER2抗体およびCD16V変異タンパク質の作製

変異K128EおよびK131Dまたは変異K128EおよびK131Eを、CD16Vと組み合わせることによって、CD16V_K128E_K131D(以下、CD16V_EDと呼ぶ)およびCD16V_K128E_K131E(以下、CD16V_EEと呼ぶ)を調製した。具体的には、実施例2で説明するように、これらのアミノ酸変異を有し、C末端に導入されたFLAG配列に連結されたCD16Vタンパク質の細胞外ポリペプチドをコードする遺伝子(SEQ ID NO: 49 および SEQ ID NO: 51)をpCDNA3.4ベクターに導入することにより、発現ベクターを構築した。次いで、この発現ベクターをExp CHO-S細胞中にトランスフェクトした。実施例2と同じように、CD16V_EDおよびCD16V_EEをそれぞれの培養上清から調製した。

【0179】

40

50

CD16VにN38Q、N74Q、またはN169Qの変異を誘発すると、Fc_wtに対する結合活性が少し高まることが報告されている(Journal of Biological Chemistry (2018) 293, pp. 16842-16850)。CD16V_K131D(以下、CD16V_Dと呼ぶ)は、Fc_E269R型抗体にのみ結合したことから、CD16V_DがN38Q変異またはN74Q変異と組み合わされているCD16V_K131D_N38Q(以下、CD16V_DQ1と呼ぶ)およびCD16V_K131D_N74Q(以下、CD16V_DQ2と呼ぶ)を調製した。具体的には、実施例2と同じように、これらのアミノ酸変異のうちの1つが導入されている、C末端に導入されたFLAG配列に連結されたCD16Vタンパク質の細胞外ドメインのポリペプチドをコードする遺伝子(SEQ ID NO: 53およびSEQ ID NO: 55)をpCDNA3.4ベクター中に導入することにより、発現ベクターを構築した。次いで、各発現ベクターをExpiCHO-S細胞中にトランスフェクトした。実施例2と同じように、CD16V_DQ1およびCD16V_DQ2をそれぞれの培養上清から調製した。

10

【0180】

Fc_E269R_E294K(以下、Fc_RKと呼ぶ)型およびFc_E269R_E294R(以下、Fc_RRと呼ぶ)型の抗HER2抗体を調製した。具体的には、実施例3と同じように、シグナル配列(MEWSWVFLFFLSVTTGVHS)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 37)が5'側に付加され、かつE269の位置においてアルギニンへのアミノ酸変異が導入されE294の位置においてリジン(K)またはアルギニン(R)へのアミノ酸変異が導入されたヒトIgγ1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 57およびSEQ ID NO: 59)が3'側に付加された、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 39)のポリヌクレオチドを、pCDNA3.4ベクター中に導入することにより、発現ベクターを構築した。結果として生じる重鎖発現ベクターおよび実施例3で得られたトラスツズマブ軽鎖発現ベクターをExpiCHO-S細胞に同時トランスフェクトし、標準的方法に従って、変異Fc型抗HER2抗体をそれぞれの培養上清から調製した。

20

【0181】

実施例6: CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質に対するFc_wt型抗HER2抗体および変異Fc型抗HER2抗体の結合活性の評価

30

実施例3で得られたFc_wt型抗HER2抗体または実施例5で得られたFc_RK型抗HER2抗体もしくはFc_RR型抗HER2抗体に対する、実施例2で得られたCD16V_Dならびに実施例5で得られたCD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2の結合活性を、実施例4と同じように評価した(図2)。

【0182】

結果として、Fc_wt型抗HER2抗体は、CD16Vに結合したが、CD16V_D、CD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2に対する結合活性は示さなかった。一方で、Fc_RK型抗HER2抗体またはFc_RR型抗HER2抗体は、CD16V変異体に結合したがCD16Vに結合しなかった。したがって、E294の位置における変異をFc_E269Rに導入することにより、CD16V変異体に対する変異Fc型抗体の結合特異性が高まったことが明らかである。また、Fc_RKおよびFc_RRに対するCD16V_DQ1およびCD16V_DQ2の結合活性は、Fc_wtに対するCD16Vの結合活性とほぼ同じであった。したがって、付加的な変異がCD16V_Dに導入されているCD16V_DQ1およびCD16V_DQ2は、高められたFc_wt結合活性を有しておらず、Fc_RR結合活性およびFc_RK結合活性だけが高まっていることが明らかである。

40

【0183】

実施例7: Fc_wt型および変異Fc型の抗EGFR抗体および抗EpCAM抗体の作製

実施例5で調製したFc配列が、抗HER2抗体以外の抗体において使用された場合に、実施例2で得られたCD16V_Dならびに実施例5で得られたCD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2に対する特異的結合活性を有するかどうかを調べるた

50

めに、Fc_wt型、Fc_RK型、およびFc_RR型の抗EGFR抗体および抗EpCAM抗体を調製した。

【0184】

Fc_wt型、Fc_RK型、およびFc_RR型の抗EGFR抗体の作製にあたって、シグナル配列(MEFGLSWVFLVALLRGVQC)

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 61)が5'側に付加され、かつヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 23)、Fc_RKを含むヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 57)、またはFc_RRを含むヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 59)が3'側に付加された、抗EGFR(セツキシマブ、Drug Bankアクセション番号DB00002)の重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 63)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、重鎖発現ベクターを調製した。また、シグナル配列(MLPSQLIGFLLLWVPASRG)

10

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 65)が5'側に付加された、セツキシマブの軽鎖領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 67)を、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、軽鎖発現ベクターも調製した。

【0185】

Fc_wt型、Fc_RK型、およびFc_RR型の抗EpCAM抗体の作製にあたって、シグナル配列(MEWSWVFLFFLSVTTGVHS)

