

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7653260号
(P7653260)

(45)発行日 令和7年3月28日(2025.3.28)

(24)登録日 令和7年3月19日(2025.3.19)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725 Z N A
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
		請求項の数	40 (全47頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2020-567809(P2020-567809)	(73)特許権者	513200313 キングス・カレッジ・ロンドン イギリス国, ロンドン グレーター ロン ドン ダブリューシー2アール 2エルエ ス, ストランド
(86)(22)出願日	令和1年6月5日(2019.6.5)	(73)特許権者	519391608 ガンマデルタ セラピューティクス リミ ティッド GAMMADELTA THERAPE UTICS LTD イギリス国、ダブリュ2 6ビーディー ロンドン、キングダム ストリート 1 1 Kingdom Street, W2 6BD London, United Kingdom 最終頁に続く
(65)公表番号	特表2021-527047(P2021-527047 A)		
(43)公表日	令和3年10月11日(2021.10.11)		
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/064739		
(87)国際公開番号	WO2019/234136		
(87)国際公開日	令和1年12月12日(2019.12.12)		
審査請求日	令和4年6月3日(2022.6.3)		
(31)優先権主張番号	62/680,932		
(32)優先日	平成30年6月5日(2018.6.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 消化管系へのペイロード送達のための、BTNL3／8を標的とする構築物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

BTNL3/8を標的とする成分;
ペイロード;及び
該BTNL3/8を標的とする成分を該ペイロードへ結合する任意のリンカーを含む、タンパク質構築物であって、
該BTNL3/8を標的とする成分は、T細胞受容体(TCR) Vγドメインを含み、該TCR Vγドメインは、J領域、及び相補性決定領域CDR1、CDR2、CDR3、及びCDR4を含み、
該TCR VγドメインのCDR4は、配列番号:3に記載のアミノ酸配列を含み、
該TCR VγドメインのCDR4は、該TCR VγドメインのCDR2領域とCDR3領域との間に位置し、
該TCR VγドメインのCDR1は、EGSTGY又はEGSNGYから選択されるアミノ酸配列を含み、該TCR VγドメインのCDR2は、YDSYTSSV又はYDSYNSKVから選択されるアミノ酸配列を含み、かつ該TCR VγドメインのCDR3は、ATWDE又はATWDGから選択されるアミノ酸配列を含み、かつ
該ペイロードは、該BTNL3/8を標的とする成分へインフレーム融合されたタンパク質ペイロードであるか、又は小分子である、前記タンパク質構築物。

【請求項2】

前記TCR VγドメインのCDR3は、ヒトのVγのCDR3を含む、請求項1記載のタンパク質構築物。

【請求項 3】

前記J領域は、ヒトV γ J領域、マウスV γ J領域、又は配列番号:15～18から選択される配列に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のタンパク質構築物。

【請求項 4】

前記BTNL3/8を標的とする成分は、ペアになったV δ ドメインを更に含む、請求項1～3のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 5】

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインは、少なくとも1つのジスルフィド結合により共有的に結合される、請求項4記載のタンパク質構築物。

【請求項 6】

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインは、特異的なヘテロダイマー性相互作用によりペアになっている、請求項5記載のタンパク質構築物。

【請求項 7】

前記ヘテロダイマー性相互作用は、ロイシンジッパー相補性である、請求項6記載のタンパク質構築物。

【請求項 8】

前記BTNL3/8を標的とする成分は、配列番号:10に記載のアミノ酸配列を含む、請求項7記載のタンパク質構築物。

【請求項 9】

前記BTNL3/8を標的とする成分は、前記V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーション融合を含む、請求項4記載のタンパク質構築物。

【請求項 10】

前記V γ ドメインは、前記V δ ドメインへのN末端である、請求項9記載のタンパク質構築物。

【請求項 11】

前記V γ ドメインは、前記V δ ドメインへのC末端である、請求項9記載のタンパク質構築物。

【請求項 12】

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーション融合は、内部リンカー配列を含む、請求項9～11のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 13】

前記V δ ドメインは、V δ 1、V δ 2又はV δ 5から選択されるヒトV δ ドメインを含む、請求項4～12のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 14】

第一T細胞受容体定常領域を更に含み、
該第一T細胞受容体定常領域は、前記V γ ドメインのC末端ヘインフレーション融合している、請求項1～13のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 15】

前記第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体定常領域である、請求項14記載のタンパク質構築物。

【請求項 16】

前記ヒトT細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域、ヒトT細胞受容体 α 定常領域、又はヒトT細胞受容体 γ 定常領域である、請求項15記載のタンパク質構築物。

【請求項 17】

前記BTNL3/8を標的とする成分は、第二T細胞受容体定常領域を更に含み、
該第二T細胞受容体定常領域は、前記ペアになったV δ ドメインのC末端ヘインフレーション融合している、請求項14～16のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 18】

前記第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域、ヒトT細胞受容体 β 定常領域、又はヒトT細胞受容体 δ 定常領域である、請求項17記載のタンパク質構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記Vδドメインと前記第二T細胞受容体定常領域とのインフレーション融合は、該Vδドメインと該第二T細胞受容体定常領域との間の内部リンカー配列を含む、請求項17又は18記載のタンパク質構築物。

【請求項 20】

前記ペイロードは、ポリペプチド、ペプチド、サイトカイン、又は抗体を含む、請求項1～19のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 21】

前記小分子は、ホルモン、核酸、又は阻害性RNA(RNAi)を含む、請求項1～19のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 22】

前記任意のリンカーは、前記BTNL3/8を標的とする成分ヘインフレーション融合したペプチドであるか、又は該BTNL3/8を標的とする成分ヘコンジュゲートされた分子を含む、請求項1～21のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

【請求項 23】

請求項1～22のいずれか一項記載のタンパク質構築物を含む、医薬組成物。

【請求項 24】

前記医薬組成物は、非経口投与に適している、請求項23記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記非経口投与は、静脈内投与、筋肉内投与、又は皮下投与を含む、請求項24記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記ペイロードは、抗炎症剤を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記抗炎症剤は、アミノサリチレート、非ステロイド系抗炎症剤、抗炎症性サイトカイン、抗催炎症剤、又はステロイドである、請求項26記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記ペイロードは、抗生物質を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロニダゾール、モキシフロキサシン、又はアモキシシリンである、請求項28記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記ペイロードは、カルシニューリン阻害剤を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記カルシニューリン阻害剤は、シクロスポリンA又はタクロリムスである、請求項30記載の医薬組成物。

【請求項 32】

前記ペイロードは、免疫調節剤を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 33】

前記免疫調節剤は、免疫抑制剤である、請求項32記載の医薬組成物。

【請求項 34】

前記免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、又はチオプリンである、請求項33記載の医薬組成物。

【請求項 35】

前記ペイロードは、抗菌剤を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記抗菌剤は、抗寄生虫剤、抗真菌剤、又は抗ウイルス剤である、請求項35記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

前記ペイロードは、栄養補助食品を含む、請求項23～25のいずれか一項記載の医薬組成物。

【請求項 38】

前記栄養補助食品は、酵素又はビタミンである、請求項37記載の医薬組成物。

【請求項 39】

配列番号:10と少なくとも90%の配列同一性を有する少なくとも1つの配列を含む、組換え γ δ TCRタンパク質であって、

該組換え γ δ TCRタンパク質は、BTNL3/8発現細胞を標的化することができ、該組換え γ δ TCRタンパク質は、BTNL3/8を標的とするTCR $V\gamma$ ドメインを含み、該TCR $V\gamma$ ドメインは、J領域、及び相補性決定領域CDR1、CDR2、CDR3、及びCDR4を含み、該TCR $V\gamma$ ドメインのCDR1は、EGSTGY又はEGSNGYから選択されるアミノ酸配列を含み、該TCR $V\gamma$ ドメインのCDR2は、YDSYTSSV又はYDSYNSKVから選択されるアミノ酸配列を含み、かつ該TCR $V\gamma$ ドメインのCDR3は、ATWDE又はATWDGから選択されるアミノ酸配列を含み、かつ該TCR $V\gamma$ ドメインのCDR4は、配列番号:3に記載のアミノ酸配列を含む、前記組換え γ δ TCRタンパク質。

10

【請求項 40】

前記組換え γ δ TCRタンパク質は、配列番号:10の配列を含む、請求項39記載の組換え γ δ TCRタンパク質。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

(1.関連出願の相互参照)

本出願は、2018年6月5日に出願された米国仮特許出願番号第62/680,932号の優先権を主張し、その全体が引用により本明細書中に組み込まれる。

【0002】

(2.配列表)

本出願はEFS-Web経由で提出した配列表を含み、その全体は参照によって本明細書に組み込まれる。そのASCIIコピーは2019年6月4日に作成され、名称は「GDT-P2577PCT-sequence listing.txt」であり、サイズは17,284バイトである。

30

【背景技術】

【0003】

(3.背景)

ほとんどの薬物は、病的部位での十分な濃度を達成するためには、全身曝露に頼っている。しかし、標的以外の組織への薬剤の曝露は、しばしば重大な毒性を引き起こす。従って、特定の組織へ医薬剤を送達するための方法の開発が緊急に必要とされている。

【0004】

T細胞の組織選択的ホーミングは、正常な免疫応答のインテグレーション中の重要な要素と考えられる。そのような「組織ホーミング」又は「組織常在性」T細胞の、興味深く非常にユニークなクラスの一つは γ δ T細胞である。 γ δ T細胞は高度に区分化されたT細胞であり、例えば、マウス(murine) $V\gamma$ 5T細胞は表皮にのみ見られるが、マウス(murine) $V\gamma$ 7T細胞は腸に特有である等の、特定の組織へのサブセットの局在化を示す。いくつかのマウス(murine)及びヒトのIEL区画は、未解明の機構を介して、ブチロフィリン(BTN)及びブチロフィリン様(Btnl/BTNL)遺伝子等の、定常状態の上皮細胞によって発現されるタンパク質にその発達と生存を依存している。(Di Marco Barrosらの文献、Cell. 2016; 167(1): 203-218; Kabelitzらの文献、F1000 Faculty Rev: 782; June 5, 2017)。

40

【0005】

ブチロフィリン及びブチロフィリン様タンパク質(BTN/BTNL)は、T細胞選択等の免疫、並びに分化及び細胞運命決定等の発達プロセスに、影響を与えるイムノグロブリンスーパーファミリーメンバーのファミリーである(Arnett及びVineyの文献、Nature Reviews

50

, 2014(14)pp. 559-569)。BTNLタンパク質(具体的には、BTNL3及びBTNL8)はヒト腸の腸細胞で不釣り合いに高度に発現され、BTNL3/8はヒトV γ 4+ γ δ T細胞を特異的に調節できることが示されている(Di Marco Barrosらの文献、Cell. 2016; 167(1): 203-218)。BTN及びBTNLタンパク質は、複数のT細胞応答を負又は正の様式で調節すると報告されているが、そのようなシグナルがT細胞へどのように伝達されるかは明らかではない(Kabelitzらの文献、F1000 Faculty Rev: 782; June 5, 2017)。

【0006】

炎症性腸疾患等の疾患の治療のために、消化管系への薬剤の局所的送達が求められている。従って、BTNL3/8発現細胞、特に腸表皮のBTNL3/8発現細胞への治療剤ペイロードを標的化できる化合物を含む、BTNL3/8発現細胞を標的化できる化合物が求められている。

10

【発明の概要】

【0007】

(4.概略)

このような(特性解明は不十分であるにもかかわらず)注目される組織／免疫区画の更なる「形状化(shaping)」及び「ホーミング」を更に探求するために、それにより γ δ T細胞組織への標的化及び特異化が達成される機構を探求することを試みた。最初に、組換えヘテロダイマー及びホモダイマー γ δ T細胞受容体タンパク質(TCR)のパネルを、ヒト γ 鎖及び δ 鎖配列の開始点(starting)から遺伝子操作することを試みた。これを達成するために、さまざまな融合相手を探求し、得られた組換えヘテロダイマー化及びホモダイマー化した γ δ 鎖が(例えば、HEK293細胞内で)発現され、無傷のまま維持され、精製時に(サイズ排除クロマトグラフィーで測定して)凝集がほとんど起こらないことを確認した。これらの実験から、(i)抗体Fc融合ドメイン相手の使用、及び(ii)操作したロイシンジッパーと組み合わせたTCR α - β 鎖定常ドメイン相手の使用、を含む、いくつかのより好ましい融合相手を特定した(Xuらの文献、PNAS, 2011Vol. 108; pp. 2414-2419)。しかしながら、これらの成功した実験は網羅的ではなかった場合には、当業者は現在、組換え γ δ のホモダイマー、ヘテロダイマー、及びモノマーサブユニットを作成する別のアプローチを特定する動機が与えられるだろうと認識できる。

20

【0008】

このヒト γ δ 配列由来のT細胞受容体組換えタンパク質のパネル又はライブラリを作成し、次にそれを使用して、(もしあるなら)どの組換え γ δ ペアがいずれかの組織特異性又は選択性を示すかを探求した。従って、これらタンパク質を、BTNL3/8を過剰発現する細胞株でインキュベートした。前例のないことに、対照比較試験を通じて、BTNL3/8タンパク質を特異的に認識するある種の組換えT細胞受容体(例えば、組換え γ 4 δ 1TCR及び、組換え γ 4 δ 2TCR)を特定する一方、認識しなかった他の受容体(例えば、組換え γ 2 δ 1TCR及び、組換え γ 8 δ 1TCR)も特定した。これは、初めて、 γ δ TCRを含む γ 4が、細胞表面に発現されたBTNL3/8と直接的に相互作用することを示している。

30

【0009】

更に又、TCRディープシーケンシングは、BTNL3/8応答性である画分内の、 γ 4TCRを発現する γ δ T細胞の選択的富化があったことを示した。つまり、シーケンシングデータ及び組換えTCR実験は、 γ 4サブユニットを含むTCRペアリングがBTNL3/8へ選択的に結合することを示した。

40

【0010】

従って、第一の態様では、タンパク質構築物が提供される。このタンパク質構築物は、BTNL3/8を標的とする成分、ペイロード、及び標的とする成分をペイロードへ結合する任意のリンカーを含む。

【0011】

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分はV γ ドメインを含み、V γ ドメインの配列位置番号87のアミノ酸はアスパラギン酸又はヒスチジンであり、V γ ドメインの配列位置番号90のアミノ酸はグリシン又はグルタミン酸であり、V γ CDR4の残りの残基は、

50

それぞれの位置で、ヒト又はマウス(murine)のV γ ドメインの対応残基から独立して選択される。

【0012】

ある実施態様では、V γ ドメインCDR4の残りの残基は、それぞれの残基位置で、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から独立して選択される。一の実施態様では、V γ ドメインの位置番号87~90のアミノ酸配列は、配列番号:1である。一の実施態様では、V γ ドメインの位置番号87~90のアミノ酸配列は、配列番号:2である。一の実施態様では、V γ ドメインCDR4の残りの残基は全て、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は、ヒトV γ 4の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は、ヒトV γ 2の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は、マウスV γ 7の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 2ドメインであり、その中ではCDR4のアミノ酸は、アミノ酸配列位置番号87でアスパラギン酸又はヒスチジンで置換され、アミノ酸配列位置番号90でグリシン又はグルタミン酸で置換されている。一の実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 4ドメインである。

【0013】

一の実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒト又はマウスのV γ CDR3配列である。一の実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 4 CDR3配列を含む。一の実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 2 CDR3配列を含む。一の実施態様では、V γ ドメインCDR3は、マウスV γ 7 CDR3配列を含む。一の実施態様では、J領域はV γ J領域である。一の実施態様ではJ領域はマウスV γ J領域である。ある実施態様では、J領域は、配列番号:15~18からなる群から選択される配列番号を含む。

【0014】

ある実施態様では、タンパク質構築物のBTNL3/8を標的とする成分は更に、ペアになったV δ ドメインを含む。一の実施態様では、V γ ドメイン及びV δ ドメインは、少なくとも1つのジスルフィド結合により共有的に結合される。一の実施態様では、V γ ドメイン及びV δ ドメインは、特異的なヘテロダイマー性相互作用によりペアになっている。一の実施態様では、ヘテロダイマー性相互作用はロイシンジッパー相補性である。一の実施態様では、標的とする成分は配列番号:9を含む。一の実施態様では、標的とする成分は配列番号:10である。一の実施態様では、標的とする成分は配列番号:11である。一の実施態様では、標的とする成分は、V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合を含む。一の実施態様では、V γ ドメインはV δ ドメインへのN末端である。一の実施態様では、V γ ドメインはV δ ドメインへのC末端である。一の実施態様では、V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合は、内部リンカー配列を含む。一の実施態様では、V δ ドメインはヒトV δ ドメインである。一の実施態様では、ヒトV δ ドメインはV δ 1、V δ 2又はV δ 5である。一の実施態様では、ヒトV δ ドメインはV δ 1である。

