

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-509241
(P2024-509241A)

(43)公表日 令和6年2月29日(2024.2.29)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z 4 C 0 7 6
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z 4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	

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

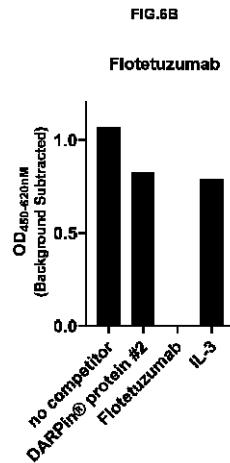
(21)出願番号	特願2023-554813(P2023-554813)	(71)出願人	515146556
(86)(22)出願日	令和4年3月9日(2022.3.9)		モレキュラー パートナーズ アクチエン
(85)翻訳文提出日	令和5年11月2日(2023.11.2)		ゲゼルシャフト
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/052128		スイス国 ツェーハー 8 9 5 2 チューリ
(87)国際公開番号	WO2022/190018		ッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラー
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)		セ 1 4
(31)優先権主張番号	63/158,539	(74)代理人	100094569
(32)優先日	令和3年3月9日(2021.3.9)		弁理士 田中 伸一郎
(33)優先権主張国・地域又は機関			100103610
米国(US)			弁理士 吉 田 和彦
(31)優先権主張番号	63/173,227	(74)代理人	100109070
(32)優先日	令和3年4月9日(2021.4.9)		弁理士 須田 洋之
(33)優先権主張国・地域又は機関			100119013
米国(US)			弁理士 山崎 一夫
(31)優先権主張番号	63/265,187	(74)代理人	100123777
			最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規のDARPinにに基づくCD123エンゲージャ

(57)【要約】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、ここで、アンキリン反復ドメインは、ヒトCD123に対する結合特異性を有する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌など、例えば急性骨髓性白血病(AML)、の疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、前記アンキリン反復ドメインが、ヒト C D 1 2 3 に対して結合特異性を有し、前記アンキリン反復ドメインが、(1)配列番号 1 2 ~ 3 0 及び配列番号 5 8 ~ 5 9 、並びに(2)配列番号 1 2 ~ 3 0 及び配列番号 5 8 ~ 5 9 のいずれかにおける最大 9 個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質。

【請求項 2】

アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、前記アンキリン反復ドメインが、ヒト C D 1 2 3 に対して結合特異性を有し、前記アンキリン反復ドメインが、配列番号 1 ~ 9 及び配列番号 5 5 ~ 5 7 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質。

【請求項 3】

前記アンキリン反復ドメインが、P B S 中のヒト C D 1 2 3 に、約 1 5 0 n M 未満の解離定数 (K_D) で、任意選択で約 5 p M ~ 約 1 5 0 n M の範囲内で結合する、請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 4】

前記アンキリン反復ドメインが、約 0 . 1 n M ~ 約 1 0 0 n M の範囲にわたる E C 5 0 でヒト C D 1 2 3 に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 5】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する結合部分を更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 6】

前記免疫細胞が T 細胞であり、免疫細胞上に発現される前記標的が C D 3 である、請求項 5 に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 7】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、アンキリン反復ドメインである、請求項 5 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 8】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 9】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインであり、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 4 ~ 3 8 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 10】

ヒト C D 3 に対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 4 ~ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 11】

ヒト C D 1 2 3 に対する結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメイン、及び免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ペプチドリンカーと共有結合している、請求項 5 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 12】

前記ペプチドリンカーが、プロリン - トレオニンに富むペプチドリンカーである、請求項 1 1 に記載の組換え結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1～50個のアミノ酸の長さを有する、請求項11～12に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 4】

前記結合タンパク質が、半減期延長部分を更に含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 5】

前記半減期延長部分が、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、請求項14に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 6】

ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号31～33のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 7】

ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号31～33のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項15及び16に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 8】

前記結合タンパク質が、腫瘍細胞において発現される標的に対して結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含み、腫瘍細胞において発現される前記標的が、ヒトCD123とは異なる、請求項1～17のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 1 9】

請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質をコードする、核酸。

【請求項 2 0】

請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質又は請求項19に記載の核酸、並びに薬学的に許容される担体及び/又は希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項 2 1】

ヒト患者の腫瘍組織における免疫細胞活性化の方法であって、請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、請求項19に記載の核酸、又は請求項20に記載の医薬組成物を、前記患者へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 2】

前記免疫細胞が、T細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 3】

医学的状態を治療する方法であって、医学的状態を治療することを必要とする患者に、治療有効量の請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、請求項19に記載の核酸、又は請求項20に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 4】

前記医学的状態が、癌である、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記医学的状態が、液性腫瘍を特徴とする癌である、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記医学的状態が、白血病である、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記医学的状態が、急性骨髓性白血病である、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 8】

治療に使用するための、請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、請求項19に記載の核酸、又は請求項20に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

癌の治療に使用するための、任意選択では液性腫瘍を特徴とする癌の治療に使用するための、請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、請求項19に記載

10

20

30

40

50

の核酸、又は請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記癌が白血病であり、任意選択で前記癌が急性骨髓性白血病である、請求項 29 に記載の使用のための組換え結合タンパク質、又は核酸、又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年3月9日に出願された米国特許仮出願第63/158,539号、2021年4月9日に出願された米国特許第63/173,227号、及び2021年12月9日に出願された米国特許出願第63/265,187号に対して優先権の利益を主張するものである。これら特許出願の開示は、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、ここで、アンキリン反復ドメインは、ヒトCD123に対する結合特異性を有する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌など、例えば急性骨髓性白血病(AML)、の疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。

【背景技術】

【0003】

急性骨髓性白血病(AML)は、急速な細胞増殖、侵攻性の臨床経過、及び一般的に高い死亡率を特徴とする、不均一かつ複雑な悪性疾患である。治療抵抗性は、急性AML関連死の未だに主要な原因である(Winner及びStone、「The Advances in Hematology」; 2019年; 10巻)。化学療法を用いる標準プロトコルは、依然として世界的に適用される主要な治療アプローチであるが、免疫療法における最近の進歩は、化学療法抵抗性AMLに対して有効な治療選択肢を提供している。そのような免疫療法アプローチには、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、及びキメラ抗原受容体発現T細胞(CAR-T細胞)が含まれる。

【0004】

CD123は、AML芽細胞及び白血病性幹細胞の約70~80%で発現されるので、CD123は、癌、特にAMLの治療のための魅力的な標的である(Enhingerら、「Blood Cancer Journal」、第4巻第e218頁(2014年))。CD123はまた、AML治療の標的として臨床的に検証されており、ここで、抗CD123抗体は、単剤療法として使用されるか、又は細胞傷害性剤とコンジュゲートされるかのいずれかとして使用される(Winner & Stone、「The Advances in Hematology」; 2019年; 第10巻)。しかしながら、これらの薬物は、有意な有害作用又は低い有効性のいずれかを示している。例えば、ヒト化抗CD123モノクローナル抗体であるタルコツズマブによる処置は、有効な治療上の利益をもたらすことができなかった。成人及び2歳以上の小児患者における芽球性形質細胞様樹状細胞新生物(BPDCN)の治療のためのFDAによる使用が承認された抗CD123抗体であるタグラクソファスブは、毛細管漏出症候群に関連している。毛細管漏出症候群は、まれではあるが潜在的に致死的な状態であり、毛細管漏出症候群では、血管が血漿を漏出し、血圧の深刻な低下を引き起こす。毛細管漏出症候群は臓器不全をもたらし得る。

【0005】

CAR-T細胞療法は、リンパ系悪性腫瘍の管理に強く影響してきたアプローチである。この技術をAMLにも適用することに大きな関心が寄せられているが、実際には、これは困難であることが証明されている。モノクローナル抗体に関して、CD123は、AMLにおけるCAR-T細胞療法のための最も有望な標的であると考えられている。しかし

10

20

30

40

50

ながら、このアプローチについての前臨床モデルは、非 A M L 細胞に対して広範な副作用（オンターゲット / オフ腫瘍毒性）を示し、サイトカイン放出症候群（ C R S ）は、別の認識されている副作用である。

【 0 0 0 6 】

二重特異性抗体を使用した腫瘍細胞の T 細胞指向性殺傷は、 A M L を含む様々な癌型の治療に利用されている別の最近の治療ツールである。これらの T 細胞エンゲージャ（ T C E ）二重特異性抗体は、 2 つの異なる可変領域を含み、一方は T 細胞受容体複合体サブユニット C D 3 に結合し、他方は腫瘍細胞表面抗原に結合する。これらの 2 つの標的への T C E の結合は、細胞間の機能的接続を提供し、 T 細胞活性化及び腫瘍細胞に対して細胞傷害活性をもたらし、正常な T C R - M H C 相互作用を回避する（ E l l e r m a n 、 「 M e t h o d s 」 ; 第 1 5 4 卷 : 第 1 0 2 ~ 1 1 7 頁 (2 0 1 9 年) ）。 フロテツズマブは、 2 つの独立したポリペプチドを用いて、一方の抗体の重鎖可変ドメインを他方の抗体の軽鎖可変ドメインに融合させて、 T 細胞上の C D 3 及び A M L 細胞上の C D 1 2 3 を接続する二重親和性再標的化抗体（ D A R T (登録商標) ）である。

10

【 0 0 0 7 】

しかしながら、多重特異性抗体療法及び二重特異性抗体療法の両方は、製造コストが高いことなどのいくつかの欠点を提示し得、かつこれらは、サイトカイン放出症候群（ C R S ）（ S h i m a b u k u r o - V o r n h a g e n ら、 「 J I mmunothe r C a n c e r 」 ; 第 6 卷（第 1 号） : 第 5 6 頁 (2 0 1 8 年) ； L a b r j i n ら、 「 N at Rev Drug Discov 」 ; 第 1 8 卷（第 8 号） : 第 5 8 5 ~ 6 0 8 頁 (2 0 1 9 年) ）、及び / 又はオンターゲット / オフ腫瘍毒性（ W e i n e r ら、 「 C a n c e r Res . 」 ; 第 5 5 卷（第 2 0 号） : 第 4 5 8 6 ~ 4 5 9 3 頁 (1 9 9 5 年) ； W e i n e r ら、 「 C a n c e r I mmunol . I mmunothe r . 」 ; 第 4 2 卷（第 3 号） ; 第 1 4 1 ~ 1 5 0 頁 (1 9 9 6 年) ）などの重篤な副作用を引き起こし得る。抗体ベースの T 細胞エンゲージャは、天然の T C R - M H C 相互作用と比較して、 C D 3 に対して 1 0 0 0 倍超高い親和性を示すことが多い（ (W u ら、 「 P h a r m a c o 1 T h e r 」 ; 第 1 8 2 卷 : 第 1 6 1 ~ 7 5 頁 (2 0 1 8 年) ；国際公開第 2 0 1 4 / 1 6 7 0 2 2 号 ; J u n n t i l a ら、 「 C a n c e r Res . 」 ; 第 1 9 卷 : 第 5 5 6 1 ~ 7 1 頁 (2 0 1 4 年) ； Y a n g ら、 「 J I mmunol Aug . 」 ; 第 1 5 卷（第 1 3 7 号） : 第 1 0 9 7 ~ 1 0 0 頁 (1 9 8 6 年) ）。この高い親和性は、 T 細胞活性化及び腫瘍細胞殺傷の点でより低い効率と相關している（ B o r t o l e t t o ら、 「 E u r . J . I mmunol . 」、第 3 2 卷 ; 第 1 1 号 : 第 3 1 0 2 ~ 3 1 0 7 頁 (2 0 0 2 年) ； E l l e r m a n 、 「 M e t h o d s 」 ; 第 1 5 4 卷 : 第 1 0 2 ~ 1 1 7 頁 (2 0 1 9 年) ； M a n d i k i a n ら、 「 M o l . C a n c e r T h e r . 」 ; 第 1 7 卷（第 4 号） : 第 7 7 6 L P - 7 8 5 (2 0 1 8 年) ； V a f a ら、 「 F r o n t i e r s i n O n c o l o g y 」 ; 第 1 0 卷 : 第 4 4 6 頁 (2 0 2 0 年) ）。更に、 T C E によって標的化される腫瘍表面マーカのダウンレギュレーションは、 T C E 治療に対して腫瘍の耐性をもたらし得る。

20

30

30

【 0 0 0 8 】

急性骨髓性白血病（ A M L ）は、上述したように、多くの点で癌療法の課題及び現在利用可能な癌療法の欠点を例示する癌の一種である。 A M L については、高い死亡率による医学的必要性が高いままであり、再発性又は難治性 A M L の処置は、未だに治療が困難である。

40

【 0 0 0 9 】

したがって、有益な特性を有する新規の C D 1 2 3 特異的結合タンパク質が依然として必要とされている。そのような結合タンパク質は、 A M L などの癌を含む、疾患の治療及び特徴付けのための治療及び診断アプローチに有用であり得る。特に、癌細胞上の C D 1 2 3 を特異的に標的とするように機能することができ、かつ例え 1 つ以上の結合部分などの他の官能性部分（ functional moieties ）と容易に組み合わせることもまたできる、新しい C D 1 2 3 特異的結合タンパク質が必要とされている。

50

【発明の概要】

【0010】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、ここで、アンキリン反復ドメインは、ヒトCD123に対する結合特異性を有する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌など、例えは急性骨髄性白血病（AML）、の疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。

【0011】

本発明の組換え結合タンパク質は、腫瘍関連抗原（TAA）CD123に特異的に結合するか、又は腫瘍関連抗原（TAA）CD123を標的とする。本発明のそのような結合タンパク質は、新しい治療剤又は診断剤を生成するためのツール又は構成要素として役立ち得る。本明細書中には、CD123特異的アンキリン反復ドメインが1つの分子中の1つ以上の他の官能性部分と組み合わされる、組換え結合タンパク質もまた開示される。そのような他の官能性部分には、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する結合部分、半減期延長部分、別の腫瘍関連抗原に対する結合特異性を有する結合部分、及び/又は細胞傷害性剤が含まれる。したがって、CD123に対する結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質は、現在の治療様式と比較して改善された毒性プロファイル及び/又は治療濃度域を提供し得る、新規治療分子の生成に有用である。

【0012】

本明細書で提供される開示に基づいて、当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、又は日常的な実験のみを使用して確認することができる。そのような等価物は、以下の実施形態（E）によって包含されることが意図される。

1. 第1の実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、（1）配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに（2）配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける最大9個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。

2. 第2の実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

3. 第3の実施形態では、本発明は、当該アンキリン反復ドメインが、PBS中のヒトCD123に、約150nM未満の解離定数（KD）で、任意選択で約5pM～約150nMの範囲内で結合する、実施形態1及び2に記載の組換え結合タンパク質に関する。

4. 第4の実施形態では、本発明は、当該アンキリン反復ドメインが、約0.1nM～約100nMの範囲にわたるEC₅₀でヒトCD123に結合する、実施形態1～3のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

5. 第5の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する結合部分を更に含む、実施形態1～4のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

6. 第6の実施形態では、本発明は、当該免疫細胞がT細胞であり、免疫細胞上に発現される当該標的がCD3である、実施形態5に記載の組換え結合タンパク質に関する。

7. 第7の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、アンキリン反復ドメインである、実施形態5～6のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

10

20

30

40

50

8. 第 8 の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、実施形態 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

9. 第 9 の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインであり、ヒト C D 3 に対する結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 4 ~ 3 8 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

10. 第 10 の実施形態では、本発明は、ヒト C D 3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 4 ~ 3 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 9 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

11. 第 11 の実施形態では、本発明は、ヒト C D 1 2 3 に対する結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメイン、及び免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ペプチドリンカーと共有結合している、実施形態 5 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

12. 第 12 の実施形態では、本発明は、当該ペプチドリンカーが、プロリン - トレオニンに富むペプチドリンカーである、実施形態 1 1 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

13. 第 13 の実施形態では、本発明は、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1 ~ 5 0 個のアミノ酸の長さを有する、実施形態 1 1 又は 1 2 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

14. 第 14 の実施形態では、本発明は、当該結合タンパク質が、半減期延長部分を更に含む、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

15. 第 15 の実施形態では、本発明は、当該半減期延長部分が、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、実施形態 1 4 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

16. 第 16 の実施形態では、本発明は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態 1 5 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

17. 第 17 の実施形態では、本発明は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 1 5 及び 1 6 に記載の組換え結合タンパク質に関する。

18. 第 18 の実施形態では、本発明は、当該結合タンパク質が、腫瘍細胞において発現される標的に対して結合特異性を有する少なくとも 1 つの結合部分を更に含み、腫瘍細胞において発現される当該標的が、ヒト C D 1 2 3 とは異なる、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

19. 第 19 の実施形態では、本発明は、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質をコードする核酸に関する。

20. 第 20 の実施形態では、本発明は、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質又は実施形態 1 9 に記載の核酸、並びに薬学的に許容される担体及び / 又は希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

21. 第 21 の実施形態では、本発明は、ヒト患者の腫瘍組織における免疫細胞活性化の方法であって、実施形態 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、実施形態 1 9 に記載の核酸、又は実施形態 2 0 に記載の医薬組成物を、当該患者へ投与する工程を含む、方法に関する。

22. 第 22 の実施形態では、本発明は、当該免疫細胞が、T 細胞である、実施形態 2 1 に記載の方法に関する。

22a. 第 22a の実施形態では、本発明は、当該免疫細胞が、ナチュラルキラー (N K) 細胞である、実施形態 2 1 に記載の方法に関する。

10

20

30

40

50

23. 第23の実施形態では、本発明は、医学的状態を治療する方法であって、医学的状態を治療することを必要とする患者に、治療有効量の実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、実施形態19に記載の核酸、又は実施形態20に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、方法に関する。

24. 第24の実施形態では、本発明は、当該医学的状態が、癌である、実施形態23に記載の方法に関する。

25. 第25の実施形態では、本発明は、当該医学的状態が、液性腫瘍を特徴とする癌である、実施形態23に記載の方法に関する。

26. 第26の実施形態では、本発明は、当該医学的状態が、白血病である、実施形態23に記載の方法に関する。

27. 第27の実施形態では、本発明は、当該医学的状態が、急性骨髄性白血病である、実施形態23に記載の方法に関する。

28. 第28の実施形態では、本発明は、治療における使用のための、実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、実施形態19の核酸、又は実施形態20の医薬組成物に関する。

29. 第29の実施形態では、本発明は、癌の治療に使用するための、任意選択では液性腫瘍を特徴とする癌の治療に使用するための、実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、実施形態19に記載の核酸、又は実施形態20に記載の医薬組成物に関する。