20

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 69)が5'側に付加され、かつヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 23)、Fc_RKを含むヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 57)、またはFc_RRを含むヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 59)が3'側に付加された、抗EpCAM(エドレコロマブ、IMGT INN番号7471)の重鎖可変領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 71)のポリヌクレオチドを、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、重鎖発現ベクターを調製した。また、シグナル配列(MSVPTQVLGLLLLWLTDARC)

30

をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 73)が5'側に付加された、エドレコロマブの軽鎖領域をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 75)を、pcDNA3.4ベクター中に導入することにより、軽鎖発現ベクターも調製した。

【0186】

これらの重鎖発現ベクターのそれぞれを、セツキシマブ軽鎖発現ベクターまたはエドレコロマブ軽鎖発現ベクターと共にExp CHO-S細胞に同時トランスフェクトし、実施例3と同じように、抗EGFR抗体および抗EpCAM抗体を精製した。

【0187】

実施例8：CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質に対するFc_wt型および変異Fc型の抗EGFR抗体または抗EpCAM抗体の結合活性の評価

実施例7で得られたFc_wt型、Fc_RK型、またはFc_RR型の抗EGFR抗体または抗EpCAM抗体に対する、実施例2で得られたCD16V、CD16V_D、ならびに実施例5で得られたCD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2の結合活性を評価した。EGFRタンパク質(Abcam、カタログab155639)をPBSで4 μg/mLに希釈するか、またはEpCAMタンパク質(Sino Biological、カタログ10694-H08H)をPBSで2 μg/mLに希釈し、希釈したタンパク質20 μLをMaxisorp 384ウェル透明プレートの各ウェルに添加し、4℃で一晩インキュベートすることによって固定した。翌日、EGFRタンパク質溶液またはEpCAMタンパク質溶液を除去し、Blocking Oneを含む50 μLのPBS

40

50

を加えたプレートを、室温で1時間インキュベートし、次いで、TBS-Tで洗浄した。実施例7で得られた各抗EGFR抗体を希釈剤で2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、同じ実施例で得られた各抗EpCAM抗体を希釈剤で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、希釈した抗体20 μL を各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。実施例2または実施例5で得られた各CD16Vタンパク質を希釈剤で希釈して、最高濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から約3倍の公比で希釈系列を調製し、希釈したCD16Vタンパク質20 μL を各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。次に、希釈剤で希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗FLAG(登録商標)M2抗体20 μL を、検出抗体として各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。TMB+基質-色素源を添加しインキュベートした後、1M硫酸を添加することによって反応を停止させ、450nmおよび参照波長における吸光度をInfinite 200 PROを用いて測定した。

10

【0188】

抗EGFR抗体および抗EpCAM抗体の場合、抗HER2抗体の場合のように、Fc_wt型抗体はCD16Vには結合したがCD16V変異体には結合せず、Fc_RK型抗体およびFc_RR型抗体はCD16Vには結合せずCD16V変異体にのみ結合した(図3、図4)。抗HER2抗体中だけでなく他の抗体中のFc_RKおよびFc_RRもCD16V変異体に特異的に結合することが、これらの結果から明らかである。

【0189】

実施例9：過剰なIgG1抗体の存在下での、CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質に対する変異Fc型抗HER2抗体の結合活性の評価

20

インビボでの変異Fc型抗HER2抗体とCD16V変異タンパク質の間の結合活性を確認するために、Fc_wt型抗体を用いる競合試験を実施した。その際に内因性免疫グロブリン模倣物として使用したFc_wt型抗体は、インビボに存在しない抗原であるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に対するヒトIgG1抗体であった。この抗体は、標準的方法によって得た。実施例4のように、HER2タンパク質をMaxisorp 384ウェル透明プレート上に固定した。翌日、HER2タンパク質溶液を除去した後、Blocking Oneを含むPBSを加えたプレートを、室温で1時間インキュベートし、次いで、TBS-Tで洗浄した。Fc_wt型、Fc_RK型、およびFc_RR型の抗HER2抗体を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。各CD16Vタンパク質およびCD16V変異タンパク質を希釈剤で希釈して、最高濃度20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から約3倍の公比で希釈系列を調製し、希釈剤または希釈剤で2mg/mLに調整した抗KLH抗体と1:1で混合した。プレートをTBS-Tで洗浄した後、これらの混合溶液20 μL を添加し、室温で1時間インキュベートした。この時、CD16Vタンパク質最終濃度の10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から約3倍の公比が存在した。プレートをTBS-Tで洗浄した後、希釈剤で2,000倍に希釈した、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗FLAG(登録商標)M2抗体20 μL を、検出抗体として各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートをTBS-Tで洗浄した。TMB+基質-色素源を添加しインキュベートした後、1M硫酸を添加することによって反応を停止させ、450nmおよび参照波長における吸光度をInfinite 200 PROを用いて測定した。

30

【0190】

結果として、抗KLH抗体の存在下でのCD16VとFc_wt型抗HER2抗体の間の結合活性は、CD16V最高濃度の10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において非常に低く、かつ3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満のCD16Vを反応させた場合の吸光度は、バックグラウンドと同じレベルであった。一方、抗KLH抗体の存在下での、Fc_RK型およびFc_RR型の抗HER2抗体と各CD16V変異体(CD16V_D、CD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2)の間の結合活性は低くなったが、一定の範囲の低下に収まり続けた(図5)。血清中の免疫グロブリンの大部分はIgG1であるため、このことから、変異Fc型抗体およびCD16V変異体の方が、血清中のFc_wtおよびCD16Vより低濃度で結合を示すことが示唆される。

