

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-540877

(P2022-540877A)

(43)公表日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/21	Z N A 4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K 14/52	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-502075(P2022-502075)	(71)出願人	522014057
(86)(22)出願日	令和2年6月25日(2020.6.25)		ケブンハウン ユニヴェルシティ
(85)翻訳文提出日	令和4年1月11日(2022.1.11)		デンマーク国 1 1 6 5 コペンハーゲン
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/067785		ケイ、ノレガデ 1 0
(87)国際公開番号	WO2021/008840	(71)出願人	517351950
(87)国際公開日	令和3年1月21日(2021.1.21)		ダンマークス テクニスケ ユニヴェルシ
(31)優先権主張番号	19186000.6		テート
(32)優先日	令和1年7月12日(2019.7.12)		デンマーク国 2 8 0 0 コンゲンズ リ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ュンビュー、アンカー エンゲルンド ヴ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(72)発明者	クレダル、トーマス、 ニッケ
			デンマーク国 2 8 0 0 コンゲンズ リ
			ュンビュー、アシルガテ 7 エ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C M V 感染に関連する疾患の治療のための融合毒素タンパク質

(57)【要約】

本発明は、C M V 感染に関連する疾患の治療に有用な免疫毒素に関する。本発明は、また、免疫毒素及び医薬品として免疫毒素を含む医薬組成物、並びに免疫毒素を含むC M V 感染の治療又は予防のためのキットに関する。

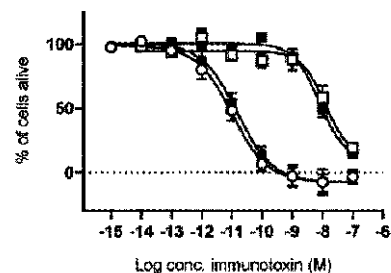


Fig. 5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下を含む免疫毒素であって：

i) 以下から選択されるアミノ酸配列を含む標的部分：

a) 配列番号 1、又は

b) 配列番号 1 と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、

i i) 毒素、

49 位の前記アミノ酸残基は、アラニン (A) 残基に置換され、1～6 位の前記アミノ酸残基は、N 末端において前記アミノ酸配列 I L D N G V S に置換される、免疫毒素。

【請求項 2】

(b) の前記アミノ酸配列が、配列番号 1 と少なくとも 90 % の配列同一性、例えば、配列番号 1 と少なくとも 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 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の免疫毒素。

【請求項 3】

前記標的部分が U S 2 8 受容体に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の免疫毒素。

【請求項 4】

前記 U S 2 8 受容体が以下：

i) 配列番号 3、又は

i i) 配列番号 3 と少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の免疫毒素。

【請求項 5】

前記ヒト相同受容体 C X 3 C R 1 についての前記免疫毒素の前記親和性が C X 3 C R 1 について C X 3 C L 1 (配列番号 1) の前記親和性に比べて低く、例えば、少なくとも 100 倍、例えば少なくとも 150 倍、例えば 200 倍、又は例えば少なくとも 250 倍少ない、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 6】

前記免疫毒素が C X 3 C R 1 についての前記親和性に比べて、U S 2 8 についての親和性が高く、例えば、少なくとも 75 倍、例えば少なくとも 100 倍、例えば少なくとも 150 倍、例えば 200 倍、又は例えば少なくとも 250 倍高い親和性である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 7】

前記 C X 3 C R 1 受容体が配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 5 又は 6 に記載の免疫毒素。

【請求項 8】

前記毒素が緑膿菌外毒素 A、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシン A 鎖、ブリオジン、ジフテリア、レストリクトシン、ジフテリア毒素及びその断片又は変異体からなる 1 つ以上の群から選択される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 9】

前記毒素が緑膿菌外毒素 A (配列番号 5) 又はその断片である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 10】

前記免疫毒素が配列番号 10 を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 11】

前記免疫毒素が、C X 3 C R 1 を発現する細胞に対する前記潜在能に比べて、U S 2 8 を発現する細胞に対する潜在能が高く、例えば、少なくとも 150 倍、例えば 175 倍、又は例えば少なくとも 200 倍、例えば少なくとも 225 倍、例えば少なくとも 250 倍高い潜在能である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の免疫毒素。

【請求項 12】

請求項 1～11 のいずれか一項に記載の免疫毒素又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

医薬品として使用するための請求項 1～11 のいずれか一項に記載の免疫毒素又は請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

CMV 感染又は CMV 関連疾患の前記治療又は予防に使用される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の免疫毒素又は請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

以下を含むキットであって：

i) 請求項 1～11 のいずれか一項に記載の免疫毒素又は請求項 12 に記載の医薬組成物、

ii) 1つ以上の追加の治療薬、及び

iii) 任意に、使用説明書、

i) 及び ii) は、同時に、別々に、又は連続して投与される、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CMV 感染に関連する疾患の治療に有用な免疫毒素に関する。本発明は、また、免疫毒素及び医薬品として免疫毒素を含む医薬組成物、並びに免疫毒素を含む CMV 感染の治療又は予防のためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

サイトメガロウイルス

サイトメガロウイルス (CMV) は、重要なヒト病原体及び主要な日和見感染であり、AIDS 患者、新生児、並びに例えば、移植レジメンの一部として免疫抑制剤を投与された個体等の免疫無防備状態の対象に現れて、疾患を発症する。これらの個体において、再出現及び／又は急性感染症の CMV の結果は、他の病理の中でも、網膜炎、脳炎及びニューモシスティスを含んで、悲惨になる可能性がある。さらに、免疫担当宿主において、CMV は、心臓移植及び粥腫切除術後の冠動脈閉塞、並びに血管形成術後の再狭窄を含む様々な炎症状態に結びついた持続的な一生にわたる感染症を確立する。CMV は、宿主の急性感染の間、及び一生にわたる潜伏感染状態の間、白血球と相互作用する。このように、白血球は、CMV が誘発する疾患に重要な役割を担い、ウイルスの播種のビヒクルとして、一生にわたる潜伏感染状態の間の住居の場として、感染症の急性期に関係する。

【0003】

現在、CMV 感染についての治療法は存在しない。ウイルス抑制剤は、CMV の複製を抑制するために使用されるが、強い副作用をもたらし、感染を抑制するに過ぎない。移植患者及び HIV / AIDS 患者の CMV 感染の治療に最も広く使用されている薬剤は、単純ヘルペスウイルス (HSV) のために元々開発された、ジェネリック医薬品のガンシクロビル及びアシクロビルである。ガンシクロビル及びアシクロビルは、HSV だけでなく CMV にも抑制効果を有する。ホスカビルも CMV 感染を抑制するために使用されているが、耐え難いほどの吐き気を引き起こすことが分かっている。小分子ターミナーゼ抑制剤であるプレバミスもウイルスの複製を抑制する。レテルモビルは、ウイルスの DNA プロセッシング及びパッケージングに必要とされる CMV DNA ターミナーゼ複合体 (pUL51、pUL56、及び pUL89) を抑制する。

【0004】

結論として、既存の薬剤は感染を根絶することはできず、免疫不全患者又は免疫抑制された患者において、CMV 疾患の進行を止めるだけである。したがって、有効性と毒性のレベルの両方で改善の余地がある。

【0005】

免疫毒素

免疫毒素は、毒素と結合するリガンドであり、リガンドについて受容体を発現する細胞

10

20

30

40

50

を殺傷するために使用することができる。免疫毒素治療は、リガンド標的治療法としても知られている。したがって、免疫毒素は、送達について標的部分（リガンド）及び細胞傷害性について毒素部分を含む。現在使用されているリガンドは、モノクローナル抗体、サイトカイン／成長因子及び可溶性受容体である。例えば、伝統的な化学療法薬を上回る免疫毒素の利点とは、細胞を分離して殺傷する必要がないことである。さらに、免疫毒素を効率的、選択的に内部移行すれば、抗原陰性細胞に副作用を引き起こさない。

【0006】

しかしながら、概して、免疫毒素は有効性の抑制レベルを示していない。一般的な問題は、免疫毒素は、疾患細胞に十分に特異的ではなく、さらに、疾患細胞に効率的に進入して、その細胞毒性効果を発揮することができないことが多いことである。免疫毒素は、おそらく免疫毒素の非特異的取り込みのために、その他の治療法よりも高いレベルの全身毒性も引き起こす。

10

【0007】

現在、抗原発現の毒性、免疫原性及び不均一性の問題を克服するために、免疫毒素に対する新しい方法が発見されている。これらの方法は、遺伝子工学を使用して、毒素の転位位置及び触媒ドメインをヒト一本鎖抗体に融合すること、ファージディスプレイを使用して、高親和性、腫瘍選択的リガンドを選択することを含む。二価構築物の使用も親和性と潜在能を高めることができる。その他の方法は、腫瘍血管内皮を標的にするリガンドの選択、及び癌遺伝子産物又は分化抗原の標的化に中心を置いている。ここ30年間で免疫毒素の研究が進んでいるにもかかわらず、ウイルス関連疾患に対する免疫毒素は市場で使用されていない。

