

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 3 部門第 2 区分  
 【発行日】令和 2 年 7 月 9 日 (2020.7.9)

【公開番号】特開 2020-79267 (P2020-79267A)  
 【公開日】令和 2 年 5 月 28 日 (2020.5.28)  
 【年通号数】公開・登録公報 2020-021  
 【出願番号】特願 2020-14954 (P2020-14954)  
 【国際特許分類】

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/00

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 N 15/31

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 5 月 15 日 (2020.5.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親野生型志賀毒素 A サブユニットエフェクターポリペプチドに由来する毒素エフェクターポリペプチドを含むタンパク質であって、

前記親野生型志賀毒素 A サブユニットエフェクターポリペプチドが、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 251 からなり、

前記毒素エフェクターポリペプチドが、配列番号 16 と少なくとも 95% 同一であるポリペプチド配列を有し、

前記毒素エフェクターポリペプチドが、細胞内在化、細胞内の経路指定、触媒活性、及び細胞毒性から選択される、1 又は 2 以上の志賀毒素 A サブユニットエフェクター機能を示すことができ、

前記毒素エフェクターポリペプチドが、異種 CD8 + T 細胞エピトープを含まない前記親野生型志賀毒素 A サブユニットエフェクターポリペプチドと同じ総数のアミノ酸を有するように、異種 CD8 + T 細胞エピトープが組み込まれており、

前記組み込まれた異種 CD8 + T 細胞エピトープが、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、前記タンパク質。

【請求項 2】

組み込まれた異種 CD8 + T 細胞エピトープが、少なくとも 1 つの内因性 B 細胞エピトープ領域及び／又は少なくとも 1 つの内因性 CD4 + T 細胞エピトープ領域を破壊することにより、毒素エフェクターポリペプチドを脱免疫化し、その結果、組み込まれた異種 CD8 + T 細胞エピトープを含むポリペプチドにおける B 細胞抗原性若しくは免疫原性及び／又は CD4 + T 細胞抗原性若しくは免疫原性が、組み込まれた異種 CD8 + T 細胞エピトープを含まない親野生型志賀毒素 A サブユニットエフェクターポリペプチドと比べ、低減しており、

前記組み込まれた異種 CD8 + T 細胞エピトープの少なくとも 1 つのアミノ酸残基により、前記 B 細胞エピトープ領域及び／又は CD4 + T 細胞エピトープ領域の少なくとも 1 つ

のアミノ酸残基が置換され、その結果、前記 B 細胞エピトープ領域及び／又は C D 4 + T 細胞エピトープ領域が破壊される、  
請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの内因性 B 細胞エピトープ領域が、配列番号 1 又は配列番号 2 の天然位置のアミノ酸領域 53～66 にあり；及び／又は  
少なくとも 1 つの内因性 C D 4 + T 細胞エピトープ領域が、配列番号 1 又は配列番号 2 の天然位置のアミノ酸領域 34～78 にある、  
請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

配列番号 16 と少なくとも 95 % 同一であるポリペプチド配列を有する志賀毒素 A サブユニットエフェクターポリペプチドを含むタンパク質であって、  
前記ポリペプチドのアミノ酸残基 53～61 が、配列番号 6 に示される異種 C D 8 + T 細胞エピトープからなり、  
前記ポリペプチドが、細胞内在化、細胞内の経路指定、触媒活性、及び細胞毒性から選択される、1 又は 2 以上の志賀毒素 A サブユニットエフェクター機能を示すことができる、  
前記タンパク質。

【請求項 5】

毒素エフェクターポリペプチドが、前記毒素エフェクターポリペプチドが存在する細胞の初期エンドソーム区画から M H C クラス I 分子に、C D 8 + T 細胞エピトープを細胞内送達することができる、請求項 1～4 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 6】

毒素エフェクターポリペプチドが、前記毒素エフェクターポリペプチドが存在する細胞の初期エンドソーム区画から M H C クラス I 分子に、C D 8 + T 細胞エピトープを細胞内送達することに加えて、1 又は 2 以上の志賀毒素 A サブユニットエフェクター機能を示すことができる、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

志賀毒素 A サブユニットエフェクター機能が、細胞毒性、酵素活性、及び／又はポリペプチドが存在する細胞のサイトゾル区画に経路指定する能力である、請求項 6 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

配列番号 16 と少なくとも 98 % 同一であるポリペプチド配列を含む、又はそれからなる、請求項 1～7 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 9】

配列番号 16 に示されるポリペプチドを含む、又はそれからなる、請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質と、細胞標的化部分又は細胞標的化剤とを含む、細胞標的化分子。