30. 第30の実施形態では、本発明は、当該癌が、白血病であり、任意選択では当該癌が、急性骨髄性白血病である、実施形態29に記載の使用のための組換え結合タンパク質、又は核酸、又は医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】ヒトCD123に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。図1A. DARPin(登録商標)タンパク質#13のSPR分析;図1B. DARPin(登録商標)タンパク質#14のSPR分析。様々な濃度の精製されたアンキリン反復タンパク質を、オン速度及びオフ速度測定のために不動化したヒトCD123を有するGLCチップに適用した。得られたSPRトレース分析を使用して、アンキリン反復タンパク質のCD123に対する結合を分析し、決定した。RU、共鳴単位;s、時間(秒)。

【図1B】ヒトCD123に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。図1A. DARPin(登録商標)タンパク質#13のSPR分析;図1B. DARPin(登録商標)タンパク質#14のSPR分析。様々な濃度の精製されたアンキリン反復タンパク質を、オン速度及びオフ速度測定のために不動化したヒトCD123を有するGLCチップに適用した。得られたSPRトレース分析を使用して、アンキリン反復タンパク質のCD123に対する結合を分析し、決定した。RU、共鳴単位;s、時間(秒)。

【図2】CD123発現腫瘍細胞への本発明の例示的な結合タンパク質の結合。DARPin(登録商標)タンパク質#2、DARPin(登録商標)タンパク質#3、DARPin(登録商標)タンパク質#9、DARPin(登録商標)タンパク質#12、DARPin(登録商標)タンパク質#13、及びDARPin(登録商標)タンパク質#14の濃度依存的結合曲線を示す。

【図3】活性化マーカーCD25を測定することによって決定される短期T細胞活性化である。汎Tエフェクター細胞及びM01m-13標的細胞を、5:1のE:T比でインキュベートし、T細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での24時間の共培養後に、FACSによって評価した。活性化したT細胞を、生存CD8+/CD25+細胞としてゲーティングした。選択されたアンキリン反復タンパク質であるDARPin(登録商標)タンパク質#18、DARPin(登録商標)タンパク質#19、DARPin(登録商標)タンパク質#15、DARPin(登録商標)タンパク質#16、及びDAR

10

20

30

40

50

P i n (登録商標) タンパク質 # 1 7 によって誘導された、T 細胞活性化を示す。

【図 4】LDH 放出を測定する細胞傷害性アッセイによって評価した腫瘍細胞殺傷。汎 T エフェクター細胞及び M o l m - 1 3 標的細胞を、5 : 1 の E : T 比でインキュベートし、腫瘍細胞殺傷を、示された分子の段階希釈物の存在下での 2 4 時間の共培養後に、F A C S によって評価した。選択されたアンキリン反復タンパク質である D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 8 、 D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 9 、 D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 5 、 D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 6 、及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 7 によって引き起こされる、T 細胞による腫瘍細胞殺傷を示す。

【図 5 A】H T R F による、(図 5 A) 全長 C D 1 2 3 標的 (N T D / D 2 / D 3 ドメイン) 及び (図 5 B) 短縮型 C D 1 2 3 標的 (D 2 / D 3 ドメイン) に結合する C D 1 2 3 特異的アンキリン反復タンパク質の評価。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 を、全長 (粗抽出物を用いる)、及び短縮型 C D 1 2 3 (D 2 / D 3 ドメイン、精製タンパク質を用いる) に対する結合について試験した。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 0 (非結合 D A R P i n 分子) 及び P B S を対照として含めた。

【図 5 B】H T R F による、(図 5 A) 全長 C D 1 2 3 標的 (N T D / D 2 / D 3 ドメイン) 及び (図 5 B) 短縮型 C D 1 2 3 標的 (D 2 / D 3 ドメイン) に結合する C D 1 2 3 特異的アンキリン反復タンパク質の評価。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 を、全長 (粗抽出物を用いる)、及び短縮型 C D 1 2 3 (D 2 / D 3 ドメイン、精製タンパク質を用いる) に対する結合について試験した。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 0 (非結合 D A R P i n 分子) 及び P B S を対照として含めた。

【図 6 A】E L I S A による C D 1 2 3 結合 D A R P i n 、フロテツズアムブ (Flotetu zuamb) 、及びリガンドの結合競合アッセイ。ビオチン化ヒト C D 1 2 3 標的を、競合物質 (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 、フロテツズマブ、及び I L 3) の有無にかかわらずプレインキュベートした後、抗ストレプトアビジン - P O D 検出剤を用いて、不動化 D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 (図 6 A) 又はフロテツズマブ (図 6 B) に対して結合を試験した。全ての試験分子について部分競合が観察された (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 、フロテツズマブ、及び I L 3)。

【図 6 B】E L I S A による C D 1 2 3 結合 D A R P i n 、フロテツズアムブ (Flotetu zuamb) 、及びリガンドの結合競合アッセイ。ビオチン化ヒト C D 1 2 3 標的を、競合物質 (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 、フロテツズマブ、及び I L 3) の有無にかかわらずプレインキュベートした後、抗ストレプトアビジン - P O D 検出剤を用いて、不動化 D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 (図 6 A) 又はフロテツズマブ (図 6 B) に対して結合を試験した。全ての試験分子について部分競合が観察された (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 、フロテツズマブ、及び I L 3)。

【図 7 A】図 7 A : h P B M C を腹腔内注射し、h P B M C 注射の 2 日後に M O L M - 1 3 腫瘍細胞を皮下異種移植し、かつ、P B S 1 × (黒丸) 又は 0 . 5 m g / k g のマルチドメインフォーマットでの D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 3 (黒四角) で処理した、マウス (ドナー当たり n = 5 マウス / 使用した 2 匹の h P B M C ドナー) における経時的な腫瘍増殖。腫瘍細胞異種移植の 4 日後に処置を開始した。データを平均 + S E M で表示する。図 7 B : 図 7 A に記載されるマウスにおける腫瘍細胞異種移植の 1 7 日後の腫瘍体積の評価。

【図 7 B】図 7 A : h P B M C を腹腔内注射し、h P B M C 注射の 2 日後に M O L M - 1 3 腫瘍細胞を皮下異種移植し、かつ、P B S 1 × (黒丸) 又は 0 . 5 m g / k g のマルチドメインフォーマットでの D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 3 (黒四角) で処理した、マウス (ドナー当たり n = 5 マウス / 使用した 2 匹の h P B M C ドナー) における経時的な腫瘍増殖。腫瘍細胞異種移植の 4 日後に処置を開始した。データを平均 + S E M で表示する。図 7 B : 図 7 A に記載されるマウスにおける腫瘍細胞異種移植の 1 7 日後の腫瘍体積の評価。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0014】

本明細書では、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質が開示され、ここで、当該アンキリン反復ドメインは、ヒトCD123に対する結合特異性を有する。組換え結合タンパク質をコードする核酸、結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及び結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物を用いる方法もまた開示される。

【0015】

アンキリン反復ドメイン

設計アンキリン反復モチーフ又はモジュールを含む、記載された組換え結合タンパク質又はその結合ドメインはまた、本明細書では、DARPin(登録商標)タンパク質とも称される(Stumppら、「Curr Opin Drug Discov Dev」第10巻(第2号):第153~9頁(2007年);及び、Binzら、「Nature Biotech.」第22巻(第5号):第575~582頁(2004年))。DARPin(登録商標)タンパク質は、標的タンパク質に対して高い特異性及び高い結合親和性を有する抗体模倣体とみなすことができる。一般に、DARPin(登録商標)タンパク質は、少なくとも1つのアンキリン反復ドメインを含み、かつ2、3、4、5、又はそれ以上のアンキリン反復ドメインを含んでもよい。

【0016】

本明細書に記載のアンキリン反復ドメインは、一般に、構造を提供するコア足場、及び標的に結合する標的結合残基を含む。構造コアは、保存されたアミノ酸残基を含み、標的結合表面は、標的に応じて異なるアミノ酸残基を含む。

【0017】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー(国際公開第2002/020565号、Binzら、「Nat. Biotechnol.」、第22巻第575~582頁、2004年;Stumppら、「Drug Discov. Today」、第13巻、第695~701頁(2008年))は、高い親和性でそれらの標的に結合する標的特異性設計アンキリン反復ドメインの選択に使用することができる。次に、そのような標的特異的設計アンキリン反復ドメインを、疾患を治療するための組換え結合タンパク質の価値ある成分として使用することができる。設計アンキリン反復タンパク質は、モノクローナル抗体の限界を克服する可能性を有する結合分子のクラスであり、したがって新規な治療的アプローチを可能にする。そのようなアンキリン反復タンパク質は、単一の設計アンキリン反復ドメインを含んでもよく、又は同じ若しくは異なる標的特異性を有する2つ以上の設計アンキリン反復ドメインの組み合わせを含んでもよい(Stumppら、「Drug Discov. Today」、第13巻、695~701、2008年;米国特許第9,458,211号)。単一の設計アンキリン反復ドメインのみを含むアンキリン反復タンパク質は、高い親和性及び特異性で所与の標的タンパク質に結合するように選択され得る小タンパク質(14kDa)である。これらの特徴、及び1つのタンパク質中の2つ以上の設計アンキリン反復ドメインを組み合わせる可能性は、設計アンキリン反復タンパク質を、理想的なアゴニスト、拮抗薬及び/又は阻害薬候補にする。更に、そのようなアンキリン反復タンパク質は、様々なエフェクター機能、例えば細胞傷害性剤又は半減期延長剤を担持し、完全に新しい薬物フォーマットを可能にするように操作することができる。

【0018】

設計アンキリン反復タンパク質はまた、モノクローナル抗体では容易にアクセスできないエピトープを標的とし得る。記載された設計アンキリン反復タンパク質の更なる利点は、それらが一般に低い免疫原性能を有し、オフターゲット効果がないか又はわずかである点である。DARPin(登録商標)候補はまた、迅速、低成本、及び高収率の製造、並びに4で最長数年までの貯蔵寿命を含む、好ましい開発特性を示す。総合すると、設計アンキリン反復タンパク質は、既存の抗体薬物を超える可能性を有する次世代のタンパク質治療薬の一例である。

【0019】

DARPin(登録商標)は、Molecular Partners AG, Swi

10

20

30

40

50

t z e r l a n d 所有の商標である。

【0020】

上記のように、CD123は、特定の癌の治療、特にAMLの治療のための魅力的な治療標的である。本明細書中に記載される組換え結合タンパク質は、ヒトCD123に特異的に結合するアンキリン反復ドメイン及びアンキリン反復モジュールを含む。

【0021】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、(1)配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに(2)配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける最大9個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。 10

【0022】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、(1)配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに(2)配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換される配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。 20

【0023】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号12～30及び配列番号58～59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0024】

別の実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。 30

【0025】

更なる実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。 40

【0026】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。 50

97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【 0 0 2 7 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号2と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号3と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号4と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

88

[0 0 5 0]

実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号5と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【 0 0 3 1 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号6と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該

50

アンキリン反復ドメインが、配列番号 7 と、少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号8と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

(0 0 3 4)

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号9と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

(0 0 3 5)

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号55と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

[0 0 3 6]

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号56と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

〔 0 0 3 7 〕

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号57と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列

同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0038】

更なる実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0039】

更なる態様では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含む、上記の組換え結合タンパク質に関する。一実施形態では、当該免疫細胞は、T細胞である。別の実施形態では、当該免疫細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞である。本発明における使用のための免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する結合部分の例としては、抗体、代替足場、及びポリペプチドが挙げられる。

10

【0040】

抗体は、抗体又は免疫グロブリン分子に由来する抗原結合ドメインを含む任意のポリペプチド又はタンパク質を含む。抗原結合ドメインは、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及び單一ドメイン抗体、例えば、重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)、及び例えば、ヒト又はラクダ科動物起源の可変ドメイン(VHH)に由来し得る。いくつかの例では、抗原結合ドメインが、結合部分が最終的に使用されるのと同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトにおける使用のために、本明細書に記載の結合部分の抗原結合ドメインが、ヒト又はヒト化抗原結合ドメインを含むことは有益であり得る。抗体は、当該技術分野で周知の技術を用いて得ることができる。

20

【0041】

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、抗体である。

【0042】

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、ラクダ科ナノボディーである。ラクダ科ナノボディー(ラクダ科単一ドメイン抗体又はVHHとしても知られる)は、ラマ、ラクダ、及びアルパカなどの哺乳動物のラクダ科に由来する。他の抗体とは異なり、ラクダ科抗体は軽鎖を欠き、2つの同一の重鎖から構成される。ラクダ科抗体は、典型的には、約15kDaの領域の比較的低い分子量を有する。

30

【0043】

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、サメ抗体ドメインである。ラクダ科ナノボディーと同様に、サメ抗体ドメインも軽鎖を欠いている。

【0044】

抗原(薬物分子など)に結合することができ、抗体又は免疫グロブリン分子に由来しない結合ドメインを含む任意のポリペプチド又はタンパク質を、代替足場は含む。代替足場の結合ドメインは、様々な異なるポリペプチド又はタンパク質構造を含んでもよく、又はそれに由来してもよい。代替足場としては、アドネクチン(モノボディー)、アフィボディー、アフィリン、アフィマー及びアプタマー、アフィチン、アルファボディー、アンチカリン、アルマジロ反復タンパク質ベースの足場、アトリマー、アビマー、アンキリン反復タンパク質ベースの足場(例えば、DARPin(登録商標)タンパク質)、フィノマー、ノッチン、及びクニッツドメインペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。代替足場は、例えば、Yuら、「Ann Rev Anal Chem」(Pal Alto Calif.)。2017年6月12日;第10巻(第1号):第293-320頁、doi:10.1146/annurevanchem-061516-045205に記載されている。

40

【0045】

50

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、代替足場である。一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、アドネクチン、モノボディー、アフィボディー、アフィリン、アフィマー、アプタマー、アフィチン、アルファボディー、アンチカリン、反復タンパク質ドメイン、アルマジロ反復ドメイン、アトリマー、アビマー、アンキリン反復ドメイン、フィノマー、ノッチン、クニッツドメイン、又はT細胞受容体（TCR）に由来するか又はこれらに関連する抗原結合ドメインを含む。

【0046】

アドネクチンは、元々はヒトフィブロネクチンII型タンパク質（10Fn3）の10番目の細胞外ドメインに由来する。フィブロネクチンII型ドメインは、7又は8個の鎖を有し、これらは2つのシートの間に分布しており、シート自体が互いにパッキングしてタンパク質のコアを形成し、更にループ（CDRに類似）を含み、ループはペータ鎖を互いに接続し、溶媒が露出している。シートサンドイッチの各縁部には少なくとも3つのそのようなループが存在し、縁部は、鎖の方向に垂直なタンパク質の境界である（米国特許第6,818,418号を参照されたい）。この構造のために、この非抗体足場は、抗体の抗原結合特性の性質及び親和性に類似した抗原結合特性を模倣する。これらの足場は、インビボでの抗体の親和性成熟のプロセスに類似するインビトロでのループ無作為化及びシャッフリング手法において使用することができる。

【0047】

アフィボディー親和性リガンドは、細菌黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来の表面タンパク質であるプロテインAのIgG結合ドメインのうちの1つの足場に基づく3ヘリックスバンドルから構成される。この足場ドメインは58個のアミノ酸からなり、そのうちの13個を無作為化して、多数のリガンドバリエントを有するアフィボディーライブラリーを作製する（例えば、米国特許第5,831,012号を参照されたい）。アフィボディー分子は抗体を模倣しているが、抗体の場合の約150kDaと比較して、約6kDaの分子量を有し、かなり小さくなっている。サイズの違いにもかかわらず、アフィボディー分子の結合部位は抗体の結合部位と類似性を有する。

【0048】

アフィリンは、構造的にヒトユビキチンに由来する（歴史的には-Bクリスタリンにも由来する）合成抗体模倣物である。アフィリンは、主にシート構造及び約20kDaの総分子量を有する2つの同一のドメインからなる。アフィリンは、修飾に好適ないくつかの表面露出したアミノ酸を含有する。アフィリンは、抗原に対する親和性及び特異性において抗体に似ているが、構造においては似ていない。

【0049】

アフィマーは、ペプチドアプタマーの一種であり、SQT（Steefin A quadrupple mutant - Tracy）（ステフィンA四重変異体 - トレイシー）として知られる構造を有する。アプタマー及びアフィマーは、結合ペプチドのN末端及びC末端両方が不活性な足場に埋め込まれた、構造上の制約のために不活性で剛性のあるタンパク質足場と親和的に結合する原因となる短いペプチドである。

【0050】

アフィチンは、特異的結合親和性を得るために操作されたDNA結合タンパク質Sac7dのバリエントである。Sac7dは、元々は超好熱菌古細菌*Sulfolobus acidocaldarius*に由来し、DNAと結合してその熱変性を防止する。アフィチンは、商業的にはNanofitinとして知られている。

【0051】

アルファボディーは、様々な抗原に結合するように操作された小さな（約10kDa）タンパク質であり、したがって抗体模倣物である。アルファボディー足場は、コイルドコイル構造に基づいてコンピュータで設計される。標準的なアルファボディー足場は、高グリシン/セリンリンカーを介して連結された、各々4つのヘプタッド反復（7残基のストレッチ）から構成される3つのヘリックスを含有する。標準的なヘプタッド配列は、「

10

20

30

40

50

I A A I Q K Q」である。細胞外及び細胞内タンパク質を標的とするアルファボディーの能力は、それらの高い結合親和性と組み合わせて、抗体では到達することができない標的にそれらが結合することを可能にし得る。

【0052】

アンチカリンは、リポカリンに見出される強固で保存的なバレル構造を有する結合タンパク質の群である。リポカリンは、シグナル伝達分子などの様々な生物学的分子の認識、貯蔵、及び輸送を担う1つのペプチド鎖(150～190アミノ酸)を含む細胞外タンパク質の一種である。

【0053】

アルマジロ反復タンパク質ベースの足場は、真核生物において豊富であり、広範な生物学的プロセス、特に核輸送に関連するプロセスに関与する。アルマジロ反復タンパク質ベースの足場は、通常、3～5個の内部反復及び2個のキャッピングエレメントからなる。それらはまた、タンデム伸長スーパーへリックス構造を有し、これは、延長された立体構造で対応するペプチドリガンドと結合することが可能である。

【0054】

アトリマーは、テトラネクチンとして知られるトリマー血漿タンパク質に由来する足場であり、3つの同一の単位からなるC型レクチンのファミリーに属する。テトラネクチン内のC型レクチンドメイン(C T L D)の構造は、標的化分子との相互作用を媒介する5つの柔軟なループを有する。

【0055】

アビマーは、H E R 3などの天然のAドメイン含有タンパク質に由来し、アミノ酸リンカーを介して連結された多数の異なる「Aドメイン」モノマー(2～10)からなる。例えば、米国特許出願公開第2004/0175756号、同第2005/0053973号、同第2005/0048512号、及び同第2006/0008844号に記載される方法論を使用して、標的抗原に結合することができるアビマーを作製することができる。