40

【0191】

実施例10：CD16Vを発現するKHYG-1細胞の樹立

50

CD16V配列には、成熟型(SEQ ID NO: 78)および未成熟型(GenBankアクセッション番号:AAH17865.1、SEQ ID NO: 90)があることが公知である。未成熟型をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 89)を、pLVSIN-CMV Purベクター(Takara Bio、カタログ6183)のマルチクローニング部位に挿入した。同様に、CD16V変異体(CD16V_D、CD16V_ED、CD16V_EE、CD16V_DQ1、CD16V_DQ2)のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88)をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87)をpLVSIN-CMV Purベクターに導入して、各CD16V変異体のベクターを構築した。レンチウイルス高力価パッケージングミックス(Takara Bio、カタログ6194)と共にリポフェクトアミン2000(Thermo Fisher Scientific、カタログ11668027)を用いて、Lenti-X(登録商標)293T細胞株(Takara Bio、カタログ632180)にこれらのベクターをトランスフェクトし、結果として生じる培養上清を採取した。PEG-itウイルス沈殿溶液(5×)(System Biosciences、カタログLV810A-1)を各培養上清に添加し、4℃で一晩インキュベートして、CD16VまたはCD16V変異体を発現するレンチウイルスベクターを濃縮した。KHYG-1細胞(JCRB Cell Bank、JCRB0156)をレンチウイルスベクターに感染させ、ピューロマイシンを用いてトランスジェニック細胞のみを選択することにより、CD16V遺伝子またはCD16V変異体遺伝子が導入された、CD16Vを発現するKHYG-1(CD16V/KHYG-1)細胞またはCD16V変異体を発現するKHYG-1(CD16V変異体/KHYG-1)細胞を調製した。

10

20

【0192】

調製されたCD16V/KHYG-1細胞またはCD16V変異体/KHYG-1細胞において発現されたCD16VまたはCD16V変異体の発現レベルを、フローサイトメトリーによって測定した。フィコエリトリンで標識された抗ヒトCD16抗体(クローン:3G8、Biolegend、カタログ302008)を、STAIN BUFFER(BD Bioscience、カタログ554656)に懸濁させた各KHYG-1細胞に添加し、氷上で20分間インキュベートした。STAIN BUFFERで細胞を3回洗浄した後、7-AAD(BD Bioscience、カタログ559925)を添加し、暗条件で15分間インキュベートした。次いで、FACS Array(BD Bioscience)を用いて、7-AAD陰性生細胞画分においてフィコエリトリンの蛍光強度を測定した。解析にはFlowJo(BD Bioscience)を使用した。結果として、樹立された細胞はすべて、75%またはそれより高い発現率でCD16VまたはCD16V変異体を発現した(図6)。

30

【0193】

実施例11: CD16Vを発現するKHYG-1細胞を用いる、抗体ADCC活性の評価

CD16V/KHYG-1細胞またはCD16V変異体/KHYG-1細胞のADCC活性を評価するために、1:10の比の、カルセインAM溶液(Dojindo Laboratories、C396)で染色されたHER2陽性SK-BR-3細胞の1万個の細胞およびCD16V/KHYG-1細胞またはCD16V変異体/KHYG-1細胞の10万個の細胞を、96ウェルプレート(CORNING、カタログ353077)に入れた培地200μL中で、最高濃度4μg/mLから4倍希釈系列で希釈した各抗HER2抗体の存在下で、4時間インキュベートした。上清100μL中のカルセインAMに由来する蛍光強度を、FlexStation 3(Molecular Devices)を用いて測定して、SK-BR-3細胞の生存能力を観察した。以下の式を用いて細胞障害活性を算出した。式中、T-MAXは、1%TritonX-100(SIGMA-ALDRICH、カタログ30-5140)をSK-BR-3細胞に添加した場合の値であり、T-Sponは、培地のみを添加した場合の値である。

40

細胞障害活性(%) (溶解率(%)) = $100 \times (\text{データ} - (\text{T-Spon})) / ((\text{T-MAX}) - (\text{T-Spon}))$

【0194】

結果として、CD16V/KHYG-1細胞は、Fc_wt型抗HER2抗体の場合にのみ、SK-BR-3細胞に対する細胞障害性を濃度依存的に示した。Fc_RK型抗HER2抗体およびFc_RR型抗HER2抗体の場合、細胞障害性は極めて低かった。一方、Fc_wt型抗HER2抗体は、評価に供されたCD16V変異体/KHYG-1細胞のすべてにおいて、細胞障害活性を示さなかったか、または極めて低い細胞障害活性を示した。Fc_RK型抗HER2抗体およびFc_RR型抗HER2抗体のみが、評価に供されたCD16V変異体/KHYG-1細胞のすべてにおいて

50

細胞障害活性を示した(図7)。したがって、CD16V変異体およびFc変異体は特異的結合活性を有し、かつ組み合わせは、ADCC誘導作用において特異性を示すことが明らかである。

【0195】

実施例12：CD16Vを発現するKHYG-1細胞を用いる、ヒト血清の存在下でのADCC活性の評価

CD16V/KHYG-1細胞またはCD16V変異体/KHYG-1細胞のADCC活性にヒト血清が与える影響を特定するために、SK-BR-3細胞に対する細胞障害性を、5%ウシ胎児血清FBSまたは5%ヒト血清を含む培地に加えた濃度1 μ g/mLの各抗HER2抗体を用いて、実施例11と同じように評価した。各血清の補体活性を熱不活化して、ADCC活性の評価が補体依存性細胞障害性の誘導によって妨害されることを回避した。

