

【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1部門第1区分

【発行日】令和3年2月25日(2021.2.25)

【公表番号】特表2020-518240(P2020-518240A)

【公表日】令和2年6月25日(2020.6.25)

【年通号数】公開・登録公報2020-025

【出願番号】特願2019-559009(P2019-559009)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 B 10/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/28 Z N A

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 19/00

A 6 1 K 47/68

A 6 1 P 35/00

A 6 1 B 10/00 E

【手続補正書】

【提出日】令和3年1月15日(2021.1.15)

【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】

エンドリソソーム標的化コンジュゲートであって、

抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインを含む標的化成分であって、ここで該標的化成分は標的細胞のエンドリソソーム区画内より低い解離定数で細胞外空間において標的細胞の細胞表面分子に結合するように構成されている、標的化成分と、

抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインにコンジュゲート化されたカーゴ分子を含む、カーゴ成分とを含み、

ここで前記標的化成分は前記カーゴ成分に直接又は間接的に融合しており、

前記標的化成分は、エンドリソソーム区画に進入すると細胞表面分子から解離するように構成されており、そして

前記エンドリソソーム標的化コンジュゲートは、前記標的細胞のエンドリソソーム区画に前記カーゴ分子を送達するように構成されている、エンドリソソーム標的化複合体。

【請求項2】

前記標的化成分は、酸性エンドリソソーム pH におけるより低い解離定数で中性近辺の

pHにおいて細胞表面分子に結合するように構成される、抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン又はナノボディーを含む、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項3】

前記標的化成分は、エンドリソソーム Ca^{2+} 濃度におけるより低い解離定数で細胞外 Ca^{2+} 濃度において細胞表面分子に結合するように構成される、抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン又はナノボディーを含む、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項4】

前記標的化成分は、酸性エンドリソソーム pHにおけるより低い解離定数で中性近辺の pHにおいて細胞表面分子に結合するように構成される、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインである、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項5】

前記標的化成分は、エンドリソソーム Ca^{2+} 濃度におけるより低い解離定数で細胞外 Ca^{2+} 濃度において細胞表面分子に結合するように構成される、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインを含む、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項6】

前記カーゴ成分は、抗体Fc領域又は抗体Fcフラグメントのドメインを含む、抗体、抗体フラグメント又は抗体ドメインを含む、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項7】

前記抗体Fc領域又は抗体FcフラグメントのドメインはヒトIgG1に由来する、請求項6に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項8】

前記カーゴ成分はアルブミン分子又はアルブミンのドメインを含む、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項9】

前記標的化成分はHER2特異的抗体のFabフラグメント又はscFvフラグメントを含み、ここで該Fabフラグメント又はscFvフラグメントの重鎖可変ドメインは、Ser55のヒスチジンへの突然変異及びGly57のグルタミン酸への突然変異を有する、請求項2に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項10】

前記標的化成分はHER2特異的抗体のFabフラグメント又はscFvフラグメントを含み、ここで該Fabフラグメント又はscFvフラグメントにおいて重鎖可変ドメインはSer103のヒスチジンへの突然変異を有し、軽鎖可変ドメインはTyr55のヒスチジンへの突然変異を有する、請求項2に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項11】

前記カーゴ分子は細胞傷害性薬物である請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項12】

前記カーゴ分子は画像化標識である、請求項1に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項13】

エンドリソソーム標的化コンジュゲートであって、

抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインを含む標的化成分であって、ここで該標的化成分は標的細胞の細胞表面分子に結合するように構成されている標的化成分と、

抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインにコンジュゲート化されたカーゴ分子を含むカーゴ成分と

を含み、
ここで前記標的化成分は標的細胞のエンドリソソーム区画内におけるより低い解離定数で細胞外空間においてカーゴ成分に結合するように構成されており、

前記標的化成分は、エンドリソソーム区画に進入すると細胞表面分子から解離するように構成されており、そして

前記エンドリソソーム標的化コンジュゲートは、標的細胞のエンドリソソーム区画にカーゴ分子を送達するように構成されている、エンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項 1 4】

前記標的化成分は酸性エンドソーム pH におけるより低い解離定数で中性近辺の pH においてカーゴ区画に結合するように構成されている、請求項 1 3 に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項 1 5】

前記標的化成分はエンドリソソーム Ca^{2+} 濃度におけるより低い解離定数で細胞外 Ca^{2+} 濃度においてカーゴ成分に結合するように構成されている、請求項 1 3 に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項 1 6】

癌の処置のためのエンドリソソーム標的化コンジュゲートを与える方法であって、

請求項 1 の標的化成分を選択する段階であって、ここで該標的化成分は、選ばれたタイプの腫瘍標的細胞上の細胞表面分子に選択的に結合するように構成される、抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインを含み、ここで前記標的化成分は、エンドリソソーム区画内におけるより低い解離定数で細胞外空間において細胞表面分子に結合するように構成されている、段階と、