【請求項 11】

細胞標的化部分が、少なくとも 1 つの細胞外標的生体分子に特異的に結合することができる結合領域を含む、請求項 10 に記載の細胞標的化分子。

【請求項 12】

結合領域が、シングルドメイン抗体断片、一本鎖可変断片、抗体可変断片、抗原結合断片、F d 断片、ラクダ科動物に由来する重鎖抗体ドメイン（V<sub>H</sub>H 断片）、軟骨魚類に由来する重鎖抗体ドメイン、免疫グロブリン新規抗原受容体（I g N A R）、V N A R 断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ等の多量体化 s c F v 断片、二重特異性タンデム s c F v 断片、ジスルフィド安定化抗体可変（F v）断片、及び二重特異性ミニボディからなる群から選択されるポリペプチドを含む、請求項 11 に記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 13】

請求項 11 又は 12 に記載の細胞標的化分子であって、前記細胞標的化分子を結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている細胞に投与すると、前記細胞の死を導く、前記細胞標的化分子。

## 【請求項 14】

メンバーが結合領域によって結合される細胞外標的生体分子と物理的に結合されている第 1 の細胞集団において、メンバーが前記結合領域によって結合されるいかなる細胞外標的生体分子とも物理的に結合されていない第 2 の細胞集団と比較して、少なくとも 3 倍大きい細胞毒性を示す、請求項 13 に記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 15】

細胞又は第 1 の細胞集団が、細胞外標的生体分子、又はその一部分を細胞の外部と結合させる、共有結合性及び／又は非共有結合性の分子間相互作用によって、前記細胞外標的生体分子と物理的に結合されているか、或いは前記細胞外標的生体分子が、前記細胞若しくは第 1 の細胞集団によって発現される不可欠膜タンパク質若しくは表在性膜タンパク質である、請求項 13 又は 14 に記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 16】

結合領域が、CD20、CD22、CD40、CD79、CD25、CD30、HER2/neu/Erbb2、EGFR、EpCAM、EphB2、前立腺特異的膜抗原、Crip1to、エンドグリン/CD105、線維芽細胞活性化タンパク質、LEWIS-Y、CD19、CD21、CS1/SLAMF7、CD33、CD52、gpA33、ムチン、TAG-72、炭酸脱水酵素 IX、葉酸結合タンパク質、ガングリオシド GD2、ガングリオシド GD3、ガングリオシド GM2、ガングリオシド LEWIS-Y2、VEGFR、アルファ V ベータ 3、アルファ 5 ベータ 1、Erbb1/EGFR、Erbb3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、テネイシン、CD64、メソセリン、BRCA1、MART-1/メラニン A、gp100、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、NY-ESO-1、CDK-4、ベータ-カテニン、MUM-1、カスパーゼ-8、KIAA0205、HPV E6、SART-1、PRAME、癌胎児抗原、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原、ヒトアスパルチル（アスパラギン）ベータ-ヒドロキシラーゼ、EphA2、HER3/Erbb-3、MUC1、チロシナーゼ関連抗原、HPV E7、エプスタイン・バーウイルス抗原、Bcr-Ab1、アルファ-フェトプロテイン抗原、17-A1、膀胱腫瘍抗原、CD38、CD15、CD23、CD53、CD88、CD129、CD183、CD191/CD244、CD294、CD305、C3AR、FcεRIα、ガレクチン-9、mrp-14、Siglec-8、Siglec-10、CD49d、CD13、CD44、CD54、CD63、CD69、CD123、CD193、TLR4、IgE、CD107a、CD203c、CD14、CD68、CD80、CD86、CD115、F4/80、ILT-3、ガレクチン-3、CD11a-c、GITRL、MHC クラス II、CD284/TLR4、CD107/Mac3、CD195/CCR5、HLA-DR、CD16/32、CD282/TLR2、CD11c、及び前述のもののいずれかの任意の免疫原性断片からなる群から選択される、請求項 11～15 のいずれかに記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 17】

毒素エフェクターポリペプチドが、前記毒素エフェクターポリペプチドの酵素活性を変化させる、天然に存在する志賀毒素 A サブユニットに対する変異を含む、請求項 10～16 のいずれかに記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 18】

変異が、ポリペプチドの細胞毒性を低減させる又は除去する、請求項 17 に記載の細胞標的化分子。

## 【請求項 19】

ホモ多量体又はヘテロ多量体の形態の、請求項 10～18 のいずれかに記載の細胞標的化分子。

【請求項 20】

ペプチド、タンパク質、細胞毒性剤、検出促進剤、小分子の化学療法剤、及びポリヌクレオチドのいずれかから選択される追加の外因性物質に連結される、請求項 10～19 のいずれかに記載の細胞標的化分子。