20

【0008】

免疫毒素の内部移行

多くの免疫毒素は、悪性形質転換を起こしている細胞に対して、この形質転換の一部として開発されており、したがって、特定の抗原又は特定の抗原の群を過剰発現する。これらの抗原は、形質転換した細胞に過剰発現するが、形質転換した細胞に単に特異的であるだけでなく、正常細胞にも発現することが多い。したがって、ほんの少しの細胞性抗原しか形質転換した細胞に過剰発現しない。したがって、標的抗原を発現する正常細胞を殺傷することによって、望ましくない毒性を回避するために、薬の開発者は、極めて少ない候補となる疾患抗原を標的にするように制約を受け、彼らは、伝統的に、細胞種分布に基づいて、標的抗原単体を選択するように制約を受けてきた。結果として、多くの免疫毒素は、高親和性で標的抗原に結合するにもかかわらず、効率的に標的細胞に進入することができず、不十分な潜在能になってしまった。

30

【0009】

CMV感染に関連する疾患の治療のための免疫毒素

免疫毒素戦略を使用したCMV感染に関連する疾患を治療するための以前の試みは成功していない。

【0010】

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方に結合する毒素がCMV感染細胞を標的にするために使用されてきた。しかしながら、GPCRに対して抗体を開発することは容易ではなく、概して、抗体は、認識部位において、変異性でGPCRを認識していない。そのため、抗体結合は、受容体の機能性に関連していない受容体のバリエーションに非常に影響を受けやすく、したがって、エスケープ変異体のリスクが高まる（耐性の発現）。結果として、抗体に基づく戦略は、おそらく免疫毒素の不十分な（選択的）標的化及び／又は内部移行によって、確証的なインビボデータを生み出せていない。

40

【0011】

あるいは、免疫毒素の標的化部分は、抗体の代わりにペプチドであってもよい。WO 2008/003327では、構成的内部移行CMVコード受容体を標的化するように設計されたペプチドを含む免疫毒素を使用して、CMV細胞を標的化した。選ばれた受容体の1つとして、US28という名前のCMV特異的受容体があり、これは、ヒトサイトメガ

50

ロウイルスオープンリーディングフレームUS28によってコードされたGタンパク質結合受容体である。US28受容体を標的化する効率的な免疫毒素の設計についての課題は、CX3CR1という名前のヒト相同受容体の存在である。したがって、CX3CR1に対するUS28の選択性は、最小のオフターゲット問題を有する安全な免疫毒素を得るために、重要な特徴である。WO2008/003327では、ケモカインCX3CL1（フラクタルカイン）の変異バージョン、すなわち、CX3CR1の天然リガンドを標的部分として使用した。この戦略を用いて、CX3CR1に対するUS28の選択性が達成された。

【0012】

オフターゲットヒト相同受容体、CX3CR1の存在により、US28を発現する細胞に対して高親和性及び潜在能を有する免疫毒素を開発することは十分ではない。代わりに、免疫毒素は、(i)競合的結合環境において、CX3CR1発現細胞に比べて、US28発現細胞について高特異性、すなわち高親和性を有するべきであり、(ii)CX3CR1発現細胞に比べて、US28発現細胞に対して高い殺傷特異性、すなわち高潜在能を有するべきである。免疫毒素をクリニックに進めるために、重症な副作用を限定し、生産コストを減少させるために、US28選択性と殺傷特異性を高めることが重要である。

【0013】

そのため、改善された免疫毒素は有利であると思われ、特に、CX3CR1発現細胞よりも、US28発現細胞に高い選択性及び殺傷特異性を有する安全な免疫毒素が有利であると思われる。

【発明の概要】

【0014】

構成的に内部移行CMVコード受容体に向けた高親和性を有する免疫毒素を設計することによって、感染細胞による免疫毒素の効率的な取り込み、したがって感染細胞の死が達成される。免疫毒素の内部移行は免疫毒素媒介性細胞傷害性において律速段階であると考えられるため、構成的内部移行受容体を標的化することは、免疫毒素ベースの薬の使用の中心的な課題を解決する。さらに、本明細書に提示される免疫毒素は、健康な細胞と感染細胞を区別するように設計される。

【0015】

したがって、本発明の目的は、構成的内部移行受容体を標的にする免疫毒素に関し、免疫毒素を、その機能を発揮することができる、すなわち、細胞を殺傷することができる標的細胞に輸送することを保証する。さらに、本発明の免疫毒素は、高精度でCMV感染細胞のみを標的にし、CMV感染又はCMV関連疾患の治療又は予防に使用することができる。

【0016】

特に、高親和性を有する安全な薬として使用することができる改善された選択性及び殺傷特異性を有する免疫毒素を提供することが本発明の目的である。

【0017】

したがって、本発明の一態様は、以下を含む免疫毒素であって：

i) 以下から選択されるアミノ酸配列を含む標的部分：

a) 配列番号1、又は

b) 配列番号1と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

ii) 毒素、

49位のアミノ酸残基は、アラニン(A)残基に置換され、1～6位のアミノ酸残基は、N末端においてアミノ酸配列ILDNGVSに置換される。

【0018】

本発明の別の態様は、本発明に記載の免疫毒素又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物に関する。

【0019】

さらに、本発明の別の態様は、医薬品として使用される、本発明に記載の免疫毒素又は

10

20

30

40

50

医薬組成物を提供することである。

【0020】

またさらに、本発明の別の態様は、CMV感染又はCMV関連疾患の治療又は予防に使用される、本発明に記載の免疫毒素又は医薬組成物を提供することである。

【0021】

またさらに本発明の態様は、以下を含むキットを提供することであり：

- i) 本発明に記載の免疫毒素又は医薬組成物、
- ii) 1つ以上の追加の治療薬、及び
- iii) 任意に、使用説明書、
- i) 及び ii) は、同時に、別々に、又は連続して投与される。

10

【0022】

本発明の別の態様は、本発明に記載の免疫毒素をコードする配列を含む核酸配列を提供することである。

【0023】

本発明のさらなる態様は、適切な宿主における免疫毒素の産生に対して適切な1つ以上の制御配列に操作可能に結合された、本発明に記載のヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供することである。

【0024】

本発明のさらに別の態様は、本発明に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供することである。

20

【0025】

本発明のまたさらなる態様は、以下のステップを含む本発明に記載の免疫毒素を製造する方法に関する。

- a) 本発明に記載の宿主細胞を提供すること、
- b) 発現に適した条件下で、免疫毒素の宿主細胞を培養すること、
- c) 免疫毒素を単離すること。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、SYN001（黒色のシンボル）とSYN004（白色のシンボル）を比較する放射性リガンドとして、 ^{125}I -CCL2を使用した、US28発現HEK293細胞（円）の安定的に誘導可能なクローンの競合結合実験を示す。

30

【図2】図2は、SYN001（黒色のシンボル）とSYN004（白色のシンボル）を比較する放射性リガンドとして、 ^{125}I -CX3CL1を使用した、CX3CR1発現HEK293細胞（四角）の安定的に誘導可能なクローンの競合結合実験を示す。

【図3】図3は、SYN000（黒色のシンボル）とSYN003（白色のシンボル）を比較する放射性リガンドとして、 ^{125}I -CCL2を使用した、US28発現HEK293細胞（円）の安定的に誘導可能なクローンの競合結合実験を示す。

【図4】図4は、SYN000（黒色のシンボル）とSYN003（白色のシンボル）を比較する放射性リガンドとして、 ^{125}I -CX3CL1を使用した、CX3CR1発現HEK293細胞（四角）の安定的に誘導可能なクローンの競合結合実験を示す。

40

【図5】図5は、US28発現HEK293細胞（円）及びCX3CR1発現HEK293細胞（四角）の安定的に誘導可能なクローンにおける、SYN001（黒色のシンボル）とSYN004（白色のシンボル）を比較する殺傷実験を示す。

【図6】図6は、US28発現HEK293細胞（円）及びCX3CR1発現HEK293細胞（四角）の安定的に誘導可能なクローンにおける、SYN000（黒色のシンボル）とSYN003（白色のシンボル）を比較する殺傷実験を示す。

【図7】図7は、以下のドメイン構造の模式図を示し、(i) ヒトCX3CL1（SS＝シグナル配列、CX3CL1＝ケモカインドメイン、Stalk＝ムチン様stalk、M＝膜貫通部分及びC＝細胞質ドメイン）、(ii) 緑膿菌外毒素A（SS＝シグナル配列、ドメインI＝受容体結合ドメイン、ドメインII＝転移ドメイン、Ib＝未知の機能

50

を有するドメイン I b、及びドメイン I I I = 酵素活性ドメイン)。前駆体タンパク質についてのアミノ酸ナンバリングは、前述の各タンパク質に与えられる。関連するアミノ酸のナンバリングと共に角括弧を有する各タンパク質について、以下にジスルフィド架橋が示される。フリンは、外毒素 A のドメイン I I のアミノ酸 304 と 305 との間に切断する。

【図 8】図 8 は、薬剤物質の候補の模式図を示す。所与のドメインの変異は、免疫毒素がベースとなる天然タンパク質（すなわち、ヒト CX3CL1 又は緑膿菌外毒素 A）のアミノ酸位置に対応するその番号と共に、関連するアミノ酸の一文字のコードで記述される。例えば、C312S は、位置番号 312 のシステインがセリンに置換されたことを意味する。一文字のコードは、構築物の N 末端及び C 末端、ドメインの間にも使用される。2 つのドメインの間の破線は、アミノ酸が接続されていることを示す。

10

【0027】

以下に、本発明をより詳細に記載する。

【発明を実施するための形態】

【発明の詳細な説明】

【0028】

定義

本発明をさらに詳細に説明する前に、以下の用語と慣習を最初に定義する。

免疫毒素

本発明の文脈において、「免疫毒素」という用語は、細胞傷害性について送達（リガンド）と毒性部分（毒素）について、標的部分を含む二官能性分子を指す。免疫毒素は、リガンドについて受容体を発現する細胞を殺傷するために使用することができる。