【0015】

ある実施態様では、タンパク質構築物は、更に第一T細胞受容体定常領域を含み、その第一T細胞受容体定常領域は、V γ ドメインのC末端ヘインフレーム融合している。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 γ 定常領域である。一の実施態様では、標的とする成分は更に、第二T細胞受容体定常領域を含み、その第二T細胞受容体定常領域は、ペアになったV δ ドメインのC末端ヘインフレーム融合している。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 δ 定常領域である。一の実施態様では、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域とのインフレーム融合は、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域との間の内部リンカー配列を含む。

【0016】

ある実施態様では、ペイロードは、標的とする成分ヘインフレイム融合されたタンパク質ペイロードである。一の実施態様では、ペイロードはポリペプチドである。一の実施態様では、ペイロードはペプチドである。一の実施態様では、ペイロードはサイトカインである。一の実施態様では、ペイロードは抗体である。一の実施態様では、ペイロードは一本鎖可変断片(scFv)である。一の実施態様では、抗体は、サイトカイン抗原に特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む。一の実施態様では、抗体は、CD3抗原に特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む。一の実施態様では、抗体は、腫瘍壊死因子 α (TNF α)抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、抗体はFc受容体と相互作用可能なFcドメインを含む。一の実施態様では、抗体は、Fc受容体と相互作用不可能なFcドメインを含む。一の実施態様では、ペイロードは小分子である。一の実施態様では、ペイロードはホルモンである。一の実施態様では、ペイロードは核酸である。一の実施態様では、ペイロードは阻害性(inhibitory)RNA(RNAi)である。

10

【0017】

ある実施態様では、任意のリンカーは標的とする成分ヘインフレイム融合したペプチドである。一の実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分のC末端ヘインフレイム融合されている。一の実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分のN末端ヘインフレイム融合されている。一の実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分ヘコンジュゲートされた分子である。

20

【0018】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、上記いずれかのタンパク質構築物及び医薬として許容し得るキャリアを含む、医薬組成物である。一の実施態様では、医薬組成物は経口投与に適している。一の実施態様では、投与は静脈内投与である。一の実施態様では、投与は筋肉内投与である。一の実施態様では、投与は皮下投与である。

【0019】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、消化管組織がBTNL3/8を発現する消化管系の状態を治療する方法であり、治療的有効量の、請求項62~66のいずれか一項記載の医薬組成物を、消化管組織がBTNL3/8を発現する状態の患者へ投与することを含む方法である。この方法の一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤は、アミノサリチレートである。一の実施態様では、抗炎症剤は、非ステロイド系抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤は、抗炎症性サイトカインである。一の実施態様では、抗炎症剤は抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤はステロイドである。一の実施態様では、ステロイドはグルココルチコイドである。一の実施態様では、グルココルチコイドはプレドニゾンである。一の実施態様では、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。一の実施態様では、ペイロードは免疫調節剤である。

30

【0020】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれか記載の医薬組成物を、炎症性腸疾患の患者へ投与することを含む、炎症性腸疾患の治療法である。一の実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎である。一の実施態様では、炎症性腸疾患はクローン病である。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤はアミノサリチレートである。一の実施態様では、抗炎症剤は非ステロイド抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤は抗炎症性サイトカイン、任意でインターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)である。一の実施態様では、抗炎症剤ペイロードは、抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤ペイロードは、ステロイドである。一の実施態様では、ステロイドはグルココルチコイドである。一の実施態様では、グルココルチコイドはプレドニゾンである。一の実施態様では、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗生物質である。一の実施態様では、抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロ

40

50

ニダゾール、モキシフロキサシン又はアモキシシリンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、カルシニユリン阻害剤である。一の実施態様では、カルシニユリン阻害剤は、シクロスポリンA又はタクロリムスである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、免疫調節剤である。一の実施態様では、免疫調節剤は免疫抑制剤である。一の実施態様では、免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、タンパク質ペイロードである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、抗体、抗体断片又は一本鎖可変断片である。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、TNF α 抗原に特異的であり、かつ(comprises and)少なくとも1つであるABSを含む。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、アダリムマブ、インフリキシマブ又はセルトリズマブの相補性決定領域(CDR)を含む。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、インターロイキン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、インターロイキンは、IL-12、IL-23、又はそれらの組み合わせである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、ウステキヌマブ又はブリキヌマブ(brikinumab)のCDRを含む。一の実施態様では、生物製剤(biologic)ペイロードは、インテグリン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、インテグリンは、 α 4インテグリンである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、インフリキシマブ、ナタリズマブ又はベドリズマブのCDRを含む。一の実施態様では、タンパク質構築物は、鎮痛剤ペイロードを含む。一の実施態様では、タンパク質構築物は、栄養補助食品ペイロードを含む。

【0021】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、過敏腸症候群の患者へ投与することを含む、過敏腸症候群の治療法である。複数の実施態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、憩室炎の患者へ投与することを含む、憩室炎の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは抗生物質である。ある実施態様では、抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロニダゾール、モキシフロキサシン又はアモキシシリンである。

【0022】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、セリアック病の患者へ投与することを含む、セリアック病の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは免疫抑制剤である。ある実施態様では、免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである。

【0023】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、微生物感染している患者へ投与することを含む、微生物感染の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは抗菌剤である。ある実施態様では、抗菌剤は、抗寄生虫剤、抗生物質、抗真菌剤又は抗ウイルス剤である。

【0024】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、代謝性障害又は代謝性欠乏の患者へ投与することを含む、代謝性障害又は代謝性欠乏の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは栄養補助食品である。ある実施態様では、栄養補助食品は、酵素又はビタミンである。

【0025】

ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有効量の、上記いずれかの医薬組成物を、免疫関連症状の患者へ投与することを含む、免疫系の制御方法である。ある実施態様では、ペイロードは、免疫抑制剤である。ある実施態様では、免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである。ある実施態様では、ペイロードは、免疫賦活剤である。ある実施態様では、免疫賦活剤はサイトカインである。

【図面の簡単な説明】

【0026】

(5.図面の簡単な説明)

【図1】 ヒトV γ 4(hV γ 4)、ヒトV γ 2(hV γ 2)及びマウスV γ 7(mV γ 7)可変(V)ドメインのアミノ酸配列アラインメントを示す。本明細書で示されるアミノ酸位置の番号付けは、18アミノ酸リーダー配列(図示せず)を含む、完全なT細胞受容体(TCR)タンパク質配列に基づく。アラインメント中の46位及び117位のダッシュは、アラインメントを最適化するために導入されたmV γ 7配列のギャップを示す。CDR領域を太字フォントで示す。CDR1は、アラインメントのアミノ酸45～50位に位置する。CDR2は、アラインメントのアミノ酸68～75位に位置する。CDR3の最初の5アミノ酸は、アラインメントのアミノ酸114～118位に位置する。CDR4は、アラインメントのアミノ酸85～100位に位置する。アラインメント87位及び90位に位置するヒトV γ 4-CDR4内の下線付きアミノ酸を、hV γ 2内の対応するアミノ酸で置き換えた場合に、機能が無効になる(図7を参照)。

10

【0027】

【図2】 応答する上皮細胞間リンパ球(IEL)から単離した $\gamma\delta$ T細胞受容体を同定、クローニング及び試験するために使用した実験的アプローチを示す。

【0028】

【図3】 図3Aは、TCR欠損Jurkat細胞内のTCR構築物中の、単離されたIEL由来の $\gamma\delta$ TCR可変ドメインの発現に使用したレンチウイルスベクターバックボーンのダイアグラムである。

【0029】

図3Bは、TCR欠損Jurkat(J76細胞)内の $\gamma\delta$ TCR可変ドメイン由来の、クローニングしたCDR3ペアを有するTCR構築物の形質導入後72時間での発現を示す。

20

【0030】

【図4】 図4Aは、V γ 4V δ 1形質導入したJ76細胞のBTNL3/8誘導された応答の表示例を示す。抗CD3刺激での陽性対照も又、(アイソタイプ対照に対して)表示する。

【0031】

図4Bは、3つの独立した、V γ 4V δ 1形質導入したJ76系統は、V γ 9V δ 2系統とは異なり、BTNL3/8発現細胞へ応答したことを示す。B3、C11及びH7は、図2に示す方法で得られた3つの異なるCDR3ペアを表す。

【0032】

【図5】 空ベクター(EV)を発現する細胞に対して正規化した形質導入細胞(+ve細胞)内でのCD69発現%の倍数変化(FC)、及び、V γ 4TCR又はV γ 2TCRを発現するJ76細胞内でのTCRダウンレギュレーションパーセントを示す。応答するV γ 4 H7 TCRの全VドメインをV γ 2コード配列(V γ 2H7)で置換した場合(ただし、CDR3 γ 及び全デルタ鎖は置換しない)、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化は失われた。しかし、応答するV γ 4 H7 TCRのCDR1(H7 CDR1^{V γ 2})及び/又はCDR2(H7 CDR2^{V γ 2})をV γ 2コード配列で置換した場合、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化は維持された。

30

【0033】

【図6】 図6Aは、ヒトV γ 2及びヒトV γ 4の一部のVドメイン配列アラインメントを示す。CDR1、CDR2及びCDR3は、網掛け四角内で示される。合計9個の(9)アミノ酸が異なる。4個の異なるアミノ酸は、CDR2とCDR4との間のフレームワーク領域3内に位置し、本明細書では「CDR4」として定義する。

40

【0034】

図6Bは、Cn3Dを使用して整列させた、V γ 4/V δ 1ペアにした可変ドメイン及びV γ 5/V δ 1ペアにした可変ドメインの既に公開されている構造を示す。CDR4領域は、従来のCDRと区別できない適切なループを形成する。特記されるのは、V γ 4のCDR4ループとV γ 5のCDR4ループとでは、顕著な立体構造の違いを示すことである。

【0035】

【図7】 空ベクター(EV)を発現する細胞に対して正規化した形質導入細胞(+ve細胞)内でのCD69発現%の倍数変化(FC)、並びに、V γ 4TCR(H7 WT)、H7 CDR3を伴うV γ 2TCR

50

(V γ 2 H7)、及びCDR4内のアミノ酸置換を伴うV γ 4TCRを発現するJ76細胞内でのTCRダウンレギュレーションパーセントを示す。アミノ酸87位及び90位でのYA置換は、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化を失わせた一方、アミノ酸94位及び98位でのNL置換は、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化を失わせなかった。

【0036】

【図8】図8は、本発明の実施態様における、2つの鎖がロイシンジッパー相補性によってヘテロダイマー化する、可溶性ヘテロダイマー性 $\gamma\delta$ TCRのポリペプチド鎖のデザイン概略図である。V γ ドメイン又は、V δ ドメインはそれぞれ、膜貫通型ドメインを欠くTCR α 又はTCR β 定常領域にインフレーム融合され、その次にロイシンジッパー配列及びヒスチジンタグ/リンカーが続く。V γ 含有ポリペプチド及びV δ 含有ポリペプチドが発現され、翻訳後にダイマー化された。

10

【0037】

【図9】図9Aは、可溶性Hisタグ付きV γ 4 δ 2 TCR及びAPC抗Hisタグ抗体で染色した後の、BTNL3及びBTNL8構築物又は空ベクターで形質導入したHEK293T細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

【0038】

図9Bは、抗FLAG及び抗HA抗体で並行染色した後の、BTNL3及びBTNL8構築物又は空ベクターで形質導入したHEK293T細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

【0039】

【図10】図10は、図8に記載したように構築した可溶性TCRの染色を示す。V γ 4V δ 1可溶性TCR及びV γ 4V δ 2可溶性TCRは、BTNL3+BTNL8を発現する細胞株への強い結合を示すが空ベクター(EV)対照細胞株は示さない。

20

【0040】

【図11】図11Aは、可溶性Hisタグ付きTCR及び抗Hisタグ抗体と共に4°CでインキュベートしたBTNL3+BTNL8発現細胞を示す概略図である。

【0041】

図11Bは、可溶性Hisタグ付きTCR及び抗Hisタグ抗体と共に37°CでインキュベートしたBTNL3+BTNL8発現細胞を示す概略図である。

【0042】

【図12】BTNL3+BTNL8発現細胞による37°Cでの可溶性TCRの内部移行の時間経過である。

30

【0043】

【図13】図13Aは、BTNL3及びBTNL8構築物を発現する染色細胞での、抗BTNL3抗体及び可溶性TCRの比較を示す。

【0044】

図13Bは、可溶性TCRと比較して、抗BTNL3抗体と共にインキュベートした細胞の蛍光の減少を示す。

【0045】

【図14】可溶性TCRによるペイロード送達を評価する方法を示す概略図である。

【0046】

40

【図15】図15Aは、BTNL3及びBTNL8構築物を発現する細胞内での、可溶性TCR+ α -His抗体複合体の内部移行を評価する実験結果を示す。図15Bは、可溶性TCR+ α -His抗体複合体と共に、4°C及び37°Cでインキュベートした細胞内での、トリプシン処置後に残存する蛍光シグナルを示すグラフである。

【0047】

【図16】図16Aは、可溶性TCR+ α -His抗体複合体と共に、4°C及び37°Cでインキュベートし、DMEM処理した293T.L3^{RI}L8細胞のイメージングサイトメトリー結果を示す。

【0048】

図16Bは、可溶性TCR+ α -His抗体複合体と共に、4°Cでインキュベートし、DMEM又はトリプシン処理した293T.L3L8細胞のイメージングサイトメトリー結果を示す。

50

【0049】

図16Cは、可溶性TCR+ α -His抗体複合体と共に、37℃でインキュベートし、DMEM又はトリプシン処理した293T.L3L8細胞のイメージングサイトメトリー結果を示す。

【0050】

上記図面は、図解の目的だけのために本発明の様々な実施態様を示す。当業者は、下記考察から、本明細書に記載された本発明の原理から逸脱することなく、本明細書に示す構造及び方法の代替的な実施態様を採用できることを容易に認識するであろう。

【発明を実施するための形態】

【0051】

(6.詳細な記載)

(6.1.定義)

他に明記しない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明の属する分野の当業者により、通常理解される意味を有する。本明細書で使用される次の用語は、下記に基づく意味を有する。

【0052】

本明細書で使用される「タンパク質構築物」は、少なくとも2つの機能的エレメント、BTNL3/8を標的とする成分及びペイロードを含む1以上のポリペプチド鎖を示す。ペイロードは、タンパク質ペイロードであってもなくてもよい。

【0053】

本明細書で使用される「BTNL3/8」は、ブチロフィリントタンパク質3(BTNL3)及びブチロフィリントタンパク質8(BTNL8)タンパク質を示す。「BTNL3/8」は、BTNL8無しのBTNL3、BTNL3無しのBTNL8、又はBTNL3及びBTNL8のヘテロダイマーを示すこともある。

【0054】

本明細書で使用される「BTNL3/8を標的とする成分」は、特異的にBTNL3/8と結合する分子を示す。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、抗原結合タンパク質である。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、V γ ドメインポリペプチドの少なくとも一部である。

【0055】

本明細書で使用される「V γ ドメイン」は、T細胞受容体(TCR) γ 鎖の可変ドメインを示す。このV γ ドメインは、J領域及び相補性決定領域(CDR)、CDR1、CDR2、CDR3及びCDR4を含む。V γ ドメイン残基の番号付けを図1に示すが、図中で残基19は、シグナル配列切断後の成熟V γ ドメインのN末端アミノ酸である。図1に示されないV γ ドメインのための、残基の番号付けは、図1の配列への最良のアラインメント後に割り当てられる。V γ ドメインの「対応残基」は、対応するとされた残基と同じ番号付けされた位置にあるアミノ酸である。

【0056】

本明細書で使用される「V γ ドメインCDR4」は、CDR2領域とCDR3領域との間に位置するV γ ドメインの連続した16アミノ酸部分を言い、図1のアミノ酸配列位置85~100に対応する。ヒトV γ 4ドメインのCDR4のアミノ酸配列は、配列番号:3の配列を有する。ヒト δ γ 2ドメインのCDR4のアミノ酸配列は、配列番号5である。マウスV γ 7ドメインのCDR4のアミノ酸配列は、配列番号:4である。