【0056】

フィノマーは、ヒトFynチロシンキナーゼのSrc相同ドメイン3(S H 3)のアミノ酸83～145から進化した小さな球状タンパク質(約7 kDa)である。フィノマーは、その高い熱安定性、システインを含まない足場、及びヒト起源により、潜在的な免疫原性を低減する、魅力的な結合分子である。

【0057】

システインノットミニタンパク質としても知られているノッチンは、典型的には、3つの逆平行シートと、システインノットを作り出すジスルフィド結合によって縛られた拘束ループとを含む30アミノ酸長のタンパク質である。このジスルフィド結合が高い熱安定性を与え、ノッチンを魅力的な抗体模倣物にしている。

【0058】

クニッツドメインペプチド又はクニッツドメイン阻害剤は、構造フレームワークを不安定化することなく変異され得る3つのジスルフィド結合及び3つのループを有する約60個のアミノ酸を含む不規則な二次構造を有するプロテアーゼ阻害剤の一種である。

【0059】

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、T細胞受容体(T C R)に由来する抗原結合ドメインを含むポリペプチド又はタンパク質である。

【0060】

好みの実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、アンキリン反復ドメインである。

【0061】

当該免疫細胞上に発現される標的の性質には、特に制限はない。一実施形態では、標的は、T細胞である免疫細胞上に発現され、当該免疫細胞上に発現される標的は、C D 3で

10

20

30

40

50

ある。

【 0 0 6 2 】

したがって、好ましい実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1)配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに(2)配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、CD3、より好ましくはヒトCD3に対する結合特異性を有する、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。 10

【 0 0 6 3 】

別の実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1)配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに(2)配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。 20

【 0 0 6 4 】

更なる実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号12～30及び配列番号58～59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。 30

【 0 0 6 5 】

別の実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1)配列番号12～30及び配列番号58～59、並びに(2)配列番号12～30及び配列番号58～59のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個ま 40

で、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(i i)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0066】

別の実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号12～30及び配列番号58～59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(i i)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0067】

好みの実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(i i)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、CD3、より好みのヒトCD3に対する結合特異性を有する、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0068】

別の実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(i i)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つと、少なくとも約85%の配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0069】

一実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(i i)第2のアンキリン反復ドメ

10

20

30

40

40

50

インであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つと、少なくとも約85%の配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0070】

一実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0071】

更なる実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～9及び配列番号55～57のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号34～38のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0072】

本発明は、更に、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対して結合特異性を有する、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該組換え結合タンパク質が、配列番号10、11、及び60～64のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0073】

一実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD123に対する結合特異性を有する、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該組換え結合タンパク質が、配列番号10～11及び配列番号60～64のいずれか1つと少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

20

30

40

50

【0074】

半減期延長部分

「半減期延長部分」は、半減期延長部分を有しない同じタンパク質と比較して、本明細書に記載の組換え結合タンパク質のインビポでの血清半減期を延長する。半減期延長部分の例としては、ポリヒスチジン、G1u-G1u、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリンDメイン、マルトース結合タンパク質(MBP)、ヒト血清アルブミン(HSA)結合ドメイン、又はポリエチレングリコール(PEG)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組換え結合タンパク質は、本明細書では「血清アルブミン結合ドメイン」ともまた呼ばれる、血清アルブミン(好ましくは、ヒト血清アルブミンなど)に特異的に結合するアンキリン反復ドメインを含む。本明細書に記載の組換え結合タンパク質はまた、2つ以上の血清アルブミン結合ドメイン、例えば、2つ又は3つの血清アルブミン結合ドメインを含んでもよい。したがって、本明細書に記載の組換え結合タンパク質は、第1及び第2の血清アルブミン結合ドメイン、又は第1、第2、及び第3の血清アルブミン結合ドメインを含んでもよい。以下に提供される実施形態は、そのような第1の血清アルブミン結合ドメイン、第2の血清アルブミン結合ドメイン、及び/又は第3の血清アルブミン結合ドメインを記載する。

【0076】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号31～33のいずれか1つと、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む、血清アルブミン特異性アンキリン反復ドメインを含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号31～33のいずれか1つと少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号32と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号32と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、血清アルブミン結合ドメインは、本発明の組換え結合タンパク質のN末端に位置する。いくつかの実施形態では、2つ以上の血清アルブミン結合ドメインが好ましい。いくつかの実施形態では、2つの血清アルブミン結合ドメインは、本発明の組換え結合タンパク質のN末端に位置する。

【0078】

いくつかの実施形態では、半減期延長部分は、免疫グロブリンDメインを含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンDメインは、Fcドメインを含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、既知の重鎖アイソタイプであるIgG(γ)、IgM(μ)、IgD(δ)、IgE(ε)、又はIgA(α)のいずれか1つに由来する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、既知の重鎖アイソタイプ又はサブタイプであるIgG₁(γ1)、IgG₂(γ2)、IgG₃(γ3)、IgG₄(γ4)、IgA₁(α1)、IgA₂(α2)のいずれか1つに由来する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG₁のFcドメインである。

【0079】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、Fcドメインは、Fcドメインの中斷されていない天然配列（すなわち、野生型配列）を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンFcドメインは、変化した生物学的活性をもたらす変異体Fcドメインを含む。例えば、少なくとも1つの点変異又は欠失は、エフェクター活性を低減又は排除するために（例えば、国際特許公開第WO2005/063815号）、及び/又は組換え結合タンパク質の生産中に均質性を増加させるために、Fcドメインに導入されてもよい。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1のFcドメインであり、以下のエフェクターヌル置換であるL234A、L235A、及びG237A（Eu番号付け）の1つ又は複数を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1のC末端位置（すなわち、Eu番号付けによるK447）に位置するリジンを含まない。リジンを含まないことは、組換え結合タンパク質の生産中に均質性を増加させ得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、C末端位置（K447、Eu番号付け）に位置するリジンを含む。

【0080】

腫瘍関連抗原に対する結合特異性を有する更なる結合部分

更なる態様では、本発明は、CD123とは異なる腫瘍関連抗原（TAA）に対する結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含む、上記の組換え結合タンパク質に関する。一実施形態では、CD123とは異なる当該1つ以上のTAAは、同じ癌に由来する細胞においてCD123と同時発現されるTAAである。更なる実施形態では、CD123とは異なる当該1つ以上のTAAは、液性腫瘍を特徴とする癌において、CD123と同時発現するTAAである。好ましい実施形態では、CD123とは異なる当該1つ以上のTAAは、白血病においてCD123と同時発現されるTAA、例えば、AML癌細胞によってCD123と同時発現されるTAAなどである。本発明における使用のための、CD123とは異なる腫瘍関連抗原（TAA）に対する結合特異性を有する結合部分の例としては、抗体、代替足場、及びポリペプチドが挙げられる。AML癌細胞で発現されるTAAを含む、多くのTAAが当技術分野で公知である。

【0081】

置換

いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対する本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復モジュールにおいて、9個以上はなく（no more 9）、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、又は1個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対して、5個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対して、4個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対して、3個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対して、2個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号12～30及び配列番号58～59の配列に対して、1個以下の置換が行われる。

【0082】

いくつかの実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列の15%以下（no more 15%）、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下、10%以下、9%以下、8%以下、又は7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、又は1%以下が、配列番号1～9及び配列番号55～57の配列に対する置換によって改変されている。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の10%以下（no more 10%）が、配列番号1～9及び配列番号55～57の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の8%以下（no more 8%）が、配列番号1～9及び配列番号55～57の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の6%以下（no more 6%）が、配列番号1～9及び配列番号55～57の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の4%以下（no more 4%）が、配列番号1～9及

10

20

30

40

50

び配列番号 55～57 の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の 2% 以下 (no more 2%) が、配列番号 1～9 及び配列番号 55～57 の配列に対する置換によって改変される。

【0083】

いくつかの態様では、結合剤に対して行われるアミノ酸置換 (複数可) は、非置換結合剤の K_D 値と比較して、 K_D 値を約 1000 倍超、約 100 倍超、又は約 10 倍超変化させない。例えば、いくつかの態様では、アミノ酸置換 (複数可) は、配列番号 1～9、配列番号 12～30、配列番号 55～59 の配列のいずれかを含む結合剤の CD123 に対する K_D 値と比較して、 K_D 値を約 1000 倍超、約 300 倍超、約 100 倍超、約 50 倍超、約 25 倍超、約 10 倍超、又は約 5 倍超変化させない。

10

【0084】

特定の実施形態では、置換は、表 1 による保存的置換である。特定の実施形態では、置換は、アンキリン反復ドメインの構造的コア残基の外側、例えば、アルファヘリックスを接続するペータループ内で行われる。

【0085】

【表 1】

表 1 : アミノ酸置換

元の残基	保存的置換	例示的な置換
Ala(A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg(R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn(N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp(D)	Glu	Glu; Asn
Cys(C)	Ser	Ser; Ala
Gln(Q)	Asn	Asn; Glu
Glu(E)	Asp	Asp; Gln
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile(I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu(L)	Ile	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys(K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met(M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe(F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val(V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

20

30

40

【0086】

特定の実施形態では、置換は、アンキリン反復ドメインの構造的コア残基内で行われる。他の実施形態では、置換は、アンキリン反復ドメインの構造的コア残基の外側で行われる。例示としては、アンキリンドメインは、コンセンサス配列 : $x D x x G x T P L H L A x x x G x x V L L x x G A D V N A$ (配列番号 40) を含んでもよく、式中、「 x 」は、任意のアミノ酸 (好ましくはシスティン、グリシン、又はプロリンではない) を表し、又は $x D x x G x T P L H L A A x x G H L E I V E V L L K z G A D V N A$ (配列番号 41) を含んでもよく、式中、「 x 」は、任意のアミノ酸 (好ましくはシスティン、グリシン、若しくはプロリンではない) を表し、「 z 」は、アスパラギン、ヒスチジン、又はチロシンからなる群から選択される。一実施形態では、置換は、「 x 」として指定される残基に対して行われる。別の実施形態では、置換は、「 x 」として指定されない残基に対して行われる。

【0087】

くわえて、本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復ドメインの最後から

50

2番目の位置は、「A」若しくは「L」であり得、かつ/又は最後の位置は、「A」若しくは「N」であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～9、配列番号31～38、及び配列番号55～57のうちのいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、任意選択的には、最後から2番目の位置のAはLで置換され、かつ/若しくは最後の位置のAはNで置換されており、又は任意選択的には、最後から2番目の位置のLはAで置換されており、かつ/若しくは最後の位置のNはAで置換されている。例示的な実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～9、配列番号31～37、及び配列番号55～57のいずれか1つと少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択的には、最後から2番目の位置のAはLで置換されており、かつ/又は最後の位置のAはNで置換されている。更に、本発明の結合タンパク質に含まれる任意のアンキリン反復ドメインの配列は、任意選択で、そのN末端に、G、S、又はGSを含んでもよい(以下を参照されたい)。

【 0 0 8 8 】

くわえて、本発明の組換え結合タンパク質に含まれる各アンキリン反復ドメインは、任意選択で、そのN末端に「G」、「S」、又は「GS」配列を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～9、配列番号31～38、及び配列番号55～57のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み、更に、そのN末端にGS（例えば、配列番号42におけるように）を含むか、又はGSの代わりにG若しくはSのみを含む。

〔 0 0 8 9 〕

結合親和性

特定の実施形態では、組換え結合タンパク質とその標的（すなわち、ヒトCD123）との間の親和性は、KDに関して記載されている。例示的な実施形態では、KDは、約10⁻¹M以下、約10⁻²M以下、約10⁻³M以下、約10⁻⁴M以下、約10⁻⁵M以下、約10⁻⁶M以下、約10⁻⁷M以下、約10⁻⁸M以下、約10⁻⁹M以下、約10⁻¹⁰M以下、約10⁻¹¹M以下、約10⁻¹²M以下、約10⁻¹³M以下、約10⁻¹⁴M以下、約10⁻¹⁵M以下、約10⁻¹⁶M～約10⁻¹⁵M、約10⁻⁷M～約10⁻¹⁵M、約10⁻⁸M～約10⁻¹⁵M、約10⁻⁹M～約10⁻¹⁵M、約10⁻¹⁰M～約10⁻¹⁵M、約10⁻⁵M～約10⁻¹⁴M、約10⁻⁶M～約10⁻¹⁴M、約10⁻⁷M～約10⁻¹⁴M、約10⁻⁸M～約10⁻¹⁴M、約10⁻⁹M～約10⁻¹⁴M、約10⁻¹⁰M～約10⁻¹⁴M、約10⁻⁵M～約10⁻¹M、約10⁻⁶M～約10⁻¹³M、約10⁻⁷M～約10⁻¹³M、約10⁻⁸M～約10⁻¹³M、約10⁻⁹M～約10⁻¹³M、約10⁻¹⁰M～約10⁻¹³M、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M、約10⁻⁶M～約10⁻¹²M、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、約10⁻⁸M～約10⁻¹²M、約10⁻⁹M～約10⁻¹²M、約10⁻¹⁰M～約10⁻¹²M、約10⁻⁵M～約10⁻¹¹M、約10⁻⁶M～約10⁻¹¹M、約10⁻⁷M～約10⁻¹¹M、約10⁻⁸M～約10⁻¹¹M、約10⁻⁹M～約10⁻¹¹M、約10⁻¹⁰M～約10⁻¹¹M、約10⁻⁷M～約10⁻¹⁰M、約10⁻⁸M～約10⁻¹⁰M、約10⁻⁹M～約10⁻¹⁰M、約10⁻⁵M～約10⁻⁹M、約10⁻⁶M～約10⁻⁹M、約10⁻⁷M～約10⁻⁹M、約10⁻⁸M～約10⁻⁹M、又は約10⁻⁸M～約10⁻⁹Mである。

【 0 0 9 0 】

例示的な実施形態では、組換え結合タンパク質は、約 150 nM、約 100 nM、約 5

0 nM、約40nM、約30nM、約20nM、約10nM、約5nM、約2nM、約1nM、約900pM、約800pM、約700pM、約600pM、約500pM、約400pM、約300pM、約200pM、約100pM、約10pM、又は約1pM以下のKD値で、ヒトCD123に結合する。例示的な実施形態では、組換え結合タンパク質は、100nM以下のKD値でCD123に結合する。例示的な実施形態では、組換え結合タンパク質は、10nM以下のKD値でCD123に結合する。

【0091】

一態様では、組換え結合タンパク質は、約1000、約900、約700、約500、約400、約300、約200、約150、約100、約70、約60、約50、約40、約30、約20、約15、約10、約7、約5、約3、約1、約0.5、又は約0.1nM未満のEC₅₀でヒトCD123に結合する。したがって、一態様では、当該結合タンパク質は、約1μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約900nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約800nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約600nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約700nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約500nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約400nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約300nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約200nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約100nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約70nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約60nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約50nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約40nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約30nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約20nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約15nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約10nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約7nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約5nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約3nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約1nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。更なる態様では、当該結合タンパク質は、約0.5nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。又は、当該結合タンパク質は、約0.1nM未満のEC₅₀でCD123に結合する。

【0092】

追加的ポリペプチド

一態様では、本発明の組換え結合タンパク質は、ポリペプチドタグを更に含む。ポリペプチドタグは、ポリペプチド/タンパク質に結合されたアミノ酸配列であり、ここで、当該アミノ酸配列は、当該ポリペプチド/タンパク質の精製、検出、若しくは標的化に有用であり、又は、当該アミノ酸配列は、ポリペプチド/タンパク質の物理化学的挙動を改善し、又は、当該アミノ酸配列はエフェクター機能を有する。組換え結合タンパク質の個々のポリペプチドタグは、組換え結合タンパク質の他の部位に、直接又はペプチドリンカーを介して接続してもよい。ポリペプチドタグは当技術分野で周知であり、当業者には十分に利用可能である。ポリペプチドタグの例は、小ポリペプチド配列、例えば、Hisタグ、HAタグ、mycタグ、FLAGタグ、若しくはStrepタグ、又は酵素（例えばア

10

20

30

40

50

ルカリホスファターゼ)等のポリペプチドであり、これらにより、当該ポリペプチドノタンパク質、又は標的化に使用できるポリペプチド(免疫グロブリン又はそれらのフラグメント等)及び/若しくはエフェクター分子として使用できるポリペプチドの検出が可能となる。

【0093】

一態様では、本発明の組換え結合タンパク質は、ペプチドリンカーを更に含む。ペプチドリンカーは、例えば、2つのタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグとタンパク質ドメイン、タンパク質ドメインと非タンパク質化合物若しくはポリエチレングリコールなどのポリマー、又はタンパク質ドメインと生物学的活性分子、タンパク質ドメインとローカライザ、又は2つの配列タグを、結合させることができるアミノ酸配列である。ペプチドリンカーは、当業者に既知である。例の一覧は、特許出願公開第WO2002/020565号の明細書に提供されている。一態様では、本発明において使用するためのペプチドリンカーは、1~50アミノ酸の長さを有する。別の態様では、本発明において使用するためのペプチドリンカーは、約5~約40アミノ酸の長さを有する。別の態様では、本発明において使用するためのペプチドリンカーは、約10~約30アミノ酸の長さを有する。

【0094】

ペプチドリンカーの具体例は、グリシン-セリン-リンカー及び可変長のプロリン-トレオニンに富むリンカーである。本発明の文脈において、プロリン-トレオニンに富むリンカーは、そのアミノ酸配列中に少なくとも約20%のプロリン残基及び少なくとも約20%のトレオニン残基を含む。グリシン-セリン-リンカーの例は、アミノ酸配列GS及び配列番号45のアミノ酸配列であり、プロリン-トレオニンに富むリンカーの例は、配列番号43及び44のアミノ酸配列である。

【0095】

N末端及びC末端キャッピング配列

本明細書に開示される組換え結合タンパク質のアンキリン反復ドメインは、N末端又はC末端キャッピング配列を含んでもよい。キャッピング配列は、アンキリン反復配列モチーフ(複数可)のN末端又はC末端に融合された追加のポリペプチド配列を指し、ここで、当該キャッピング配列は、アンキリン反復配列モチーフ(複数可)との厳密な三次相互作用(すなわち、三次構造相互作用)を形成し、それによって、側面のアンキリン反復ドメインの疎水性コアを、溶媒に曝露することから遮蔽するキャップを提供する。

【0096】

N末端及び/又はC末端のキャッピング配列は、キャッピング単位、又は反復単位に隣接する天然に存在する反復タンパク質中に見出される他の構造単位に由来してもよい。キャッピング配列の例は、国際公開第2002/020565号及び同第2012/069655号、米国特許出願公開第2013/0296221号、並びにIntelandら、「J Mol Biol.」、2008年1月18日；第375巻(第3号)：第837~54頁に記載されている。N末端アンキリンキャッピングモジュール(すなわち、N末端キャッピング反復)の例としては、配列番号47~50が挙げられ、アンキリンC末端キャッピングモジュール(すなわち、C末端キャッピング反復)の例としては、配列番号51~54が挙げられる。