20

【0029】

免疫毒素は、融合毒素タンパク質（FTP）とも呼ぶことができる。したがって、「免疫毒素」と「融合毒素タンパク質（FTP）」という用語は、本明細書では同義に使用される。

【0030】

リガンド又は標的部分

本発明の文脈において、「リガンド」という用語は、任意のアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を指し、例えば、ウイルスを起源とする受容体又は抗原に対して特異的な結合親和性を有する。

30

【0031】

本明細書では、リガンドは、所望の位置に免疫毒素を特異的に標的にするために使用される。したがって、リガンドは、「標的部分」とも呼ばれる。結果として、「リガンド」と「標的部分」という用語は、本明細書では同義に使用される。

【0032】

本明細書に記載の免疫毒素の標的部分は、ペプチド又はポリペプチドの形態が好ましい。

【0033】

ペプチド又はポリペプチド

本発明の文脈において、「ペプチド」又は「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基、関連する天然の構造変異体、及びペプチド結合によって結合されるその合成非天然類似体からなるポリマーを指す。「ペプチド」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書では同義に使用される。

40

【0034】

ポリペプチドは、組換え又は合成で製造することができる。ポリペプチドの組換え製造は、当業者に周知のように、既知の発現系において、目的のポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを導入することによって達成することができる。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチドシンセサイザを使用して合成することができる。

【0035】

50

ポリペプチド配列を描写するために、本明細書では通常の表記法が使用され、すなわち、ポリペプチド配列の左端は、アミノ末端（N末端）であり、ポリペプチド配列の右端は、カルボキシ末端（C末端）である。

【0036】

毒素

本発明の文脈において、「毒素」という用語は、細胞傷害性又は細胞分裂停止的であり、又はアポトーシス又は壊死を誘導し、又は病原体の複製、増殖又は播種を直接的に抑制し、又は感染細胞を感染した宿主免疫応答に弱いタンパク質又は非ペプチドである任意の物質を指す。

【0037】

毒素の例として、限定されないが、外毒素、内毒素、酵素毒素、膜孔形成毒素、スーパー抗原及びリボソーム不活性化タンパク質（RIP）が挙げられる。

【0038】

酵素毒素の例として、限定されないが、緑膿菌外毒素A、コレラ毒素、ジフテリア毒素、百日咳毒素、志賀毒素、ボツリヌス毒素、破傷風毒素、炭疽毒素及び黄色ブドウ球菌エクスフォリアチンBが挙げられる。

【0039】

膜孔形成毒素の例として、限定されないが、ヘモリジン、リステリオリジン、炭疽EF、アルファトキシン、ニューモリシン、ストレプトリジンO、ロイコシジン及びperfringiolysin Oが挙げられる。

【0040】

リボソーム不活性化タンパク質（RIP）の例として、限定されないが、緑膿菌外毒素A、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン、ジフテリア、レストリクトシン及びジフテリア毒素が挙げられる。

【0041】

CX3CL1及びCX3CR1

本発明の文脈において、「CX3CL1」という用語は、CX3Cケモカインファミリーのメンバーであるケモカインを指す。ケモカインは、細胞の移動を制御する低分子量のタンパク質である。多くのケモカインは、免疫系の細胞の成熟、活性化、増殖及び分化を誘導する能力も有する。CX3CL1はフラクタルカイン及びニューロタクチンとしても知られ、したがって、「CX3CL1」、「フラクタルカイン」及び「ニューロタクチン」という用語は本明細書では同義に使用される。

【0042】

CX3CL1は、対応するケモカイン受容体との相互作用を担うケモカインドメインを含む。ケモカインドメインは、配列番号1として挙げられるアミノ酸配列によって定義される。このアミノ酸配列は、エントリP78423の下、UniProtデータベースに与えられる天然ヒトCX3CL1の25位～99位に対応する。

【0043】

CX3CL1は本発明に従って改変されてもよい（すなわち、削除、挿入、及び／又は置換、結合等によって変異される）。

【0044】

CX3CL1は、「CX3CR1」という名前の対応する受容体と相互作用することによってその機能を発揮する。したがって、本発明の文脈において、「CX3CR1」という用語は、フラクタルカイン受容体を指し、配列番号4として挙げられるアミノ酸配列を有する。このアミノ酸配列は、エントリP49238の下、UniProtデータベースに与えられる天然ヒトフラクタルカイン受容体に対応する。

【0045】

内部移行

本発明の文脈において、「内部移行」という用語は、細胞外環境から細胞の細胞内区画への実体の移行を指す。したがって、本明細書に記載の免疫毒素の内部移行は、免疫毒素

10

20

30

40

50

の標的部分と相互作用する抗原を発現する細胞等の標的細胞の細胞内区画に免疫毒素を移行することを指す。

【0046】

免疫毒素の内部移行は、US28等の構成的内部移行受容体によって媒介されてもよい。構成的内部移行は、形質膜で発現し、先立つ刺激のない状態で、細胞形質膜から細胞質又は細胞内区画に内部移行する任意の抗原を指す。抗原内部移行は、リガンドによって調節することができ、内部移行された抗原は、形質膜に再循環してもよく、又は内部移行後に分解されてもよい。

【0047】

US28

本発明の文脈において、「US28」という用語は、ヒトサイトメガロウイルスオープンリーディングフレームUS28によってコードされるGタンパク質結合受容体を指す。US28は、構成的内部移行受容体であり、したがって、US28に結合するケモカイン又はその他の化合物は、受容体を発現する細胞に内部移行される。本発明の文脈において、US28は、配列番号3として挙げられるアミノ酸配列を有する。このアミノ酸配列は、エントリQ9IP69の下、UniProtデータベースに与えられるCX3CR1相同体に対応する。しかしながら、US28は異なる変異体に存在し、本明細書に記載の免疫毒素の標的化は、1つの特定の変異体、すなわち、US28のアミノ酸配列に限定されない。

【0048】

親和性

本発明の文脈において、「親和性」という用語は、結合親和性、すなわち、免疫毒素と受容体との結合相互作用の強度を指す。親和性は、異種結合実験における平衡解離定数 (K_i) として測定され、報告される。 K_i 値が小さいほど、その標的についてのリガンドの結合親和性は大きい。 K_i 値が大きいほど、標的分子とリガンドが互いに引きつけられ、結合する力が弱い。

【0049】

K_i は、限定されないが、等温滴定熱量測定 (ITC)、ELISA、ゲルシフトアッセイ、プルダウンアッセイ、平衡透析、分析用超遠心、SPR、及び分光アッセイ、飽和結合実験 (saturation binding experiments)、並びに同族及び異種競合結合実験を含む方法によって測定することができる。

【0050】

選択性

本発明の文脈において、「選択性」という用語は、US28についての免疫毒素の親和性対CX3CR1についての免疫毒素の親和性を指す。これは、式 $K_i(\text{US28}) / K_i(\text{CX3CR1})$ によって示すことができる。解離定数の指数は、異種結合の場合であるため、「i」で示される。

【0051】

潜在能

本発明の文脈において、「潜在能」という用語は、免疫毒素を投与した時の細胞生存率の減少を指す。潜在能は、したがって、阻害能として定義され、IC50値によって量化される。したがって、US28を発現する細胞に対する潜在能は、本明細書ではIC50 (US28) で示され、CX3CR1を発現する細胞に対する潜在能は、IC50 (CX3CR1) で示される。典型的には、IC50値はnMで報告され、高い潜在能に対応する免疫毒素の濃度が低いほど、低い潜在能に対応する免疫毒素の濃度は高い。

【0052】

殺傷特異性

本発明の文脈において、「殺傷特異性」という用語は、免疫毒素の、CX3CR1を発現する細胞に対するUS28を発現する細胞を特異的に殺傷する能力を指す。殺傷特異性は、CX3CR1を発現する細胞に対する (阻害) 能とUS28を発現する細胞に対する

10

20

30

40

50

(阻害)能との比として定量化される。したがって、殺傷特異性は、 $IC50(CX3CR1) / IC50(US28)$ として計算することができ、高い値は、US28を発現する細胞に対する殺傷特異性が高いことを示す。

【0053】

本明細書で定義される殺傷特異性は、いくつかの例では選択性指数としても示される。結果として、「殺傷特異性」と「選択性指数」という用語は、本明細書では同義に使用される。

【0054】

サイトメガロウイルス (CMV)

本発明の文脈において、「サイトメガロウイルス」又は「CMV」という用語は、ヘルペスウイルス科のウイルスを指す。ヒトCMV (HCMV) は、「ヒトヘルペスウイルス 5」、又は「HHV-5」とも呼ばれ、ヒトに感染することができるCMVを指す。

【0055】

CMV感染及びCMV関連疾患

本発明の文脈において、「CMV感染」又は「CMV関連疾患」は、疾患を有する個体におけるCMVの存在によって引き起こされる若しくはそれに関連する、又は疾患を有する個体の血清学的調査から明らかな疾患、症候群、病弊又は死亡率を指す。