【0001】 本明細書で使用される「ペイロード」は、目的の標的細胞(例えば、BTNL3/8を発現する細胞及び／又は腸上皮細胞)へ送達されるいずれかの分子を示す。ペイロードは、ヌクレオチド、ヌクレオチド(例えば、検出可能成分若しくは毒素を含む、又は転写を阻害するヌクレオチド)、DNA及びRNA等の核酸(例えば、mRNA、RNAi、miRNA、siRNA、snRNA、snoRNA、piRNA、exRNA、scaRNA及びlncRNA)、アミノ酸(例えば、検出可能成分若しくは毒素を含む、又は翻訳を阻害するアミノ酸)、ポリペプチド(例えば、酵素、生物製剤)、脂質、炭水化物、小分子(例えば、小分子薬及び小分子毒素)並びにそれらの組み合わせを含むことができる。ある実施態様では、ペイロードは治療薬である。治療

10

20

30

40

50

薬には、次に限定されるものではないが、化学療法薬、造影剤(例えば、放射性同位元素)、免疫調節剤(例えば、サイトカイン、ケモカイン、又はチェックポイント阻害剤)、及び毒素(例えば、細胞毒性剤)が含まれる。ある実施態様では、ペイロードは抗体である。

【0057】

本明細書で使用される「リンカー」は、タンパク質構築物の機能的エレメント(例えば、標的とする成分及びペイロード)を結合するために使用できるいずれかの分子を示す。ある実施態様では、リンカーは、タンパク質構築物の機能的エレメント(例えば、標的とする成分及びペイロード)への分子の部位特異的コンジュゲーションを可能にするために使用できる。ある実施態様では、リンカーは、タンパク質構築物をインビトロ又はインビボで、同定又は検出するために使用できる。

【0058】

本明細書で使用される「ペプチドリンカー」は、ポリペプチドであるリンカーを示す。ある実施態様では、ペプチドリンカーは、タンパク質構築物(例えば標的とする成分及びペイロード)の機能的エレメントへ、インフレイムで融合される。ある実施態様では、ペプチドリンカーは、タンパク質構築物のエレメントへの、分子の部位特異的コンジュゲーションを可能にする。ペプチドリンカーは、ペプチドリンカーが融合する機能的エレメントの、求められる立体構造を可能とするなら、どんな長さ及び種類のアミノ酸配列でもよい。

【0059】

本明細書で使用される「内部リンカー」は、そのN末端及びC末端両方で、少なくとも1つの追加的なポリペプチドと共有結合するポリペプチド配列を示す。ある実施態様では、内部リンカーは、標的とする成分(例えば、V γ ドメインとV δ ドメインとの間の内部リンカー)内のポリペプチド鎖である。内部リンカーは、どんな長さ及び種類のアミノ酸配列でもよいが、それは内部リンカーが融合する追加的なポリペプチドが、求められる立体構造を維持できるものである。

【0060】

本明細書で使用される「抗体」は、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む少なくとも1つの抗体可変ドメインを含む、いずれかの抗体タンパク質構築物を含む。抗体は、次に限定されるものではないが、可変ドメインのみの分子、一本鎖可変断片(scFv)、一本鎖Fab断片(scFab)、二重特異性抗体、ハイブリッドIgG、Fab融合タンパク質、Fc改変IgG、付加IgG、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディ、DART、タンデムダイアボディ(tandAb)及びミニボディを含む。

【0061】

本明細書で使用される「一本鎖インフレイム融合」は、一本鎖インフレイム融合T細胞受容体可変ドメイン(scTv)を示し、T細胞受容体の少なくとも2つのポリペプチド可変ドメインの少なくとも一部は一本鎖の融合ポリペプチド鎖として生成され、その可変ドメイン配列はインフレイム融合されている。一本鎖インフレイム融合T細胞受容体可変ドメイン(scTv)は、1を超える可変ドメイン及び/又は定常領域を含むことができ、任意の起源のT細胞受容体とペアになってもよい。従って、scTvは、2以上の可変ドメインがインフレイム融合されているタンデムscTvを含む。

【0062】

本明細書で使用される「抗原結合部位」(ABS)は、所与の抗原又はエピトープを特異的に認識しそれと結合する抗体分子の領域を示す。ABSは、特異的な抗原又はエピトープに特別な親和性で結合するといわれる。本明細書に記載された「親和性」は、ある分子と別の分子との間の非共有分子間力の相互作用の強さを示す。親和性、即ち、相互作用の強さは、解離平衡定数(K_D)として表すことができ、低 K_D 値は、分子間の相互作用が強いことを示す。抗体構築物の K_D 値は、当分野で周知の方法によって測定され、次に限定されるものではないが、バイオレイヤー干渉法(例えば、Octet/FORTEBIO(登録商標))、表面プラズモン共鳴(SPR)技術(例えば、Biacore(登録商標))、及び細胞結合アッセイを含む。ABSとその同種(cognate)抗原又はエピトープとの間の親和性は、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、又は 10^{-10} M未満の K_D 値を有する。

10

20

30

40

50

【0063】

本明細書で使用される「小分子」は、900ダルトン>未満の低分子量を有する分子を示し、ペプチドを含まない。小分子は、生物学的プロセスを調節する可能性があり、1nmオーダーのサイズを有する有機分子を含む。

【0064】

本明細書で使用される「抗炎症性サイトカイン」は、抗炎症活性を有するいずれのサイトカインを示す。抗炎症性サイトカインは、次に限定されるものではないが、インターロイキン(IL)IL-1ra、IL-4、IL-6、IL-10、IL-11、IL-13、及びトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)を含む。

【0065】

本明細書で使用される「抗催炎症剤」は、炎症誘発性サイトカインの活性又は発現を阻害するいずれかの分子又は薬剤を示す。抗催炎症剤は、炎症誘発性サイトカインの阻害剤を含み、それは、次に限定されるものではないが、インターロイキン-1(IL-1)、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターフェロン γ (INF- γ)及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含む。抗催炎症剤は、可溶性腫瘍壊死因子受容体p55、可溶性腫瘍壊死因子、p75、可溶性IL-1受容体II型、IL-18結合タンパク質等の、抗炎症活性を有する可溶性サイトカイン受容体を含む。抗催炎症剤は又、膜結合型IL-1受容体II型等の炎症誘発性サイトカイン受容体と競合する細胞内シグナル伝達を欠くサイトカイン受容体も含む。

【0066】

本明細書で使用される「免疫調節剤」は、免疫系の細胞の免疫応答及び／又は活性を変化させるいずれかの分子を示す。ある実施態様では、免疫調節剤は、免疫抑制剤又は免疫賦活剤である。「免疫抑制剤」は、免疫系の細胞の免疫応答及び／又は活性を低下させるいずれかの分子又は薬剤を示し、一方「免疫抑制剤」は、免疫系の細胞の免疫応答及び／又は活性を増加させるいずれかの分子又は薬剤を示す。

【0067】

本明細書で使用される「免疫関連症状」は、免疫系の活性の変化と関連するいずれの症状又は障害をも示す。免疫関連症状は、免疫応答の増加又は減少と関連する症状が含まれる。免疫関連症状は、次に限定されるものではないが、自己免疫性疾患、炎症症状、アレルギー反応、免疫不全、造血性癌及びその他の造血性異常を含む。

【0068】

本明細書で使用される「炎症症状」は、炎症組織の炎症の増大又は存在と関連するいずれの症状又は障害をも示す。炎症症状は、次に限定されるものではないが、喘息、アテローム性動脈硬化、自己免疫性疾患、自己炎症性疾患、癌、セリアック病、慢性前立腺炎、大腸炎、憩室炎、糸球体腎炎、化膿性汗腺炎、過敏症、炎症性腸疾患、間質性膀胱炎、扁平苔癬、マスト細胞活性化症候群、マスト細胞症、耳炎、骨盤炎症性疾患、再灌流障害、リウマチ熱、関節リウマチ、鼻炎、サルコイドーシス、移植拒絶及び血管炎を含む。

【0069】

本明細書で使用される「消化管系症状」は、消化管系のいずれかの組織と関連するいずれの症状又は障害をも示す。消化管系症状は、次に限定されるものではないが、消化管系の免疫関連症状、消化管系の炎症症状、消化管系組織の微生物感染、及び摂食異常、代謝性障害又は代謝性欠乏によって引き起こされる症状を含む。消化管系症状は、次に限定されるものではないが、炎症性腸疾患、セリアック病、過敏性腸症候群、憩室炎、クローン病、及び癌(例えば、結腸癌、直腸癌、胃癌)を含む。

【0070】

本明細書で使用される用語「処置」又は「治療」は、治療的処置及び予防的又は防御的措置の両方を示し、その目的は、多発性硬化症、関節炎、又は癌の進行等の、望ましくない生理学的変化又は障害を防御又は減速(軽減)することである。有益な又は求められる臨床的な結果は、次に限定されるものではないが、検出可能又は検出不可能のいずれかの、兆候の緩和、疾患範囲の減少、安定化した(すなわち、悪化しない)疾患状態、疾患の進行

10

20

30

40

50

の遅延又は鈍化、病状の改善又は寛解、及び(局所的又は全体的な)緩解を含む。「治療」にはまた、治療を受けない場合に予測される生存と比較して、生存を延長させる意味もある。治療が必要な人には、すでにその症状又は障害を有する人と同様に、その症状又は障害を起こしやすい人、又はその症状又は障害を防御すべき人も含まれる。

【0071】

「対象」又は「個体」又は「動物」又は「患者」又は「哺乳動物」は、全ての対象を意味し、特に、診断、予後診断、又は療法が求められる哺乳類対象を意味する。哺乳類対象は、ヒト、又は、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、乳牛その他等の、家庭内動物、家畜、及び動物園の動物、運動用動物、若しくは愛玩動物を含む。

10

【0072】

用語「充分な量」は、求められる効果を生じるのに充分な量、例えば、細胞内タンパク質凝集を調節するのに充分な量を意味する。

【0073】

用語「治療的有效量」は、疾患の兆候を改善するのに効果的な量である。予防は療法と見なすことができるため、治療的有效量は「予防的有效量」である場合もある。

【0074】

本明細書全体で言及される用語「組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質」又はこの用語の派生的表現は、ヒト $\gamma\delta$ TCR配列又はその機能的誘導体若しくはホモログから、標準的な遺伝子工学的的方法論によって生成されるいずれかの組換えタンパク質を示す。そのような組換えタンパク質はまた、ダイマー化ドメイン等の追加的な融合エレメントを含むことができる。その非限定的例は、TCRの正しい折り畳みをサポートするための融合、膜貫通型ドメインとして作用するための融合(例えば、細胞膜の表面でTCRの正確な提示をサポートするため)、又は半減期を延長する、若しくはサイズを大きくするための融合(例えば、ヒト血清アルブミン融合ドメイン)又は本明細書で別に記載されるペイロード融合を含む。これらの追加的な融合エレメントは、 $\gamma\delta$ TCR配列又はその誘導体及びホモログに由来する配列で生成することができ、又それとは別に、この融合配列は起源が非TCRでもよい。

20

【0075】

本明細書全体で言及される用語「組換え $\gamma\delta$ TCR配列」若しくは「組換えヒトTCRライブラリ」若しくは「組換えヒトTCRパネル」又はそれらに由来する派生的用語は、1を超える組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質のコレクション、又は2、若しくは3、若しくは4、若しくは5、又は10を超える組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質のコレクションを示す。このコレクションは、少なくとも1つ以上のアミノ酸において異なる配列のコレクションを含むこともある。この組換えTCRのコレクションは、可溶性形状で提示されることもできる。或いは、ディスプレイ目的のために、このコレクションは又、無機又は有機材料(非限定的例としては、「ビーズ」又は「プレート」又は「カラム」又は「ファージ」が含まれる。)へ結合、又は融合、又は繋ぎ止めることもできる。或いは、このようなコレクションは又、無傷細胞若しくは生細胞中にみられるような膜、又はミセル等の非生命の膜の、1の膜上又は複数の膜コレクション上で、提示又はディスプレイすることもできる。そのようなコレクションを1又は複数の生細胞上で発現及び提示する場合、通常は、同種発現ベクターのコレクションも又生成する。この同種発現ベクターのコレクションを使用して、最初に1又は複数の細胞を操作し、この組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質、又はこのタンパク質のライブラリ若しくはパネル若しくはコレクションをディスプレイし、このTCRタンパク質を発現する細胞のライブラリを作成することができる。

30

40

【0076】

本明細書全体で言及される用語「同種結合相手」若しくは「同種結合相手候補」又はそれらに由来する派生的用語は、配列特異的な様式で組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質に結合すると特定されたタンパク質又はその誘導体を示す。そのような同種結合相手の発見又はスクリーニング又は検証のために、それらはそれらの自然な環境(例えば、1又は複数の細胞の表面上)で提示又はディスプレイされることができる。それらはまた、そのような細胞

50

からの抽出物若しくは分泌物、それらから精製した誘導体として、又は組換え形状で、提示又はディスプレイされることができる。

【0077】

(6.2.他の解釈規則)

他に特記しない限り、本明細書の配列に関する全ての参照はアミノ酸配列に関する。

【0078】

本開示中、「を含む(comprises)」、「を含んでいる(comprising)」、「を備えている(containing)」、「を有する(having)」、「を含有する(includes)」、「を含有している(including)」、及びその語学的な変異形は、米国特許法に記載された意味を有し、それが明示的に列挙する範囲を超えて、追加的な要素の存在を許容するものである。

【0079】

本明細書で提供される範囲は、列挙された終点を含む、範囲内の全ての値の省略形であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、及び50から構成される群からの、任意の数、数の組み合わせ、又は部分範囲を含むと理解される。

【0080】

特記しない又は文脈から明白でない限り、本明細書で使用される用語「又は」は、包括的であると理解される。特記しない又は文脈から明白でない限り、本明細書で使用される用語「1の(a)」、「1つの(an)」、及び「この(the)」は、単数形又は複数形であると理解される。

【0081】

特記しない又は文脈から明白でない限り、本明細書で使用される用語「約」は、当技術分野における通常の許容誤差範囲内、例えば平均の2標準偏差内であると理解される。「約」は、記載された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、又は0.01%範囲内と理解できる。他に、文脈から明白でない限り、本明細書で提供される全ての数値は、この用語「約」によって改変される。

【0082】

(6.3.BTNL3/8を標的とする成分を含むタンパク質構築物)

第一の態様では、タンパク質構築物が提供される。このタンパク質構築物は、BTNL3/8を標的とする成分、ペイロード、及び、標的とする成分をペイロードへ結合する任意のリンカー、を含む。

【0083】

(6.3.1.1 BTNL3/8を標的とする成分)

BTNL3/8を標的とする成分は、特異的に、ヒトBTNL3、ヒトBTNL8及び／又はヒトBTNL3/8ヘテロダイマーへ結合する。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、下記に更に詳細に記載するように、T細胞受容体(TCR)V γ ドメインポリペプチドの少なくとも一部である。別の実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は抗体の抗原結合部位である。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、そのBTNL3/8を標的とする成分がBTNL3/8へ結合すると、BTNL3/8の機能を阻害又は部分的に阻害する。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、そのBTNL3/8を標的とする成分がBTNL3/8へ結合すると、BTNL3/8の機能を刺激又は活性化する。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、そのBTNL3/8を標的とする成分がBTNL3/8ヘテロダイマーへ結合すると、BTNL3/8ヘテロダイマー機能を阻害又は部分的に阻害する。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、そのBTNL3/8を標的とする成分がBTNL3/8ヘテロダイマーへ結合すると、BTNL3/8ヘテロダイマー機能を刺激又は活性化する。

【0084】

(6.3.1. TCR γ 可変ドメイン)

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、T細胞受容体(TCR)V γ ドメインポ

10

20

30

40

50

リペプチドの少なくとも一部を含む。通常の実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分はV γ ドメインポリペプチドを含む。

【0085】

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、V γ 4由来のCDR4領域を含む。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分はV γ ドメインを含み、そのV γ ドメインの配列位置番号87のアミノ酸はアスパラギン酸又はヒスチジンであり、V γ ドメインの配列位置番号90のアミノ酸はグリシン又はグルタミン酸であり、V γ CDR4の残りの残基は、それぞれの位置で、ヒト又はマウス(murine)のV γ ドメインの対応残基から独立して選択される。

【0086】

ある実施態様では、V γ ドメインCDR4の残りの残基は、それぞれの位置で、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から独立して選択される。いくつかの実施態様では、V γ ドメインCDR4の残りの残基は全て、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は全て、ヒトV γ 4の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は全て、ヒトV γ 2の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ CDR4の残りの残基は全て、マウスV γ 7の対応残基から選択される。一の実施態様では、V γ ドメインの位置番号87~90のアミノ酸配列は、配列番号:1である。一の実施態様では、V γ ドメインの位置番号87~90のアミノ酸配列は、配列番号:2である。

【0087】

ある実施態様では、V γ ドメインは図1に示されるV γ ドメイン配列である。ある実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ ドメインである。一の実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 4ドメインである。一の実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 2ドメインであり、その中ではCDR4のアミノ酸は、アミノ酸配列位置番号87でアスパラギン酸又はヒスチジンで置換され、アミノ酸配列位置番号90でグリシン又はグルタミン酸で置換されている。