【0097】

核酸及び方法

別の態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一態様では、本発明は、本発明の組換えタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸に関する。更に、本発明は、本発明のいずれかの核酸を含むベクターに関する。核酸は、当業者に周知である。実施例において、核酸は、本発明の設計アンキリン反復ドメイン又は組換え結合タンパク質を、大腸菌で生産するために使用した。

【0098】

組成物、使用及び治療方法

一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質及び/若しくは設計アンキリン

10

20

30

40

50

反復ドメイン、及び／又は本発明の組換え結合タンパク質及び／若しくは設計アンキリン反復ドメインをコードする核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【0099】

一態様では、本発明は、組換え結合タンパク質、又は本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【0100】

薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤は当業者に既知であり、下記でより詳細に説明する。

10

【0101】

医薬組成物は、本明細書に記載のような組換え結合タンパク質、及び／又は設計アンキリン反復ドメイン、及び／又は核酸、好ましくは、組換え結合タンパク質及び／又は核酸、並びに例えば「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第16版、Osol, A. 編(1980年)に記載のような、薬学的に許容される担体、賦形剤、若しくは安定剤を含む。

20

【0102】

当業者に既知の、好適な担体、希釈剤、賦形剤又は安定剤としては、例えば、生理食塩水、リングル液、デキストロース溶液、ハンクス液、固定油、オレイン酸エチル、5%デキストロース生理食塩水、等張性及び化学的安定性を高める物質、緩衝液並びに保存剤が挙げられる。他の好適な担体としては、それ自体が、組成物を投与される個体にとって有害な抗体の生産を誘発しない任意の担体、例えば、タンパク質、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、及びアミノ酸コポリマーなどが挙げられる。医薬組成物はまた、抗癌剤若しくは抗血管新生剤、又は更なる生物活性化合物等の、追加の有効成分を含む、合剤であってもよい。インビボ投与に使用される組成物は、無菌でなくてはならない、又は、滅菌されていなくてはならない。これは、滅菌濾過膜で濾過することにより、容易に実施される。

20

【0103】

一態様では、医薬組成物は、本明細書に記載のような少なくとも1つの組換え結合タンパク質、並びに非イオン性洗剤などの洗剤、リン酸塩緩衝液などの緩衝液、及びスクロースなどの糖を含む。一態様では、そのような組成物は、上記のような組換え結合タンパク質及びPBSを含む。

30

【0104】

別の態様では、本発明は、ヒトを含む哺乳動物におけるT細胞の腫瘍局所的活性化の方法であって、当該哺乳動物に、本発明の組換えタンパク質、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

30

【0105】

別の態様では、本発明は、医学的状態を処置するための方法であって、医学的状態を処置することを必要とする患者に、治療有効量の本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

40

【0106】

別の態様では、本発明は、医学的状態を治療するための方法であって、医学的状態を治療することを必要とする患者に、治療有効量の、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む本発明の組換え結合タンパク質、当該組換え結合タンパク質をコードする核酸、又は当該結合タンパク質を含む医薬組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

【0107】

一態様では、本発明は、疾患の治療において使用するための、本発明による医薬組成物、組換え結合タンパク質、又は核酸に関する。その目的のため、本発明による医薬組成物、核酸又は組換え結合タンパク質は、これらを必要とする患者に、治療有効量で投与され

50

る。投与としては、局所投与、経口投与、及び非経口投与を挙げることができる。典型的な投与経路は非経口投与である。親的 (parental) 投与において、本発明の医薬組成物は、上で定義したような薬学的に許容される賦形剤と共に、溶液、懸濁液、又はエマルジョンなどの単位用量の注射可能な形態で処方される。用量及び投与方法は、治療される個体及び疾患によって異なる。

【0108】

更に、上述の医薬組成物、核酸又は組換えタンパク質のいずれかは、障害の治療における使用のためのものとみなされる。

【0109】

一態様では、本明細書に記載の当該組換え結合タンパク質又はそのような他の医薬組成物は、静脈内投与される。非経口用途のため、組換え結合タンパク質又は当該医薬組成物は、ボーラス注入として又は緩徐な点滴注入により、治療有効量で注入することができる。

10

【0110】

一態様では、本発明は、疾患の治療のための医薬品としての、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一態様では、本発明は、医薬品の製造のための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一態様では、本発明は、疾患の治療のための医薬品を製造するための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一態様では、本発明は、疾患の治療のための医薬品の製造のためのプロセスであって、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸分子、又は本発明の医薬組成物が、医薬品の有効成分である、プロセスに関する。一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を使用する、疾患の治疗方法に関する。

20

【0111】

一態様では、本発明は更に、それを必要とする対象の医学的状態を治療するためのそのような組換え結合タンパク質の使用を提供する。

【0112】

本明細書で使用される場合、当該医学的状態又は疾患は、癌、好ましくは液性腫瘍、より好ましくは白血病、更により好ましくは急性骨髓性白血病 (AML) である。

30

【0113】

本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の使用はまた、当技術分野において既知の1つ以上の他の療法との併用とすることができます。用語「～との併用」は、本明細書で使用する場合、所与の投与計画の下で実施される共投与を指すものとする。これには、異なる化合物の同時投与及び異なる化合物の時間をえた投与が含まれる（例えば、化合物Aを1回投与し、かつ化合物Bをその後に数回投与する、若しくは逆もまた同様、又は、両化合物を同時に投与し、かつ2つのうちの1つを後の段階でまた投与する）。

【0114】

一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質を含むキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の医薬組成物を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の組換えタンパク質、及び／又は本発明の核酸、及び／又は本発明の医薬組成物を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明のC D 1 2 3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号1～1～9及び配列番号55～57を含む組換えタンパク質、並びに／又はC D 1 2 3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号1～9及び配列番号55～57を含む組換えタンパク質をコードする核酸、並びに／又はC D 1 2 3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号1～9及び配列番号55～57を含む組換えタンパク質を含む医薬組成物を備える、キットに関する。一態様では、本発明は、配列番号

40

50

1～30及び配列番号55～64のアミノ酸配列のいずれか1つを含む組換えタンパク質、並びに/又は当該組換えタンパク質をコードする核酸、並びに/又は組換えタンパク質を含む医薬組成物を備える、キットに関する。

【0115】

一態様では、本発明は、本発明の組換えタンパク質を产生するための方法に関する。一態様では、本発明は、組換え結合タンパク質、例えば、配列番号1～30及び配列番号55～64のいずれか1つのアミノ酸配列を含む組換えタンパク質を生産するための方法であって、(i)当該組換え結合タンパク質を好適な宿主細胞(例えば、細菌中)で発現させる工程と、(ii)当該組換え結合タンパク質を(例えば、クロマトグラフィーを用いて)精製する工程と、を含む、方法に関する。当該方法は追加の工程を含んでもよい。本発明の組換え結合タンパク質のこのような产生方法は、実施例1に記載される。

10

【0116】

本発明は、実施例に記載の特定の態様に制限されない。本明細書は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、添付の配列表に開示されている多くのアミノ酸配列、核酸配列、及び配列番号を参照する。

【0117】

定義

本明細書で別段定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。更に、文脈によって特に必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。概して、本明細書に記載の細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、及びタンパク質並びに核酸化学の技術に関連して使用される命名法は、当該技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。

20

【0118】

用語「含む(comprising)」、「有する」、「含む(including)」、及び「含有/収容する(containing)」は、特に明記しない限り、非限定的用語として解釈されるべきである。本発明の態様で、ある特徴について、「～を含む」と説明されている場合、態様では、その特徴について「～からなる」又は「～から本質的になる」も考えられる。本明細書で提供されるありとあらゆる例、又は例示を意味する文言(例えば、「など」)の使用は、単に本開示をよりよく説明することを意図するものであり、別段の請求がない限り、本開示の範囲に制限を課さない。本明細書におけるいかなる文言も、特許請求されていない任意の要素を本開示の実施に不可欠なものとして示すものとして解釈されるべきではない。実施されている例以外、又は別段の指示がない限り、本明細書で使用される成分又は反応条件の量を表す全ての数は、全ての場合において、「約」という用語が当業者によって解釈されるように、その用語によって修飾されると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「約」は、特に明記しない限り、所与の数値の±10%に相当する。

30

【0119】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段の指示がない限り、その範囲内に入る各別個の値及び各エンドポイントを個々に指す簡略法として役立つことを単に意図しており、各別個の値及びエンドポイントは、本明細書において個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。

40

【0120】

本発明の文脈において、用語「タンパク質」とは、ポリペプチドを含む分子を指し、ポリペプチドの少なくとも一部は、単一のポリペプチド鎖内及び/又は複数のポリペプチド鎖間において二次、三次、又は四次構造を形成することによって、定義された三次元配列を有する、又は獲得することができる。タンパク質が2つ以上のポリペプチド鎖を含む場合、個々のポリペプチド鎖は、非共有結合又は共有結合により、例えば、2つのポリペプチド間のジスルフィド結合により、結合され得る。二次及び/又は三次構造を形成することによって定義された三次元配列を個別に有する、又は獲得することができるタンパク質

50

の一部は、「タンパク質ドメイン」と呼ばれる。そのようなタンパク質ドメインは、当業者に周知である。

【0121】

組換えタンパク質及び組換えポリペプチドなどで使用される用語「組換え」とは、当該タンパク質又はポリペプチドが、当業者に周知の組換えDNA技術の使用によって產生されることを意味する。例えば、ポリペプチドをコードする組換えDNA分子（例えば遺伝子合成によって產生される）を細菌発現プラスミド（例えばpQE30、QIAGen）、酵母発現プラスミド、哺乳動物発現プラスミド、若しくは植物発現プラスミド、又はインビトロ発現を可能にするDNAにクローニングすることができる。例えば、そのような組換え細菌発現プラスミドを適切な細菌（例えば、大腸菌）に挿入すると、これらの細菌は、この組換えDNAによってコードされたポリペプチド（複数可）を生産することができる。それに応じて生産されたポリペプチド又はタンパク質は、組換えポリペプチド又は組換えタンパク質と呼ばれる。

【0122】

本発明の文脈において、用語「結合タンパク質」は、結合ドメインを含むタンパク質を指す。結合タンパク質はまた、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上の結合ドメインを含んでもよい。好ましくは、この結合タンパク質は、組換え結合タンパク質である。本発明の結合タンパク質は、CD123に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む。

【0123】

更に、任意のそのような結合タンパク質は、当業者に周知の追加のポリペプチド（例えば、ポリペプチドタグ、ペプチドリンカー、結合特異性を有する他のタンパク質ドメインへの融合、サイトカイン、ホルモン、又はアンタゴニストなど）、又は化学修飾（ポリエチレンギリコール、毒素（例えば、免疫原からのDM1）、小分子、抗生物質などへのカップリングなど）を含み得る。本発明の結合タンパク質は、ローカライザ分子を含んでもよい。

【0124】

用語「結合ドメイン」は、標的に対して結合特異性を示すタンパク質ドメインを意味する。好ましくは、この結合ドメインは、組換え結合ドメインである。

【0125】

本明細書で使用される場合、用語「標的」は、核酸分子、ポリペプチド若しくはタンパク質、炭水化物、又は任意の他の天然に存在する分子などの個々の分子を指し、そのような個々の分子の任意の一部を含むか、又はそのような分子の2つ以上の複合体、又は細胞全体若しくは組織試料、又は任意の非天然化合物を指す。好ましくは、標的はCD123である。より好ましくは、標的はヒトCD123である。

【0126】

本発明の文脈において、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって結合された、複数、すなわち2つ以上のアミノ酸の鎖からなる分子に関する。好ましくは、ポリペプチドは、ペプチド結合によって結合された8個超のアミノ酸からなる。用語「ポリペプチド」はまた、システインのS-S架橋によって結合されたアミノ酸の複数の鎖も含む。ポリペプチドは、当業者に周知である。

【0127】

特許出願公開第WO2002/020565号及びForrerら、2003（Forrer, P., Stumpf, M.T., Binz, H.K., Pluckthun, A., 2003. FEBS Letters 539, 2~6）には、反復タンパク質の特徴及び反復ドメインの特徴、技術、及び用途の一般的な説明が含まれる。用語「反復タンパク質」とは、1つ以上の反復ドメインを含むタンパク質を指す。好ましくは、反復タンパク質は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つの反復ドメインを含む。更に、当該反復タンパク質は、追加の非反復タンパク質ドメイン、ポリペプチドタグ、及び/又はペプチドリンカーを含んでもよい。反復ドメインは、結合ドメインであり得る。

10

20

30

40

50

【0128】

用語「反復ドメイン」は、構造単位として2つ以上の連続する反復モジュールを含むタンパク質ドメインを指し、この反復モジュールは、構造相同性及び配列相同性を有する。好ましくは、反復ドメインは、N末端及び/又はC末端キャッピングモジュールを更に含む。明確にするために、キャッピングモジュールは、反復モジュールであり得る。そのような反復ドメイン、反復モジュール、及びキャッピングモジュール、配列モチーフ、並びに構造的相同性及び配列相同性は、アンキリン反復ドメイン（国際公開第2002/020565号）、ロイシンリッチ反復ドメイン（国際公開第2002/020565号）、テトラトリコペプチド反復ドメイン（Main, E. R., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L., Regan, L., Structure 11 (5), 497~508, 2003）、及びアルマジロ反復ドメイン（国際公開第2009/040338号）の実施例から、当業者に周知である。そのような反復ドメインが反復されるアミノ酸配列を含むタンパク質とは異なることは、当業者には更に周知であり、反復されるアミノ酸配列は全て、個々のドメイン（例えば、フィプロネクチンのFN3ドメイン）を形成することができる。

【0129】

用語「アンキリン反復ドメイン」は、構造単位として2つ以上の連続するアンキリン反復モジュールを含む反復ドメインを指す。アンキリン反復ドメインは、標準的な組換えDNA技術を使用して、任意選択で半減期延長ドメインと共に、より大きなアンキリン反復タンパク質にモジュール式に組み立てられてもよい（例えば、Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003、国際公開第2002/020565号、国際公開第2016/156596号、国際公開第2018/054971号を参照されたい）。

【0130】

設計反復タンパク質、設計反復ドメインなどにおいて使用される用語「設計」は、そのような反復タンパク質及び反復ドメインがそれぞれ人工的であり、自然界では生じないという特性を指す。本発明の結合タンパク質は、反復タンパク質を設計し、これらは少なくとも1つの設計アンキリン反復ドメインを含む。好ましくは、設計反復ドメインは、設計アンキリン反復ドメインである。

【0131】

用語「標的相互作用残基」は、標的との直接的な相互作用に寄与する反復モジュールのアミノ酸残基を指す。

【0132】

用語「フレームワーク残基」は、反復モジュールのアミノ酸残基を指し、これは、折り畳みトポロジーに寄与する、すなわち、当該反復モジュールの折り畳みに寄与するか、又は隣接モジュールとの相互作用に寄与する。そのような寄与は、反復モジュール内の他の残基との相互作用、又は-ヘリックス若しくは-シートに見られるポリペプチド骨格構造への影響、又は直鎖ポリペプチド若しくはループを形成するアミノ酸ストレッチへの関与であってもよい。そのようなフレームワーク及び標的相互作用残基は、X線結晶解析、NMR及び/又しくはCD分光法などの物理化学法によって得られる構造データの分析によって、又は構造生物学及び/又しくはバイオインフォマティクスにおいて当業者に周知の既知の関連する構造情報と比較することによって同定され得る。

【0133】

用語「反復モジュール」は、元々は天然に生じる反復タンパク質の反復単位に由来する、設計反復ドメインの反復されたアミノ酸配列及び構造単位を指す。反復ドメインに含まれる各反復モジュールは、天然に存在する反復タンパク質のファミリー又はサブファミリー、例えば、アンキリン反復タンパク質ファミリーの1つ以上の反復単位に由来する。更に、反復ドメインに含まれる各反復モジュールは、例えば、実施例1に記載されるように、標的上で選択された反復ドメインから得られ、同じ標的特異性を有する相同反復モジュールから推定される「反復配列モチーフ」を含み得る。

10

20

30

40

50

【0134】

したがって、用語「アンキリン反復モジュール」は、元々天然に存在するアンキリン反復タンパク質の反復単位に由来する反復モジュールを指す。アンキリン反復タンパク質は、当業者に周知である。設計アンキリン反復タンパク質は、以前に記載されており、例えば、国際公開第2002/020565号、同第2010/060748号、同第2011/135067号、同第2012/069654号、同第2012/069655号、同第2014/001442号、同第2014/191574号、同第2014/083208号、同第2016/156596号、及び同第2018/054971号を参照されたく、これらは全て、その全体が参照により組み込まれる。典型的には、アンキリン反復モジュールは、ループによって分離された2つのアルファヘリックスを形成する約31～33個のアミノ酸残基を含む。10

【0135】

反復モジュールは、標的特異的反復ドメインを選択する目的で、ライプラリー内でランダム化されていないアミノ酸残基を有する位置（「非ランダム化位置」）及び標的特異的反復ドメインを選択する目的で、ライプラリー内でランダム化されたアミノ酸残基を有する位置（「ランダム化位置」）を含み得る。非ランダム化された位置は、フレームワーク残基を含む。ランダム化された位置は、標的相互作用残基を含む。「ランダム化された」とは、例えば、反復モジュールのアミノ酸位置で2つ以上のアミノ酸が許可され、通常の20個の天然に存在するアミノ酸のいずれかが許可された、若しくはシステイン以外のアミノ酸、又はグリシン、システイン、及びプロリン以外のアミノ酸などの、20個の天然に存在するアミノ酸のほとんどが許可されたことを意味する。20

【0136】

用語「反復配列モチーフ」は、1つ以上の反復モジュールから推定されるアミノ酸配列を指す。好ましくは、当該反復モジュールは、同じ標的に対して結合特異性を有する反復ドメインに由来する。そのような反復配列モチーフは、フレームワーク残基位置及び標的相互作用残基位置を含む。当該フレームワーク残基位置は、反復モジュールのフレームワーク残基の位置に対応する。同様に、当該標的相互作用残基位置は、反復モジュールの標的相互作用残基の位置に対応する。反復配列モチーフは、非ランダム化位置及びランダム化位置を含む。

【0137】

用語「反復単位」は、1つ以上の天然に存在するタンパク質の配列モチーフを含むアミノ酸配列を指し、当該「反復単位」は複数のコピーに見出され、タンパク質のフォールディングを決定する全ての当該モチーフに共通の定義されたフォールディングトポロジーを示す。そのような反復単位の例としては、ロイシンに富む反復単位、アンキリン反復単位、アルマジロ反復単位、テトラトリコペプチド反復単位、H E A T 反復単位、及びロイシンに富むバリアント反復単位が挙げられる。30