10

【0196】

結果として、Fc_wt型抗HER2抗体の場合の、CD16V/KHYG-1によるSK-BR-3に対する細胞障害性は、FBSと比べてヒト血清の存在下で低下した。一方、ヒト血清の存在下での、Fc_RK型抗HER2抗体の場合の、CD16V変異体/KHYG-1によるSK-BR-3に対する細胞障害性は、FBSの存在下の場合とほぼ同じであった(図8)。同様に、ヒト血清の存在下での、Fc_RR型抗HER2抗体の場合の、CD16V変異体/KHYG-1によるSK-BR-3に対する細胞障害性は、CD16V_EE/KHYG-1を除いてFBSの存在下の場合とほぼ同じであった(図8)。

20

【0197】

したがって、この結果から、ヒト血清はFc_wt型抗体とCD16Vの相互作用を妨害するが、Fc_RK型抗体またはFc_RR型抗体およびヒト血清IgGは、CD16V変異体/KHYG-1に対するADCC誘導作用についての競合の程度が小さいことが示される。

【0198】

実施例13：CD16V CARを発現するT細胞の細胞障害活性の評価

CAR-Tは、がん免疫療法におけるがん細胞に対する最も強力なエフェクター細胞のうちの1つであることが公知である。CD16V変異体とFc変異体の組み合わせの用途を広げるために、CD16VまたはCD16V変異体の細胞外ドメインがシグナル伝達ドメインと融合されているキメラ受容体(CD16V CARまたはCD16V変異体CAR)を初代T細胞において発現させ、CD16V CARまたはCD16V変異体CARを発現するこれらのT細胞(CD16V/CAR-TまたはCD16V変異体/CAR-T)のがん細胞に対する細胞障害活性を評価した。

30

【0199】

CD16V CAR、すなわち、CD8aヒンジおよびCD8膜貫通ドメインを介してのCD16Vの細胞外ドメインとCD3 ζ およびCD137のシグナルドメインとの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子(SEQ ID NO: 92)であって、シグナル配列(MALPVTALLLPLALLLHAARP) (SEQ ID NO: 104)

をコードする遺伝子が5'側に付加されている該遺伝子を、pLVSIN-EF1 α Neo Vector (Takara Bio、カタログ6184)のマルチクローニング部位に挿入した。同様に、シグナル配列

40

(MALPVTALLLPLALLLHAARP) (SEQ ID NO: 104)

をコードする遺伝子が5'側に付加されている、各CD16V変異体(CD16V_D、CD16V_EE、CD16V_DQ1、およびCD16V_DQ2)CARのアミノ酸配列をコードする各遺伝子(SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、およびSEQ ID NO: 102)を、pLVSIN-EF1 α Neo Vectorのマルチクローニング部位に挿入した。これらのベクターを用いて、実施例10と同じように、CD16VまたはCD16V変異体を発現するレンチウイルスベクターを調製した。

【0200】

汎T細胞単離キット(Miltenyi Biotec、カタログ130-096-535)を用いてヒト末梢

50

血単核細胞(Lonza、カタログCC-2702)から精製したヒトT細胞をレンチウイルスベクターに感染させることによって、CD16V/CAR-TおよびCD16V変異体/CAR-Tを調製した。T細胞におけるCD16Vまたは各CD16V変異体の発現率は60%を上回っていた。CD16V/CAR-TまたはCD16V変異体/CAR-Tの細胞障害活性を評価するために、1:15の比の、カルセインAM溶液で染色されたSK-BR-3細胞の1万個の細胞およびCD16V/CAR-TまたはCD16V変異体/CAR-Tの15万個の細胞を、培地200 μ L中で、最高濃度16 μ g/mLから4倍希釈系列で希釈した各抗HER2抗体の存在下で4時間インキュベートした。実施例11と同じように、上清100 μ L中のカルセインAMに由来する蛍光強度を測定し、細胞障害活性を算出した。

【0201】

結果として、CD16V/CAR-Tは、Fc_{wt}型抗HER2抗体の場合にのみ、SK-BR-3細胞に対する細胞障害を濃度依存的に示した。Fc_{RK}型抗HER2抗体およびFc_{RR}型抗HER2抗体の場合、細胞障害性は極めて低かった。一方、Fc_{wt}型抗HER2抗体は、すべてのCD16V変異体/CAR-Tにおいて、細胞障害活性を誘導しなかったか、または極めて低い細胞障害活性を誘導した。Fc_{RK}型抗HER2抗体およびFc_{RR}型抗HER2抗体のみが、CD16V変異体/CAR-Tのすべてにおいて細胞障害活性を誘導した(図9)。したがって、CD16V変異体およびFc変異体の組み合わせが、CARに似たキメラタンパク質に適用した場合に特異性を保つことが明らかである。

【0202】

本発明のFc γ 受容体変異体およびFc領域変異体は、内因性免疫グロブリンまたは内因性Fc γ 受容体に本質的に結合しないが、Fc γ 受容体変異体およびFc領域変異体は互いに特異的に結合する。したがって、これらの組み合わせは、内因性分子が薬物有効性を低下させることがない免疫療法を実現すると予想される。

【0203】

等価物

当業者は、本明細書において説明される特定の態様および方法の多くの等価物を認識するか、またはルーチンに過ぎない実験を用いて確認することができる。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれると意図される。

【0204】

[配列表フリーテキスト]

人工配列の説明は、下記の配列表の数字見出し〈223〉の下に記載されている。具体的には、配列表のSEQ ID NO: 1によって示されるヌクレオチド配列は、CD16V配列の細胞外部分的配列タンパク質のC末端にFLAG配列が連結されているタンパク質をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、およびSEQ ID NO: 17に示されるヌクレオチド配列は、タンパク質のC末端にFLAG配列が連結されCD16V配列の細胞外部分配列に変異が導入されているタンパク質をコードする、ヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、およびSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、およびSEQ ID NO: 17によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 37は、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子のN末端に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 21およびSEQ ID NO: 39は、トラスツズマブの重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 23は、ヒトIg γ 1定常領域をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 38、およびSEQ ID NO: 40は、それぞれ、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 37、およびSEQ ID NO: 39によってコードされるアミノ酸配列