請求項 1 のカーゴ成分を選択する段階であって、ここでカーゴ分子は、選ばれたタイプの腫瘍標的細胞の成長を抑制するための薬効を有する、細胞傷害性薬物を含む、段階と、

前記カーゴ成分に直接又は間接的に融合した前記標的化成分を含む、エンドリソソーム標的化コンジュゲートを与える段階と

を含む、方法。

【請求項 1 7】

癌の処置のためのエンドリソソーム標的化コンジュゲートを与える方法であって、

請求項 1 3 の標的化成分を選択する段階であって、ここで該標的化成分は、選ばれたタイプの腫瘍標的細胞上の細胞表面分子に選択的に結合するように構成される、抗体、抗体フラグメント、ナノボディー、タンパク質、タンパク質フラグメント又はタンパク質ドメインを含む、段階と、

請求項 1 3 のカーゴ成分を選択する段階であって、ここでカーゴ分子は、選ばれたタイプの腫瘍標的細胞の成長を抑制するための薬効を有する、細胞傷害性薬物を含む、段階とを含み、ここで

前記標的化成分は第 1 のタンパク質ドメインをさらに含むように改変され、

前記カーゴ成分は第 2 のタンパク質ドメインをさらに含むように改変され、そして

第 1 のタンパク質ドメインは、エンドリソソーム区画内におけるより低い解離定数で細胞外空間において第 2 のドメインに結合するように構成されている、
方法。

【請求項 1 8】

前記標的化成分は、ヒト表皮成長因子受容体 2 に結合するように構成される、抗体、抗体フラグメント、抗体ドメイン又はナノボディーを含む、請求項 1 又は 1 3 に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項 1 9】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48 又はそれらの相同体の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を有する、1 個以上のタンパク質を含む、請求項 1 又は 13 に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【請求項 20】

前記カーゴ分子は標的細胞の挙動を改変する薬物その他の薬剤である、請求項 1 又は 13 に記載のエンドリソソーム標的化コンジュゲート。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

ファージディスプレイベクター、pHEN1 (Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., Winter, G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucl. Acids Res. 19, 4133 - 4137) 中でペルツズマブ scFv 遺伝子を作製するために、標準的な分子生物学の方法を用いてペルツズマブのための Fab フラグメント発現ベクターを修飾し、重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子の間にリンカーペプチド [Gly₄Ser]₃Gly₂Ser リンカー] を挿入し、続いて scFv 遺伝子を pHEN1 中に再クローニングした。CDRs 中にランダムに突然変異した残基を有する突然変異ペルツズマブ scFvs のライブラリを作成するために、以下のオリゴヌクレオチドを用いた。各オリゴヌクレオチドに関し、DNA 配列を 5' から 3' への方角で示す、CDRH1Back, GCTTCTGGATTTCACATTCACANNBNNBNNBATGGATTGGGTGAGACAGGCT (配列番号 49)、CDRH1For, TGTGAATGTGAATCCAGAAGC (配列番号 50)、CDRH2Back, TGGGTGGCTGATGTGAATCCTNNBNNBNNBNNBTCTATCTACAATCAGAGATTTC (配列番号 51)、CDRH2For, AGGATTCACATCAGCCACCCA (配列番号 52)、CDRH3Back, TACTACTGTGCTAGAAATCTGNNBCCTNNBTTCNNBTTCGATNNBTGGGGACAGGGAACACTG (配列番号 53)、CDRH3For, CAGATTTCTAGCACAGTAGTA (配列番号 54)、CDRL2-1Back, CCTAAGCTGCTGATCTACTCTNNBTCTNNBAGANNBACAGGAGTGCCCTTCTAGA (配列番号 55)、CDRL2-1For, AGAGTAGATCAGCAGCTTAGG (配列番号 56)、CDRL2-2Back, GGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGNNBNNBNNBGCTTCTTACAGATACACAGGA (配列番号 57)、及び CDRL2-2For, CAGCAGCTTAGGAGCCTTTCC (配列番号 58)。当業者に既知の分子生物学法を用い、scFvs 遺伝子のライブラリを作成し、E. coli TG1 (Lucigen, カタログ番号 60502) のエレクトロポレーションを用いてそれぞれの標的とされる CDR に関する約 5×10^7 個の突然変異体のライブラリを作成した。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