【0138】

用語「標的に対して結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」、「高い特異性で標的に結合する」、「標的に対して特異的な」又は「標的特異性」、又は「特異的に結合する」などは、結合タンパク質又は結合ドメインが、大腸菌マルトース結合タンパク質（M B P）などの非関連タンパク質に結合するよりも、P B S 中で、標的に、より低い解離定数で結合する（すなわち、より高い親和性で結合する）ことを意味する。好ましくは、標的に対するP B S 中での解離定数（「K_D」）は、M B P に対する対応する解離定数よりも、少なくとも10²倍、より好ましくは少なくとも10³倍、より好ましくは少なくとも10⁴倍、又はより好ましくは少なくとも10⁵倍低い。タンパク質-タンパク質間の相互作用の解離定数を測定するための方法、例えば、表面プラズモン共鳴（S P R）に基づく技術（例えば、S P R 平衡解析）又は等温滴定熱量測定（I T C）は、当業者に周知である。特定のタンパク質-タンパク質相互作用のK_Dの測定値は、異なる条件下（例えば、塩濃度、p H）で測定された場合、変動し得る。したがって、K_D値の測定は、好ましくは、タンパク質の標準化溶液及びP B S 等の標準化緩衝液を使用して実施され40

る。C D 1 2 3 に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質の解離定数 (K_D) の、表面プラズモン共鳴 (S P R) 分析による典型的かつ好ましい決定は、実施例 2 に説明されている。様々なアッセイ形式を使用して、目的の薬物分子に特異的に結合する結合部分を選択又は特徴付けることができる。例えば、固相 E L I S A イムノアッセイ、免疫沈降、B I A c o r e (商標) (G E H e a l t h c a r e, P i s c a t a w a y, N J)、蛍光活性化細胞選別 (F A C S)、O c t e t (商標) (F o r t e B i o, I n c ., M e n l o P a r k, C A) 及びウエスタンプロット分析は、標的薬物分子に特異的に結合する結合部分を同定するために使用され得る多くのアッセイの一部である。典型的には、特異的又は選択的結合は、少なくとも 2 倍のバックグラウンドシグナル又はノイズ、より典型的には 10 倍超のバックグラウンドシグナルである。より具体的には、結合剤は、平衡解離定数 (K_D) 値が $< 1 \mu M$ 、例えば、 $< 500 n M$ 、 $< 100 n M$ 、 $< 10 n M$ 、 $< 100 p M$ 、又は $< 10 p M$ である場合、標的に「特異的に結合する」と言われる。

【0139】

「結合剤」又は「結合部分」という用語は、標的分子に特異的に結合することができる任意の分子を指す。用語「結合剤」は、例えば、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、ペプチド (例えば、W i l l i a m s ら、「J B i o l C h e m」、第 266 卷 : 第 5182 ~ 5190 頁 (1991 年))、代替足場、抗体模擬体、反復タンパク質、例えば、設計アンキリン反復タンパク質、受容体タンパク質、及び標的分子のいずれかの他の天然に存在する相互作用パートナーを含み、天然タンパク質と、例えば、非天然残基を含むように、及び / 又は天然残基を欠いているように修飾され若しくは遺伝子操作されたタンパク質とを含むことができる。

【0140】

用語「P B S」は、137 mM N a C l、10 mM リン酸塩及び 2.7 mM K C l を含み、p H が 7.4 であるリン酸緩衝水溶液を意味する。

【0141】

好ましくは、クリアランス、及び / 又は曝露、及び / 又は終末相半減期は、哺乳動物、より好ましくはマウス及び / 又はカニクイザル、より好ましくはカニクイザルで評価する。好ましくは、クリアランス、及び / 又は曝露、及び / 又は終末相半減期をマウスで測定する場合、評価は、注入後最大 48 時間までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、マウスにおける終末相半減期の評価は、24 時間 ~ 48 時間で計算される。好ましくは、クリアランス、及び / 又は曝露、及び / 又は終末相半減期をカニクイザルで測定する場合、評価は、注射後最大 7 日目までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、カニクイザルにおける終末相半減期の評価は、1 日目 ~ 5 日目で計算する。当業者は、標的媒介クリアランスなどの効果を更に特定し、終末相半減期を計算する場合、それらを考慮することができる。本発明の組換え結合タンパク質などの薬物の用語「終末相半減期」とは、偽平衡に達した後、哺乳動物に適用した薬物の血漿中濃度の半分に達するのに必要な時間を指す (例えば、マウスでは 24 時間 ~ 48 時間で計算し、又はカニクイザルでは 1 日目 ~ 5 日目で計算する)。終末相半減期は、哺乳動物に投与された薬物の用量の半分を排泄するのに必要な時間とは定義されない。終末相半減期という用語は、当業者に周知である。好ましくは、薬物動態の比較は、任意の用量、より好ましくは同等の用量 (すなわち、同一の mg / kg 用量) 又は等モル用量 (すなわち、同一の mol / kg 用量)、より好ましくは等モル投与量 (すなわち、同一の mol / kg 用量) で行う。当業者であれば、動物での同等及び / 又は等モルの投与は、少なくとも約 20 %、より好ましくは約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 90 %、又は約 100 % の実験的な投与量のばらつきを伴うことを理解する。好ましくは、薬物動態の測定に用いられる投与量は、約 0.001 ~ 約 1000 mg / kg、より好ましくは約 0.01 ~ 約 100 mg / kg、より好ましくは約 0.1 ~ 約 50 mg / kg、より好ましくは約 0.5 ~ 約 10 mg / kg から選択される。

【0142】

10

20

30

40

50

「CD3」又は「分化クラスター3」という用語は、3つの対(　　、　　、　　)として集合する4つの異なるポリペプチド鎖、イプシロン(　　)、ガンマ(　　)及びゼータ(　　)から構成される多量体タンパク質複合体を指す。CD3複合体は、T細胞受容体と非共有結合的に会合するT細胞共受容体として機能する。それは、任意の形態のCD3、並びにCD3の活性の少なくとも一部を保持するその変異体、アイソフォーム、及び種相同体を指し得る。したがって、本明細書に定義及び開示される結合タンパク質はまた、ヒト以外の種からCD3に結合してもよい。他の場合では、結合タンパク質は、ヒトCD3に完全に特異的であってもよく、種又は他のタイプの交差反応性を示さなくてもよい。ヒトCD3に対する特定の参照によってなど異なる指示がない限り、CD3は、天然配列CD3、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシの全ての哺乳動物種を含む。ヒトCD3ガンマ、デルタ及びゼータのアミノ酸配列は、NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)参照配列、それぞれNP_000064.1、NP_000723.1、及びNP_932170.1に示されている。
10

【0143】

本明細書で使用される用語「CD3発現細胞」は、細胞障害性T細胞(CD8+T細胞)及びTヘルパー細胞(CD4+T細胞)などのT細胞を含むがこれらに限定されない、細胞表面上にCD3(分化クラスター3)を発現するいずれかの細胞を指す。

【0144】

「CD123」という用語は、インターロイキン-3受容体サブユニットアルファを指す。これはインターロイキン-3の受容体である。ヒトCD123(hCD123)のアミノ酸配列は、UniProt(www.uniprot.org)参考資料第P26951号に示されている。
20

【0145】

用語「T細胞の腫瘍限局性活性化」は、非腫瘍組織と比較して、T細胞が腫瘍組織において優先的に活性化されることを意味する。

【0146】

更に、用語「ペプチド」とはまた、例えばグリコシル化によって修飾されたペプチドと、2つ以上のポリペプチド鎖を含むタンパク質、4~600アミノ酸長の長さの各々、例えばインスリン及び免疫グロブリンなどのジスルフィド結合によって架橋されたタンパク質と、を包含する。用語「化学的又は生化学的薬剤」とは、レシピエントに投与され得る任意の自然起源又は合成の化合物を含むことが意図される。好ましい態様では、ローカライザは、標的特異性アンキリン反復ドメインである。
30

【0147】

「医学的状態」(又は障害又は疾患)という用語には、自己免疫障害、炎症性障害、網膜症(特に増殖性網膜症)、神経変性障害、感染症、代謝性疾患、及び腫瘍性疾患が含まれる。本明細書に記載の組換え結合タンパク質のいずれかを、そのような障害、特に、腫瘍性疾患の治療のための薬剤の調製に使用することができる。「医学的状態」は、不適切な細胞増殖を特徴とするものである場合がある。医学的状態は、過剰増殖状態である場合がある。本発明は、特に、医学的状態を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に、本発明の組換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物の治療有効量を投与する工程を含む、治療方法に関する。好ましい態様では、当該医学的状態は、腫瘍性疾患である。用語「腫瘍性疾患」は、本明細書で使用する場合、急速に増殖する細胞増殖又は腫瘍を特徴とする、細胞又は組織の異常な状態(state or condition)を指す。一態様では、当該医学的状態は、悪性腫瘍性疾患である。一態様では、当該医学的状態は、癌、好ましくは白血病、より好ましくは急性骨髄性白血病である。用語「治療有効量」は、患者において所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。
40

【0148】

用語「抗体」は、インタクトな抗体分子だけでなく、免疫原結合能力を保持する抗体分子の任意のフラグメント及び変異体も意味する。そのようなフラグメント及び変異体もまた、当技術分野において周知であり、インピトロ及びインピボの両方で常時使用されてい

10

20

30

40

50

る。したがって、用語「抗体」は、インタクトな免疫グロブリン分子、例えば、F_ab、F_ab'、F(a_{b'})₂及び单鎖V領域フラグメント(scfv)、二重特異性抗体、キメラ抗体、抗体融合ポリペプチド、及び非従来型抗体を包含する。

【0149】

用語「癌」及び「癌性」は、本明細書では、典型的には、調節されていない細胞増殖によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を指すか、又は記載するために使用される。癌は、固体腫瘍及び液性腫瘍、並びに原発性腫瘍及び転移性を包含する。「腫瘍」は、1つ以上の癌性細胞を含む。固体腫瘍は、典型的には、腫瘍間質も含む。癌の例としては、原発性及び転移性癌、リンパ腫、芽腫、肉腫、及び白血病、並びに任意の他の上皮及びリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。脳癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、明細胞腎臓癌、頭頸部扁平上皮癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、悪性黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、三重陰性乳癌、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫(HL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、多発性骨髓腫(MM)、骨髓異形成症候群(MDS)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、頭頸部扁平上皮癌(SCCHN)、慢性骨髓性白血病(CML)、小リノンパ球性リンパ腫(SLL)、悪性中皮腫、結腸直腸癌、又は胃癌が挙げられる。

10

【実施例】

【0150】

以下に開示の出発物質及び試薬は、当業者に既知であり、市販されている、及び/又は周知の技術を用いて調製することができる。

20

【0151】

材料

化学物質はSigma-Aldrich(USA)より購入した。オリゴヌクレオチドはMicrosynth(Switzerland)より購入した。特に明記しない限り、DNAポリメラーゼ、制限酵素、及び緩衝液は、New England Biolabs(USA)又はFermentas/Thermo Fisher Scientific(USA)より購入した。誘導性大腸菌発現株は、例えば、大腸菌のXL1-blue(Stratagene, USA)又はBL21(Novagen, USA)などのクローニング及びタンパク質生産に使用した。

30

【0152】

分子生物学

特に明記しない限り、方法は、既知のプロトコルに従って実施される(例えば、Sambrook J.、Fritsch E. F.、及びManiatis T.、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory(1989年)、New York参照)。

【0153】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーを生成する方法は、例えば、米国特許第7,417,130号; Binzら、「J. Mol. Biol.」第332巻第489~503頁、2003年; Binzら(2004年)、上記引用に記載されている。このような方法により、ランダム化アンキリン反復モジュール及び/又はランダム化キャッピングモジュールを有する、設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーを構築することができる。例えば、そのようなライブラリーはしたがって、固定化N末端キャッピングモジュール(例えば、配列番号47、48、又は49のN末端キャッピングモジュール)、又はランダム化N末端キャッピングモジュール(例えば、配列番号50による)、及び固定化C末端キャッピングモジュール(例えば、配列番号51、52、又は53のC末端キャッピングモジュール)又はランダム化C末端キャッピングモジュール(例えば、配列番号54

40

50

による)に基づいて組み立てられてもよい。好ましくは、そのようなライブラリーは、反復又はキャッシングモジュールのランダム化された位置にアミノ酸 C、G、M、N (G 残基の前) 及び P のいずれも有するこがないように組み立てられる。

【0154】

更に、そのようなライブラリー内のそのようなランダム化されたモジュールは、ランダム化されたアミノ酸位置を有する追加のポリペプチドループ挿入を含んでもよい。そのようなポリペプチドループ挿入の例は、抗体又はデノボ生成ペプチドライブラリーの補体決定領域 (CDR) ループライブラリーである。例えば、そのようなループ挿入は、ガイドンスとして、ヒトリボヌクレアーゼ L の N 末端アンキリン反復ドメインの構造を用いて設計することができた (Tanaka, N.、Nakanishi, M.、Kusakabe, Y.、Goto, Y.、Kitade, Y.、Nakamura, K. T. , EMBOD 23 (30), 3929 - 3938, 2004)。2 つのアンキリン反復の境界近くに存在する ターンに 10 個のアミノ酸が挿入される、このアンキリン反復ドメインと同様に、アンキリン反復タンパク質ライブラリーは、アンキリン反復ドメインの 1 つ以上の

ターンに挿入された可変長 (例えば、1 ~ 20 個のアミノ酸) のランダム化ループ (固定化及びランダム化位置を有する) を含有してもよい。アンキリン反復タンパク質ライブラリーのいずれかのそのような N 末端キャッシングモジュールは、好ましくは、RILLAA モチーフ、RILLKA モチーフ、又は RELLK A モチーフを有し (例えば、配列番号 1 の位置 19 ~ 24 に存在)、アンキリン反復タンパク質ライブラリーのいずれかのそのような C 末端キャッシングモジュールは、好ましくは、KLN モチーフ、KLA モチーフ、又は KAA モチーフを有する (例えば、配列番号 1 の最後の 3 つのアミノ酸に存在)。配列番号 47 ~ 49 は、RILLAA モチーフ、RILLKA モチーフ、又は RELLK A モチーフを含む N 末端キャッシングモジュールの例を提供し、配列番号 51 ~ 53 は、KLN モチーフ、KLA モチーフ、又は KAA モチーフを含む C 末端キャッシングモジュールの例を提供する。

【0155】

そのようなアンキリン反復タンパク質ライブラリーの設計は、標的と相互作用するアンキリン反復ドメインの既知の構造によって誘導され得る。タンパク質構造データバンク (Protein Data Bank: PDB) の独自の受託コード又は識別コード (PDB-ID) によって識別される、そのような構造の例は、1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V2O、3UXG、3TWQ - 3TWX、1N11、1S70、及び 2ZGD である。

【0156】

N2C 及び N3C で設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーなどの、設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーの例が説明されている (米国特許第 7,417,130 号、Binzら、2003 年、上記引用; Binzら、(2004 年) 上記引用)。N2C 及び N3C の数字は、N 末端及び C 末端のキャッシングモジュール間に存在するランダム化反復モジュールの数を説明している。

【0157】

反復単位及びモジュール内の位置を定義するために使用される命名法は、Binzら (2004 年) の上記引用に基づき、アンキリン反復モジュールとアンキリン反復単位との境界が、1 アミノ酸位置シフトするという修飾を伴う。例えば、Binzら (2004 年) の上記引用のアンキリン反復モジュールの位置 1 は、本開示のアンキリン反復モジュールの位置 2 に対応し、結果として、Binzら (2004 年) の上記引用のアンキリン反復モジュールの位置 3 は、本開示の以下のアンキリン反復モジュールの位置 1 に相当する。

【0158】

実施例 1 : C D 1 2 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む結合タンパク質の選択

リボソームディスプレイ (Hanes, J. 及び Pluckthun, A.、「PNA S」第 94 卷第 4937 ~ 42 頁 (1997 年)) を用いて、ヒト C D 1 2 3 (hCD1

10

20

30

40

50

23)に対して結合特異性を有する多くのアンキリン反復タンパク質を、Binzら(2004年)の上記引用による記載と同様のDARPin(登録商標)ライブラリーから選択した。選択されたクローンの組換えヒトCD123標的への結合は、粗抽出物のホモジニアス時間分解蛍光測定(Homogeneous Time Resolved Fluorescence: HTRF)によって評価され、数百のhCD123特異的結合タンパク質が正常に選択されたことを示した。例えば、配列番号1~9のアンキリン反復ドメインは、hCD123に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む、選択された結合タンパク質のアミノ酸配列を構成する。配列番号12~30は、hCD123に対する結合特異性を有する選択された結合タンパク質のアンキリン反復モジュールを構成する。

【0159】

10

リボソームディスプレイによるCD123特異的アンキリン反復タンパク質の選択

hCD123特異的アンキリン反復タンパク質の選択は、ヒトCD123のビオチン化細胞外ドメイン(配列番号39)を、標的タンパク質として、上記のアンキリン反復タンパク質のライブラリー、及び確立されたプロトコルとして用いる、リボソームディスプレイ(Hanes及びPluckthun(上記引用))によって実施した(例えば、Zahnd, C.、Amstutz, P.、及びPluckthun, A.、「Nat. Methods」第4巻、第69~79頁、2007年、参照)。CD123標的(Evitria)は、C末端Fcタグ及びAviタグを含有し、酵素BirA-GSTを使用してビオチン化した。計4ラウンドの標準的なリボソーム選択を採用し、標的濃度を減少させ、洗浄ストリンジェンシを増加させて、ラウンド1からラウンド4への選択圧力を増加させた(Binzら、(2004年)上記引用)。ストレプトアビジン及びニュートラアビジンビーズを用いることによって、各ラウンドにおいて選択解除戦略を適用した。各選択ラウンド後の逆転写(RT)-PCRサイクルの数は、結合剤の富化のために、収率に合わせて調整する45から28に一定に減少させた。

20

【0160】

高親和性CD123特異的アンキリン反復タンパク質を富化するために、標準リボソームディスプレイ選択(上記)の第4ラウンドからの出力を、選択ストリンジェンシの増加を伴うオフ速度選択ラウンドに供した(Zahnd(2007年)上記引用)。最後の標準選択ラウンドを、オフレート選択ラウンドの後に実施して、オフレート選択された結合タンパク質を增幅及び回収した。ラウンド5及び6では、RT-PCRサイクルの数は、それぞれ30及び35であった。

30

【0161】

CD123結合T細胞エンゲージャ(特許US9822181B2-7G3エピトープ)を用いる競合溶出工程を適用することによって、又は選択を実行する前にhCD123特異的アンキリン反復タンパク質(抗体7G3とは異なるエピトープを有する)をCD123標的と共にインキュベートすることによってのいずれかで、潜在的なエピトープ空間を拡大するために、更なる2つの更なる選択アプローチを(上記のような)標準的なアプローチの次に行った。適用したアプローチの各々から、CD123に対して結合剤を生成した。