10

20

30

40

50

である。SEQ ID NO: 27は、トラスツズマブの軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 28は、SEQ ID NO: 27によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 25は、トラスツズマブの軽鎖領域の5'側に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 26は、SEQ ID NO: 25によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、およびSEQ ID NO: 35は、ヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子に変異が導入されているタンパク質をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、およびSEQ ID NO: 36は、それぞれ、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、およびSEQ ID NO: 35によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、およびSEQ ID NO: 47によって示されるヌクレオチド配列は、ヒトIgY1定常領域をコードする遺伝子にアミノ酸変異が導入されているタンパク質をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、およびSEQ ID NO: 48は、それぞれ、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、およびSEQ ID NO: 47によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、およびSEQ ID NO: 55に示されるヌクレオチド配列は、タンパク質のC末端にFLAG配列が連結されCD16V配列の細胞外部分配列に変異が導入されているタンパク質をコードする、ヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 54、およびSEQ ID NO: 56に示されるアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 53、およびSEQ ID NO: 55によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 57およびSEQ ID NO: 59によって示されるヌクレオチド配列は、ヒトIgY1定常領域に変異が導入されているタンパク質をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 58およびSEQ ID NO: 60は、SEQ ID NO: 57およびSEQ ID NO: 59によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 61は、セツキシマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子のN末端に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 65は、セツキシマブの軽鎖領域をコードする遺伝子のN末端に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 62およびSEQ ID NO: 66は、SEQ ID NO: 61およびSEQ ID NO: 65によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 63およびSEQ ID NO: 67は、それぞれ、セツキシマブの重鎖可変領域および軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 64およびSEQ ID NO: 68は、それぞれ、SEQ ID NO: 63およびSEQ ID NO: 67によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 69は、エドレコロマブの重鎖可変領域をコードする遺伝子のN末端に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 73は、エドレコロマブの軽鎖領域をコードする遺伝子のN末端に連結されるシグナル配列をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 70およびSEQ ID NO: 74は、それぞれ、SEQ ID NO: 69およびSEQ ID NO: 73によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 71およびSEQ ID NO: 75は、それぞれ、エドレコロマブの重鎖可変領域および軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 72およびSEQ ID NO: 76は、それぞれ、SEQ ID NO: 71およびSEQ ID NO: 75によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 77は、成熟CD16V配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 78は、SEQ ID NO: 77によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、およびSEQ ID NO: 87は、導入された変異を有するCD16V変異体の配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、およびSEQ ID NO: 88は、それぞれ、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、およびSEQ ID NO: 87によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 89は、未成熟CD16V配列をコードするヌクレオチド配列であり、SEQ ID NO: 90は、SEQ ID NO: 89によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 91は、FLAGのアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 92に示され

10

20

30

40

50

るヌクレオチド配列は、CD8aヒンジおよびCD8膜貫通ドメインを介してのCD16Vの細胞外の部分的タンパク質とCD3 ζ およびCD137のシグナルドメインとの融合タンパク質であって、シグナル配列がN末端に連結された該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 93に示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 92によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、およびSEQ ID NO: 102に示されるヌクレオチド配列は、CD8aヒンジおよびCD8膜貫通ドメインを介しての、変異が導入されたCD16Vの細胞外の部分的タンパク質とCD3 ζ およびCD137のシグナルドメインとの融合タンパク質であって、シグナル配列がN末端に連結された該融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列である。SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 101、およびSEQ ID NO: 103に示されるアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 100、およびSEQ ID NO: 102によってコードされるアミノ酸配列である。SEQ ID NO: 104は、CD16V CARタンパク質またはCD16V変異体CARタンパク質のN末端に連結されるシグナル配列のアミノ酸配列である。