【0088】

ある実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 3又はヒトV γ 5である。特別な実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 3又はヒトV γ 5であり、その中ではCDR4のアミノ酸は、アミノ酸配列位置番号87でアスパラギン酸又はヒスチジンで置換され、アミノ酸配列位置番号90でグリシン又はグルタミン酸で置換されている。ある実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 4と少なくとも70%の配列同一性を有するヒトV γ ドメインである。

【0089】

ある実施態様では、V γ ドメインは、非ヒト哺乳動物V γ ドメインであるV γ ドメインである。ある実施態様では、V γ ドメインはヒトV γ 4と少なくとも70%の同一性を有する非ヒト哺乳動物V γ ドメイン配列である。

【0090】

いくつかの実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒト又はマウスのV γ CDR3配列である。ある実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒトCDR3配列を含む。特別な実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 4 CDR3配列を含む。特別な実施態様では、V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 2 CDR3配列を含む。ある実施態様では、V γ ドメインCDR3は、非ヒト哺乳動物CDR3配列を含む。一の実施態様では、V γ ドメインCDR3は、マウスV γ 7 CDR3配列を含む。

【0091】

いくつかの実施態様では、J領域はV γ J領域である。ある実施態様では、J領域はヒトV γ J領域である。ある実施態様では、J領域はマウスV γ J領域である。一の実施態様では、J領域は、配列番号:15~18からなる群から選択されるポリペプチド配列を有する。

【0092】

(6.3.1.1.1 V δ とのペア)

ある実施態様では、タンパク質構築物のBTNL3/8を標的とする成分は更に、ペアになったV δ ドメインを含まない。ある実施態様では、タンパク質構築物のBTNL3/8を標的とす

10

20

30

40

50

る成分は、少なくとも1の追加的なV γ ドメインとペアになったV δ ドメインを含む。ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分はV γ 4ホモダイマーである。ある実施態様では、タンパク質構築物のBTNL3/8を標的とする成分は更に、ペアになったV δ ドメインを含む。ある実施態様では、V δ ドメインはヒトV δ ドメインである。ある実施態様では、ヒトV δ ドメインは、V δ 1、V δ 2、V δ 3、V δ 5、又はV δ 8である。一の実施態様では、ヒトV δ ドメインはV δ 1である。ある実施態様では、V δ ドメインは非ヒト哺乳動物V δ ドメインである。

【0093】

((a)ヘテロダイマーフォーマット)

いくつかの実施態様では、V δ ドメインは、第一及び第二ポリペプチドのヘテロダイマー化によりペアになっており、そのポリペプチドのうちの1つはV γ ドメインを含み、そのポリペプチドのうちの1つはV δ ドメインを含む。

【0094】

ヘテロダイマー性相互作用は、V γ ドメイン及びV δ ドメインを含む複数のポリペプチド間の共有相互作用及び／又は非共有相互作用を含むことができる。通常の実施態様では、V γ ドメイン及びV δ ドメインは、ヘテロダイマーよりもホモダイマーのほうが形成されにくい直交特色によってペアになっている。

【0095】

いくつかの実施態様では、それぞれV γ ドメイン及びV δ ドメインを含むポリペプチドは、遺伝子操作した少なくとも1つのジスルフィド架橋によって共有結合する。遺伝子操作したジスルフィド架橋は、2以上のドメインが会合したときに非ネイティブのジスルフィド結合が形成されるように、2以上のドメインに非内因性システインアミノ酸を提供するアミノ酸配列である。これらの実施態様のあるものでは、少なくとも1つのジスルフィド架橋が、V γ ドメイン及びV δ ドメイン内に設計されている。ある実施態様では、少なくとも1つのジスルフィド架橋は、可変領域とインフレーション融合した定常領域内のような、可変領域の外側のドメイン内に設計される。

【0096】

いくつかの実施態様では、ヘテロダイマー性相互作用はロイシンジッパー相補性である。

【0097】

ある実施態様では、ペアになったV γ /V δ ヘテロダイマーの、1以上のポリペプチドは更に、T細胞受容体定常領域を含む。ある実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ペアになったV γ ドメインのC末端ヘインフレーション融合している。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域はヒトTCR定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域はヒトTCR β 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域はヒトTCR α 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域はヒトTCR γ 定常領域である。一の実施態様では、ペアになったV γ /V δ ヘテロダイマーのポリペプチドは更に、第二T細胞受容体定常領域を含み、その第二T細胞受容体定常領域はペアになったV δ ドメインのC末端ヘインフレーション融合している。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域はヒトTCR α 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域はヒトTCR β 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域はヒトTCR δ 定常領域である。

【0098】

いくつかの実施態様では、V γ ドメインの、第一定常領域とのインフレーション融合は、V γ ドメインと第一TCR定常領域との間の内部リンカー配列を含む。いくつかの実施態様では、V δ ドメインの、第二TCR定常領域とのインフレーション融合は、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域との間の内部リンカー配列を含む。

【0099】

一の実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は配列番号:9を含む。一の実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は配列番号:10を含む。一の実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は配列番号:11を含む。

10

20

30

40

50

【0100】

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインを含む。ある実施態様では、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインは、多量体化している。ある実施態様では、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインの全部又は一部は、T細胞受容体定常領域ヘインフレーム融合している。ある実施態様では、1を超える多量体化V γ ドメイン及び／又はV δ ドメインは、1以上の内部リンカーを含む。

【0101】

更なる態様では、組換え $\gamma\delta$ TCR構築物が提供される。従って、更なる態様においては、配列番号:9(任意で、C末端Hisタグ無し)を含む組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質が提供される。別の態様では、配列番号:10を含む組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質が提供される。別の態様では、配列番号:11(任意で、C末端Hisタグ無し)を含む組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質が提供される。別の態様では、配列番号:12を含む組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質が提供される。別の態様では、配列番号:13を含む組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質が提供される。

【0102】

((b)一本鎖インフレーム融合)

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、V γ ドメイン及びペアになったV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合を含む。いくつかの実施態様では、V γ ドメインはV δ ドメインに対してN末端である。いくつかの実施態様では、V γ ドメインはV δ ドメインに対してC末端である。様々な実施態様では、V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合は、内部リンカー配列を含む。

【0103】

いくつかの実施態様では、V δ ドメインはヒトV δ ドメインである。一の実施態様では、ヒトV δ ドメインは、V δ 1、V δ 2又はV δ 5である。一の実施態様では、ヒトV δ ドメインはV δ 1である。ある実施態様では、一本鎖インフレーム融合は更に、少なくとも1のT細胞受容体定常領域を含む。ある実施態様では、一本鎖インフレーム融合は更に、第一T細胞受容体定常領域を含み、その第一T細胞受容体定常領域は、V γ ドメインのC末端ヘインフレーム融合している。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である。一の実施態様では、第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 γ 定常領域である。一の実施態様では、一本鎖インフレーム融合は更に、第二T細胞受容体定常領域を含み、その第二T細胞受容体定常領域は、ペアになったV δ ドメインのC末端ヘインフレーム融合している。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である。一の実施態様では、第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 δ 定常領域である。一の実施態様では、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域とのインフレーム融合は、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域との間の内部リンカー配列を含む。

【0104】

ある実施態様では、一本鎖インフレーム融合は、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインを含む。ある実施態様では、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインは、多量体化している。ある実施態様では、1を超える多量体化V γ ドメイン及び／又はV δ ドメインは、1以上の内部リンカーを含む。ある実施態様では、1を超えるV γ ドメイン及び／又はV δ ドメインの全部又は一部は、少なくとも1のT細胞受容体定常領域ヘインフレーム融合している。

【0105】

(6.3.2.抗体ベースの標的成分)

ある実施態様では、BTNL3/8を標的とする成分は、特異的に、ヒトBTNL3、ヒトBTN L8及び／又はヒトBTNL3/8ヘテロダイマーへ結合する抗体を含む。ある実施態様では、

抗体は、完全長抗体断片又は抗体フォーマットであり、次に限定されるものではないが、Fab断片、Fv、scFv、タンデムscFv、ダイアボディ、scダイアボディ、DART、タンデムダイアボディ(tandAb)、ミニボディ、ラクダ類VHH、及び、当業者に公知の他の抗体断片又はフォーマットを含む。例示的な抗体及び抗体断片フォーマットは、Brinkmannらの文献、MABS, 2017, Vol. 9, No. 2, 182-212に詳細に記載されており、引用によりその教示全体が本明細書に組み込まれる。

【0106】

一の実施態様では、抗体はFc受容体と相互作用可能なFcドメインを含む。一の実施態様では、抗体は、Fc受容体と相互作用不可能なFcドメインを含む。ある実施態様では、抗体は、抗体ドメインのアミノ酸配列中に1以上の遺伝子操作した変異を有し、それは本来的にその抗体結合と関係しているエフェクター機能を低下させるものである。エフェクター機能は、次に限定されるものではないが、抗体依存性細胞傷害(ADCC、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害とも呼ばれる)、補体固定化(fixation)(例えば、C1q結合)、抗体依存性細胞貪食(ADCP)、及びオプソニン作用等、抗体のFc部分に結合するFc受容体から生じる細胞機能を含む。エフェクター機能を低下させる遺伝子操作変異は、米国出願公開番号第2017/0137530号、Armourらの文献(Eur. J. Immunol. 29(8)(1999)2613-2624)、Shieldsらの文献(J. Biol. Chem. 276(9)(2001)6591-6604)、及びOganessianらの文献(Acta Crystallographica D64(2008)700-704)に詳細に記載されており、それらは引用により本明細書へその全体が組み込まれる。特別な実施態様では、抗体は、FcR受容体によるROR結合分子のFc部の結合を減少させる抗体ドメインのアミノ酸配列中に、1以上の遺伝子操作変異を有する。いくつかの実施態様では、FcR受容体はFcR γ 受容体である。特別な実施態様では、FcR受容体はFc γ RIIa及び／又はFc γ RIIIA受容体である。特別な実施態様では、エフェクター機能を減少させる、1以上の遺伝子操作変異は、抗体のCH2ドメイン内の変異である。

【0107】

(6.3.2.1ペイロード)

本タンパク質構築物は、ペイロードを含む。

【0108】

様々な実施態様では、ペイロードは、ヌクレオチド、更に検出可能成分若しくは毒素を含む、又は転写を阻害するヌクレオチド、DNA、酵素等のポリペプチドをコードするmRNA分子、他のRNA分子(例えば、RNAi、miRNA、siRNA、piRNA、snRNA、snRNA、exRNA、scaRNA及びlncRNA)等の核酸、アミノ酸(例えば、検出可能成分若しくは毒素を含む、又は翻訳を阻害するアミノ酸)、ポリペプチド(例えば、酵素、生物製剤)、脂質、炭水化物、小分子(例えば、小分子薬及び小分子毒素)並びにそれらの組み合わせを含むことができる。

【0109】

ある実施態様では、ペイロードは治療薬である。治療薬には、次に限定されるものではないが、化学療法薬、免疫調節剤(例えば、サイトカイン、ケモカイン、又はチェックポイント阻害剤)、ホルモン及び毒素(例えば、細胞毒性剤)が含まれる。

【0110】

ある実施態様では、ペイロードは抗体である。一の実施態様では、抗体は、CD3抗原に特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む。一の実施態様では、抗体は、腫瘍壊死因子 α (TNF α)抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、抗体はFc受容体と相互作用可能なFcドメインを含む。一の実施態様では、抗体は、Fc受容体と相互作用不可能なFcドメインを含む。

【0111】

ある実施態様では、ペイロードはホルモンである。ある実施態様では、ペイロードは栄養補助食品である。ある実施態様では、ペイロードは抗菌剤である。

【0112】

ある実施態様では、タンパク質構築物は、同一又は異なってもよい複数のペイロードを

含む。

【0113】

特別な実施態様では、ペイロードは、BTNL3/8を標的とする成分のC末端へ結合する。
特別な実施態様では、ペイロードは、BTNL3/8を標的とする成分のN末端へ結合する。

【0114】

(6.3.1.ポリペプチド)

様々な実施態様では、ペイロードはポリペプチドである。ある実施態様では、ペイロードは、BTNL3/8を標的とする成分へインフレーション融合したポリペプチドである。特別な実施態様では、ペイロードはBTNL3/8を標的とする成分のC末端へインフレーション融合している。特別な実施態様では、ペイロードはBTNL3/8を標的とする成分のN末端へインフレーション融合している。

10

【0115】

ある実施態様では、ポリペプチドペイロードはサイトカインである。ある実施態様では、ペイロードは、インターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)等の抗炎症性サイトカインである。

【0116】

ある実施態様では、ペイロードは抗炎症性ポリペプチドである。特別な実施態様では、抗炎症性ポリペプチドは、1以上の炎症誘発性サイトカインの阻害剤である。特別な実施態様では、抗炎症性ポリペプチドは、1以上のインターロイキン-1(IL-1)、IL-6、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターフェロン γ (INF- γ)又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子の、阻害剤である。ある実施態様では、抗炎症性ポリペプチドは、可溶性腫瘍壊死因子受容体p55、可溶性腫瘍壊死因子、p75、可溶性IL-1受容体II型、IL-18結合タンパク質等の、抗炎症活性を有する可溶性サイトカイン受容体である。ある実施態様では、抗炎症性ポリペプチドは、特異的に炎症誘発性サイトカインへ結合する抗体抗原結合部位を含む。

20

【0117】

いくつかの実施態様では、ペイロードはペプチドである。ある実施態様では、ペイロードは、BTNL3/8を標的とする成分へインフレーション融合したペプチドである。

【0118】

(6.3.2.1.1抗体抗原結合部位)

ある実施態様では、ペイロードは、少なくとも1つの抗体抗原-結合部位(ABS)である。ある実施態様では、抗体抗原-結合部位は、Fab断片、Fv、scFv、タンデムscFv、ダイアボディ、scダイアボディ、DART、タンデムダイアボディ(tandAb)、ミニボディ、ラクダ類VHH、ナノボディ、又は、当業者に公知の他の抗体断片又はフォーマットとして構成される。例示的な抗体及び抗体断片フォーマットは、Brinkmannらの文献、MABS, 2017, Vol. 9, No. 2, 182-212に詳細に記載されており、引用によりその教示全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0119】

様々な実施態様では、少なくとも1つの抗体抗原-結合部位は、サイトカインに特異的である。いくつかの実施態様では、抗原-結合部位は、炎症誘発性サイトカインに特異的である。特別な実施態様では、少なくとも1つの抗原-結合部位は、インターロイキン-1(IL-1)、IL-6、IL-12、IL-18、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターフェロン γ (INF- γ)又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に特異的である。

40

【0120】

一の実施態様では、抗体は、インターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)等の抗炎症性サイトカインに特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む。一の実施態様では、抗体は、抗炎症剤に特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む。

【0121】

いくつかの実施態様では、抗体は、サイトカイン抗原に特異的な、少なくとも1つの抗

50

原結合部位(ABS)を含む。一の実施態様では、抗体は、腫瘍壊死因子 α (TNF α) 抗原に特異的な、少なくとも1つのABSであり、を含む(is comprises)。

【0122】

(6.3.2.小分子ペイロード)

[0100]ある実施態様では、ペイロードは小分子である。ある実施態様では、小分子は治療薬(即ち、小分子薬)である。ある実施態様では、小分子治療薬は免疫調節剤である。ある実施態様では、小分子は、細胞性タンパク質(例えば、受容体、他のシグナル分子、酵素又は転写因子)の阻害剤又は活性化剤である。ある実施態様では、小分子治療薬は毒素である。