40

【0162】

選択されたクローンは、粗抽出物HTRFによって示されるようにヒトCD123に特異的に結合する

溶液中でhCD123に特異的に結合する個々の選択されたアンキリン反復タンパク質を、標準プロトコルを用いて、アンキリン反復タンパク質発現大腸菌細胞の粗抽出物を使用するホモジニアス時間分解蛍光測定(HTRF)アッセイによって同定した。リボソームディスプレイによって選択されたアンキリン反復タンパク質クローンを、C末端CD3特異性アンキリン反復ドメイン、引き続いてFlagタグを含有するpQE30(Qiagen)発現ベクター(pMPDV045)の誘導体にクローニングし、大腸菌のXL1-Blue(Stargate)に形質転換し、LB-寒天(1%グルコース及び50μg/mlのアンピシリンを含有)上に播種し、次いで、37℃で一晩インキュベート

50

した。160 μl の成長培地 (1% グルコースと 50 μg / ml のアンピシリンとを含有する TB) を含有する 96 ウェルプレートに単一のコロニーを播種し (単一のウェル中に各クローン)、37、800 rpm で振盪しながら、一晩インキュベートした。アンピシリン 50 μg / ml を含有する 150 μL の新鮮な TB 培地に、新しい 96 ウェルプレート中 8.5 μL の一晩培養物を播種した。37 及び 700 rpm で 120 分間インキュベートした後、発現を IPTG (最終濃度 0.5 mM) で誘導し、4 時間続けた。細胞を収集し、ペレットを -20 で一晩凍結した後、8 μL の B-PER II (Thermo Scientific) 中に再懸濁し、振盪 (900 rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートした。次いで、160 μL の PBS を添加し、細胞片を遠心分離によって除去した (3220 g で 15 分間)。

10

【0163】

各溶解したクローンの抽出物を、PBSTB (0.1% Tween 20 (登録商標) 及び 0.2% (w/v) BSA、pH 7.4 を補充した PBS) 中で、4 nM (最終濃度) ビオチン化ヒト hCD123、1:400 (最終濃度) の抗 strep-Tb HTRF 抗体 - FRET ドナーコンジュゲート (Cisbio)、及び 1:400 (最終濃度) の抗 6 His - D2 抗体 FRET 受容体コンジュゲート (Cisbio) と一緒に、1:1000 希釈 (最終濃度) として 384 ウェルプレートのウェルへ適用し、室温で 60 分間インキュベートした。340 nm の励起波長及び 665 ± 10 nm の発光フィルタを使用して、Tecan M1000 で HTRF を読み取った。そのような粗細胞抽出物 HTRF による数百のクローンのスクリーニングは、hCD123 に特異的なアンキリン反復ドメインを明らかにした。hCD123 に特異的に結合する選択されたアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 9 で提供される：

DARPin (登録商標) タンパク質 #1 (配列番号 1) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #2 (配列番号 2) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #3 (配列番号 3) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #4 (配列番号 4) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #5 (配列番号 5) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #6 (配列番号 6) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #7 (配列番号 7) ;
 DARPin (登録商標) タンパク質 #8 (配列番号 8) ; 及び
 DARPin (登録商標) タンパク質 #9 (配列番号 9)。

20

30

40

【0164】

これらの DARPin (登録商標) タンパク質は、任意選択では、それらの N 末端に G、S、又は GS 配列を追加的に含む。

【0165】

hCD123 に対して結合特異性を有する追加のアンキリン反復タンパク質の操作
 配列番号 2 は、配列番号 1 の配列に基づいて更に操作される。表面電荷を変化させるために、配列を改変した。N 末端キャッピングモジュールにおいて、アスパラギン酸 (18 位) をロイシンで置換し、C 末端キャッピングモジュールにおいて、グルタミン酸 (18 位) をグルタミンで置換した。

【0166】

CD123 特異的アンキリン反復タンパク質の発現

更なる分析のために、上記のように粗細胞抽出物 HTRF で特異的なヒト CD123 結合を示す選択されたクローンを、容易な精製のためにそれらの N 末端に融合される His タグ (配列番号 66) を用いて、大腸菌細胞で発現させた。発現したタンパク質を標準プロトコルに従って精製した。0.11 ml の静置一晩培養物 (TB、1% のグルコース、50 mg / l のアンピシリン；37) を使用して、96 ディープウェルプレートで 0.99 ml の培養物 (TB、50 mg / l のアンピシリン、37) に接種した。37 (700 rpm) で 2 時間インキュベートした後、培養物を 0.5 mM IPTG で誘導し、振盪しながら (900 rpm) 37 で 6 時間インキュベートした。細胞を収集し、ペ

50

レットを - 20 で一晩凍結した後、DNAase I (200 ユニット / ml) 及びリゾチーム (0.4 mg / ml) を補充した 50 μL の B - PER II (Thermo Scientific) 中に再懸濁し、振盪 (900 rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートした。次いで、60 μL の低塩リン酸ナトリウム緩衝液を添加し、細胞片を遠心分離によって除去した (3220 g で 15 分間)。合計で、8 つの個々の発現をプールした後、遠心分離 (3,200 g、60 分間、4) によって細胞破片を除去した。MultiScreen フィルタプレート (Millipore) を用いて上清を濾過した後、96 ウェル Thermo HisPur コバルトスピinnプレートを用いて精製し、96 ウェル Thermo Zeba スピinn脱塩プレートを用いて PBS 中でタンパク質溶液を再緩衝化した。精製されたタンパク質は、Agilent 1200 HPLC システム上で標準 Sephadex 150 / 5 カラムを使用して、PBS 中で可溶性及び単量体であった。

【0167】

hCD123 に対する結合特異性を有する親和性成熟 CD123 特異的結合タンパク質の生成。

最初に同定された CD123 特異性結合タンパク質の更なる開発において、標的タンパク質に対して非常に高い親和性及び / 又はそれからの非常に低いオフ速度を有する変異体が、親和性成熟を用いて生成された。それにより、1 つの最初に同定された結合タンパク質 DARPin (登録商標) タンパク質 #2 (「親」結合タンパク質) を、親和性成熟の好適な出発点として選択した。親和性成熟手順は、出発点として使用されるアンキリン反復ドメインの各無作為化位置の飽和変異誘発を伴った。親和性成熟手順によって生成された配列を、競合 HTRF によってより低いオフレートについてスクリーニングした。簡単に説明する：簡単に説明する：単一アミノ酸点突然変異変異体を、単一の N N K 縮重コドンを有するプライマーを使用して親プラスミド上で標準的な QuickChange PCR によって生成して、潜在的な結合位置に 20 個全てのアミノ酸を導入した。N 末端 His タグ (配列番号 66) を含有するアンキリン反復タンパク質の粗抽出物を、ビオチン化標的と共にインキュベートした後、過剰の非フラグタグ化親 CD123 特異的結合タンパク質を添加し、HTRF シグナルを経時的に測定した。親クローニよりも高い HTRF シグナルに基づいて同定された有益な変異を、タンパク質工学によって結合タンパク質において組み合わせた。親タンパク質よりも高い HTRF シグナルに基づいて同定された有益な変異を、タンパク質工学によって結合タンパク質において組み合わせた。このようにして、親和性成熟 DARPin (登録商標) タンパク質 #13 及び DARPin (登録商標) タンパク質 #14 が、DARPin (登録商標) タンパク質 #2 に由来して生成された。

【0168】

次いで、このような親和性成熟 CD123 特異的結合ドメインを、pQE30 (Qiagene) 発現ベクターの誘導体にサブクローニングすることで、N 末端 His タグ (配列番号 66) をコードし、その後、CD123 特異的結合ドメイン (配列番号 56 又は 57) 及び配列番号 36 の C 末端 CD3 特異性結合ドメインをコードする、発現構築物を得た。T 細胞エンゲージャフォーマット中のこれらの構築物を大腸菌細胞中で発現させ、標準プロトコルに従ってこれらの His タグを用いて精製した。タンパク質を、エフェクター細胞 (E) としての健常ドナー PBMC、及び標的細胞 (T) としての Molm-13 - N1 腫瘍細胞 (5 : 1 の E : T 比) から単離された初代 T 細胞を使用して、用量依存的インビトロ T 細胞活性化及び腫瘍細胞殺傷アッセイについて試験した。構築物を大腸菌細胞中で発現させ、標準プロトコルに従ってこれらの His タグを用いて精製した。

【0169】

実施例 2：表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によるヒト CD123 に対して結合特異性を有する組換えアンキリン反復タンパク質の解離定数 (KD) の決定

組換えヒト CD123 標的上の精製されたアンキリン反復タンパク質の結合親和性を、ProteOn 装置 (BioRad) を用いて分析し、当業者に既知の標準的な手順に従って測定を行った。

10

20

30

40

50

【0170】

ProteOn XPR36 機器 (BioRad) を用いて SPR 測定を行った。泳動用緩衝液は、0.005% Tween 20 (登録商標) を含有する PBS pH 7.4 (PBS-T) であった。bio.hCD123 標的を NLC チップ (BioRad) 上に 600 RU のレベルまで不動化した。TCE フォーマットでの 96 ウェル精製 CD123 特異的アンキリン反復タンパク質の bio.hCD123 への相互作用は、DARPin (登録商標) 分子を 50 nM で注入し、100 μL / 分の一定流量を用いて、120 秒の会合及び 1200 秒の解離によって測定した。いくつかの DARPin タンパク質を 600 秒の解離を用いて再注入した。10 mM グリシン pH 2.5 を用いて、個々の測定の間に標的を再生した。シグナルを、L1 及び A6 の泳動用緩衝液 (PBS-T) 処理された対照レーンに対して二重参照した。この研究で得られた K_D 値を表 2a に要約する。

10

【0171】

表 2a は、TCE フォーマット (すなわち、CD3 特異的アンキリン反復ドメインでフォーマット化) における、DARPin (登録商標) タンパク質について得られた K_D 値を示す。解離定数 (K_D) を、当業者に既知の標準的な手順を用いて、推定されたオンレート及びオフレートから算出した。 K_D 値をシングルトレース SPR によって決定した。表 2a の値は複数の反復の平均である。

20

【0172】

【表 2】

表 2a

DARPin (登録商標) タンパク質 (TCE フォーマット)	K_D (M)
DARPin (登録商標) タンパク質 #3	5.2E-10
DARPin (登録商標) タンパク質 #5	8.5E-9
DARPin (登録商標) タンパク質 #1	1.2E-08
DARPin (登録商標) タンパク質 #6	4.5E-09
DARPin (登録商標) タンパク質 #4	4.5E-08
DARPin (登録商標) タンパク質 #9	2.1E-09
DARPin (登録商標) タンパク質 #7	9.3E-10
DARPin (登録商標) タンパク質 #8	1.0E-09

【0173】

30

更に、組換えヒト CD123 標的に対する 3 つの追加的な精製アンキリン反復タンパク質の結合親和性を、測定し、DARPin タンパク質 #1、#3 ~ #9 について上記のような手順で分析した。簡潔には、ニュートラアビジンを NLC チップ (BioRad) 上に 6000 RU のレベルまでプレコーティングした。第 2 の工程では、bio.hCD123 を 1030 RU のレベルに不動化した。100 nM、33 nM、11 nM、3.7 nM、及び 1.2 nM の段階希釈を使用して、DARPin タンパク質 #12、DARPin タンパク質 #13、及び DARPin タンパク質 #14 の bio.hCD123 への結合を測定した。記載された全ての測定について、100 μL / 分の一定流量を用いた 120 秒の会合及び 1200 秒の解離を適用した。CD123 標的を、各々 30 秒間適用した 2 つの異なる条件 (10 mM グリシン pH 2.0 及び 4 M MgCl₂) で再生した。シグナルを、interspot 及び泳動用緩衝液 (0.005% Tween 20 (登録商標) を含有する PBS-T - PBS pH 7.4) 処理された対照レーン A6 に対して二重参照した。1:1 ラングミュアモデルをフィッティングに使用した。この研究で得られた K_D 値を表 2b に要約する。

40

【0174】

表 2b は、bio.hCD123 全長標的に結合する、本発明の CD123 特異的アンキリン反復タンパク質の K_D 値を示す。 K_D 値を、当業者に既知の標準的な手順を用いて、推定されたオンレート及びオフレートから算出した。表 2b の値は複数の反復の平均である。

【0175】

50

【表3】

表2 b

タンパク質	K_D (M)
DARPinタンパク質#12	4.9E-10
DARPinタンパク質#13	2.0E-11
DARPinタンパク質#14	2.0E-11

【0176】

図1(A～B)は、ヒトCD123に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴(SPR)分析を示す。図1AはDARPin(登録商標)タンパク質#13のSPR分析を示し、図1BはDARPin(登録商標)タンパク質#14のSPR分析を示す。

10

【0177】

実施例3：雌BALB/cマウスにおけるCD123特異的アンキリン反復タンパク質の薬物動態分析

本発明のCD7123特異的アンキリン反復ドメインが、治療剤の開発に有用するためにインビボで適切な血清半減期を有し得るかどうかを決定するために、DARPin(登録商標)タンパク質#2、DARPin(登録商標)タンパク質#12、DARPin(登録商標)タンパク質#13、及びDARPin(登録商標)タンパク質#14の薬物動態プロファイルを、マウスで分析した。そのために、DARPin構築物をサブクローニングし、上記のようにpQE30(Qiagen)発現ベクターの誘導体に発現させることで、N末端Hisタグ(配列番号66など)、半減期延長に関するHSA結合アンキリン反復ドメイン(そのような配列番号32)、ペプチドライナー(配列番号43など)、及びCD123特異的結合ドメインのC末端の1つをコードする発現構築物を得る。

20

【0178】

インビボ投与及び試料採取

上記のヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメイン(配列番号32)でフォーマットした、DARPin(登録商標)タンパク質#2、DARPin(登録商標)タンパク質#12、及びDARPin(登録商標)タンパク質#13、及びDARPin(登録商標)タンパク質#14を、各アンキリン反復融合タンパク質について、6匹のマウスの尾静脈に単回静脈内ボーラス注射として投与した。目標用量レベルは、5mL/kgの適用容量で1mg/kgである。アンキリン反復融合タンパク質を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液中に配合する。

30

【0179】

マウスを、等しい数の動物を有する2つの群に分割する。各マウスから4つの血清試料を採取する。薬物動態調査のための血液試料を、化合物投与後5分、4時間、24時間、48時間、76時間、96時間、及び168時間に採取する。血液を室温に維持して凝固させ、続いて遠心分離し、血清を採取する。

【0180】

血清試料中のアンキリン反復タンパク質を測定するためのELISAによる生物分析

40

PBS中の10nMのポリクローナルヤギ抗ウサギIgG抗体(Ab18)の1ウェル当たり100μLを、NUNC Maxisorb ELISAプレートに4で一晩コードティングする。1ウェル当たり300μLのPBST(0.1%のTween20を添加したPBS)で5回洗浄した後、Heidolph Titramax 1000振盪器(450rpm)で、0.25%のカゼイン(PBST-C)を補充した300μLのPBSTで、室温(RT)で1時間ウェルをブロックする。プレートを上記のように洗浄する。PBST-C中の100μLの5nmol/Lのウサギ抗DARPin(登録商標)1-1-1抗体を添加し、プレートを軌道振盪(450rpm)しながら室温(22)で1時間インキュベートする。上記のようにプレートを洗浄する。

【0181】

50

希釈した血清試料（1：5の希釈工程で1：20～1：312500）又はアンキリン反復タンパク質標準曲線試料（1：3の希釈工程で0及び50～0.0008 nmol/L）の100 μLを、450 rpmで振盪しながら、室温で2時間適用する。プレートを上記のように洗浄する。

【0182】

次いで、ウェルを100 μLのマウス抗RGS-His-HRP IgG（Ab06、PBST-C中1：2000）と共にインキュベートし、室温、450 rpmで1時間インキュベートする。プレートを上記のように洗浄する。100 μL/ウェルのTMB基質溶液を5分間使用して、1 mol/LのH₂SO₄を100 μL添加することによって停止させてELISAを展開する。450 nmでの吸光度及び620 nmでの吸光度の差を算出する。試料は、2つの異なるプレートにて二連で測定する。

【0183】

薬物動態解析

薬物動態データ分析を、Phoenix 64、Pharsight、North Carolinaの一部としてWinNonlinプログラムのバージョン7.0を使用して、Molecular Partnersで行う。静脈内ボーラス注射を介して投与された動物の平均濃度-時間データに基づく薬物動態パラメータの算出を、ノンコンパートメント分析（NCAモデル200-202、IVボーラス、線形台形線形補間）を用いて行う。薬物動態パラメータは、以下のように算出される：

AUC_{inf}、AUC_{last}、AUC_%extrapol、C_{max}、T_{max}、
C₁_pred、V_{ss}_pred、t_{1/2}。

【0184】

最大血清濃度（C_{max}）及びそれらの発生時間（T_{max}）は、血清濃度-時間プロファイルから直接得られる。血清濃度-時間曲線の下の面積（AUC_{inf}）は、最後のサンプリング点（T_{last}）までの線形台形公式及び終末相の单一指数関数的減少を仮定した無限大への外挿によって決定する。無限大までの外挿は、C_{last}/zを使用して実行され、ここで、zは、対数線形回帰によって推定された最終速度定数を示し、C_{last}は、最終対数線形回帰によってT_{last}で推定された濃度を示す。総血清クリアランス（C₁_pred）及び見かけの終末相半減期を以下のように算出する：C₁_pred = 静脈内用量 / AUC_{inf} 及び t_{1/2} = ln 2 / z。定常状態分布体積V_{ss}は、以下によって決定する：V_{ss} = i.v.投与量 · AUMC_{inf} / (AUC_{inf})²。AUMC_{inf}は、AUC_{inf}の計算について記載したのと同じ外挿手順を使用して、無限大に外挿された薬物濃度-時間曲線の第1の瞬間の総面積を示す。nmol/Lの用量で与えられた濃度に基づいてPKパラメータを算出するために、mg/kgとして与えられた投与量値をアンキリン反復タンパク質の分子量を使用してnmol/kgに変換する。表3は、上記のようにヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメインでフォーマット化された、4つのアンキリン反復タンパク質である、DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPin（登録商標）タンパク質#12、DARPin（登録商標）タンパク質#13、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14のおよその予測半減期を示す。

【0185】

【表4】

表3：2つの例示的なHSA x CD123特異的アンキリン反復タンパク質の半減期（t_{1/2}）

パラメータ	単位	DARPin (登録商標) タンパク質#2	DARPin (登録商標) タンパク質#12	DARPin (登録商標) タンパク質#13	DARPin (登録商標) タンパク質#14
HL_Lambda_z (半減期)	時間	約29	約23	約29	約30