【0056】

CMVは急性及び慢性疾患を引き起こしている。急性疾患は、高レベルのウイルス複製に関連し、多臓器に影響を及ぼすことを特徴とすることがもっとも多いが、単核球症様症候群、未成熟な小児の周産期感染症、移植レシピエントのCMV症候群、及びAIDS患者等の免疫不全患者の播種感染である。慢性感染は、低レベルのウイルス複製に関連することが最も多いが、先天性感染症、移植患者の血管疾患、正常な宿主の血管疾患、及び特に消化管の炎症疾患である。

【0057】

さらに、分子的又は血清学的方法のいずれかによって決定されるCMVの存在は、移植レシピエントの罹患率及び死亡率の増加に関連する。確かに、CMVの予防は、移植後の総死亡率の減少を示している。また、CMV感染は、固形臓器移植レシピエントの臓器拒絶及び造血幹細胞レシピエントの移植片対宿主病に関連する。

【0058】

アミノ酸配列

本発明の文脈において、「アミノ酸配列」という用語は、天然アミノ酸及び／又は人工アミノ酸類似体を含む一連の連続するアミノ酸を指す。アミノ酸配列は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド等のアミノ酸のポリマーであってもよい。遺伝暗号の縮重がある場合、1つ以上の核酸又はその相補的核酸は特異的ポリペプチド配列をコードし、ポリペプチド配列から決定することができる。

【0059】

変異体

本発明の文脈において、「変異体」という用語は、配列を含むポリペプチドを指し、1つ以上のアミノ酸位置において（異なるアミノ酸についてのアミノ酸の削除、アミノ酸の挿入、及び／又はアミノ酸の置換によって）、天然のポリペプチド配列と異なる。変異体配列は、非天然配列、すなわち、自然には見られない配列であってもよい。好ましくは、「変異体」は、天然ポリペプチドと同じ機能を保持する。したがって、「変異体」は、天然ポリペプチドと同じ又は高い親和性、選択性、潜在能又は殺傷特異性を有する免疫毒素である。

【0060】

断片

本発明の文脈において、「断片」という用語は、より大きい親ポリペプチドの抜粋である配列を含むポリペプチドを指す。したがって、断片配列は、親配列と連続するアミノ酸の強度を共有するが、長さは短い。好ましくは、「断片」は、親ポリペプチドと同じ機能

10

20

30

40

50

を保持する。したがって、「断片」は、天然ポリペプチドと同じ又は高い親和性、選択性、潜在能又は殺傷特異性を有する免疫毒素である。

【0061】

医薬組成物

本発明の文脈において、「医薬組成物」という用語は、個体における薬学的使用に適した組成物を指す。医薬組成物は、概して、免疫毒素等の有効量の活性剤、及び限定されないが、薬学的に許容される担体を含む担体を含む。

【0062】

有効量

本発明の文脈において、「有効量」という用語は、所望の効果を生み出すのに十分な用量又は量を指す。所望の効果は、個体の予防的又は治療的治療等の用量又は量のレシピエントにおいて、客観的又は主観的改善を含んでもよい。

【0063】

予防的 (prophylactic) / 予防的 (preventive) 治療

本発明の文脈において、「予防的治療」という用語は、疾患、病理、若しくは医的障害の徴候又は症状を示さない、又は疾患、病理、若しくは医的障害の初期徴候又は症状のみを示す個体に投与される治療薬を指し、治療薬は疾患、病理又は医的障害の発症リスクを無くす、予防する又は減少させる目的のために投与される。予防的治療は、疾患又は障害に対して予防的治療薬として機能し、したがって、「予防的 (prophylactic) 治療」及び「予防的 (preventive) 治療」は本明細書では同義に使用される。

【0064】

治療的治療

本発明の文脈において、「治療的治療」は、病理、疾患又は障害の症状又は徴候を示す個体に投与される治療薬を指し、治療薬は、病理、疾患又は障害のこれらの徴候又は症状を無くす又は根絶する目的のために個体に投与される。

【0065】

ヌクレオチド酸配列

本発明の文脈において、「ヌクレオチド酸配列」（例えば、核酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等）は、ヌクレオチド A、C、T、U、G を含むヌクレオチドのポリマー、又はその他の天然ヌクレオチド又は人工ヌクレオチド類似体を指す。所与の核酸又は相補的核酸のいずれかは、任意の特定されたポリヌクレオチド配列から決定することができる。他に示されない限り、特定の核酸配列は、また、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）及び相補的配列、並びに明示的に示される配列を暗黙に含む。特に、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（又は全ての）コドンの第3の位置が、混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成することができる。本発明の文脈において、「核酸」という用語は、「遺伝子」、「cDNA」、及び「遺伝子によってコードされる mRNA」と同義に使用される。

【0066】

遺伝子由来の核酸

本発明の文脈において、「遺伝子由来の核酸」という句は、遺伝子又はそのサブ配列の合成が最終的にはテンプレートとしての役割を担う核酸を指す。したがって、mRNA、mRNA から逆転写された cDNA、cDNA から転写された RNA、cDNA から増幅された DNA、増幅した DNA から転写された RNA 等は、すべて遺伝子に由来する。

【0067】

免疫毒素のタンパク質標的は、いくつかの実施形態において、そのアミノ酸配列の代わりに、その遺伝的起源（すなわち核酸配列）によって記述されてもよい。

【0068】

操作可能に結合された

本発明の文脈において、「操作可能に結合された」という用語は、酵素連結によって、

10

20

30

40

50

さもなければ、配列の正常な機能が行われるように互いに対してある構成で、2つ以上のヌクレオチド配列を共有結合することを指す。例えば、プレ配列又は分泌リーダーをコードするヌクレオチド配列は、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドについてヌクレオチド配列に操作可能に結合され、プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合、コード配列と操作可能に結合され、リボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように配置される場合、コード配列と操作可能に結合される。概して、「操作可能に結合された」は、結合されるヌクレオチド配列が分泌リーダーの場合は連続的であり、リーディングフェーズにおいて連続的であることを意味する。結合は、都合のよい制限部位において、連結によって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが、標準的な組換えDNA方法と組み合わせて使用される。

10

【0069】

制御配列

本発明の文脈において、「制御配列」という用語は、全ての要素を含む配列を指し、本発明のポリペプチドの配列に重要であり、又は有利である。各制御配列は、天然であっても、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して外来であってもよい。このような制御配列として、限定されないが、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列及び転写ターミネータが挙げられる。典型的には、制御配列は、少なくとも1つのプロモーター並びに転写及び翻訳ストップシグナルを含む。制御配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード領域で、制御配列の連結を促す特定の制限部位を導入する目的のために、リンカーと提供されてもよい。

20

【0070】

発現ベクター

本発明の文脈において、「発現ベクター」という用語は、DNA分子を指し、線形又は環状であり、ポリペプチドをコードするセグメントを含み、その転写を提供する追加のセグメントに操作可能に結合される。

【0071】

宿主細胞

本発明の文脈において、「宿主細胞」という用語は、核酸構築物による形質転換の影響を受けやすい任意の細胞種を指す。宿主細胞は、真核生物又は原核生物であってもよい。

30

【0072】

組換え

本発明の文脈において、「組換え」という用語は、細胞、ウイルス、ヌクレオチド、又は異種（又は外来）核酸の導入又は天然の核酸の変化によって改変されたベクターを指し、又はタンパク質若しくはポリペプチドは、異種アミノ酸の導入によって改変され、又は細胞は、このように改変された細胞に由来する。組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態にはみられない核酸配列（例えば、遺伝子）を発現し、又は異常に発現した、発現中の、若しくは全く発現しないと思われる天然の核酸配列（例えば、遺伝子）を発現する。

【0073】

配列同一性

本発明の文脈において、「配列同一性」という用語は、ヌクレオチド、塩基又はアミノ酸レベルで、それぞれ、遺伝子間又はタンパク質間で配列同一性として本明細書では定義される。特に、DNA及びRNA配列は、DNA配列の転写物が、同一のRNA配列に転写することができる場合、同一であると考えられる。

40

【0074】

したがって、本発明の文脈において、「配列同一性」は、アミノ酸レベルにおけるタンパク質間の同一性の尺度、及びヌクレオチドレベルにおける核酸間の同一性の尺度である。タンパク質配列同一性は、配列が整列される場合、各配列における所与の位置のアミノ酸配列を比較することによって決定してもよい。同様に核酸配列同一性は、配列が整列される場合、各配列における所与の位置の核酸配列を比較することによって決定してもよい

50

。

【0075】

2つのアミノ酸配列の同一率又は2つの核酸の同一率を決定するために、配列を最適比較のために整列させる（例えば、第2のアミノ酸若しくは核酸配列と最適整列するために、第1のアミノ酸の配列又は核酸配列にギャップを導入してもよい。）その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置において、アミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列の位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有される場合、この分子は、その位置において同一である。2つの配列間の同一率は、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、同一率＝同一の位置の#／位置の合計#（例えばオーバーラップ位置）× 100）。一実施形態において、2つの配列は同一の長さである。

10

【0076】

別の実施形態では、2つの配列は異なる長さであり、異なる位置としてギャップが見られる。手動で配列を整列し、同一のアミノ酸の数を数えることができる。あるいは、同一率の決定について2つの配列の整列は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。このようなアルゴリズムは（Altschulet al., 1990）のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチドサーチは、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12で実施して、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質サーチは、XBLASTプログラム、スコア＝50、ワード長＝3で実施して、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。