【0123】

[0101]いくつかの実施態様では、ペイロードは、BTNL3/8を標的とする成分と化学的コンジュゲーションにより結合する薬物である。

【0124】

[0102]本明細書に開示されたタンパク質構築物へ、薬物をコンジュゲートするために利用できる、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の調製法は、例えば、米国特許第8,624,003号(釜(pot)式製法)、米国特許第8,163,888号(一段式)、米国特許第5,208,020号(二段式製法)、米国特許第8,337,856号、米国特許第5,773,001号、米国特許第7,829,531号、米国特許第5,208,020号、米国特許第7,745,394号、国際公開WO2017/136623、国際公開WO2017/015502、国際公開WO2017/015496、国際公開WO2017/015495、国際公開WO2004/010957、国際公開WO2005/077090、国際公開WO2005/082023、国際公開WO2006/065533、国際公開WO2007/030642、国際公開WO2007/103288、国際公開WO2013/173337、国際公開WO2015/057699、国際公開WO2015/095755、国際公開WO2015/123679、国際公開WO2015/157286、国際公開WO2017/165851、国際公開WO2009/073445、国際公開WO2010/068759、国際公開WO2010/138719、国際公開WO2012/171020、国際公開WO2014/008375、国際公開WO2014/093394、国際公開WO2014/093640、国際公開WO2014/160360、国際公開WO2015/054659、国際公開WO2015/195925、国際公開WO2017/160754、Storzの文献(MAbs, 2015 Nov-Dec; 7(6): 989-1009)、Lambertらの文献(AdvTher, 2017 34: 1015)、Diamantisらの文献(British Journal of Cancer, 2016, 114, 362-367)、Carricoらの文献(Nat Chem Biol, 2007. 3: 321-2)、Weらの文献(Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106: 3000-5)、Rabukaらの文献(Curr Opin Chem Biol., 2011 14: 790-6)、Hudakらの文献(Angew Chem Int Ed Engl., 2012: 4161-5)、Rabukaらの文献(Nat Protoc., 2012 7:1052-67)、Agarwalらの文献(Proc Natl Acad Sci USA., 2013, 110: 46-51)、Agarwalらの文献(Bioconjugate Chem., 2013, 24: 846-851)、Barfieldらの文献(Drug Dev. and D., 2014, 14:34-41)、Drakeらの文献(Bioconjugate Chem., 2014, 25:1331-41)、Liangらの文献(J Am Chem Soc., 2014, 136:10850-3)、Drakeらの文献(Curr Opin Chem Biol., 2015, 28:174-80)、及びYorkらの文献(BMC Biotechnology, 2016, 16(1):23)に記載されており、引用により上記それぞれの教示全体が本明細書に組み込まれる。

【0125】

(6.3.3.核酸ペイロード)

[0103]ある実施態様では、ペイロードは核酸である。核酸は、次に限定されるものではないが、dsDNA、mRNA、miRNA、lncRNA及びsiRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA及びscaRNA等の、DNA又はRNAでもよい。

【0126】

(6.3.3.1任意のリンカー)

[0104]本明細書に記載されたタンパク質構築物は、任意で、標的とする成分をペイロードへ結合するリンカーを含む。

【0127】

[0105]いくつかの実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分ヘインフレイム融

10

20

30

40

50

合したペプチドである。一の実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分のC末端ヘインフレーム融合される。一の実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分のN末端ヘインフレーム融合される。

【0128】

[0106]いくつかの実施態様では、任意のリンカーは、標的とする成分へコンジュゲートされた分子である。様々な実施態様では、タンパク質構築物は、追加的な機能的エレメント(例えば、ペイロード、及びBTNL3/8を標的とする成分)を結合する等の下流プロセス及び下流精製プロセスで利用できる、機能性基又は化学反応性基を含む、改変を有する。ある実施態様では、リンカーは、切断可能な分子(例えば、部位特異的プロテアーゼ又はリンカーを2以上の断片へ切断可能とする他の分子によって、切断可能なペプチド)を含む。ある実施態様では、改変は、次に限定されるものではないが、反応性チオール(例えば、マレイミドベースの反応性基)、反応性アミン(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドベースの反応性基)、「クリックケミストリー」基(例えば、反応性アルキン基)、及びホルミルグリシン(FGly)を有するアルデヒドを含む化学反応性基である。ある実施態様では、改変は、次に限定されるものではないが、親和性ペプチド配列(例えば、HA、HIS、FLAG、GST、MBP、及びStrep systems等)を含む機能性基である。ある実施態様では、機能性基又は化学反応性基は、切断可能なペプチド配列を有する。特別な実施態様では、切断可能なペプチドは、次に限定されるものではないが、光切断、化学的切断、プロテアーゼ切断、還元条件、及びpH条件を含む手段によって切断される。特別な実施態様では、プロテアーゼ切断は、細胞内プロテアーゼによって行われる。特別な実施態様では、プロテアーゼ切断は、細胞外又は膜結合型プロテアーゼによって行われる。プロテアーゼ切断を採用したADC療法は、Choiらの文献(Theranostics, 2012; 2(2): 156-178.)に詳細に記載されており、引用によりその教示全体が本明細書に組み込まれる。

【0129】

[0107]ある実施態様では、標的とする成分のペイロードへの結合に加え、リンカーは、分子をタンパク質構築物の機能的エレメント(例えば、標的とする成分及びペイロード)へ部位特異的コンジュゲーションすることを可能にするために利用できる。ある実施態様では、リンカーは、タンパク質構築物をインビトロ又はインビボで、同定又は検出するために追加的に利用できる。ある実施態様では、タンパク質構築物は、1を超える任意のリンカーを含む。

【0130】

(6.4.他の標的成分)

[0108]ある態様では、本明細書に記載されるのは、組換えホモダイマー及びヘテロダイマーヒト $\gamma\delta$ TCRのパネル又はライブラリ、並びに、このパネル又はライブラリを、 $\gamma\delta$ T細胞の組織特異的分布を決定又は促進する、特異的な同種ヒト結合ドメイン又は相手を特定するために使用する方法である。この結合相手は、しばしばヒト生来の「自己抗原」と呼ばれ、本明細書に記載された発見がなされるまでは、更なる決定又は特徴付けが非常に困難/不可能であった。本発明のある態様では、その天然の細胞環境内で示されるものと似ている組織特異性又は結合性を示す組換えヒト $\gamma\delta$ TCRタンパク質を記載する。更なる本発明の態様では、(i)少なくとも1つの組換え $\gamma\delta$ TCRを生成すること、(ii)この1又は複数の組換えタンパク質を、好ましくは細胞表面上に発現している、潜在的な1又は複数の同種結合相手へ、ディスプレイ若しくは提示する又は混合すること、並びに、(iii)次に、特異的な $\gamma\delta$ TCR/結合相手との相互作用を、特定又は検証する、方法を記載する。本発明のある態様では、結果的に特定された $\gamma\delta$ TCR又はその由来配列を、標的とする成分として採用し、治療薬ペイロードを、同種結合相手を発現している標的組織又は細胞へ送達する。更なる実施態様では、本明細書に記載された方法によって特定された、特定された同種結合相手を発現する細胞は次に、抗体又はその誘導体等の別の標的とする成分で標的化される。

【0131】

(6.5.作成方法)

[0109]本明細書に記載されたタンパク質構築物は、T細胞受容体又は抗体の生成に現在使用されている、標準的な細胞フリー翻訳、一過性トランスフェクション、及び安定したトランスフェクションアプローチを使用したタンパク質発現によって容易に生成できる。

【0132】

(6.6.精製方法)

[0110]当業者に公知の適切な精製方法が、タンパク質構築物の精製に使用できる。発現したタンパク質は、アフィニティレジン(例えば、タンパク質構築物上の親和性タグに結合するもの)を使用して、望ましくないタンパク質及びタンパク質複合体から容易に分離できる。更なる精製は、当分野で日常的に使用されているように、イオン交換クロマトグラフィーを使用して行うことができる。

【0133】

[0111]精製段階の有効性及び効率を評価する方法は、当業者に周知であり、次に限定されるものではないが、SDS-PAGE分析、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び質量分析を含む。純度も又、さまざまな基準によって評価することができる。基準の例は、次に限定されるものではないが:1)完全に組み立てたタンパク質構築物から得られる溶出液中の全タンパク質のパーセンテージの評価、2)求める生成物を精製する方法の富化倍数又は増加割合を評価、例えば、溶出液中の完全に組み立てられたタンパク質構築物から得られる全タンパク質の、出発サンプルのそれとの比較、3)全タンパク質のパーセンテージ又は、望ましくない生成物、例えば、上記不完全な複合体の減少割合の評価、例えば、特定の望ましくない生成物(例えば、非会合性一本鎖ポリペプチド、いずれかの組み合わせのポリペプチド鎖ダイマー、又はいずれかの組み合わせのポリペプチド鎖トリマー)のパーセント又は減少割合の決定、を含むものである。

【0134】

(6.7.医薬組成物)

[0112]別の態様では、本明細書に記載された、BTNL3/8を標的とする成分及びペイロードを含むタンパク質構築物、並びに医薬として許容し得るキャリア又は希釈剤を含む、医薬組成物が提供される。通常の実施態様では、医薬組成物は無菌である。ある態様では、本明細書に記載されているのは、上記いずれかのタンパク質構築物及び医薬として許容し得るキャリアを含む、医薬組成物である。

【0135】

[0113]一の実施態様では、医薬組成物は経口投与に適している。一の実施態様では、投与は静脈内投与である。一の実施態様では、投与は筋肉内投与である。一の実施態様では、投与は皮下投与である。

【0136】

[0114]様々な実施態様では、医薬組成物は、タンパク質構築物を0.1 mg/ml~100 mg/ml濃度で含む。特別な実施態様では、医薬組成物は、タンパク質構築物を0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml、5 mg/ml、7.5 mg/ml、又は10 mg/ml濃度で含む。いくつかの実施態様では、医薬組成物は、タンパク質構築物を10 mg/mlを超える濃度で含む。ある実施態様では、タンパク質構築物は、20 mg/ml、25 mg/ml、30 mg/ml、35 mg/ml、40 mg/ml、45 mg/ml、又は更には50 mg/ml又はそれより高い濃度で存在する。特別な実施態様では、タンパク質構築物は、50 mg/mlを超える濃度で存在する。

【0137】

[0115]様々な実施態様では、医薬組成物は、米国特許番号第8,961,964号、米国特許番号第8,945,865号、米国特許番号第8,420,081号、米国特許番号第6,685,940号、米国特許番号第6,171,586号、米国特許番号第8,821,865号、米国特許番号第9,216,219号、米国特許出願番号10/813,483号、国際公開WO2014/066468、国際公開WO2011/104381、及び国際公開WO2016/180941に詳細に記載されており、引用によりそれぞれの教示全体が本明細書に組み込まれる。

【0138】

(6.8.使用のための組成物)

[0116]一の態様では、使用のための組成物も同様に提供される。一の実施態様では、本明細書に記載された、BTNL3/8を標的とする成分及びペイロードを含むタンパク質構築物を含有する、療法での使用のための組成物が提供される。組成物は、例えば、炎症症状、炎症性腸疾患、過敏腸症候群、憩室炎、セリアック病、代謝性障害、癌、免疫関連障害、自己免疫、移植拒絶、外傷後免疫応答、移植片対宿主病、虚血、卒中、及び感染症の治療のために使用することができる。

【0139】

[0117]一の態様では、医薬品製造のための組成物の使用も同様に提供される。一の実施態様では、本明細書に記載された、BTNL3/8を標的とする成分及びペイロードを含むタンパク質構築物を含有する、医薬品製造のための組成物の使用が提供され、その医薬品は、例えば、炎症症状、炎症性腸疾患、過敏腸症候群、憩室炎、セリアック病、代謝性障害、癌、免疫関連障害、自己免疫、移植拒絶、外傷後免疫応答、移植片対宿主病、虚血、卒中、及び感染症の治療のために使用される。

【0140】

(6.9.治療法)

[0118]一の態様では、治療法であって、本明細書に記載された、BTNL3/8を標的とする成分及びペイロードを含むタンパク質構築物を、患者を治療するための有効量で患者へ投与することを含む方法が提供される。本開示のタンパク質構築物は、それ自体で、又は医薬組成物の形状で、例えば、炎症症状、炎症性腸疾患、過敏腸症候群、憩室炎、セリアック病、代謝性障害、癌、免疫関連障害、自己免疫、移植拒絶、外傷後免疫応答、移植片対宿主病、虚血、卒中、及び感染症の治療のために、対象へ投与されてもよい。

【0141】

(6.9.1.1消化管系症状)

[0119]ある態様では、本明細書に記載されているのは、消化管系症状の治療法である。消化管系症状は、次に限定されるものではないが、消化管系の免疫関連症状、消化管系の炎症症状、消化管系組織の微生物感染、及び摂食異常、代謝性障害又は代謝性欠乏によって引き起こされる症状を含む。消化管系症状は、次に限定されるものではないが、炎症性腸疾患、セリアック病、過敏性腸症候群、憩室炎、クローン病、及び癌(例えば、結腸癌、直腸癌、胃癌)を含む。ある態様では、本明細書に記載されているのは、消化管組織がBTNL3/8を発現する消化管系の状態を治療する方法であり、治療的有效量の、請求項62~66のいずれか一項記載の医薬組成物を、消化管組織がBTNL3/8を発現する条件下で、患者へ投与することを含む方法である。この方法の一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤は、アミノサリチレートである。一の実施態様では、抗炎症剤は、非ステロイド系抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤は、任意でインターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)である、抗炎症性サイトカインである。一の実施態様では、抗炎症剤は抗催炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤はステロイドである。一の実施態様では、ステロイドはグルココルチコイドである。一の実施態様では、グルココルチコイドはプレドニゾンである。一の実施態様では、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。一の実施態様では、ペイロードは免疫調節剤である。

【0142】

(6.9.2.1炎症性腸疾患)

[0120]ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有效量の、上記いずれか記載の医薬組成物を、炎症性腸疾患の患者へ投与することを含む、炎症性腸疾患の治療法である。一の実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎である。一の実施態様では、炎症性腸疾患はクローン病である。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤はアミノサリチレートである。一の実施態様では、抗炎症剤は非ステロイド抗炎症薬である。一の実施態様では、抗炎症剤は抗炎症性サイトカイン、任意でインターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又は

トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)である。一の実施態様では、抗炎症剤ペイロードは、抗催炎症剤である。一の実施態様では、抗炎症剤ペイロードは、ステロイドである。一の実施態様では、ステロイドはグルココルチコイドである。一の実施態様では、グルココルチコイドはプレドニゾンである。一の実施態様では、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、抗生物質である。一の実施態様では、抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロニダゾール、モキシフロキサシン又はアモキシシリンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、カルシニューリン阻害剤である。一の実施態様では、カルシニューリン阻害剤は、シクロスポリンA又はタクロリムスである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、免疫調節剤である。一の実施態様では、免疫調節剤は免疫抑制剤である。一の実施態様では、免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである。一の実施態様では、タンパク質構築物のペイロードは、タンパク質ペイロードである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、抗体、抗体断片又は一本鎖可変断片である。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、TNF α 抗原に特異的であり、かつ(comprises and)少なくとも1つであるABSを含む。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、アダリムマブ、インフリキシマブ又はセルトリズマブの相補性決定領域(CDR)を含む。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、インターロイキン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、インターロイキンは、IL-12、IL-23、又はそれらの組み合わせである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、ウステキヌマブ又はブリキヌマブ(brikinumab)のCDRを含む。一の実施態様では、生物製剤(biologic)ペイロードは、インテグリン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む。一の実施態様では、インテグリンは、 $\alpha 4$ インテグリンである。一の実施態様では、タンパク質ペイロードは、インフリキシマブ、ナタリズマブ又はベドリズマブのCDRを含む。一の実施態様では、タンパク質構築物は、鎮痛剤ペイロードを含む。一の実施態様では、タンパク質構築物は、栄養補助食品ペイロードを含む。

【0143】

(6.9.3.1感染)

[0121]ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有效量の、上記いずれかの医薬組成物を、微生物感染している患者へ投与することを含む、微生物感染の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは抗菌剤である。ある実施態様では、抗菌剤は、抗寄生虫剤、抗生物質、抗真菌剤又は抗ウイルス剤である。

【0144】

(6.9.4.1代謝性障害又は代謝性欠乏)

[0122]ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有效量の、上記いずれかの医薬組成物を、代謝性障害又は代謝性欠乏の患者へ投与することを含む、代謝性障害又は代謝性欠乏の治療法である。ある実施態様では、ペイロードは栄養補助食品である。ある実施態様では、栄養補助食品は、酵素又はビタミンである。

【0145】

(6.9.5.1免疫系の制御)

[0123]ある態様では、本明細書に記載されているのは、治療的有效量の、上記いずれかの医薬組成物を、免疫関連症状を有する患者へ投与することを含む、免疫系の制御方法である。ある実施態様では、ペイロードは、免疫抑制剤である。ある実施態様では、免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである。ある実施態様では、ペイロードは、免疫賦活剤である。ある実施態様では、免疫賦活剤はサイトカインである。

【実施例】

【0146】

(6.10.実施例)

[0124]下記実施例は、本発明を限定するものではなく、図解のためにのみ提供する。

【0147】

(6.10.1.1方法)

[0125]TCR V γ ドメインを含むBTNL3/8標的成分を含むタンパク質構築物の設計及び分析のための、非限定的で例示的な方法を下記に記載する。初代リンパ球の単離、BTNL3/8発現HEK293細胞との共培養、及びディープシーケンシングの方法は又、Di Marco Barrosらの文献、Cell. 2016,(167), pp. 203-218に記載されている。

【0148】

(ヒトサンプル及び初代リンパ球単離)