【請求項 21】

追加の外因性物質が、ペプチド又は抗原を含むタンパク質である、請求項 20 に記載の細胞標的化分子。

【請求項 22】

薬学的に許容される塩又は溶媒和物の形態の、請求項 10～21 のいずれかに記載の細胞標的化分子。

【請求項 23】

請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子と、  
少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤又は担体と  
を含む医薬組成物。

【請求項 24】

薬学的に許容される担体が、生理学的に許容される溶媒又は分散媒を含み；及び／又は  
薬学的に許容される担体が、水、アルコール、ポリオール、及びそれらの好適な混合物、  
植物油、又は注入可能な有機エステルを含む、  
請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

アジュバント、コーティング、抗微生物剤、抗菌剤又は抗真菌剤；等張剤；ポリアルコール；  
吸収遅延剤；安定化剤；緩衝剤；界面活性剤；及び／又は薬学的に許容される抗酸化剤をさらに含む、  
請求項 23 又は 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

アジュバントが、保存剤、湿潤剤、乳化剤、又は分散剤であり；  
コーティングが、レシチンであり；  
抗菌剤又は抗真菌剤が、パラベン、クロロブタノール、フェノール、又はソルビン酸であり；  
等張剤が、糖又は塩化ナトリウムであり；  
ポリアルコールが、マンニトール又はソルビトールであり；及び／又は  
薬学的に許容される抗酸化剤が、水溶性抗酸化剤、油溶性抗酸化剤、又は金属キレート剤  
である、  
請求項 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

水溶性抗酸化剤が、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、又は亜硫酸ナトリウムであり；  
油溶性抗酸化剤が、パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、レシチン、没食子酸プロピル、又はアルファートコフェロールであり；  
及び／又は  
金属キレート剤が、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸、ソルビトール、酒石酸又はリン酸である、  
請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子と、  
検出促進剤と  
を含む診断用組成物。

【請求項 29】

請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質、若しくは請求項 10～21 のいずれかに記載の細胞標的化分子をコードするポリヌクレオチド；又はその補体。

**【請求項 30】**

請求項 29 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

**【請求項 31】**

請求項 29 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 30 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 32】**

細胞を、請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質、請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子、又は請求項 23～27 のいずれかに記載の医薬組成物と接触させるステップを含む、前記細胞を殺滅するインビトロにおける方法。

**【請求項 33】**

請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質、請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子、又は請求項 23～27 のいずれかに記載の医薬組成物を含む、患者における疾患、障害又は状態の治療剤であって、  
前記疾患、障害又は状態が、前記細胞標的化部分又は細胞標的化剤によって標的化される細胞によって特徴づけられる、前記治療剤。

**【請求項 34】**

疾患、障害又は状態が、がん、腫瘍、免疫障害及び微生物感染からなる群から選択される、請求項 33 に記載の治療剤。

**【請求項 35】**

がんが、骨がん、乳がん、中枢／末梢神経系がん、胃腸がん、胚細胞がん、腺がん、頭頸部がん、血液がん、腎・尿路癌、肝がん、肺／胸膜がん、前立腺がん、肉腫、皮膚がん、及び子宮がんからなる群から選択されるか、又は  
免疫障害が、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、喘息、クローン病、糖尿病、移植片拒絶、移植片対宿主病、橋本甲状腺炎、溶血性尿毒症症候群、HIV 関連疾患、エリテマトーデス、多発性硬化症、多発動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎、及び血管炎からなる群から選択される疾患に関連するものである、  
請求項 34 に記載の治療剤。

**【請求項 36】**

細胞標的化分子又は医薬組成物が、脊索動物内の組織部位への「接種」により投与するためのものであり、前記組織部位が、前記細胞標的化分子により標的化される細胞を含む、請求項 33～35 のいずれかに記載の治療剤。

**【請求項 37】**

組織部位が、悪性組織、罹病組織、炎症組織、腫瘍塊、がん性腫瘍、腫瘍、感染組織、又は異常細胞塊を含む、請求項 36 に記載の治療剤。

**【請求項 38】**

CD8+T 細胞エピトープが、MHC クラス I 複合体中の細胞標的化分子の標的細胞によって天然に提示されないペプチド、前記標的細胞によって発現されるいずれのタンパク質中にも自然に存在しないペプチド配列、前記標的細胞のプロテオーム中に自然に存在しないペプチド配列、接種される部位の細胞外微小環境に天然に存在しないペプチド、及び標的にされる腫瘍塊又は感染組織部位に天然に存在しないペプチドからなる群から選択される、請求項 36 又は 37 に記載の治療剤。