20

【0077】

比較のためにギャップアライメントを得るために、Gapped BLASTを使用してもよい。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の遠い関係性を検出する反復サーチを実施してもよい。NBLAST、XBLAST及びGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラムのデフォルト値を使用してもよい。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。あるいは、配列を例えばEMBLデータベース（www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST）のBLASTプログラムによって整列した後に、配列同一性を計算してもよい。概して、例えば、「スコアリングマトリックス」及び「ギャップペナルティ」に関するデフォルトの設定値を整列に使用してもよい。本発明の文脈において、BLASTN及びPSI-BLASTのデフォルト設定値は有意であり得る。

30

【0078】

2つの配列間の同一率を、ギャップがあってもなくても、前述と同じような技術を使用して決定してもよい。同一率を計算する場合に、厳密な一致だけを数える。本発明の一実施形態は、したがって、いくらかの程度の配列バリエーションを有する本発明の配列に関する。

【0079】

実質的に相同／同一

本発明の文脈において、2つの核酸又はポリペプチドにおいて、「実質的に相同」又は「実質的に同一」は、概して、比較アルゴリズムを用いて、又は視認によって測定するように、最大一致のために比較、整列する場合に、少なくとも40%、60%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド又はアミノ酸残基同一性を有する2つ以上の配列又はサブ配列を指す。

40

【0080】

融合毒素タンパク質

サイトメガロウイルス（CMV）は、未成熟又は易感染性の免疫機能を有する個体において、臨床的に重要な日和見的なウイルス病原体である。HCMV感染又は疾患の予防、予防的な又は治療に使用されるヒトCMV（HCMV）に対する全ての承認された薬物治療法は、ウイルス複製機構を標的にする。この戦略はいくつかの条件では効果的であるが

50

、現在承認されているヌクレオシド類似体薬は、その他の条件、例えば、肺、心臓－肺、脾臓、及び同種造血幹細胞移植といった他の条件ではHCMV疾患を予防することができない。小分子ターミナーゼ抑制剤であるプレバイミスもウイルスの複製を抑制する。レテルモビルは、ウイルスのDNAプロセッシング及びパッケージングに必要とされるCMV DNAターミナーゼ複合体（pUL51、pUL56、及びpUL89）を抑制する。プレバイミス予防法は、造血幹細胞のレシピエントにおけるCMV感染及び疾患を阻害する。重要なことに、承認されているヌクレオシド類似体薬は、重度の、腎臓、神経、及び血液学的毒性を含む治療制限的副作用を有し、薬物耐性株の頻繁な発現の影響を受けやすく、通常、1つの変異がクラス間の多剤耐性をもたらす。プレバイミスは、一般的に安全に使用できると考えられているが、プレバイミス予防法は、高頻度の（約30%）ブレークスルー再活性に依然として関連する。まとめると、これらの制限は、既存の治療法を改善又は補充するために、耐性があるために、DNAポリメラーゼ阻害剤に難治性の疾患を治療するために、新しい機序に基づいて、より良い戦略が必要であることを強調している。

10

【0081】

本明細書では、virus-encoded seven-transmembrane（7TM）ケモカイン受容体、US28のその発現によって、HCMV感染細胞の標的化に基づくHCMV抗ウイルス戦略を提示する。HCMV抗ウイルス戦略は、毒素及び標的部分を含むキメラ分子である免疫毒素によって影響を受ける。

【0082】

CMVによる細胞感染において、US28は感染細胞の表面に発現し、環境においてケモカインに応答することができるようになる。US28受容体は、様々なヒト、マウス及びウイルスコードCCケモカインに結合する。興味深いことに、たった1つの追加の受容体、いわゆるその同源受容体、CX3CR1を標的にしながら、CX3Cケモカイン、フラクタルカイン（CX3CL1とも呼ばれる）はUS28に非常に高い親和性で結合し、したがって、CX3CL1ベースの免疫毒素戦略の望ましくないオフターゲット効果についての潜在能を減少させる。

20

【0083】

さらに、US28受容体の多くは、細胞表面から離れて、エンドソームに局所化される。この分布は、急速、構成的、リガンド依存的受容体内部移行の結果である。したがって、US28に結合するケモカイン又はその他の化合物は、受容体を発現する細胞に内部移行する。理論に縛られないが、本明細書に記載の免疫毒素は、この特徴から利益を得て、US28に結合したときに、毒素が細胞傷害機能を発揮することができるCMV感染細胞に輸送される。

30

【0084】

オフターゲットヒト相同受容体、CX3CR1が存在するために、免疫毒素は、CX3CR1発現細胞に比べてUS28発現細胞について、高い親和性と潜在能を有することが重要である。本明細書では、US28についての標的部分が天然リガンドフラクタルカインに基づいたペプチドであるが、改変され、改善されたアミノ酸配列は、CMV感染又はCMV関連疾患の治療又は予防のために強力な免疫毒素になる。

【0085】

したがって、本発明の一態様は、以下を含む免疫毒素であって：

i) 以下から選択されるアミノ酸配列を含む標的部分：

a) 配列番号1、又は

b) 配列番号1と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

i i) 毒素、

49位のアミノ酸残基は、アラニン（A）残基に置換され、1～6位のアミノ酸残基は、N末端においてアミノ酸配列ILDNGVSに置換される。

40

【0086】

US28の天然リガンド、CX3CL1（フラクタルカイン）は、ケモカインドメイン、ムチンstalk、及びCX3CL1を細胞膜に係留する膜貫通ドメインからなる。C

50

X3CL1のケモカインドメインは、US28に高い親和性を有する。本明細書では、ケモカインドメインは、天然ヒトCX3CL1の25位～99位に対応する配列番号1として挙げられるアミノ酸配列によって規定される。配列番号1に対するコア変異は、驚くほど強力な免疫毒素になった。理論に縛られることはないが、アラニン置換に対するフェニルアラニン及び標的部分の改変されたN末端（ILDNGVS、配列番号13）が、本明細書に記載される改善された免疫毒素を発生していると考えられている。したがって、同様の機能的特徴を有する多くの異なる免疫毒素は、非重要単一アミノ酸又は標的部分のアミノ酸の非重要領域を置換することによって想起することができる。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、（b）のアミノ酸配列は、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、例えば、配列番号1と少なくとも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%の配列同一性を有する。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分のN末端配列は、QH HGV T（配列番号14）ではない。

10

【0087】

他の例では、標的部分は、コア変異で改変されているだけのフラクタルカインのケモカインドメインとよく似ていることが好ましい。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、49位のアミノ酸残基がアラニン（A）残基によって置換され、1～6位のアミノ酸残基がN末端のアミノ酸配列ILDNGVSで置換される配列番号1である。この標的部分は、2つのコア変異を含み、配列番号2によっても示される。したがって、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、配列番号2を含む。

20

【0088】

免疫毒素は、組換え又は合成で生成することができる。組換え生成の場合に、翻訳は、イニシエータtRNAに結合されるメチオニンから始まる。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、この標的部分のアミノ酸は、N末端からの第1のアミノ酸としてメチオニン（M）残基をさらに含む。イニシエータメチオニン（M）を有する標的部分を含む免疫毒素は、配列番号11によって示される。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、配列番号11を含む。

【0089】

本明細書に記載の免疫毒素は、US28受容体の標的化によって、HCMV感染細胞に細胞傷害効果を持異的に発揮する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、US28受容体に結合する。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、US28に結合した後内部移行する。

30

【0090】

US28受容体は、ヒトサイトメガロウイルスオープンリーディングフレームUS28によってコードされるGタンパク質結合受容体を指す。本発明の文脈において、US28受容体は、配列番号3によって示されるアミノ酸配列を有する。しかしながら、US28は異なる変異体に存在し、本明細書に記載の免疫毒素の標的化は、1つの特定の変異体に限定されないが、実質的に相同又は実質的に同一の変異体にも伸長する。

【0091】

したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、US28受容体は以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

i) 配列番号3、又は

ii) 配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列。

40

【0092】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、US28受容体は以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

i) 配列番号3、又は

ii) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性、例えば、配列番号3と少なくとも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%の

50

配列同一性を有するアミノ酸配列。

【0093】

US28受容体は、遺伝子レベルでも規定されてもよい。したがって、本発明の文脈において、US28受容体は、配列番号12によって示される核酸配列によってコードされる。US28受容体は異なる変異体中存在し、遺伝子コードは縮重に供されるため、その遺伝子コードによって定義されるUS28受容体は、1つの単一核酸に限定されないが、実質的に相同又は実質的に同一な変異体にも伸長する。

【0094】

したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、US28受容体は以下から選択される核酸配列によってコードされる：

i) 配列番号12、又は

ii) 配列番号12と少なくとも80%の配列同一性を有する核酸配列。

【0095】

したがって、本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、US28受容体は以下から選択される核酸配列によってコードされ：

i) 配列番号12、又は

ii) 配列番号12と少なくとも90%の配列同一性、例えば、配列番号12と少なくとも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%の配列同一性を有する核酸配列。

【0096】

本明細書に記載の免疫毒素は、US28について、強い親和性 (K_i) で結合するように設計される。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、 10^{-7} M以下、例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-9} M以下、例えば 10^{-10} M以下、例えば 10^{-11} M以下の K_i でUS28に結合する。結合親和性は、放射線リガンドとして $^{125}\text{I}-\text{CCL2}$ 又は $^{125}\text{I}-\text{CX3CL1}$ と競合してアッセイされる。厳密なアッセイは、実施例にさらに詳述する。