[0126]内視鏡生検を、日常的な検査で大腸内視鏡検査を受ける成人ドナーの上行結腸から得た。初代腸リンパ球を、Clarkらの文献、2006, J. Invest. Dermatol.(126), pp. 1059-1070記載の方法を適用して得た。生検を、5mLの洗浄培地(RPMI 1640 10%FCS、 β -メルカプトエタノール、ペニシリン[500U/ml]、ストレプトマイシン[500 mg/ml]、メトロニダゾール[5 mg/ml、Guy's Hospital、薬部門]、ゲンタマイシン[100 mg/ml、Sigma-Aldrich]及びアンホテリシン12.5 mg/ml[Thermo Fisher Scientific])で20分間洗浄した。1の内視鏡生検を各マトリックス上に置き、それを反転し、圧を加えて、生検をマトリックス内に押しこんだ。マトリックスを24ウェルプレート(ウェルあたり1個)内に配置し、2 mL RPMI 1640(10%FCS、 β -メルカプトエタノール、ペニシリン[100 U/ml]、ストレプトマイシン[100 mg/ml]、メトロニダゾール[1 mg/ml]、ゲンタマイシン[20 mg/ml]、アンホテリシン[2.5 mg/ml])、IL-2(100 U/mL、Novartis Pharmaceutical 英国)及びIL-15(10 ng/mL、Biolegend)を補充したもので覆った。1mlの培地を1日おき(毎2日目)に吸引し、2 $\times$ 濃縮サイトカインを含む完全培地と交換した。細胞を回収し、残りの生検及び空のウェルをPBS 0.02 mM HEPESで洗浄した。細胞懸濁液を70mmナイロンセルストレーナに通し、400gで5分間遠心分離し、追加的なサイトカインを含まない完全培地内で再懸濁させ、すぐに共培養内に配置した。リンパ球を培養5~7日後に使用した。PBMCを、献血サービスから得た血液からFicollグラジエントによって単離した。

(HEK293T共培養アッセイ)

空ベクター(EV)、BTNL3、BTNL8又はBTNL3+8のいずれかで形質導入した 5×10^5 のHEK293T細胞、及び、新たに採取した 2×10^5 の初代ヒトリンパ球を、96ウェルプレート内で、補充サイトカイン無しの完全培地で共培養し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で16時間、インキュベートした。

【0149】

(ディープシーケンシング)

[0127]マウスTRDV遺伝子の、ソートしたV γ 7+IELから精製したRNA由来のTCR δ CDR3の増幅及びシーケンシング(配列決定)は、Amp2Seq Platform(iRepertoire)を使用して実施した。ヒトTCRGV γ 遺伝子：TCR γ CDR3の増幅及びシーケンシングは、immunoseq Platform(Adaptive Biotechnologies)を使用して実施した。

【0150】

(可溶性 $\gamma\delta$ TCRヘテロダイマーのデザイン)

[0128]下記実施例で使用した、T細胞受容体 α 及びT細胞受容体 β 定常領域を含む可溶性 $\gamma\delta$ TCRヘテロダイマーのデザインは、Xuらの文献、PNAS, 2011 Vol. 108; pp. 2414-2419に従って行った。

【0151】

(6.10.2.1実施例1:ヒト腸組織由来の上皮細胞間リンパ球から単離した $\gamma\delta$ TCR可変領域は、BTNL3/8へTCR活性の誘導を与えた)

[0129]ヒト腸由来かつBTNL3/8応答性の上皮細胞間リンパ球(IEL)のTCR可変領域をクローニングし、TCR欠損細胞内で発現させた(図2)。IELをヒト腸組織から単離し、HEK293T細胞内で共培養し、BTNL3/8を同時過剰発現させた。次に、TCR活性化(CD25の高発現及びダウンレギュレーションV γ)を示した応答性IELを単一細胞ソートした。 γ 鎖及び δ 鎖の可変領域を増幅し、レンチウイルス発現ベクターへクローニングした(図3A)。TCR欠損Jurkat細胞(J76細胞株)を形質導入し、BTNL3/8を発現するHEK293T細胞と共培

養した(図3B)。次に、J76細胞をTCR活性化(CD69発現及びTCRダウンレギュレーション)のためにソートした(図4A)。抗CD3抗体をTCR活性化のための陽性対照として使用した。BTNL3/8発現細胞と共培養した場合、V γ 4及びV δ 1ドメインを有する形質導入TCR(H7 TCR)を発現するJ76細胞は、CD69発現の増加とV δ TCRのダウンレギュレーションを示した。V γ 4V δ 1で形質導入した3つの独立したJ76系統であるB3、C11、及びH7は、図2に示す方法で得られた3つの異なるCDR3ペアを代表するが、V γ 9V δ 2系統(V γ 9V δ 2)とは違い、BTNL3/8発現細胞に応答した(図4B)。これらの結果は、ヒトIELのV γ 4V δ 1ドメインは、BTNL3/8へTCR応答性を与えるのに充分であることを示す。

【0152】

(6.10.3.1実施例2:V γ 4のCDR4は、BTNL3/8へのTCR応答性のために必要である)

[0130]BTNL3/8への応答性に重要なV γ 4領域を特定するために、H7応答性TCR系統の全V γ 4ドメインをV γ 2領域で置換した(図5)。BTNL3/8を発現するHEK293Tと共培養した時の、V γ 4 TCR(H7 WT)又はV γ 2置換されたTCRを発現する形質導入J76細胞内での、CD69発現%の倍数変化(FC)及びTCRダウンレギュレーションパーセントを決定した。応答性V γ 4 H7 TCRの全V領域をV γ 2コード配列(V γ 2 H7)で置換すると(ただし、CDR3 γ 及び全 δ 鎖は置換しない)、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化は失われた。しかし、応答性V γ 4 H7 TCRのCDR1(H7 CDR1^{V γ 2})及び/又はCDR2(H7 CDR2^{V γ 2})をV γ 2コード配列で置換すると、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化は維持された。これらの結果は、BTNL3/8へのTCR応答にはCDR4が必要であることを示す。

【0153】

[0131]BTNL3/8への応答に必須であるV γ 4内の領域を更に解明するために、CDR4に位置する2対のアミノ酸をV γ 2配列で置換した(図6及び7)。BTNL3/8を発現するHEK293Tと共培養した時の、形質導入細胞内でのCD69発現%の倍数変化(FC)を決定し、かつ、V γ 4 TCRを発現(H7 WT)、H7のCDR3を伴うV γ 2 TCRを発現(V γ 2H7)、及びCDR4内のアミノ酸置換を伴うV γ 4 TCRを発現するJ76細胞内でのTCRダウンレギュレーションパーセントを決定した(図7)。アミノ酸87位及び90位でのYA置換は、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化を失わせた一方、アミノ酸94位及び98位でのNL置換は、BTNL3/8発現細胞によるTCR活性化を失わせなかった。これらの結果は、V γ 4TCRのCDR4領域のアミノ酸87位及び90位は、BTNL3/8へのTCR応答性に必須であることを確認している。

【0154】

(5.10.4.1実施例3:可溶性TCR V γ 4/V δ ヘテロダイマーは、BTNL3/8発現細胞に結合する)

[0132]可溶性V γ /V δ TCRヘテロダイマーは、ロイシンジッパー相補性により発現され、安定化された(図8)。V γ 又はV δ ドメインは、膜貫通ドメインを欠くTCR α 又はTCR β 定常領域にインフレイム融合され、その次にロイシンジッパー配列及びヒスチジンタグ/リンカーが続く。V γ 4/V δ 1ヘテロダイマーは、配列番号:10及び9に対応する。V γ 4/V δ 2ヘテロダイマーは、配列番号:10及び11に対応する。V γ 2/V δ 1ヘテロダイマーは、配列番号:12及び9に対応する。V γ 8/V δ 1ヘテロダイマーは、配列番号:13及び9に対応する。

【0155】

[0133]可溶性TCRを使用して、Flag-BTNL3+HA-BTNL8又は空ベクターで形質導入したHEK293T細胞を染色した(図10)。V γ 4/V δ 1可溶性TCR及びV γ 4/V δ 2可溶性TCRは、BTNL3+BTNL8を発現する細胞株への強い結合を示すが空ベクター(EV)対照細胞株へは結合しない。結果は、V γ 4/V δ 1ドメイン又はV γ 4/V δ 2ドメインを発現する可溶性TCRは、BTNL3/8発現細胞には結合するが、BTNL3/8を欠く細胞には結合しないことを示す。まとめると、この結果は、V γ 4 CDR4がBTNL3/8誘導TCR応答に不可欠であることを示し、又、V γ 4 CDR4がBTNL3/8と相互作用することをも示唆する。

【0156】

[0134]BTNL3+8を発現する細胞への可溶性V γ 4⁺TCR構築物の結合を更に評価するために、HEK293T細胞を、提示されたBTNL3及びBTNL8構築物又は空ベクター(EV)をコ

10

20

30

40

50

ードしているpCSIGPWで形質導入した。次に、細胞を可溶性Hisタグ付きV γ 4 δ 2 TCRで、4°Cで45分間染色し、2回洗浄し、APC抗Hisタグ抗体(α -His)で4°Cで45分間染色し、再度2回洗浄し、その後フローサイトメトリーで分析した(図9A)。図9Bに示す細胞集団を、抗FLAG及び抗HA抗体で並行して染色し、可溶性TCR結合の欠如が、BTNL3+8構築物の発現の失敗によるものではないことを確認した。この結果は、BTNL3+BTNL8を発現する細胞に結合する可溶性TCR構築物の能力を示し、かつこの可溶性TCR構築物はV γ 4⁺T細胞による応答を誘導できないと以前の文献で記載されていた、IgVドメイン変異体(例えば、L3^{GQFSS}、L3^{RI}、L3^{YQKAI})のいずれにも結合しなかった。Melandriらの文献、Nat. Immunol. 2018を参照し、これはその全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0157】

(6.10.5.1実施例4:BTNL3/8発現細胞へ結合する可溶性TCRは内部移行する)

[0135]BTNL3+BTNL8を発現する細胞の表面に結合した可溶性TCRが内部移行しているかどうかを決定するために、HEK293T細胞を形質導入して野生型BTNL3及びBTNL8(293T.L3L8)を発現させ、可溶性Hisタグ付きV γ 4V δ 2 TCRで、37°Cで120分までの間染色した(図11B)。293T.L3L8細胞を可溶性Hisタグ付きV γ 4V δ 2 TCRで、4°Cで120分間染色して、低温で内部移行が妨害された対照として使用した(図11A)。次に細胞を、APC α -Hisタグ抗体(α -His)で4°Cで45分間染色した。この結果、APCシグナルの減少が37°Cでインキュベートした細胞集団内での経時的に生じ、細胞が可溶性TCR構築物を急速に内部移行させることを示す(図12)。

【0158】

[0136]可溶性TCRの内部移行が特異的であるか、又は細胞表面BTNL分子の急速なサイクリング(cycling)の結果であるかを決定するために、実験を繰り返して、可溶性TCRを抗BTNL3抗体(ウサギポリクローナル、Aviva Biosystems)(参考文献を含む)と比較した。HEK293T細胞を空ベクター(293T.EV)で形質導入し、 α -BTNL3での染色における陰性対照として使用した。HEK293T細胞をBTNL3構築物L3^{RI}L8(293T.L3^{RI}L8)で形質導入し、可溶性TCRでの染色における陰性対照として使用した。結果は、 α -BTNL3染色は4°Cと37°Cとで同一であることを示し、 α -BTNL3がBTNL3/8を発現する細胞へ特異的に結合する一方で、抗体は細胞の表面に留まることが示された(図13A)。結果の定量化を図13Bに示す。

【0159】

(6.10.6.1実施例5:可溶性TCRは、ペイロードをBTNL3/8発現細胞へ送達する)

[0137]ペイロードがBTNL3/8発現細胞への可溶性TCRの結合を介して細胞内に送達され得るかどうかを決定するために、293T.L3L8又は293T.L3^{RI}L8細胞を、APC α -Hisタグ抗体で、可溶性TCR構築物のカルボキシ末端上に予め標識した可溶性TCRとともにインキュベートした。複合体を3 μ g/mL又は10 μ g/mLいずれかの量で、4°C又は37°Cのいずれかで1時間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、15分間トリプシン又はDMEM(対照)で図14に示すように処理した。結果は、可溶性TCR+ α -Hisシグナル(APC蛍光)のフラクションは、細胞を複合体と37°Cでインキュベートして複合体の内部移行によってトリプシンから保護した場合は、4°Cでインキュベートの場合と比較して、トリプシン処理後に大きいことを示した(図15A)。従って、結果は、可溶性TCRの内部移行が、ペイロードを細胞内でBTNL3/8発現細胞に送達するための手段として使用できることを示す。結果の定量化を図15Bに示す。

【0160】

[0138]イメージングサイトメトリーを使用して、APC α -His抗体ペイロードの、可溶性TCR経由細胞内送達を視覚化した。293T.L3^{RI}L8又は293T.L3L8細胞を、可溶性TCR+ α -His抗体複合体とともに1時間4°C又は37°Cでインキュベートした。次に(上記のとおり)DMEM若しくはトリプシン処理し、細胞を固定して透過処理(図16A)又は固定して透過処理し、後期エンドソームマーカーCD107aで染色した(図16B及び16C)。陰性対照のイメージングサイトメトリーにより、バックグラウンドAPCシグナルの評価が可能であった(図16A)。TCR+ α -His抗体複合体とインキュベートした細胞のイメージングサイトメトリ

10

20

30

40

50

一結果は、複合体を4℃で細胞とインキュベートした場合、DMEM処理後は、細胞周囲で複合体が視覚化されて複合体の大部分が細胞表面に結合していることが示された一方、トリプシン処理後ではシグナルは完全に失われた(図16B)。しかし、37℃で細胞とインキュベートされた複合体は、トリプシン処理後もCD107a⁺区画近位の細胞内領域で検出される(図16C)。

【0161】

(6.11.配列)

>ヒトV γ 4アミノ酸87～90[配列番号:1]

【化1】

DTYG

10

>マウスV γ 7アミノ酸87～90[配列番号:2]

【化2】

HVYE

>ヒトV γ 4ドメインCDR4アミノ酸85～100[配列番号:3]

【化3】

KYDTYGSTRKNLRMIL

>マウスV γ 7ドメインCDR4アミノ酸85～100[配列番号:4]

【化4】

KYHVYEGPDKRYKFVL

20

>ヒトV γ 2ドメインCDR4アミノ酸85～100[配列番号:5]

【化5】

KYYTYASTRNNLRLIL

>ヒトV γ 4アミノ酸19～118[配列番号:6]

【化6】

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWYLHQEGKAPQRLLYYDSY

30

TSSVVLES GISPGKYDTYGSTRKNLRMILRNLIENDSGVYYCATWDG

ヒトV γ 2アミノ酸19～118[配列番号:7]

【化7】

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSNGYIHWYLHQEGKAPQRLQYYDSY

NSKVVL ESGVSPGKYTYASTRNNLRLILRNLIENDSGVYYCATWDG

>マウスV γ 7アミノ酸19～118[配列番号:8]

【化8】

SSNLEERIMSITKLEGSSAIMTCDTHR-TGTYIHWYRFQKGRAPEHLLYYNFVS

40

STTVVDSRFNSEKYHVYEGPDKRYKFVLRNVEESDSALYYCASWA-

>ヒトV δ 1、及び結晶構造30MZ由来のCDR3、CDR3がインフレーム融合しているTCR α 定常領域、ロイシンジッパー並びにC末端Hisタグ[配列番号:9]

50

【化 9】

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYIYFWYKQLPSKEMIFLIRQG
SDEQNAKSGRYSVNFKKAASKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIF
GKGTRVTVEPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSV
YITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCT
TAPSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQGS GHHHHHH

> ヒト V_γ 4、及び結晶構造 4MNH 由来の CDR3、CDR3 が融合している TCR β 定常領域、
ロイシンジッパー [配列番号:10]

10

【化 10】

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWYLVHQEGKAPQRLLYYDSY
TSSVVLESGISPGKYDTYGSTRKNLRMLRNLIENDSGVYYCATWDEKYYKK
LFGSGTTLVVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE
LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNH
FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCTTAPSAQLEKELQ
ALEKENAQL

20

> ヒト V_δ 2、及び結晶構造 30MZ 由来の CDR3、CDR3 がインフレーム融合している TCR
α 定常領域、ロイシンジッパー並びに C 末端 His タグ [配列番号:11]

【化 11】

AIELVPEHQTPVPSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTITFIYREKD
IYGPGFKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCALGESLTRADKLIFGK
GTRVTVEPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYIT
DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCTTA
PSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQGS GHHHHHH