10

20

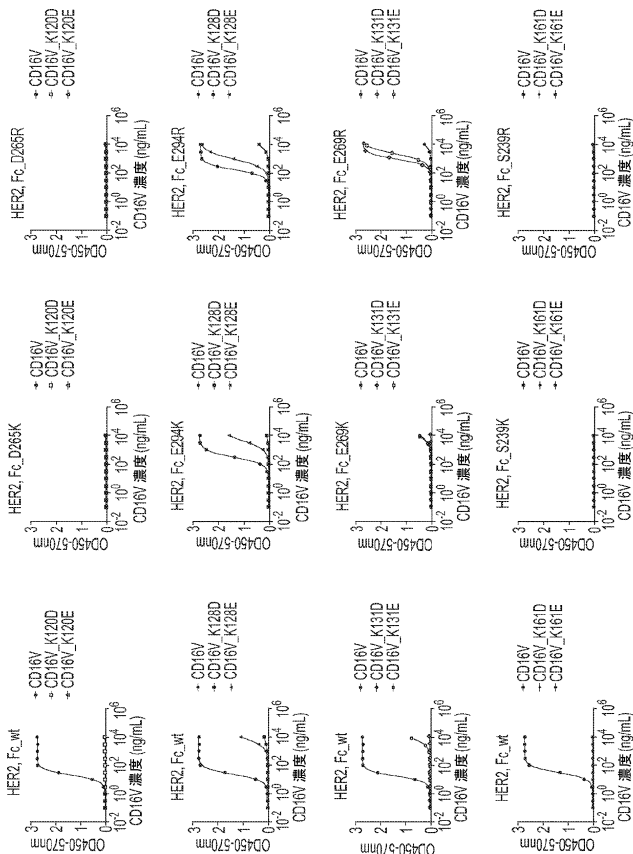
30

40

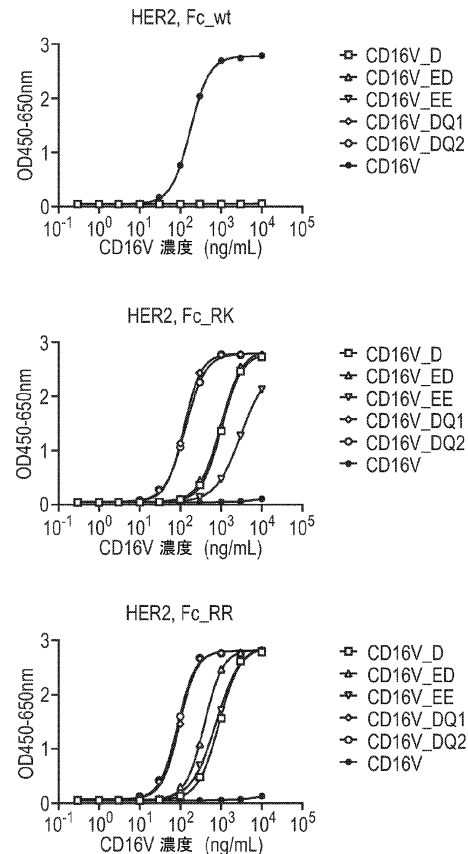
50

【図面】

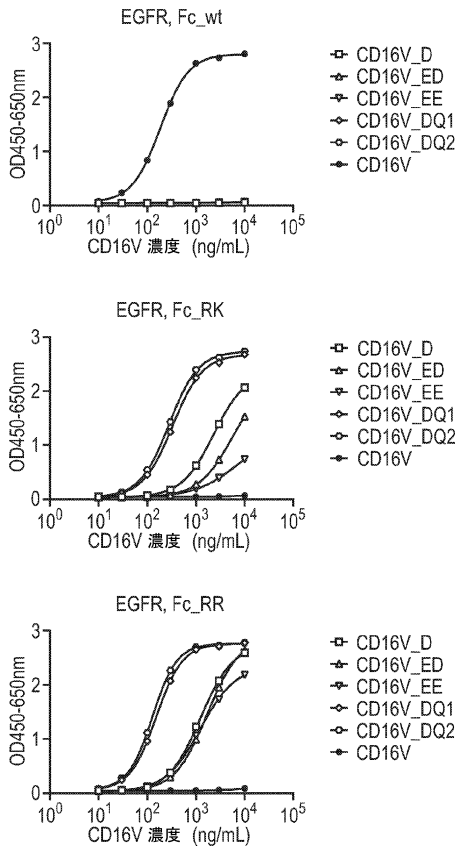
【図 1】



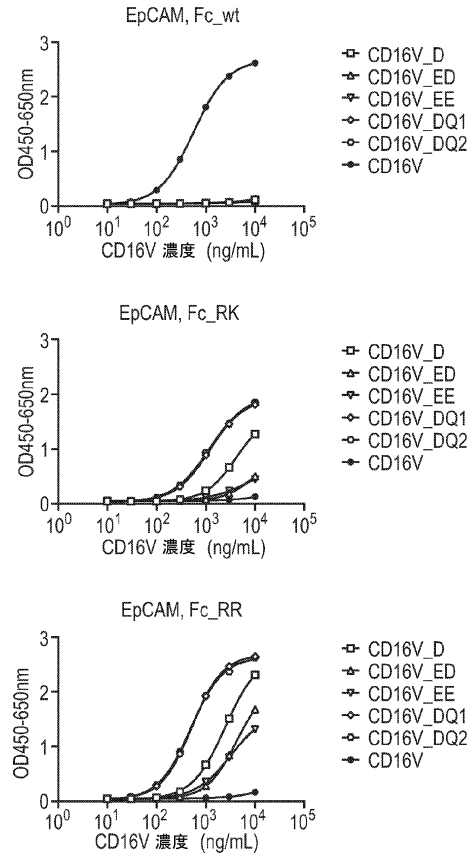
【図 2】



【図 3】



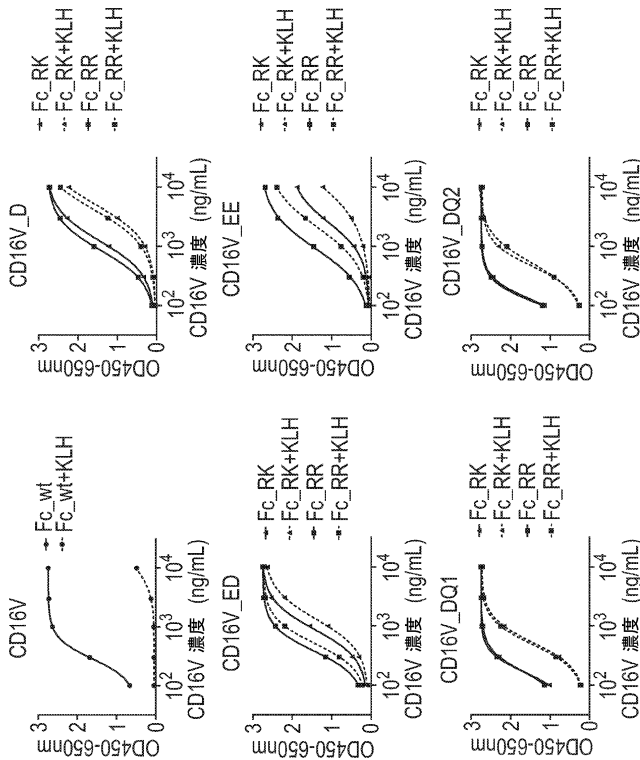
【図 4】



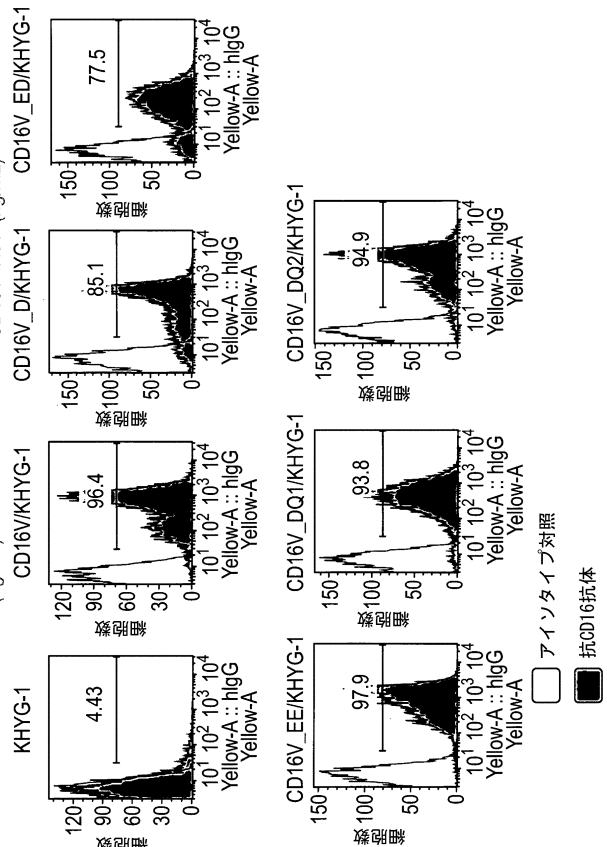
10

20

【図 5】



【図 6】

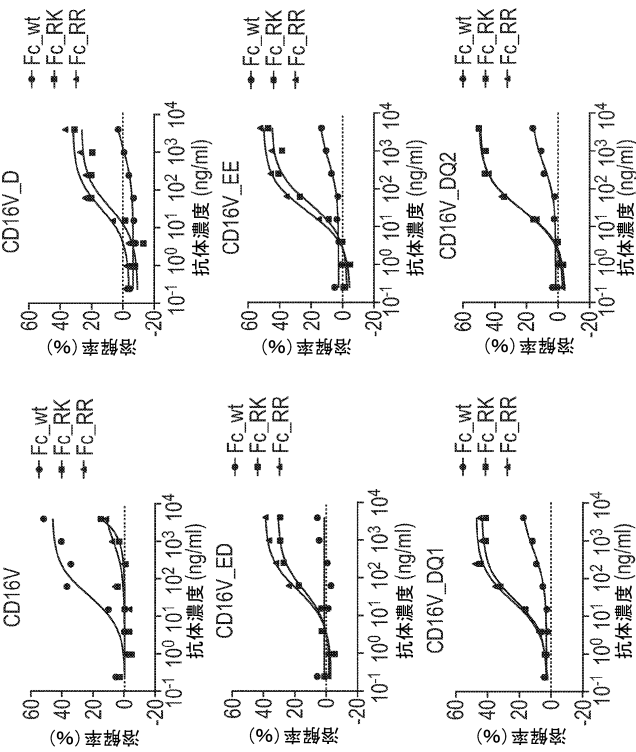


30

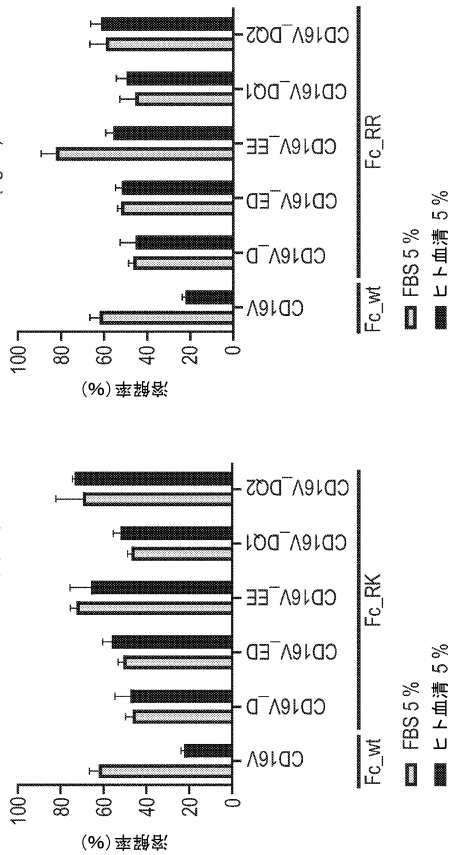
40

50

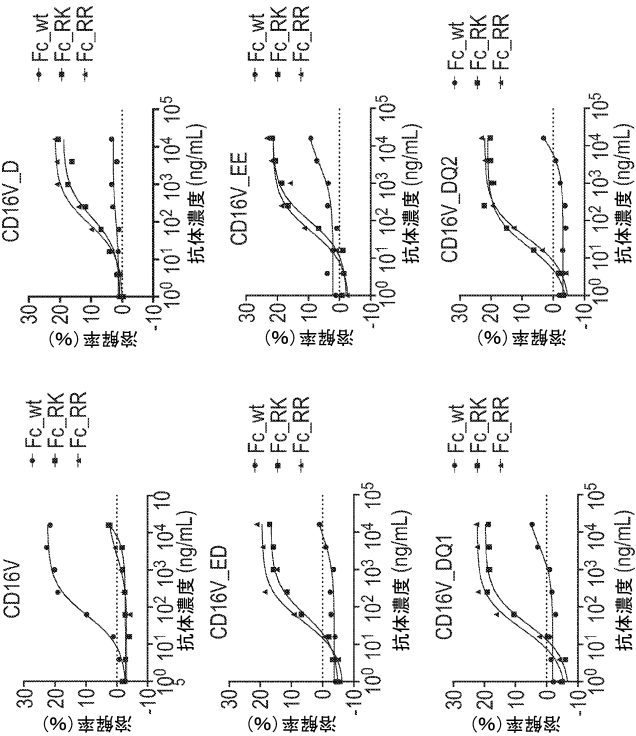
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2023540888000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2021/000556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/725 A61K39/00 C07K14/705 C07K14/735 C07K16/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 737 056 B1 (PRESTA LEONARD [US]) 18 May 2004 (2004-05-18) column 4, line 30 - column 6, line 63 column 54, line 9 - column 69, line 64 examples 4-5 claims 1-14	1-98
X	US 2010/291549 A1 (RAMAKRISHNAN VIJAY [US]) 18 November 2010 (2010-11-18) paragraphs [0004] - [0008], [0421] - [0423], [0619] - [0646]; examples 2, 4 ----- -/--	1-98

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2021

Date of mailing of the international search report

24/01/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Surdej, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2021/000556

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOENE HARRY R ET AL: "Fc-gamma-RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc-gamma-RIIIa, independently of the Fc-gamma-RIIIa-48L/R/H phenotype", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 90, no. 3, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 1109-1114, XP009518824, ISSN: 0006-4971 the whole document	1-98
X	NAMBOODIRI A M ET AL: "Differential inhibition of trastuzumab- and cetuximab-induced cytotoxicity of cancer cells by immunoglobulin G1 expressing different GM allotypes", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 166, no. 3, 8 November 2011 (2011-11-08), pages 361-365, XP071088193, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/J.1365-2249.2011.04477.X the whole document	1-98