【0097】

ヒト相同受容体、CX3CR1は、望ましくないオフターゲットを示すため、免疫毒素がCX3CR1について比較的低い親和性を有するかどうか有利である。これは、免疫毒素の有効性を増加させるだけでなく、健康な細胞が免疫毒素の投与によって受ける影響が少ないため、有害作用も減少する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、ヒト相同受容体、CX3CR1についての免疫毒素の親和性は、CX3CR1についてCX3CL1 (配列番号1) の親和性に比べて低く、例えば、少なくとも100倍、例えば少なくとも150倍、例えば200倍、又は例えば少なくとも250倍少ない。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、 10^{-6} 以上の K_i でCX3CR1に結合する。本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、CX3CR1についての親和性に比べて、US28についての親和性が高く、例えば、少なくとも75倍、例えば少なくとも100倍、例えば少なくとも150倍、例えば200倍、又は例えば少なくとも250倍高い親和性である。

【0098】

理論に縛られることはないが、US28受容体との結合を担っているのは、主に免疫毒素の標的部分であると推測される。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、 10^{-7} M以下、例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-9} M以下、例えば 10^{-10} M以下、例えば 10^{-11} M以下の K_i でUS28に結合する。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、ヒト相同受容体CX3CR1についての標的部分の親和性は、CX3CR1についてCX3CL1 (配列番号1) の親和性に比べて低く、例えば、少なくとも100倍、例えば少なくとも150倍、例えば200倍、又は例えば少なくとも250倍少ない。本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、 10^{-6} 以上の K_i でCX3CR1に結合する。本発明の

10

20

30

40

50

さらに別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、標的部分は、C X 3 C R 1 についての親和性に比べて、U S 2 8 についての親和性が高く、例えば、少なくとも 7 5 倍、例えば少なくとも 1 0 0 倍、例えば少なくとも 1 5 0 倍、例えば 2 0 0 倍、又は例えば少なくとも 2 5 0 倍高い親和性である。

【0099】

ヒト相同受容体、C X 3 C R 1 は、本発明の文脈において、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列に示されてもよい。しかしながら、本明細書に記載の C X 3 C R 1 は、1 つの特定の変異体に限定されないが、実質的に相同又は実質的に同一の変異体にも伸長する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、C X 3 C R 1 受容体は配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む。

10

【0100】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、C X 3 C R 1 受容体は以下から選択されるアミノ酸配列を含む：

i) 配列番号 4、又は

i i) 配列番号 4 と少なくとも 8 0 % の配列同一性、例えば、配列番号 3 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列。

【0101】

理論に縛られることはないが、免疫毒素の毒素は、免疫毒素への結合及び免疫毒素の C M V 感染細胞への内部移行に寄与しない。したがって、免疫毒素は、機能的であり、広範囲の毒素を使用する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、外毒素、内毒素、酵素毒素、膜孔形成毒素、スーパー抗原及びリボソーム不活性化タンパク質 (R I P) からなる 1 つ以上の群から選択される。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、リボソーム不活性化タンパク質 (R I P) である。本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、緑膿菌外毒素 A、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシン A 鎖、ブリオジン、ジフテリア、レストリクトシン、ジフテリア毒素及びその断片又は変異体からなる 1 つ以上の群から選択される。

20

【0102】

緑膿菌外毒素 A は、伸長因子 2 を修飾するそのアデノシンニリン酸リボシル化によって細胞を殺傷することができる非常に高い潜在能を有する毒素であり、タンパク質合成の停止及びアポトーシスの開始を導く。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は緑膿菌外毒素 A (配列番号 5) 又はその断片である。

30

【0103】

緑膿菌外毒素 A は、転位置 (ドメイン I I)) 及び細胞傷害性 (ドメイン I b 及び I I I) にそれぞれ関連する。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、緑膿菌外毒素 A の結合ドメイン (ドメイン I I、配列番号 6)、中間ドメイン (ドメイン I b、配列番号 7) 及び A D P リボシル化ドメイン (ドメイン I I I、配列番号 8) からなる群から選択される 1 つ以上の断片を含む。本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、緑膿菌外毒素 A の結合ドメイン (ドメイン I I、配列番号 6) 及び A D P リボシル化ドメイン (ドメイン I I I、配列番号 8) を含む。

40

【0104】

緑膿菌外毒素 A の変異体において、C 末端は、細胞傷害性を増加させるように改変される。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、A D P リボシル化ドメインの C 末端アミノ酸配列 R E D L K (配列番号 1 5) は、アミノ酸配列 K D E L (配列番号 1 6) によって置換される。したがって、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、毒素は、P E 3 8 K D E L (配列番号 9) である。

【0105】

したがって、本発明の別の好ましい実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免

50

疫毒素は、配列番号 9 及び配列番号 2 を含む。免疫毒素は、49 位のアミノ酸残基がアラニン（A）残基によって置換され、1～6 位のアミノ酸残基は N 末端のアミノ酸配列 I L D N G V S で置換される配列番号 1 である標的部分、及び配列番号 10 によって示される P E 3 8 K D E L である毒素の組み合わせを含む。したがって、本発明の好ましい実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、配列番号 10 を含む。

【0106】

本明細書の実施例に説明されるように、本明細書に記載の免疫毒素は、驚くべきことに、C X 3 C R 1 発現細胞に比べて U S 2 8 発現細胞に対して高い潜在能を示す。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素に関し、免疫毒素は、C X 3 C R 1 を発現する細胞に対する潜在能に比べて、U S 2 8 を発現する細胞に対する潜在能が高く、例えば、少なくとも 150 倍、例えば 175 倍、又は例えば少なくとも 200 倍、例えば少なくとも 225 倍、例えば少なくとも 250 倍高い潜在能である。

10

【0107】

本明細書に記載の免疫毒素は、医学的使用を意図し、したがって、医薬組成物の部分を形成することができる。医学的使用のために、免疫毒素は、薬学的に許容される塩として製剤化することができる。医薬組成物は、医学的使用に標準的であり、当業者に周知であると思われる要素を含んでもよい。したがって、本発明の態様は、本明細書に記載の免疫毒素又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物に関する。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の医薬組成物に関し、組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／又は賦形剤を含む。

20

【0108】

本発明の態様は、医薬品として使用される本明細書に記載の免疫毒素又は本明細書に記載の医薬組成物に関する。

【0109】

好ましくは、本明細書に記載の免疫毒素は、CMV 感染の治療又は予防のためにある。免疫毒素は、それを必要とする個体に有効量投与される。個体は、CMV 感染を有する任意のヒト、又は CMV 感染になるリスクがある任意のヒトである。

【0110】

したがって、本発明のさらなる態様は、CMV 感染又は CMV 関連疾患の治療又は予防に使用される、本明細書に記載の免疫毒素又は本明細書に記載の医薬組成物に関する。本発明の実施形態は、本明細書に記載の免疫毒素の使用に関し、CMV 感染又は CMV 関連疾患の治療又は予防は、(i) 患者にインビボ又は (ii) 細胞又は臓器にエクスビボである。

30

【0111】

免疫毒素は、医薬品の調製物の成分であってもよい。したがって、本発明の実施形態は、CMV 感染又は CMV 関連疾患の治療又は予防のための医薬品を製造するための本明細書に記載の免疫毒素の使用に関する。

【0112】

CMV 感染は、身体の様々な広範囲の場所で発生し得、全体として組織と体液の 2 つに分けられる。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV 感染は、以下に存在し：

40

- i) 網膜、角膜、心臓、肝臓、腎臓、肺、胃腸組織、胸腺、脾臓、皮膚及び筋肉からなる 1 つ以上の群から選択される組織、並びに／又は
- ii) 唾液、血液、尿、精液及び母乳からなる 1 つ以上の群から選択される体液。

【0113】

CMV は多くの個体が生涯にわたって感染する非常に一般的なウイルスである。したがって、世界の人口の多くが、ウイルスに対する抗体を製造している可能性が最も高く、一次感染後の症状は多くの場合なくなる。しかしながら、ウイルスは宿主において休眠状態にあり、免疫系が弱ると直ぐにウイルスは潜伏期から目覚めることがある。したがって、CMV は、弱った免疫系を有する個体に大きなリスクをとるウイルスである。したがって

50

、本発明の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV感染は、免疫不全の患者の感染症である。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV感染は、HIV患者、新生児及び免疫抑制的な患者、骨髄移植患者、固形臓器移植患者、免疫治療患者、癌患者、集中治療患者、外傷のある患者、幹細胞の患者、遺伝子治療の患者、細胞療法の患者、老齢期の患者及び多疾病罹患患者からなる群から選択される免疫不全の患者における感染症である。本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV感染は、免疫不全になるリスク／又はその予定の患者の感染症である。本発明のさらなる実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV感染は、冠疾患及び／又は血管疾患を罹患している患者の感染症である。本発明のさらに別の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、CMV感染は、潜在型CMV感染症である。

10

【0114】

免疫毒素は、任意の通常経路で投与することができる。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、免疫毒素又は医薬組成物は、経口、非経口、静脈、皮内、皮下、及び局所投与からなる1つ以上の群から選択される経路を介して投与される。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、免疫毒素又は医薬組成物は、エクスピボで細胞又は臓器に投与される。

【0115】

20

免疫毒素は併用治療の部分であってもよく、1つ以上の追加の治療薬が投与される。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、免疫毒素又は医薬組成物は、1つ以上の追加の治療薬と同時、別々に又は連続して投与される。本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物に関し、治療薬は、抗ウイルス薬、免疫抑制剤及び調節薬からなる群から選択される。