30

> ヒト V_γ 2、及び結晶構造 4MNH 由来の CDR3、CDR3 が融合している TCR β 定常領域、
ロイシンジッパー [配列番号:12]

【化 12】

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSNGYIHWYLVHQEGKAPQRLQYYDSY
NSKVVLESGVSPGKYTYASTRNNLRLLRNLIENDSGVYYCATWDEKYYKK
LFGSGTTLVVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE
LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNH
FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCTTAPSAQLEKELQ
ALEKENAQLWELQALEKELAQ

40

> ヒト V_γ 8、及び結晶構造 4MNH 由来の CDR3、CDR3 が融合している TCR β 定常領域、
ロイシンジッパー [配列番号:13]

50

【化 1 3】

SSNLEGRTKSVTRPTGSSAVITCDLPVENAVYTHWYLHQEGKAPQRLLYYDS
YNSRVVLESGISREKYHTYASTGKSLKFILENLIERDSGVYYCATWDEKYYKK
LFGSGTTLVVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVE
LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNH
FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRADCTTAPSAQLEKELQ
ALEKENAQLWELQALEKELAQ

10

> ヒト V_γ 4 のリーダー配列 [配列番号:14]

【化 1 4】

MAWALAVLLAFLSPASQK

> ヒト V_γ J 領域、TRFJP [配列番号:15]

【化 1 5】

GQELGKKIKVFGPGTKLIIT

> ヒト V_γ J 領域、TRFJP1 [配列番号:16]

【化 1 6】

GQELGKKIKVFGPGTKLIIT

20

> ヒト V_γ J 領域、TRFJP2 [配列番号:17]

【化 1 7】

SSDWIKTFAKGTRLIVTSP

> ヒト V_γ J 領域、TRFJP1/2 [配列番号:18]

【化 1 8】

NYYKKLFGSGTTLVVT

30

【0 1 6 2】

(7.文献引用による組込み)

本出願で引用する全ての刊行物、特許、特許出願及び他の文書は、個々の刊行物、特許、特許出願又は他の文書が引用によりその全ての目的のために組み込まれると個別に表示されているのと同じ程度に、あらゆる目的のために、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 1 6 3】

(8.均等物)

様々な特定の実施態様が例示及び説明されているが、上記明細書の記載は限定的なものではない。本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことが可能であると理解されるだろう。本明細書を検討する当業者には、本発明の多くのバリエーションが明らかであろう。

40

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様 1)

BTN13/8を標的とする成分;

ペイロード;及び

該標的とする成分を該ペイロードへ結合する任意のリンカーを含む、タンパク質構築物。

(態様 2)

50

前記BTNL3/8を標的とする成分はV γ ドメインを含み、
該V γ ドメインの配列位置番号87のアミノ酸はアスパラギン酸又はヒスチジンであり、V γ ドメインの配列位置番号90のアミノ酸はグリシン又はグルタミン酸であり、及び
該V γ CDR4の残りの残基は、それぞれの位置で、ヒト又はマウス(murine)のV γ ドメインの対応残基から独立して選択される、態様1記載のタンパク質構築物。
(態様3)
前記V γ ドメインCDR4の残りの残基は、それぞれの残基位置で、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から独立して選択される、態様2記載のタンパク質構築物。
(態様4)
前記V γ ドメインの位置番号87～90のアミノ酸配列は、配列番号:1である、態様2記載のタンパク質構築物。
(態様5)
前記V γ ドメインの位置番号87～90のアミノ酸配列は、配列番号:2である、態様2記載のタンパク質構築物。
(態様6)
前記V γ ドメインCDR4の残りの残基は全て、ヒトV γ 4、ヒトV γ 2、又はマウスV γ 7の対応残基から選択される、態様3記載のタンパク質構築物。
(態様7)
前記V γ CDR4の残りの残基は、ヒトV γ 4の対応残基から選択される、態様6記載のタンパク質構築物。
(態様8)
前記V γ CDR4の残りの残基は、ヒトV γ 2の対応残基から選択される、態様6記載のタンパク質構築物。
(態様9)
前記V γ CDR4の残りの残基は、マウスV γ 7の対応残基から選択される、態様6記載のタンパク質構築物。
(態様10)
前記V γ ドメインはヒトV γ 2ドメインであり、その中ではCDR4のアミノ酸は、アミノ酸配列位置番号87でアスパラギン酸又はヒスチジンで置換され、アミノ酸配列位置番号90でグリシン又はグルタミン酸で置換されている、態様2記載のタンパク質構築物。
(態様11)
前記V γ ドメインはヒトV γ 4ドメインである、態様2記載のタンパク質構築物。
(態様12)
前記V γ ドメインCDR3は、ヒト又はマウスのV γ CDR3配列である、態様1～11のいずれか一項記載のタンパク質構築物。
(態様13)
前記V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 4 CDR3配列を含む、態様12記載のタンパク質構築物。
(態様14)
前記V γ ドメインCDR3は、ヒトV γ 2 CDR3配列を含む、態様12記載のタンパク質構築物。
(態様15)
前記V γ ドメインCDR3は、マウスV γ 7 CDR3配列を含む、態様12記載のタンパク質構築物。
(態様16)
前記J領域はV γ J領域である、態様2～15のいずれか一項記載のタンパク質構築物。
(態様17)
前記J領域はヒトV γ J領域である、態様16記載のタンパク質構築物。
(態様18)
前記J領域はマウスV γ J領域である、態様16記載のタンパク質構築物。

10

20

30

40

50

(態様 19)

前記J領域は、配列番号:15～18からなる群から選択される配列番号を含む、態様16記載のタンパク質構築物。

(態様 20)

前記BTNL3/8を標的とする成分は更に、ペアになったV δ ドメインを含む、態様1～19のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様 21)

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインは、少なくとも1つのジスルフィド結合により共有的に結合される、態様20記載のタンパク質構築物。

(態様 22)

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインは、特異的なヘテロダイマー性相互作用によりペアになっている、態様21記載のタンパク質構築物。

(態様 23)

前記ヘテロダイマー性相互作用はロイシンジッパー相補性である、態様22記載のタンパク質構築物。

(態様 24)

前記標的とする成分は配列番号:9を含む、態様23記載のタンパク質構築物。

(態様 25)

前記標的とする成分は配列番号:10である、態様23記載のタンパク質構築物。

(態様 26)

前記標的とする成分は配列番号:11である、態様23記載のタンパク質構築物。

(態様 27)

前記標的とする成分は、V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合を含む、態様20記載のタンパク質構築物。

(態様 28)

前記V γ ドメインはV δ ドメインへのN末端である、態様27記載のタンパク質構築物。

(態様 29)

前記V γ ドメインはV δ ドメインへのC末端である、態様27記載のタンパク質構築物。

(態様 30)

前記V γ ドメイン及びV δ ドメインの一本鎖インフレーム融合は、内部リンカー配列を含む、態様27～29のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様 31)

前記V δ ドメインはヒトV δ ドメインである、態様20～24又は27～30のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様 32)

前記ヒトV δ ドメインはV δ 1、V δ 2又はV δ 5である、態様31記載のタンパク質構築物。

(態様 33)

前記ヒトV δ ドメインはV δ 1である、態様32記載のタンパク質構築物。

(態様 34)

更に第一T細胞受容体定常領域を含む、態様2～33のいずれか一項記載のタンパク質構築物であって、該第一T細胞受容体定常領域は、V γ ドメインのC末端へインフレーム融合している、前記タンパク質構築物。

(態様 35)

前記第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体定常領域である、態様34記載のタンパク質構築物。

(態様 36)

前記第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である、態様35記載のタンパク質構築物。

(態様 37)

前記第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である、態様35記載のタ

10

20

30

40

50

ンパク質構築物。

(態様38)

前記第一T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 γ 定常領域である、態様35記載のタンパク質構築物。

(態様39)

前記標的とする成分は更に、第二T細胞受容体定常領域を含む、態様20~38のいずれか一項記載のタンパク質構築物であって、該第二T細胞受容体定常領域は、ペアになったV δ ドメインのC末端ヘインフレーション融合している、前記タンパク質構築物。

(態様40)

前記第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 α 定常領域である、態様39記載のタンパク質構築物。

(態様41)

前記第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 β 定常領域である、態様39記載のタンパク質構築物。

(態様42)

前記第二T細胞受容体定常領域は、ヒトT細胞受容体 δ 定常領域である、態様39記載のタンパク質構築物。

(態様43)

前記V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域とのインフレーション融合は、V δ ドメインと第二T細胞受容体定常領域との間の内部リンカー配列を含む、態様39~42のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様44)

前記ペイロードは、標的とする成分ヘインフレーション融合されたタンパク質ペイロードである、態様1~43のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様45)

前記ペイロードはポリペプチドである、態様44記載のタンパク質構築物。

(態様46)

前記ペイロードはペプチドである、態様45記載のタンパク質構築物。

(態様47)

前記ペイロードはサイトカインである、態様45記載のタンパク質構築物。

(態様48)

前記ペイロードは抗体である、態様45記載のタンパク質構築物。

(態様49)

前記ペイロードは一本鎖可変断片(scFv)である、態様48記載のタンパク質構築物。

(態様50)

前記抗体は、サイトカイン抗原に特異的な、少なくとも1つの抗原結合部位(ABS)を含む、態様47~49のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様51)

前記抗体は、腫瘍壊死因子 α (TNF α)抗原に特異的な、少なくとも1つのABSであり、を含む、態様47~49のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様52)

前記抗体は、Fc受容体と相互作用可能なFcドメインを含む、態様47~又は49~51のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様53)

前記抗体は、Fc受容体と相互作用不可能なFcドメインを含む、態様47又は48~51のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様54)

前記ペイロードは小分子である、態様1~42のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様55)

前記ペイロードはホルモンである、態様54記載のタンパク質構築物。

10

20

30

40

50

(態様56)

前記ペイロードは核酸である、態様54記載のタンパク質構築物。

(態様57)

前記ペイロードは阻害性RNA(RNAi)である、態様56記載のタンパク質構築物。

(態様58)

前記任意のリンカーは標的とする成分ヘインフレーム融合したペプチドである、態様1～57のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様59)

前記任意のリンカーは、標的とする成分のC末端ヘインフレーム融合されている、態様58記載のタンパク質構築物。

(態様60)

前記任意のリンカーは、標的とする成分のN末端ヘインフレーム融合されている、態様58記載のタンパク質構築物。

(態様61)

前記任意のリンカーは、標的とする成分ヘコンジュゲートされた分子である、態様1～57のいずれか一項記載のタンパク質構築物。

(態様62)

態様1～61のいずれか一項記載のタンパク質構築物及び医薬として許容し得るキャリアを含む、医薬組成物。

(態様63)

前記医薬組成物は非経口投与に適している、態様62記載の医薬組成物。

(態様64)

前記投与は静脈内投与である、態様63記載の医薬組成物。

(態様65)

前記投与は筋肉内投与である、態様63記載の医薬組成物。

(態様66)

前記投与は皮下投与である、態様63記載の医薬組成物。

(態様67)

消化管組織がBTNL3/8を発現する消化管系の状態を治療する方法であり、治療の有効量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、消化管組織がBTNL3/8を発現する状態の患者へ投与することを含む、前記方法。

(態様68)

前記タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である、態様67記載の方法。

(態様69)

前記抗炎症剤は、アミノサリチレートである、態様68記載の方法。

(態様70)

前記抗炎症剤は、非ステロイド系抗炎症剤である、態様68記載の方法。

(態様71)

前記抗炎症剤は、抗炎症性サイトカイン、任意でインターロイキン10(IL-10)、インターロイキン22(IL-22)又はトランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)である、態様68記載の方法。

(態様72)

前記抗炎症剤は抗催炎症剤である、態様68記載の方法。

(態様73)

前記抗炎症剤はステロイドである、態様68記載の方法。

(態様74)

前記ステロイドはグルココルチコイドである、態様73記載の方法。

(態様75)

前記グルココルチコイドはプレドニゾンである、態様74記載の方法。

(態様76)

10

20

30

40

50

前記グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである、態様74記載の方法。

(態様77)

前記ペイロードは免疫調節剤である、態様67記載の方法。

(態様78)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、炎症性腸疾患の患者へ投与することを含む、炎症性腸疾患の治療法。

(態様79)

前記炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎である、態様78記載の方法。

(態様80)

前記炎症性腸疾患はクローン病である、態様78記載の方法。

(態様81)

前記タンパク質構築物のペイロードは、抗炎症剤である、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様82)

前記抗炎症剤はアミノサリチレートである、態様81記載の方法。

(態様83)

前記抗炎症剤は非ステロイド抗炎症薬である、態様81記載の方法。

(態様84)

前記抗炎症剤は抗炎症性サイトカインである、態様81記載の方法。

(態様85)

前記抗炎症剤ペイロードは、抗催炎症剤である、態様81記載の方法。

(態様86)

前記抗炎症剤ペイロードは、ステロイドである、態様81記載の方法。

(態様87)

前記ステロイドはグルココルチコイドである、態様86記載の方法。

(態様88)

前記グルココルチコイドはプレドニゾンである、態様87記載の方法。

(態様89)

前記グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである、態様87記載の方法。

(態様90)

前記タンパク質構築物のペイロードは、抗生物質である、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様91)

前記抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロニダゾール、モキシフロキサシン又はアモキシシリンである、態様90記載の方法。

(態様92)

前記タンパク質構築物のペイロードは、カルシニューリン阻害剤である、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様93)

前記カルシニューリン阻害剤は、シクロスポリンA又はタクロリムスである、態様92記載の方法。

(態様94)

前記タンパク質構築物のペイロードは、免疫調節剤である、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様95)

前記免疫調節剤は免疫抑制剤である、態様94記載の方法。

(態様96)

前記免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである、態様95記載の方法。

(態様97)

10

20

30

40

50

前記タンパク質構築物のペイロードは、タンパク質ペイロードである、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様98)

前記タンパク質ペイロードは、抗体、抗体断片又は一本鎖可変断片である、態様97記載の方法。

(態様99)

前記タンパク質ペイロードは、TNF α 抗原に特異的であり、かつ(comprises and)少なくとも1つであるABSを含む、態様97又は98記載の方法。

(態様100)

前記タンパク質ペイロードは、アダリムマブ、インフリキシマブ又はセルトリズマブの相補性決定領域(CDR)を含む、態様99記載の方法。

(態様101)

前記タンパク質ペイロードは、インターロイキン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む、態様97又は98記載の方法。

(態様102)

前記インターロイキンは、IL-12、IL-23、又はそれらの組み合わせである、態様101記載の方法。

(態様103)

前記タンパク質ペイロードは、ウステキヌマブ又はブリキヌマブ(brikinumab)のCDRを含む、態様102記載の方法。

(態様104)

前記生物製剤ペイロードは、インテグリン抗原に特異的な、少なくとも1つのABSを含む、態様97又は98記載の方法。

(態様105)

前記インテグリンは、 $\alpha 4$ インテグリンである、態様104記載の方法。

(態様106)

前記タンパク質ペイロードは、インフリキシマブ、ナタリズマブ又はベドリズマブのCDRを含む、態様105記載の方法。

(態様107)

前記タンパク質構築物は、鎮痛剤ペイロードを含む、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様108)

前記タンパク質構築物は、栄養補助食品ペイロードを含む、態様78～80のいずれか一項記載の方法。

(態様109)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、過敏腸症候群の患者へ投与することを含む、過敏腸症候群の治療法。

(態様110)

治療的有效量の、態様1～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、憩室炎の患者へ投与することを含む、憩室炎の治療法。

(態様111)

前記ペイロードは、抗生物質である、態様109又は110記載の方法。

(態様112)

前記抗生物質ペイロードは、リファキシミン、シプロフロキサシン、メトロニダゾール、モキシフロキサシン又はアモキシシリンである、態様111記載の方法。

(態様113)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、セリアック病の患者へ投与することを含む、セリアック病の治療法。

(態様114)

前記ペイロードは免疫抑制剤である、態様113記載の方法。

10

20

30

40

50

(態様 115)

前記免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである、態様114記載の方法。

(態様 116)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、微生物感染している患者へ投与することを含む、微生物感染の治療法。

(態様 117)

前記ペイロードは抗菌剤である、態様116記載の方法。

(態様 118)

前記抗菌剤は、抗寄生虫剤、抗生物質、抗真菌剤又は抗ウイルス剤である、態様117記載の方法。

10

(態様 119)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、代謝性障害又は代謝性欠乏の患者へ投与することを含む、代謝性障害又は代謝性欠乏の治療法。

(態様 120)

前記ペイロードは栄養補助食品である、態様119記載の方法。

(態様 121)

前記栄養補助食品は、酵素又はビタミンである、態様120記載の方法。

(態様 122)