X	US 2016/159921 A1 (D ANGELO IGOR [CA] ET AL) 9 June 2016 (2016-06-09) paragraphs [0022] - [0023] claims 1-11	1-98
A	MIMOTO F ET AL: "Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for Fc", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 58, no. 1, 14 December 2013 (2013-12-14), pages 132-138, XP028548629, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2013.11.017 the whole document	1-98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/000556

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2021/000556

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6737056	B1	18-05-2004	US 6737056 B1	18-05-2004
			US 2004191244 A1	30-09-2004
			US 2004228856 A1	18-11-2004
			US 2005118174 A1	02-06-2005
			US 2005233382 A1	20-10-2005
			US 2006194957 A1	31-08-2006
			US 2008274108 A1	06-11-2008
			US 2011293632 A1	01-12-2011
			US 2014147436 A1	29-05-2014
			US 2014342404 A1	20-11-2014
			US 2016060330 A1	03-03-2016

US 2010291549	A1	18-11-2010	AU 2007244683 A1	08-11-2007
			CA 2650730 A1	08-11-2007
			EP 2027291 A2	25-02-2009
			EP 3026123 A1	01-06-2016
			US 2010291549 A1	18-11-2010
			US 2014170670 A1	19-06-2014
			WO 2007127936 A2	08-11-2007

US 2016159921	A1	09-06-2016	AU 2011235569 A1	15-11-2012
			BR 112012024489 A2	31-05-2016
			CA 2794708 A1	06-10-2011
			CA 2794745 A1	06-10-2011
			CN 102971340 A	13-03-2013
			EP 2552957 A1	06-02-2013
			EP 3208281 A1	23-08-2017
			JP 2013523098 A	17-06-2013
			JP 2013528357 A	11-07-2013
			JP 2017165728 A	21-09-2017
			MX 341925 B	07-09-2016
			RU 2012145183 A	10-05-2014
			US 2013089541 A1	11-04-2013
			US 2013108623 A1	02-05-2013
			US 2016159921 A1	09-06-2016
			WO 2011120134 A1	06-10-2011
			WO 2011120135 A1	06-10-2011

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)