【0116】

免疫毒素は、併用療法として容易に投与するために、他の治療薬と一緒に包装されてもよい。したがって、本発明の一態様は、以下を含むキットに関し：

30

- i) 本明細書に記載の免疫毒素又は本明細書に記載の医薬組成物、
 - ii) 1つ以上の追加の治療薬、及び
 - iii) 任意に、使用説明書、
- i) 及び ii) は、同時に、別々に、又は連続して投与される。

【0117】

免疫毒素は好ましくは、組換え発現システムを用いて製造される。適切な組換え発現システムは当業者に周知であると思われる。組換え発現のために、目的のペプチド配列をコードする核酸、発現ベクター及び発現システム（組換え発現のための細胞株）を必要とする。したがって、本発明の態様は、本発明に記載の免疫毒素をコードする配列を含む核酸配列に関する。本発明の実施形態は、核酸に関し、核酸配列は以下から選択される：

40

- i) 配列番号20、又は

ii) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性、例えば、配列番号20と少なくとも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%の配列同一性を有する核酸配列。

【0118】

免疫毒素の個別の部分にコードする核酸は、発現システム、すなわち、細胞に導入するために発現ベクターに構築される。したがって、本発明の別の態様は、適切な宿主における免疫毒素の産生に対して適切な1つ以上の制御配列に操作可能に結合された、本明細書に記載のヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターに関する。

【0119】

発現ベクターは、任意の通常の方法を用いて宿主細胞に導入され、目的のペプチド配列

50

の組換え発現に合わせて条件は調整される。したがって、本発明の態様は、本明細書に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞に関する。本発明の別の態様は、以下のステップを含む本明細書に記載の免疫毒素を製造する方法に関する：

- i) 本明細書に記載の宿主細胞を提供すること、
- ii) 発現に適した条件下で、免疫毒素の宿主細胞を培養すること、
- iii) 免疫毒素を単離すること。

【0120】

本発明の実施形態は、本明細書に記載の方法に関し、宿主細胞は、真核生物又は原核生物のいずれかである。

【0121】

本発明の態様の1つの文脈において記載される実施形態及び特徴は、また、本発明の他の態様に適用する。また、本発明の実施形態及び特徴の概要を、以下の項目に記載する。

【0122】

項目

1. 以下を含む免疫毒素：

i) 以下から選択されるアミノ酸配列を含む標的部分：

a) 配列番号1、又は

b) 配列番号1と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

ii) 毒素、

49位のアミノ酸残基は、アラニン(A)残基に置換され、1～6位のアミノ酸残基は、N末端においてアミノ酸配列ILDNGVSに置換される。

【0123】

2. (b)のアミノ酸配列が、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、例えば、配列番号1と少なくとも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%の配列同一性を有する項目1に記載の免疫毒素。

【0124】

3. 標的部分が配列番号2を含む、項目1～2のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0125】

4. この標的部分のアミノ酸がN末端からの第1のアミノ酸としてメチオニン(M)残基をさらに含む、項目1～3のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0126】

5. 標的部分がUS28受容体に結合する、項目1～4のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0127】

6. US28受容体が以下から選択されるアミノ酸配列を含む、項目5に記載の免疫毒素：

i) 配列番号3、又は

ii) 配列番号3と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列。

【0128】

7. 免疫毒素が 10^{-7} M以下、例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-9} M以下、例えば 10^{-10} M以下、例えば 10^{-11} M以下の K_i でUS28に結合する、項目1～6のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0129】

8. ヒト相同受容体CX3CR1についての免疫毒素の親和性がCX3CR1についてCX3CL1(配列番号1)の親和性に比べて低く、例えば、少なくとも100倍、例えば少なくとも150倍、例えば200倍、又は例えば少なくとも250倍少ない、項目1～7のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0130】

9. 免疫毒素が 10^{-6} 以上の K_i でCX3CR1に結合する、項目1～8のいずれか1つに記載の免疫毒素。

10

20

30

40

50

【0131】

10. 免疫毒素がCX3CR1についての親和性に比べて、US28についての親和性が高く、例えば、少なくとも75倍、例えば少なくとも100倍、例えば少なくとも150倍、例えば200倍、又は例えば少なくとも250倍高い親和性である、項目1～9のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0132】

11. CX3CR1受容体が配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む、項目8～10のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0133】

12. 免疫毒素がUS28に結合後に内部移行する、項目1～11のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0134】

13. 毒素が緑膿菌外毒素A、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン、ジフテリア、レストリクトシン、ジフテリア毒素及びその断片又は変異体からなる1つ以上の群から選択される、項目1～12のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0135】

14. 毒素が緑膿菌外毒素A（配列番号5）又はその断片である、項目1～13のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0136】

15. 毒素が緑膿菌外毒素Aの結合ドメイン（ドメインII、配列番号6）、中間ドメイン（ドメインIb、配列番号7）及びADPリボシル化ドメイン（ドメインIII、配列番号8）からなる群から選択される1つ以上の断片を含む、項目14に記載の免疫毒素。

【0137】

16. ADPリボシル化ドメインのC末端アミノ酸配列REDLK（配列番号15）が、アミノ酸配列KDEL（配列番号16）によって置換される、項目15に記載の免疫毒素。

【0138】

17. 毒素がPE38KDEL（配列番号9）である、項目16に記載の免疫毒素。

【0139】

18. 免疫毒素が配列番号9及び配列番号2を含む、項目1～17のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0140】

19. 免疫毒素が配列番号10を含む、項目1～18のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0141】

20. 免疫毒素が、CX3CR1を発現する細胞に対する潜在能に比べて、US28を発現する細胞に対する潜在能が高く、例えば、少なくとも150倍、例えば175倍、又は例えば少なくとも200倍、例えば少なくとも225倍、例えば少なくとも250倍高い潜在能である、項目1～19のいずれか1つに記載の免疫毒素。

【0142】

21. 項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物。

【0143】

22. 組成物が、薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／又は賦形剤を含む、項目21に記載の医薬組成物。

【0144】

23. 医薬品として使用するための項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素又は項目21若しくは22のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0145】

10

20

30

40

50

24. CMV感染又はCMV関連疾患の治療又は予防に使用される、項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素又は項目21若しくは22のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0146】

25. CMV感染が以下に存在する、項目24に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物：

i) 網膜、角膜、心臓、肝臓、腎臓、肺、胃腸組織、胸腺、脾臓、皮膚及び筋肉からなる1つ以上の群から選択される組織、並びに／又は

ii) 唾液、血液、尿、精液及び母乳からなる1つ以上の群から選択される体液。

【0147】

26. CMV感染が、HIV患者、新生児及び免疫抑制的な患者、骨髄移植患者、固形臓器移植患者、免疫治療患者、癌患者、集中治療患者、外傷のある患者、幹細胞の患者、遺伝子治療の患者、細胞療法の患者、老齢期の患者及び多疾病罹患患者からなる群から選択される免疫不全の患者における感染症である、項目24又は25のいずれか1つに記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物。

【0148】

27. CMV感染が冠疾患及び／又は血管疾患を罹患している患者の感染症である、項目24又は25のいずれか1つに記載の免疫毒素又は医薬組成物。

【0149】

28. CMV感染が潜在型CMV感染症である、項目24～27のいずれか1つに記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物。

【0150】

29. 免疫毒素又は医薬組成物が、経口、非経口、静脈、皮内、皮下、及び局所投与からなる1つ以上の群から選択される経路を介して投与される、項目23～28のいずれか1つに記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物。

【0151】

30. 免疫毒素又は医薬組成物が、1つ以上の追加の治療薬と同時、別々に又は連続して投与される、項目23～29のいずれか1つに記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物。

【0152】

31. 治療薬が、抗ウイルス薬、免疫抑制剤及び調節薬からなる群から選択される、項目30に記載の使用のための免疫毒素又は医薬組成物。

【0153】

32. 以下を含むキット：

i) 項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素又は項目21若しくは22のいずれか1つに記載の医薬組成物。

ii) 1つ以上の追加の治療薬、及び

iii) 任意に、使用説明書、

i) 及び ii) は、同時に、別々に、又は連続して投与される。

【0154】

33. 項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素をコードする配列を含む核酸配列。

【0155】

34. 適切な宿主における免疫毒素の産生に対して適切な1つ以上制御配列に操作可能に結合された、項目33に記載のヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター。

【0156】

35. 項目34に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【0157】

36. 以下のステップを含む項目1～20のいずれか1つに記載の免疫毒素を産生する方法：

10

20

30

40

50

- i) 項目35記載の宿主細胞を提供すること、
- ii) 発現に適した条件下で、免疫毒素の宿主細胞を培養すること、
- iii) 免疫毒素を単離すること。

【0158】

本出願に記載されるすべての特許及び非特許参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0159】

本発明を、以下の非限定的な実施例によって、さらに詳細に説明する。

【実施例】

【0160】

実施例1－融合タンパク質SYN000、SYN001、SYN003及びSYN004の調製

免疫毒素の構造

本明細書では、US28を特異的に標的にするように設計された一連の免疫毒素を開示する。免疫毒素は、ケモカインCX3CL1（フラクタルカイン）及び緑膿菌の外毒素A（両方とも図7に記載）に基づく。薬剤物質の候補SYN000（配列番号17）、SYN001（配列番号18）、SYN003（配列番号19）及びSYN004（配列番号10）は、図8に記載されるように、約400個のドメイン構造を有するアミノ酸からなる単一ポリペプチド鎖である。