治療的有效量の、態様62～66のいずれか一項記載の医薬組成物を、免疫関連症状の患者へ投与することを含む、免疫系の制御方法。

20

(態様 123)

前記ペイロードは、免疫抑制剤である、態様122記載の方法。

(態様 124)

前記免疫抑制剤は、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート又はチオプリンである、態様123記載の方法。

(態様 125)

前記ペイロードは、免疫賦活剤である、態様122記載の方法。

(態様 126)

前記免疫賦活剤はサイトカインである、態様125記載の方法。

30

(態様 127)

前記BTNL3/8を標的とする成分及び／又はペイロードの少なくとも一部は、細胞内に移行される、態様67～126のいずれか一項記載の方法。

(態様 128)

前記BTNL3/8を標的とする成分及び／又はペイロードは、細胞内に移行されない、態様67～126のいずれか一項記載の方法。

(態様 129)

配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、及び配列番号:13から構成される群からの配列と少なくとも90%の配列同一性を有する少なくとも1つの配列を含む、組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質。

40

(態様 130)

前記タンパク質は、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、及び配列番号:13から構成される群からの配列と少なくとも90%の配列同一性を有する2以上の配列を含む、態様129記載の組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質。

(態様 131)

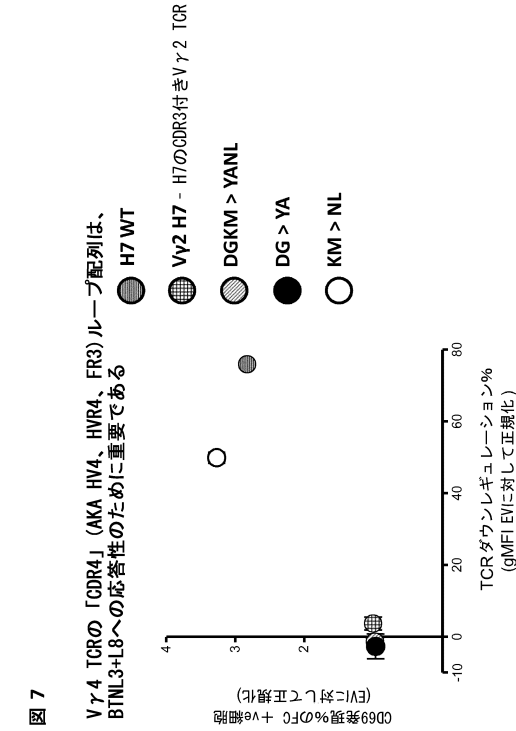
前記タンパク質は、配列番号:10と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、態様129～130のいずれか一項記載の組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質。

(態様 132)

前記タンパク質は、配列番号:10及び配列番号:11と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、態様129～131のいずれか一項記載の組換え $\gamma\delta$ TCRタンパク質。

50

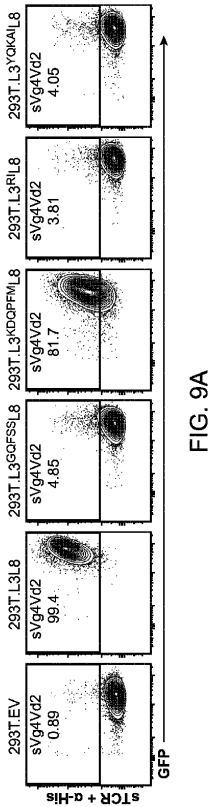
【図 7】



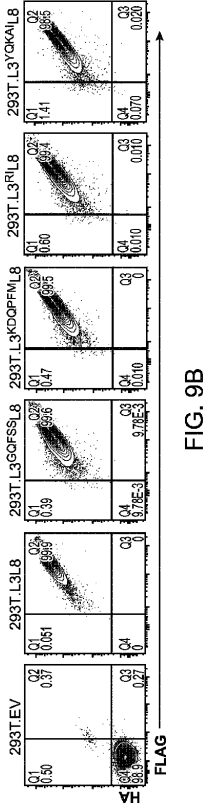
【図 8】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

20

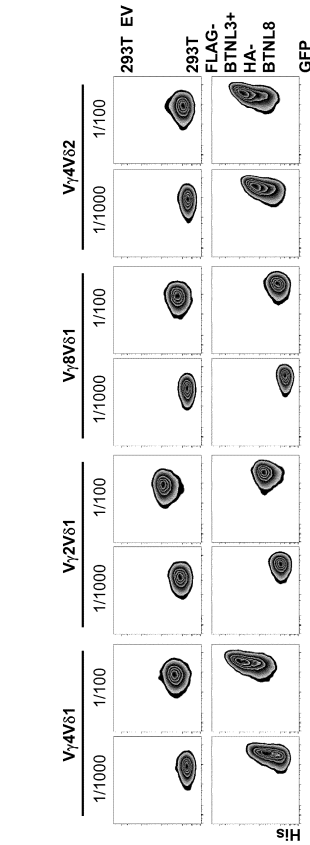
30

40

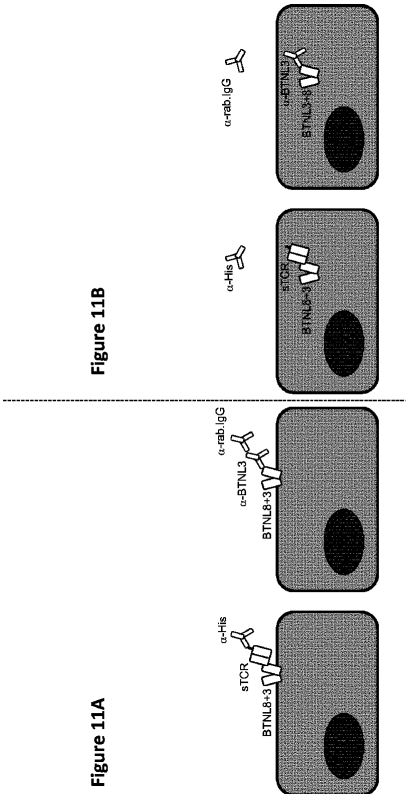
50

【図 10】

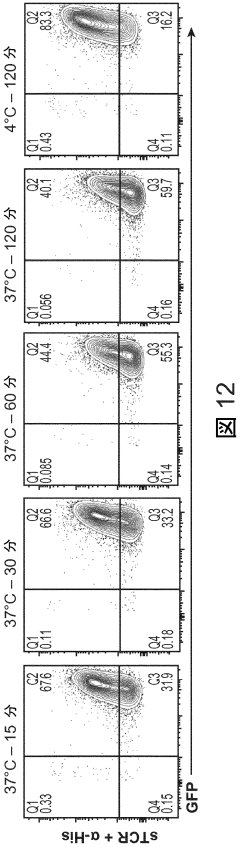
表示した可溶性TCR構築物(Hisタグ付き)+αHis-APCで染色した細胞
プロット上の数字は、TCR+αHis-APCの希釈度を示す



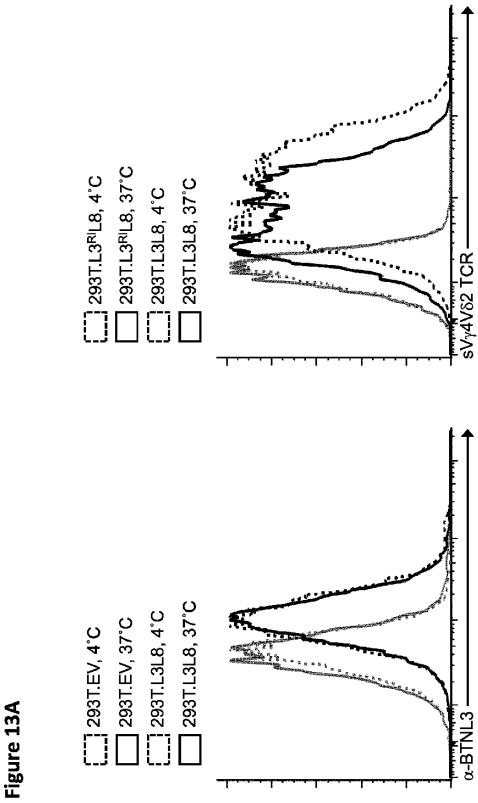
【図 11 A - 11 B】



【図 12】



【図 13 A】



【図 1 3 B】

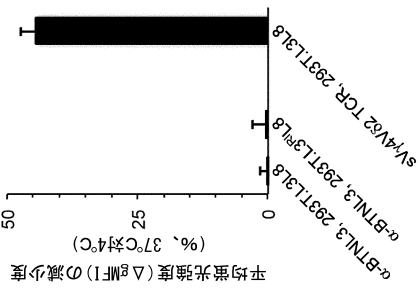


図 13B

【図 1 4】

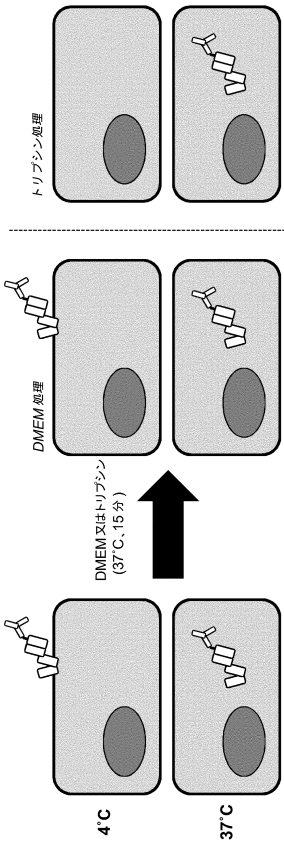


図 14

【図 1 5 A】

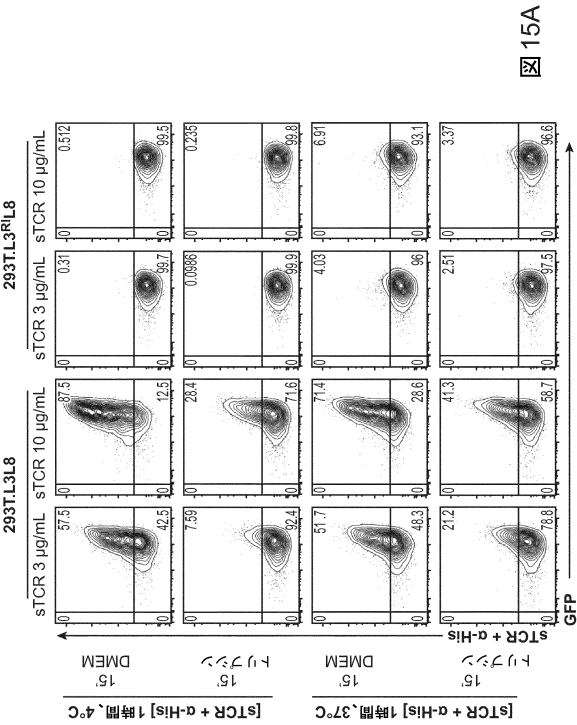


図 15A

【図 1 5 B】

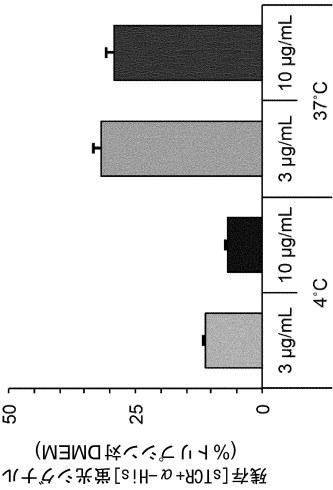


図 15B

10

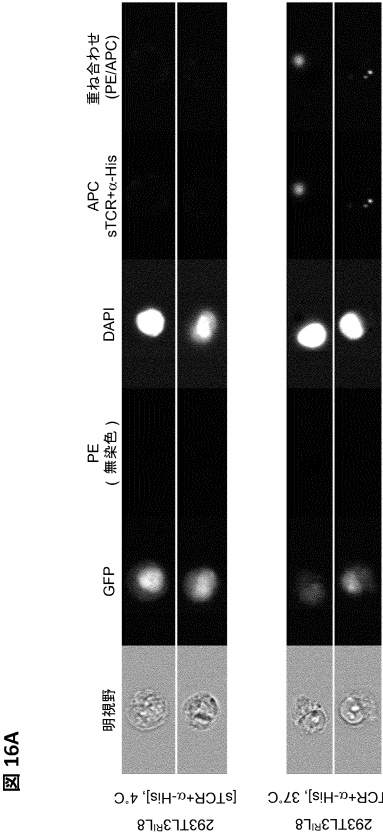
20

30

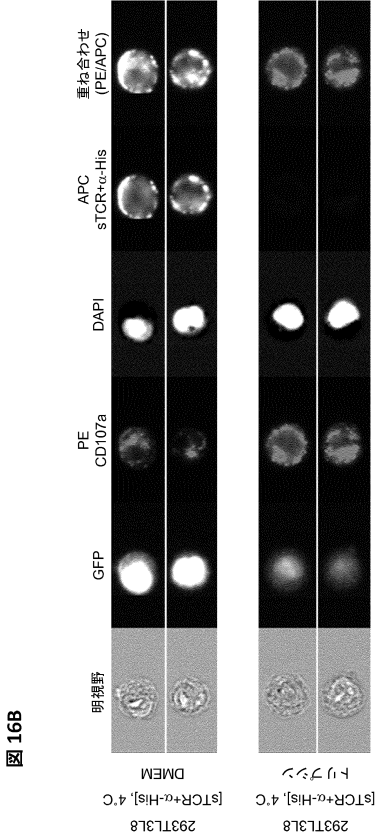
40

50

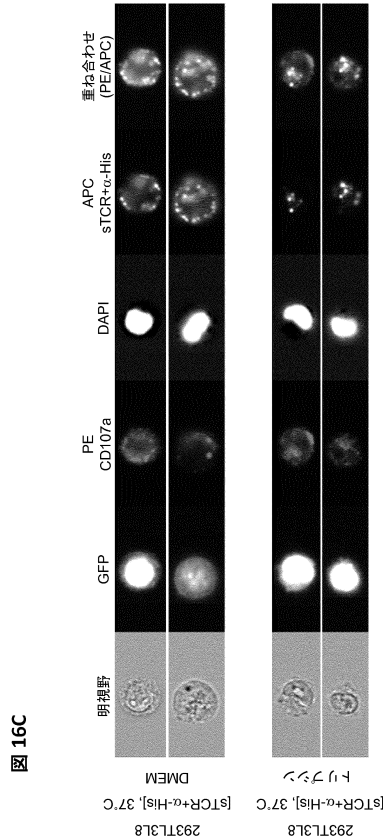
【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007653260000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/22 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	38/22	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	31/606(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/606	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/56 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	31/573(2006.01)	A 6 1 K	31/56	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	31/496(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	31/4164(2006.01)	A 6 1 K	31/496	
A 6 1 K	31/4709(2006.01)	A 6 1 K	31/4164	
A 6 1 K	31/43 (2006.01)	A 6 1 K	31/4709	
A 6 1 K	31/437(2006.01)	A 6 1 K	31/43	
A 6 1 K	38/13 (2006.01)	A 6 1 K	31/437	
A 6 1 K	31/706(2006.01)	A 6 1 K	38/13	
A 6 1 K	31/52 (2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 K	31/519(2006.01)	A 6 1 K	31/52	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
		A 6 1 P	3/00	

(74)代理人 100097456

弁理士 石川 徹

(72)発明者 オリバー ヌスバウマー

英国 ロンドン エヌダブリュー1 0エヌエイチ ロイヤル カレッジ ストリート 2 ロンドン バイオサイエンス イノベーション セントレ ガンマデルタ セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 オグザナ ポルヤコバ

英国 ロンドン エヌダブリュー1 0エヌエイチ ロイヤル カレッジ ストリート 2 ロンドン バイオサイエンス イノベーション セントレ ガンマデルタ セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 ラジ メータ

英国 ロンドン エヌダブリュー1 0エヌエイチ ロイヤル カレッジ ストリート 2 ロンドン バイオサイエンス イノベーション セントレ ガンマデルタ セラピューティクス リミテッド

(72)発明者 アドリアン ハイデイ

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 ビエーレ ヴァントウラウト

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 イヴァ ズラタレバ

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 デイジー メランドリ

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 ロビン ジョン キャンプベル ダート

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 アダム ライング

英国 ロンドン ダブリューシー2アール 2エルエス スtrand キングス カレッジ ロンドン

審査官 安川 聡

-
- (56)参考文献 中国特許出願公開第105296431 (CN, A)
Journal of Biological Chemistry, 2011年, Vol. 286, p.25611-25619, DOI: 10.1074/jbc.M111.239624
Nature Immunology, 2012年, Vol. 13, p.872-879, DOI: 10.1038/ni.2394
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K、A61K、A61P
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
CAPLUS/REGISTRY (STN)
UniProt/GeneSeq