C 1 2 N 5/0784(2010.01)
C 1 2 N 5/0786(2010.01)
C 1 2 N 5/0787(2010.01)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 47/65 (2017.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 K 35/15 (2015.01)
A 6 1 K 35/30 (2015.01)
A 6 1 K 35/32 (2015.01)
A 6 1 K 35/12 (2015.01)
A 6 1 K 35/545 (2015.01)
A 6 1 K 35/28 (2015.01)
A 6 1 K 35/54 (2015.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088(2006.01)

C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N 5/0784
C 1 2 N 5/0786
C 1 2 N 5/0787
A 6 1 P 37/02
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 47/65
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 35/15
A 6 1 K 35/30
A 6 1 K 35/32
A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/545
A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 35/54
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 31/7088

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

C
 E
 D

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
 弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 守屋 隆一
 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号

(72)発明者 白井 宏樹
 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号

(72)発明者 曾我 真司
 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号

(72)発明者 嶋田 尚子
 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号

(72)発明者 ラッセル デヴィッド ウィリアム
 アメリカ合衆国 9 8 1 2 1 ワシントン州 シアトル ファースト アベニュー 3 0 0 5

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

F ターム (参考)

4C076 AA95 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 CC07 CC27 CC41 EE41
EE59 FF31 FF68

4C084 AA13 MA66 NA05 NA10 NA13 NA14 ZB071 ZB072 ZB261 ZB262

4C085 AA13 BB42 CC22 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05
GG06

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA10 NA13 NA14 ZB07
ZB26

4C087 AA01 AA02 BB43 BB44 BB45 BB57 NA05 NA10 NA13 NA14
ZB07 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA50 DA76 EA28 FA74