10

30

40

50

【0186】

結論として、本発明のCD123特異的アンキリン反復ドメインは、半減期延長部分、例えば血清アルブミン特異的結合ドメインなどと組み合わせて、治療剤の開発に有用であるためにインビオで適切な血清半減期を達成することができる。

【0187】

実施例4：CD123発現腫瘍細胞への本発明のアンキリン反復タンパク質結合の結合の決定

腫瘍細胞の表面上に発現されたCD123に対する本発明の結合タンパク質の結合を、蛍光活性化細胞選別（FACS）フローサイトメトリーによって分析した。この目的のために、CD123発現腫瘍細胞（Molm-13 N1）を、96ウェルプレートに1ウェル当たり100'000細胞で播種した。単一特異性フォーマットのDARPinタンパク質#2、DARPinタンパク質#3、DARPinタンパク質#9、DARPinタンパク質#12、DARPinタンパク質#13、及びDARPinタンパク質#14を、2000nMで開始して、1:5の希釈比で滴定した。腫瘍細胞を、希釈したDARPinタンパク質で再懸濁し、4で60分間インキュベートした。アッセイは、2%ウシ胎児血清を含み、ヒト血清アルブミン20μM（HSA）を含まないPBS中で行った。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で2回洗浄した後、DARPin（登録商標）タンパク質特異性腫瘍細胞結合を、非標識一次抗ウサギDARPin（登録商標）抗体（抗ウサギ1-1-1抗体、CePower）を2ug/mLで添加することによって検出した。続いて4で少なくとも30分間のインキュベーション工程を行った。その後、細胞をPBSで洗浄し、Alexa Fluor 488抗体（Thermo Fisher）で標識した2μg/mLの抗ウサギニセヤギ抗体を添加した。同じインキュベーション条件を適用した。最後に、細胞を2回洗浄し、Cytofix固定緩衝液（BD Biosciences）中に室温（RT）で15分間再懸濁した。Alexa Fluor 488 DARPin（登録商標）タンパク質標識腫瘍細胞の蛍光強度中央値（MFI）を、分析用のFlowJoソフトウェア、及びデータプロット用のGraphPad Prism 8を用いて、Attune NXT（Thermo Fisher）によって測定した（図2は、CD123発現腫瘍細胞に対する、DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPinタンパク質#3、DARPin（登録商標）タンパク質#9、DARPinタンパク質#12、DARPin（登録商標）タンパク質#13、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14の結合曲線を示す）。表4は、それらのEC50値によって表される、6つの例示的なアンキリン反復タンパク質の結合の定量化を示す。

【0188】

【表5】

表4

タンパク質	EC50(nM)
DARPinタンパク質#2	29
DARPinタンパク質#3	77
DARPinタンパク質#9	7.9
DARPinタンパク質#12	3.2
DARPinタンパク質#13	0.41
DARPinタンパク質#14	1.3

【0189】

実施例5：標的特異的短期T細胞活性化アッセイを用いた、T細胞エンゲージャフォーマットにおける本発明のCD123特異的アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力の評価。

実施例4の上述した例示的なCD123特異的アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力を、CD8+T細胞上のCD25活性化マーカのFACS測定によるインビトロ短期T細胞活性化アッセイにおいて評価した。試験したタンパク質、DARPinタンパク質#2、DARPinタンパク質#9、DARPinタンパク質#12、DARPinタン

10

20

30

40

50

パク質 # 1 3 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 4 を、二重特異性 T 細胞エンゲージャフォーマットで評価した。このような T 細胞エンゲージャタンパク質は、前述の C D 1 2 3 特異的アンキリン反復ドメインにくわえて、 C D 3 特異的結合ドメイン（配列番号 3 6 ）を含み、これらはそれぞれ、 D A R P i n タンパク質 # 1 8 、 D A R P i n タンパク質 # 1 9 、 D A R P i n タンパク質 # 1 5 、 D A R P i n タンパク質 # 1 6 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 7 として示されている。

【 0 1 9 0 】

したがって、 1 ウェル当たり 1 0 0 , 0 0 0 個の精製された汎 T エフェクター細胞及び 2 0 , 0 0 0 個の M o l m - 1 3 標的細胞を、 6 0 0 μ M ヒト血清アルブミンの存在下、 3 7 で 4 8 時間、選択された D A R P i n タンパク質の段階希釈物と 2 連で同時インキュベートした（ E : T 比 5 : 1 ）。 4 8 時間後、細胞を洗浄し、 1 : 1 , 0 0 0 の L i v e / D e a d G r e e n (T h e r m o F i s h e r) 、 1 : 4 0 0 マウス抗ヒト C D 8 P a c i f i c B l u e (B D) 、及び 1 : 1 0 0 マウス抗ヒト - C D 2 5 P e r C P - C y 5 . 5 (e B i o s c i e n c e s) 抗体を用いて、 4 で 3 0 分間染色した。洗浄及び固定後、細胞を A t t u n e N x T (T h e r m o F i s h e r) 機で分析した。 T 細胞活性化を、 L i v e / D e a d 陰性及び C D 8 + ゲート T 細胞上の C D 2 5 + 細胞を測定することによって評価した。 F l o w J o ソフトウェアを用いて F A C S データを分析し、 G r a p h P a d P r i s m 8 (3 - P L - フィット) を用いてデータをプロットした。図 3 は、活性化マーカ C D 2 5 によって測定される、 D A R P i n タンパク質 # 1 8 、 D A R P i n タンパク質 # 1 9 、 D A R P i n タンパク質 # 1 5 、 D A R P i n タンパク質 # 1 6 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 7 によって引き起こされる短期 T 細胞活性化を示す。試験した本発明の C D 1 2 3 特異的結合タンパク質は全て、 T 細胞エンゲージャフォーマットで、腫瘍細胞上に発現した C D 1 2 3 に結合し、 T 細胞を活性化することができた。

【 0 1 9 1 】

実施例 6 : 標的特異的短期腫瘍細胞殺傷アッセイを用いた、 T 細胞エンゲージャフォーマットにおける本発明の C D 1 2 3 特異的アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力の評価。

T 細胞エンゲージャフォーマット（すなわち、それぞれ D A R P i n タンパク質 # 1 8 、 D A R P i n タンパク質 # 1 9 、 D A R P i n タンパク質 # 1 5 、 D A R P i n タンパク質 # 1 6 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 7 ）における、本発明の C D 1 2 3 特異的アンキリン反復タンパク質、 D A R P i n タンパク質 # 2 、 D A R P i n タンパク質 # 9 、 D A R P i n タンパク質 # 1 2 、 D A R P i n タンパク質 # 1 3 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 4 の特異性及び効力もまた、 L D H 放出によるインピトロ短期細胞傷害性アッセイによって評価した。この理由のために、 1 0 0 , 0 0 0 個の精製汎 T エフェクター細胞及び 2 0 , 0 0 0 個の M o l m - 1 3 標的細胞 / ウェルを、 6 0 0 μ M ヒト血清アルブミンの存在下において、選択されたアンキリンタンパク質の段階希釈物と 2 連で、 3 7 にて 4 8 時間にわたり共インキュベートした（ E : T 比 5 : 1 ）。 4 8 時間のインキュベーション後、細胞をスピンドラウンドし、各ウェルの 1 0 0 μ L の上清を、製造業者のプロトコル（ L D H 検出キット； R o c h e A p p l i e d S c i e n c e 、インキュベーション 3 0 分間）に従って L D H 放出について分析した。吸光度を、 T E C A N i n f i n i t e M 1 0 0 0 P r o リーダーによって 4 9 2 n m ~ 6 2 0 n m で測定した。 G r a p h P a d P r i s m 8 を使用して O D 値をプロットした。

【 0 1 9 2 】

図 4 は、 D A R P i n タンパク質 # 1 8 、 D A R P i n タンパク質 # 1 9 、 D A R P i n タンパク質 # 1 5 、 D A R P i n タンパク質 # 1 6 、及び D A R P i n タンパク質 # 1 7 によって引き起こされる腫瘍細胞殺傷を示す。

【 0 1 9 3 】

試験した本発明の C D 1 2 3 特異的結合タンパク質は全て、 T 細胞エンゲージャフォーマットで、腫瘍細胞上に発現した C D 1 2 3 に結合し、腫瘍細胞を次いで死滅させる T 細

胞を活性化することができた。

【0194】

実施例7：本発明のCD123特異的結合タンパク質によって結合されるCD123エピトープの決定

本発明のCD123特異的アンキリン反復タンパク質によって結合されるCD123エピトープを、短縮型CD123標的タンパク質を用いて、並びにベンチマーク対照分子フロテツズマブ類似物(Evitriaから購入したCD3-CD123特異的DART(登録商標))及び天然リガンドIL-3(Protechより購入)に対する競合ELISA及びHTRFを用いて調査した。

【0195】

最初に、全長(NTD/D2/D3ドメイン)及び短縮型(D2/D3ドメイン)CD123標的(Evitriaから購入)を、それらをDARPin(登録商標)タンパク質#1とインキュベートし、結合を、全長CD123についてはHTRF試薬Anti-6His-d2及びストレプトアビシン-Tb、又は短縮型CD123についてhIgG-d2及び抗His-Tbのいずれかを用いることによって検出した、HTRF結合アッセイに適用した。最初に、DARPin(登録商標)タンパク質#1、非結合DARPin分子(対照として、DARPin(登録商標)タンパク質#20)、及び短縮型標的(D2-D3-hCD123)を、PBS(0.1%(v/v)Tween20(登録商標)及び0.2%ウシ血清アルブミンを含有するPBS)を用いて、それぞれ、80nM及び24nMに希釈し、384ウェルプレート(PerkinElmer、6008280)に添加した。第2の工程では、HTRF試薬hIgG-d2及び抗His-Tbを、PBS中でそれぞれ1:150及び1:200に希釈した後、反応混合物に適用した。反応物を室温で2時間40分間インキュベートした。反応の励起を340nmで測定し、発光を665nmで測定し、バックグラウンドを340nM及び620nMでそれぞれ測定した。次いで、DARPin(登録商標)タンパク質#1の粗抽出物を、PBS(0.1%(v/v)Tween20(登録商標)及び0.2%ウシ血清アルブミンを含有するPBS)を用いて1:250(最終1:1000)に希釈し、384ウェルプレート(PerkinElmer、6008280)に添加した。全長及びビオチン化標的bio.hCD123-Fc(kih)-Aviを、5.3nM(最終4nM)に希釈し、両方とも1:300に希釈した(最終1:400)HTRF試薬抗6His-d2及びStrep-Tb(cisbio)と混合した。混合物を粗抽出物に適用し、室温で1時間インキュベートした。反応の励起を340nmで測定し、発光を665nmで測定し、バックグラウンドを340nM及び620nMでそれぞれ測定した。結合を、全長CD123についてはHTRF試薬抗6His-d2及びストレプトアビシン-Tb、又は短縮型CD123標的についてはhIgG-d2及び抗His-Tbのいずれかを用いることによって検出した。

【0196】

図5に示すように、全長(図5A)及び短縮型CD123(図5B)の両方に対する強い結合シグナルが、DARPin(登録商標)タンパク質#1については検出されたが、非結合DARPin(DARPin(登録商標)タンパク質#20)及び緩衝液対照(PBS)については検出されなかった。

【0197】

次に、ヒトCD123標的への結合についてのCD123特異的結合タンパク質DARPin(登録商標)タンパク質#2、フロテツズマブ、及びIL3(CD123の天然リガンド)の競合を、競合ELISAによって評価した。簡単に記載すると、Nunc MaxiSorp 96ウェルプレートを、40nMのDARPin(登録商標)タンパク質#2又は5nMのフロテツズマブ類似物により一晩コーティングした。ELISAプレートを3回洗浄し、PBS(0.1%(v/v)Tween20(登録商標)及び0.25%カゼインを含有するPBS)で、450rpmにて3時間10分間にわたりプロッキングした。一方で、2000nM(最終1000nM)のDARPin(登録商標)

10

20

30

40

50

タンパク質 # 2、並びにフロテツズマブ及び 600 nM (最終 300 nM) の IL-3 を、40 nM (最終 20 nM) の bio. hCD123 全長標的と 1:1 の比で室温にて 2 時間プレインキュベートした。競合物質を含まない bio. hCD123 を陽性対照として含めた。次いで、プレインキュベートした試料をコーティングした Maxisorp プレートに添加し、室温及び 450 rpm で 30 分間インキュベートした。プレートを、PBS ST で 3 回洗浄した後、ストレプトアビジン - POD 抗体 (Roche、カタログ番号: 11089153001) で標的を検出した。検出のために、新たに調製した TM B 緩衝液 (30 mM クエン酸緩衝液 pH 4.1、5% (v/v) TMB 溶液 (Carl Roth GmbH 製) 及び 0.16% H2O2) を添加し、反応を 1M H2SO4 で停止させた。吸光度を OD 450 で測定し、Sunriseマイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて OD 620 について参照した。緩衝液 (PBS) 値を差し引くことによってデータを分析した。GraphPad Prism を分析に使用した。

【0198】

ヒト CD123 標的を 50 倍モル過剰のフロテツズマブ類似物、及び 15 倍モル過剰の IL-3 とプレインキュベートする際、DARPin (登録商標) タンパク質 # 2 への結合を競合することができなかった (図 6A)。結合シグナルの部分的な減少のみが観察された。フロテツズマブ類似物をマイクロプレート上に不動化し、かつ DARPin (登録商標) タンパク質 # 2 及び IL-3 を競合物質として適用した場合、同じことが観察された (図 6B)。データは、DARPin (登録商標) タンパク質 # 2、フロテツズマブ類似、及び IL-3 が、CD123 上の異なる部位に結合する可能性が高いことを示している。全体として、得られたデータは、DARPin (登録商標) タンパク質 # 2 が CD123 の D2/D3 ドメインに結合し、結合についてフロテツズマブ又は IL-3 と競合しないことを示唆している。

【0199】

実施例 8 : PBMC ヒト化マウス及び MOLM-13 腫瘍モデルにおける、DARPin (登録商標) タンパク質 # 13 を含む例示的なマルチドメイン TCE 結合タンパク質のインビオ有効性評価

ヒト血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つのアンキリン反復ドメイン、それぞれ腫瘍関連抗原 1 (TAA1) 及び腫瘍関連抗原 2 (TAA2) に対する結合特異性を有する 2 つのアンキリン反復ドメイン、並びに CD3 に対する結合特異性を有する 1 つのアンキリン反復ドメインを追加的に含む、マルチドメイン T 細胞エンゲージャ結合タンパク質でフォーマットされた DARPin (登録商標) タンパク質 # 13 を、腫瘍細胞株 MOLM-13 を保有する末梢血単核細胞 (PBMC) ヒト化マウスモデルで試験した。インビオ実験を、6 ~ 9 週齢の雌免疫不全 NXG マウス (Janvier Labs によって提供された) において実施した。マウスを、標準的な齧歯類マイクロアイソレーター (20 ± 1 の室温、50 ± 10 % の相対湿度及び 12 時間の明暗サイクル) 内の標準化環境条件下で維持した。マウスに、放射線照射食品及び床敷並びに 0.22 um 濾過飲料水を与えた。全ての実験は、スイス動物保護法に従って州及び連邦の獣医学当局からの認可を受けて行った。

【0200】

マウスに、PBMC (2 人の異なるドナーからのバフィーコートから調製した 5 × 10⁶ 個の PBMC) を、癌細胞の異種移植の 2 日前に腹腔内注射した。MOLM-13 細胞を、マウスの右側腹部の皮下に (s.c.) 異種移植した。2 匹の hPBMC ドナーを使用した。処置は、癌細胞移植の 4 日後に静脈内 (i.v.) 注射した。処置は以下のように施した：

- マルチドメイン TCE フォーマットの DARPin (登録商標) タンパク質 # 13、又はビヒクルを、0.5 mg/kg で 2 週間にわたり、週に 3 回、i.v. 投与した

【0201】

腫瘍サイズをキャリパー測定によって評価した。腫瘍体積は、以下の式を用いて計算した：腫瘍体積 (mm³) = 0.5 × 長さ × 幅²。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 2 】

図 7 (A ~ B) に見られるように、マルチドメイン T C E フォーマットでの D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 3 は、実験の全期間にわたって (図 7 A) 、及び最初の注射の 1 7 日後に (図 7 B) 、腫瘍増殖及び腫瘍体積の阻害に関して良好な有効性を示した。

【 0 2 0 3 】

本明細書は、明細書内で引用された参考文献の教示に照らして最も十分に理解される。本明細書内の態様は、本発明の態様の例示を提供し、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。当業者は、多くの他の態様が本発明に包含されることを容易に認識する。本開示で引用された全ての刊行物、特許、及び G e n B a n k 配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。参照により組み込まれる資料が本明細書と矛盾するか、又は一致しない限り、本明細書は、任意のそのような資料に優先する。本明細書における参考文献の引用は、そのような参考文献が本発明に対する先行技術であることを認めるものではない。

【 0 2 0 4 】

当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の態様に対する多くの等価物を認識するか、又は日常的な実験のみを使用して確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【 0 2 0 5 】

【 表 6 - 1 】

配列

配列番号	説明	DARPinタンパク質	配列
1	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 1	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAEQGHEDIAEVLQKAA
2	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 2	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAEQGHEDIAEVLQKAA
3	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 3	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQYGRTPLHAAIKGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAVEGPLEIVEVLLKAGADVNAKDQYGRPLHAAAWGHLEIVEVLLKAGADVNA NAQDKSGKTPADLAARAGHEDIAEVLQKAA
4	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 4	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDEYGATPLHAAASGHLEIVEVLLKAGADVNA KDEWGRTPHLVAALSGHLEIVEVLLKAGADVNAKDHQGRTPHLAAALWGHLEIVEVLLKAVAD VNAQDKSGKTPADLAARAGHEDIAEVLQKAA
5	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 5	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDRFGYTPLHAAWTGHLEIVEVLLKAGADVNA KDAYGWTPHLHIAAHSGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAAGQGHEDIAEVLQKAA
6	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 6	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQAGQTPADLAAALGHEDIAEVLQKAA
7	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 7	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDEYGLTPLHAAEFGHLEIVEVLLKAGADVNA KDAHNGHTPLHLAAAYDHLLEIVEVLLKAGADVNAKDTSGKTPHLHAAQYGHLEIVEVLLKAGADV NAQDKSGKTPADLAARAGHEDIAEVLQKAA
8	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 8	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA DHGWTPHLHAAVGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNAGNTPADLVAFQGHEDIAEVLQKAA
9	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 9	DLGWKLLEAAIEGQDDEVVILLAAGADVNAKDQGKTPHLHAAAHGHLEIVEVLLKAGADVNA DEIGRTPLHLAAFKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGETPADLAARVGHEDIAEVLQKAA
10	CD123 - CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 # 10	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAEQGHEDIAEVLQKAA TPTPTPTPTPTPTGSDLQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTA AQTHLEIFEVLLKAGADVNAKDDKGVTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPAD LAAYGHEDIAEVLQKAA
11	CD123 - CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 # 11	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHLAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAEQGHEDIAEVLQKAA TPTPTPTPTPTPTGSDLQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTA AQTHLEIFEVLLKAGADVNAKDDKGVTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPAD LAAYGHEDIAEVLQKAA
12	アンキリン反復モジュール		KDQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA
13	アンキリン反復モジュール		KDSIGRTPLHLAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNA
14	アンキリン反復モジュール		KDQYGRTPHLAAIKGHLEIVEVLLKAGADVNA