**【請求項 39】**

がん、腫瘍、免疫障害、又は微生物感染の治療又は予防における使用のための、請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質、又は請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子を含む組成物。

**【請求項 40】**

がん、腫瘍、免疫障害、若しくは微生物感染の治療又は予防のための医薬品の製造における、請求項 1～9 のいずれかに記載のタンパク質、請求項 10～22 のいずれかに記載の細胞標的化分子、請求項 23～27 のいずれかに記載の医薬組成物、又は請求項 28 に

記載の診断用組成物の使用。

【請求項 4 1】

細胞標的化分子、医薬組成物又は診断用組成物が、脊索動物内の組織部位への「接種」により投与するためのものであり、前記組織部位が、細胞標的化分子により標的化される細胞を含む、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

組織部位が、悪性組織、罹病組織、炎症組織、腫瘍塊、がん性腫瘍、腫瘍、感染組織、又は異常細胞塊を含み、細胞標的化分子により標的化される細胞を含む、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 3】

C D 8 + T 細胞エピトープが、M H C クラス I 複合体中の細胞標的化分子の標的細胞によって自然に提示されないペプチド、前記標的細胞によって発現されるいずれのタンパク質中に自然に存在しないペプチド配列、前記標的細胞のプロテオーム中に自然に存在しないペプチド配列、接種される部位の細胞外微小環境に自然に存在しないペプチド、及び標的にされる腫瘍塊又は感染組織に自然に存在しないペプチドからなる群から選択される、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の使用。

【請求項 4 4】

疾患、障害又は状態の診断、予後予測又は特性評価における、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のタンパク質、又は請求項 1 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の細胞標的化分子の使用。

【請求項 4 5】

外因性物質を細胞の内部に送達するインビトロの方法であって、前記細胞を請求項 1 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の細胞標的化分子、請求項 2 3 ～ 2 7 のいずれかに記載の医薬組成物、又は請求項 2 8 に記載の診断用組成物と接触させるステップを含み、前記外因性物質が、組み込まれた異種 C D 8 + T 細胞エピトープである、前記方法。

【請求項 4 6】

外因性物質を細胞の内部に送達するインビトロの方法であって、前記細胞を請求項 2 0 又は 2 1 に記載の細胞標的化分子と接触させるステップを含み、前記外因性物質が、追加の外因性物質である、前記方法。

【請求項 4 7】

請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のタンパク質、請求項 1 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の細胞標的化分子、請求項 2 3 ～ 2 7 のいずれかに記載の医薬組成物、請求項 2 8 に記載の診断用組成物、請求項 2 9 に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 0 に記載の発現ベクター、又は請求項 3 1 に記載の宿主細胞、並びに追加の試薬及び／又は医薬送達デバイスを備えるキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 5 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 5 6】

ジフテリア毒素由来エフェクターポリペプチド

ジフテリア毒素は、抗毒素及びリガンド毒素融合分子を設計するために用いられており、ジフテリア由来成分は細胞内在化及び細胞質ゾルルーティングエフェクター機能を提供することができる。計算法を利用して、哺乳類の免疫システムによる応答を誘発する可能性があるジフテリア毒素 A サブユニット中の抗原性及び／又は免疫原性 B 細胞エピトープを予測した。BcePred ウェブサーバー (Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)) を使って、ジフテリア毒素の A サブユニット (配列番号 4 4) 中の B 細胞エピトープ領域を予測した。この計算法で、典型的なジフテリア毒素 A サブユニット中に 7 つの推定される B 細胞エピトープ領域があることが明らかになった (表 5)。さらに、米国立アレルギー感染病調査所 (N I A I D、National Institutes of Aller

gy and Infectious Diseases of the U.S.) が管理する免疫エピトープデータベース (IEDB) は、全ての実験で特徴づけられたジフテリア毒素の B 細胞及び T 細胞エピトープを提供されている。現在、IEDB は、本実施例で使用されるジフテリア毒素 A サブユニット及びジフテリア毒素エフェクターポリペプチド配列番号 45 に関連するペプチドエピトープに関する少なくとも 1 つの陽性測定を有する 7 つのエピトープを提供する (表 5、並びに配列番号 45 の領域 182 ~ 201 及び 225 ~ 238 を参照されたい)。