マウス異種移植片モデルにおけるHER2-ADCsによる腫瘍成長の抑制

HER2-ADCs (WT-MMAE、SG-MMAE及びYS-MMAE)の薬物動態学の分析は、BALB/c SCIDマウスにおけるSG-MMAE及びYS-MMAEの生体内持続性がWT-MMAEのものに類似であることを示す(図7A、n=グループ当たり5匹のマウス)。ADCsを125-Iで放射性標識し、マウス中に注入し(グループ当たり5匹のマウス)、示される時点に血液中及び全身レベルにおける残留放射能を決定した。MDA-MBA-MB-453異種移植片(中程度のHER2発現レベル)を保有するBALB/c SCIDマウスにおけるADCsを用いる治療研究は、処置においてSG-MMAE及びYS-MMAEがWT-MMAE又はT-DM1より有効であることを示す(図7B)。17日及び38日(実験1、矢印により示す)又は24日及び45日(実験2、矢印により示す)における2回の2mg/kgのADCの投薬を用いて、マウスを処置した。エラーバーは標準偏差を示し、処置の終了点における統計的に有意な差(SG-MMAE対WT-MMAE又はT-DM1、YS-MMAE対WT-MMAE又はT-DM1)を*により示す(Studentのt-検定、 $p < 0.05$ 、n=グループ当たり5-8匹のマウス)。まとめて、データはSG-MMAE及びYS-MMAEが好ましい薬物動態学を有し、且つ腫瘍成長の低下においてそれらの親であるWTペルツズマブ及び臨床的に承認されたHER2特異的ADCであるT-DM1より有効でもあることを示す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図5B

【補正方法】変更

【補正の内容】

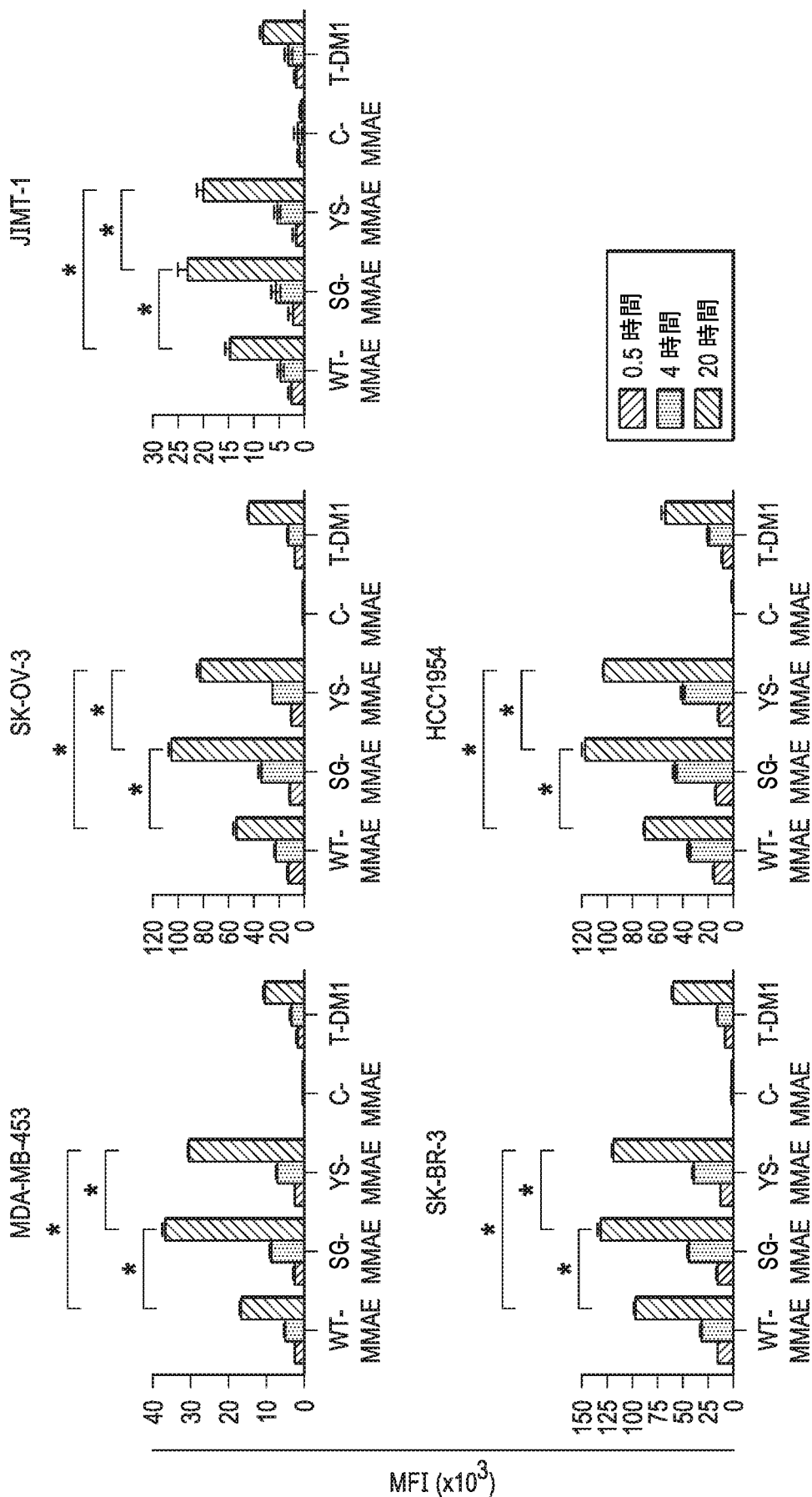


図 5B