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

(上記表の続き)

配列番号	説明	DARPinタンパク質	配列
15	アンキリン反復モジュール	KDSLGYTPLHAAVEGPLEIVEVLLKAGADVNA	
16	アンキリン反復モジュール	KDAYGQTPLHIAAAWGHLEIVEVLLKAGADVNA	
17	アンキリン反復モジュール	KDEYGATPLHAAAGHLEIVEVLLKAGADVNA	
18	アンキリン反復モジュール	KDEWGRTPLHVAALSGHLEIVEVLLKAGADVNA	
19	アンキリン反復モジュール	KDHQGRTPHLAAALWGHLEIVEVLLKAGADVNA	
20	アンキリン反復モジュール	KDRFGYTPLHAAWTGHLEIVEVLLKAGADVNA	
21	アンキリン反復モジュール	KDAYGWTPLHIAAHSGHLEIVEVLLKAGADVNA	
22	アンキリン反復モジュール	KDQEGLYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA	
23	アンキリン反復モジュール	KDSIDRTPLHAAYGKGLLEIVEVLLKAGADVNA	
24	アンキリン反復モジュール	KDEYGLTPLHAAEGHLEIVEVLLKAGADVNA	
25	アンキリン反復モジュール	KDANGHTPLHAAAYDHLEIVEVLLKAGADVNA	
26	アンキリン反復モジュール	KDTSGKTPPLHAAQYGHLEIVEVLLKAGADVNA	
27	アンキリン反復モジュール	KDIVGKTPPLHIAAWLGHLEIVEVLLKAGADVNA	
28	アンキリン反復モジュール	KDDHGWTPLHIAAHVGHLEIVEVLLKAGADVNA	
29	アンキリン反復モジュール	KDKGGITPLHIAAAAHGHLEIVEVLLKAGADVNA	
30	アンキリン反復モジュール	KDEIGRTPHLAAFKGHLEIVEVLLKAGADVNA	
31	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGKKLLEAARAGQDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHAAANGHKLIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPPLHAAANEGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA	
32	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGKKLLEAARAGQDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHAAANGHKLIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPPLHAAADGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA	
33	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGKKLLEAARAGQDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHAAANGHKLIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPPLHAAADGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA	
34	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKDSQGWTPLHTAAQGHLLEIFEVLLKAGADVNA AKDDKGVTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA	
35	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQGHLLEIFEVLLKAGADVNA AKDDKGVTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA	
36	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQGHLLEIFEVLLKAGADVNA AKNDKRVTPPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA	
37	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン	DLGQKLLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQGHLLEIFEVLLKAGADVNA KTNKRVTPPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA	

10

20

【0207】

【表 6 - 3】

(上記表の続き)

配列番号	説明	DARPinタンパク質	配列
38	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKLLEAAWAGQDDEVVILLAAAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQGHLLEIFEVLLKAGADVNA KNDKRVTPPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKLN
39	CD123標的タンパク質(ECD)		TKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNTDIECVKDAUDYMSMPAVNNSYCQFGAISLCEVNTY TVRVANPPFSTWILFPENSQPKWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVPGPAPADVQYDLYLNVN RRQQYECLHYKTDAAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILT PPNMTAKCNKTHSFHMWKMRSHFNRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQI RARERYEFLSAWSTPGRFECDQEEGANTRA
40	アンキリン反復モジュール		xDxxGxTPLHAXxxGxxIVxVLLxxGADVNA 式中、「x」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、シテイン、グリシン、又はプロリンではない)
41	アンキリン反復モジュール		xDxxGxTPLHAXxxGxxIVxVLLxxGADVNA 式中、1、3、4、6、14、15位の「x」は、任意のアミノ酸(好ましくは、シテイン、グリシン、若しくはプロリンではない)を表し、27位の「x」は、アスパラギン、ヒスチジン、又はチロシンからなる群から選択される
42	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン		GSDLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADV NAKDSIGRTPLHAAAGKGLLEIFEVLLKAGADVNAQDQLLGETPADLAAEQGHEDIAEVLQKAA
43	高PTペプチドリンカー		GSPTPTPTPTPTPTPTPTGS
44	高PTペプチドリンカー		GSPTPTPTPTPTPTPTPTPT
45	コンセンサスGSリンカー		[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]n、式中、nは、1、2、3、4、5、又は6である
46	Hisタグ		MRGSHHHHHH
47	Nキャップ		DLGKLLQAAQAGQDDEVRELLKAGADVNA
48	Nキャップ		DLGKLLQAAQAGQDDEVRELLKAGADVNA
49	Nキャップ		DLGKLLQAAQAGQDDEVRELLKAGADVNA
50	N-キャップ(ランダム化)		DLGXKLLXAAXXGGDDEVRELLAAGADVNA 式中、「x」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、シテイン、グリシン、又はプロリンではない)
51	Cキャップ		QDKFGKTPADIAADNGHEDIAEVLQKLN
52	Cキャップ		QDKSGKTPADLAARAGHEDIAEVLQKLA
53	Cキャップ		QDSSGFTPADLAALVGHEDIAEVLQKAA
54	Cキャップ(ランダム化)		QDXGXGXTPADLAAXXGHEDIAEVLQKLN 式中、「x」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、シテイン、グリシン、又はプロリンではない)
55	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 12	DLGWKLDDAAEIGGLDEVRELLKAGADVNAKDKQGQITPLHIAAAHGHLEIVEVLLKAGADVNAK D EIGRTPHLAAFKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIIIGETPADLAAVRGHEDIAEVLQKAA
56	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 13	DLGKKLLEAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDQIGRTPHLAAAGKGLLEIFEVLLKAGADVNAQDIIIGQTPADLAQGRGHQDIAEVLQKAA
57	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 # 14	DLGKLLQAALEGQDDEVRELLKAGADVNAKDIEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA DQIGRTPHLAAAGKGLLEIFEVLLKAGADVNAQDIIQGQTPADLAQGRGHQDIAEVLQKAA

30

40

【0208】

50

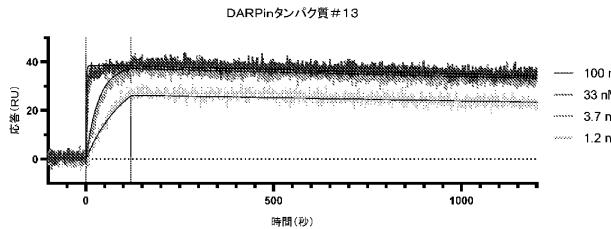
【表 6 - 4】

(上記表の続き)

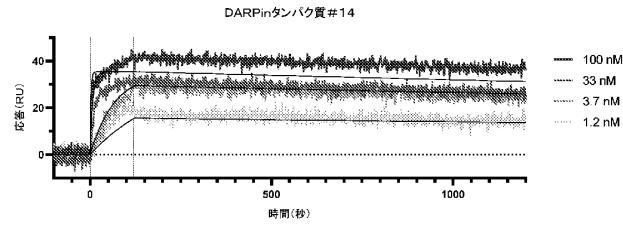
配列番号	説明	DARPinタンパク質	配列
58	アンキリン反復モジュール		KDQIGRTPLHAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNA
59	アンキリン反復モジュール		KDIEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA
60	CD123-CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 #15	DLGKLLDAEIGQLDEVRELLKAGADVNAKDKQGQITPLHIAAAHGHLEIVEVLLKAGADVNAK EIGRTPLHAAFKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGETPADLAAVRGHEDIAEVLQKAAGSPTP PTPTPTPTPTPTGSDLGQKLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQ GHLEIVEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNARDWSGTTPADLA KGHQDIAEVLQKAA
61	CD123-CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 #16	DLGKLLDAEALLEGQLDEVRELLKAGADVNAKDKQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDQIGRTPLHAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGQTPADLAAGRGHEDIAEVLQKAAGSPT PTPTPTPTPTPTGSDLGQKLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQ QTGHLEIVEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNARDWSGTTPADLA AAKYGHQDIAEVLQKAA
62	CD123-CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 #17	DLGKLLDAEALLEGQLDEVRELLKAGADVNAKDKQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA DQIGRTPLHAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGQTPADLAAGRGHEDIAEVLQKAAGSPT PTPTPTPTPTPTGSDLGQKLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQ TGHLIEFEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNARDWSGTTPADLA AKYGHQDIAEVLQKAA
63	CD123-CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 #18	DLGKLLDAEALLEGQLDEVRELLKAGADVNAKDKQEGYTPLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNA KDSIGRTPLHAAAYKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGQTPADLAEGGHQDIAEVLQKAAGSPT PTPTPTPTPTPTGSDLGQKLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQ AQTHLEIVEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNARDWSGTTPADLA AAKYGHQDIAEVLQKAA
64	CD123-CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標) タンパク質 #19	DLGKLLDAEIGQDDEVRELLAAGADVNAKDKQGQITPLHIAAAHGHLEIVEVLLKAGADVNAK DEIGRTPLHAAFKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDQIGETPADLAAVRGHEDIAEVLQKAAGSPTP PTPTPTPTPTPTGSDLGQKLEAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQ TGHLIEFEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNARDWSGTTPADLA AKYGHQDIAEVLQKAA
65	CD123に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標) タンパク質 #20	DLGKLLDAEARAGQDDEVRELLKAGADVNAKDKDGYTPLHAAAREGHLEIVEVLLKAGADVNA KDKDGYTPLHAAAREGHLEIVEVLLKAGADVNAQDKSGKTPADLAADAGHEDIAEVLQKAA
66	Hisタグ		MRGSHHHHHGS

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

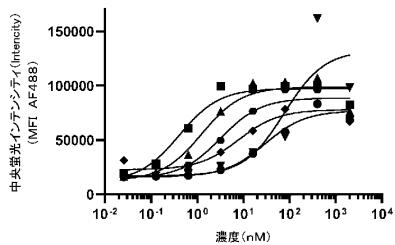
20

30

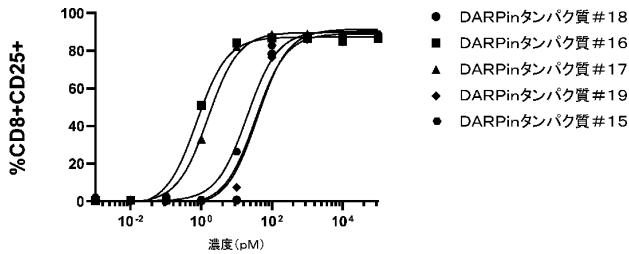
40

50

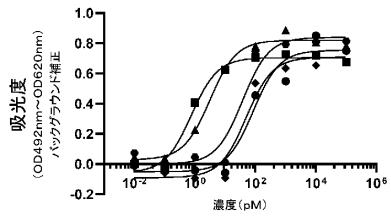
【図2】



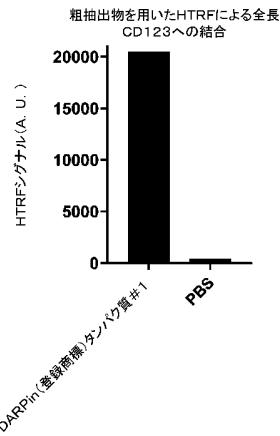
【図3】



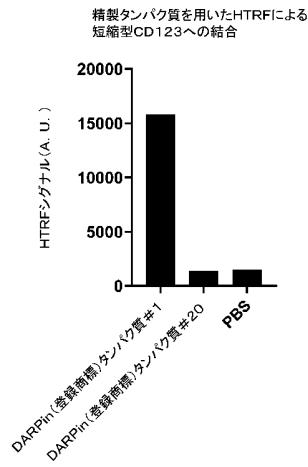
【図4】



【図5 A】

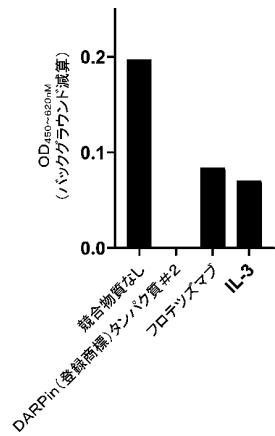


【図5 B】



【図6 A】

DARPin(登録商標)タンパク質#2



10

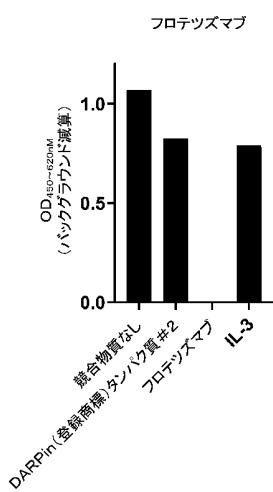
20

30

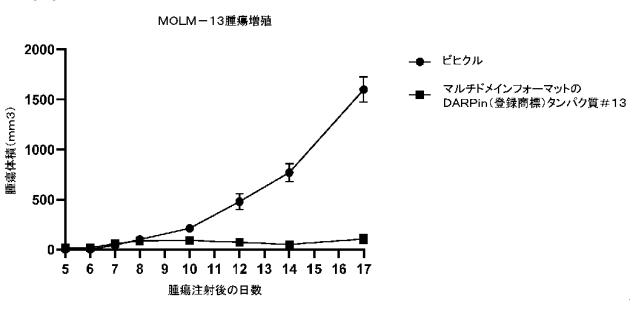
40

50

【図 6 B】



【図 7 A】



10

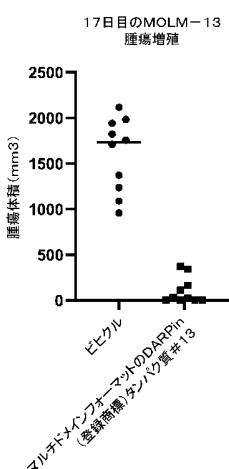
20

30

40

50

【図 7 B】



【配列表】

20245092410000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2022/052128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61P35/02 C07K16/28 C07K16/46
 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)

A61P C07K

10

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, 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.	
Y	<p>LI HONG ET AL: "Highlights of 2019 Protein Engineering Summit (PEGS) in Boston, USA: Advancing Antibody-Based Cancer Therapies to the Clinic", ANTI BODY THERAPEUTICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB</p> <p>, vol. 2, no. 4 30 September 2019 (2019-09-30), pages 79-87, XP009525570, ISSN: 2516-4236, DOI: 10.1093/abt/tbz010 Retrieved from the Internet: URL: http://academic.oup.com/abt/article-pdf/2/4/79/35906262/tbz010.pdf [retrieved on 2019-12-03] paragraph bridging page 83 and 84</p> <p>----- -/-</p>	1-30	20

 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 doubt 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

Date of mailing of the international search report

13 June 2022**29/06/2022**

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Voigt-Ritzter, Heike

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 3

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/052128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Anonymous: "Molecular Partners: Pioneering a new class of drugs with a broad portfolio and global partnerships", 1 November 2020 (2020-11-01), pages 1-36, XP55903556, Retrieved from the Internet: URL: https://investors.molecularpartners.com/static-files/2bbb524d-477e-451a-afd4-1a912bbcfe55 [retrieved on 2022-03-21] page 5</p> <p>-----</p>	1-30
A	<p>BINZ H. KASPAR ET AL: "Design and characterization of MP0250, a tri-specific anti-HGF/anti-VEGF DARPin drug candidate", MABS, vol. 9, no. 8, 16 October 2017 (2017-10-16), pages 1262-1269, XP55927972, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2017.1305529 abstract</p> <p>-----</p>	1-30
A	<p>VENUGOPAL SANGEETHA ET AL: "An Update on the Clinical Evaluation of Antibody-Based Therapeutics in Acute Myeloid Leukemia", CURRENT HEMATOLOGIC MALIGNANCY REPORTS, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 16, no. 1, 1 February 2021 (2021-02-01), pages 89-96, XP037429594, ISSN: 1558-8211, DOI: 10.1007/s11899-021-00612-w [retrieved on 2021-02-25] paragraph bridging page 91-92</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-30

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/052128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>By Geoffrey L ET AL: "Flotetuzumab as salvage immunotherapy for refractory acute myeloid leukemia Michigan Medicine Bone Marrow Transplant", 11 February 2021 (2021-02-11), pages 751-762, XP055805199, Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/bloc db1d2020007732.pdf?token=AQECABi208BE490oa n9khw_Ercy7Dm32L_9Cf3qfkAc485ysgAAA8IwggO -BgkqhkiG9w0BBwagggOvMIIDqwIBADCCA6QGCSqGS Ib3DQEhATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMJKcOEGOmvtR nMa9HAgEQgIIDdel5apxzyhkCCpTO4NqJoo_3irzc eUwGjVFCT6W6mspTfbQ80DzP4VQ-SiHcuP_Q-_YKwZ ixo3QVr6Ha [retrieved on 2021-05-18] the whole document</p> <p>-----</p>	1-30
A	<p>STEINER D ET AL: "Efficient Selection of DARPinS with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 382, no. 5, 24 October 2008 (2008-10-24), pages 1211-1227, XP025426617, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2008.07.085 [retrieved on 2008-08-06] abstract</p> <p>-----</p>	1-30
A	<p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>4 February 2021 (2021-02-04), "FAP-binding ankyrin repeat module, SEQ ID 66.", XP002806763, retrieved from EBI accession no. GSP:BIS20367 Database accession no. BIS20367 sequence</p> <p>-----</p>	1-30
A	<p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>4 February 2021 (2021-02-04), "CD137 (4-1BB) binding domain alternative 1 SEQ ID 24.", XP002806764, retrieved from EBI accession no. GSP:BIS35179 Database accession no. BIS35179 sequence</p> <p>-----</p>	1-30

Form PCT/MSA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IB2022/052128
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 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.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 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.</p>	
<p>3. Additional comments:</p>	

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)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

(32)優先日 令和3年12月9日(2021.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(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,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,NE,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,JM,JO,JP,KE,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,NG,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

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 ライヒエン クリストゥイアン

スイス 8 9 5 2 チューリッヒ ヒルツエンバッハシュトラーセ 6 8

(72)発明者 レシュケ ニーナ

スイス 4 1 2 7 ビルスフェルデン ムッテンツアーシュトラーセ 6 0

(72)発明者 シュレーレス ベルント

スイス 8 9 5 2 シュリーレン シュールシュトラーセ 8 2

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 EE59 FF70

4C084 AA02 AA07 AA13 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53 NA14 ZB26

ZB27

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 EA28 FA74