【0161】

免疫毒素の製造

免疫毒素は、大腸菌（E. coli）に可溶性タンパク質凝集物（封入体、IB）として製造される。薬剤物質の製造工程は、3つの加工フェーズ：細胞の培養と収集、回収及び精製からなる。大腸菌の培養ステップは、高レベルの薬剤物質を含むIBが製造される。IBは、一連の洗浄と遠心分離によって回収される。精製工程は、IBの可溶化、レドックス対を含むリン酸緩衝液に対する透析による再折りたたみ、続いてAEX及びGFクロマトグラフィー方法を行って、純粋な薬剤物質を得ることからなる。

【0162】

実施例2－US28及びCX3CR1に対するSYN000、SYN001、SYN003及びSYN004の親和性（ K_i 値）

受容体競合結合

US28－HEK293細胞及びCX3CR1－HEK293細胞の安定誘導可能なクローンを10%のウシ胎仔血清、180 units/mLのペニシリン及び45 µg/mLのストレプトマイシンを有するダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）GlutaMAX（GIBCOR）に、10%のCO₂、37℃で、湿潤したインキュベーターで増殖した。細胞は、100 µLの増殖培地において、ポリ-D-リジン（Invitrogen社）コートされた96ウェル組織培養プレート（Nunc社）において、ウェルあたり10,000個の細胞を播種した。播種から1日後、US28及びCX3CR1の発現をテトラサイクリン（5 ng/mL）によって誘導して、5～10%の特異的結合を得た。競合結合試験を誘導から1日後、二重で実施した。端的には、細胞を、4－（2-ヒドロキシエチル）－1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液（50 mMのHEPES、5 mMのMgCl₂、1 mMのCaCl₂、pH 7.2）及び0.5%のウシ血清アルブミンからなる結合緩衝液に2回洗浄した。細胞は、その後、約25 pMの¹²⁵I－CX3CL1（又は¹²⁵I－CCL2）＋5 µLの非標識リガンド、すなわち、100 µLの結合緩衝液の免疫毒素又は相同ケモカインで、4℃で3時間、インキュベートした。その後、細胞を0.5 MのNaClを補充した4℃の結合緩衝液で2回洗浄した。最後のステップとして、細胞を180 µLの200 mMのNaOH及び1%のドデシル硫酸ナトリウム溶解緩衝液で溶解した。ガンマカウンター（1470 Wizard）を用いてデータを回収した。 K_i 値は、IC₅₀（特異的に結合した放射線リガンドの50%の置換を明らかにする非標識リガンドの濃度）、[L]（放射線リガンドの濃度）、 K_d （

10

20

30

40

50

放射線リガンドの解離定数)をCheng-Prusoff式、式(I)：から計算した。

【0163】

【数1】

$$\text{Formula(I)} : K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{[L]}{K_d}\right)}$$

【0164】

結果

放射線リガンドとしての¹²⁵I-CCl2図1及び3、並びに表1に示されるように、SYN000は-8.67、SYN001は-7.96、SYN003は-8.36、SYN004は-7.36の親和性(Log K_i)で、US28に結合する。

【0165】

放射線リガンドとしての¹²⁵I-CX3CL1図2及び4、並びに表1に示されるように、SYN000は-6.86、SYN001は-5.00、SYN003は-7.72、SYN004は-5.22の親和性(Log K_i)で、CX3CR1に結合する。

【0166】

【表1】

受容体競合結合

	SYN000 US28	SYN000 CX3CR1	SYN003 US28	SYN003 CX3CR1	SYN001 US28	SYN001 CX3CR1	SYN004 US28	SYN004 CX3CR1
Log K _i	-8. 67 ± 0. 16	-6. 86 ± 0. 07	-8. 36 ± 0. 12	-7. 72 ± 0. 08	-7. 96 ± 0. 09	-5. 00 ± 0. 19	-7. 36 ± 0. 13	-5. 22 ± 0. 13
比 US28/ CX3CR1	64. 6		4. 37		912		138	
比 F1 单独 F1-F49A	0. 07				0. 15			

【0167】

導入されたN末端アミノ酸配列は、SYN000(Log K_i-8.67)に比べてSYN003(Log K_i-8.36)において2倍；SYN001(Log K_i-7.96)に比べてSYN004(Log K_i-7.36)において4倍、US28に対する親和性を中程度に低下させたように見える。

【0168】

対照的に、導入されたN末端アミノ酸配列は、SYN000(Log K_i-6.86)に比べてSYN003(Log K_i-7.72)において7倍；SYN001(Log K_i-5.00)に比べてSYN004(Log K_i-5.22)において1.7倍、CX3CR1に対する親和性を中程度に増加させる。

【0169】

結論

全体的に、免疫毒素のN末端アミノ酸配列(F1変異)の導入は、US28に対する親和性を減少させ、CX3CR1に対する親和性を増加させる。結果として、SYN003及びSYN004は、それぞれSYN000及びSYN001より、CX3CR1よりもUS28についての嗜好性において、選択性が低い(倍変化が1未満、表1を参照のこと)

。

【0170】

実施例3ー誘導されたUS28 HEK293細胞及び誘導されたCX3CR1 HEK293細胞に対するSYN000、SYN001、SYN003及びSYN004の潜在能

インビトロの潜在能

US28-HEK293及びCX3CR1-HEK293細胞、及びナীবHEK293細胞の安定誘導可能なクローンを10%のウシ胎仔血清、180units/mLのペニシリン及び45μg/mLのストレプトマイシンを有するダルベッコ変法イーグル培地(DMEM) GlutaMAX (GIBCOR)に、10%のCO₂、37℃で、湿潤したインキュベーターで増殖した。細胞は、100μLの増殖培地において、ポリ-Dーリジン(Invitrogen社)コートされた96ウェル組織培養プレート(Nunc社)において、ウェルあたり11,000個の細胞を播種した。受容体の発現は、0.125μg/mL(US28)及び0.5μg/mL(CX3CR1)のテトラサイクリンを用いて、播種してから24時間後に誘導された。異なる濃度の指示された免疫毒素(0.01μM~0.1pM)及び緩衝液(mock treatment)を受容体の誘導から1日後に、100μLの増殖培地の最終容量に添加し、37℃で24時間インキュベートした。生存率を推定するために、細胞を増殖培地と1:10で混合したAlamar Blue(Invitrogen社)、ウェルあたり100μLで37℃で4時間インキュベートした。データはFlexStation 3(Molecular Devices社)プレートリーダーを用いて回収し、蛍光は、540nmの波長の励起及び585nmの波長の排出を読み取ることによって、測定した。細胞の生存率は、異なる濃度の免疫毒素で決定し、IC50値は、50%の細胞生存率で抽出した。対応する参照値は、シクロヘキシミドの存在(0%の細胞生存率)と免疫毒素又はシクロヘキシミドの非存在(100%の細胞生存率)で得た。

10

20

【0171】

結果

図5及び6並びに表2は、SYN000、SYN001、SYN003及びSYN004の潜在能を示す。US28において、潜在能は、SYN001よりUS28にわずかに高い潜在能を有するSYN000、SYN003及びSYN004の傾向と類似する。CX3CR1において、潜在能は、SYN001及びSYN004より高い潜在能を有するSYN003及びSYN000、並びにSYN001よりCX3CR1に対して低い潜在能を有するSYN004とで、かなり変動する。

30

【0172】

潜在能を使用して、各免疫毒素の殺傷特異性、すなわち、免疫毒素の、CX3CR1を発現する細胞に対するUS28を発現する細胞を特異的に殺傷する能力を計算することができる。殺傷特異性は表において倍変化として報告され、SYN000については8.91倍変化、SYN003については7.08倍変化、SYN001については501倍変化、SYN004については1175倍変化を示す。

40

【0173】

50

【表 2】

免疫毒素の潜在能

	SYN000 US28	SYN000 CX3CR1	SYN003 US28	SYN003 CX3CR1	SYN001 US28	SYN001 CX3CR1	SYN004 US28	SYN004 CX3CR1
Log IC50	-11.03 ± 0.15	-10.08 ± 0.10	-11.01 ± 0.11	-10.16 ± 0.12	-10.82 ± 0.15	-8.12 ± 0.15	-10.99 ± 0.17	-7.92 ± 0.18
比 US28/ CX3CR1	8.91		7.08		501		1175	
比 F1 单独 F1-F49A	0.82				2.35			

【0174】

結論

SYN000 (SYN003を作る) への F1 配列の追加が、殺傷特異性の増加に寄与しておらず (比は1未満、表2を参照のこと)、SYN001 (SYN004になる) への F1 配列の追加は殺傷特異性を2.35倍増加させることが示される。結果として、選択性の減少を有するにもかかわらず (実施例2を参照)、SYN004は驚くべきことに、すなわち、殺傷特異性の増加によって、かなり改善された免疫毒素を示す。

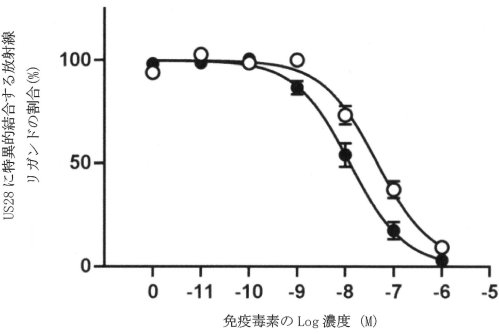
【0175】

参考文献

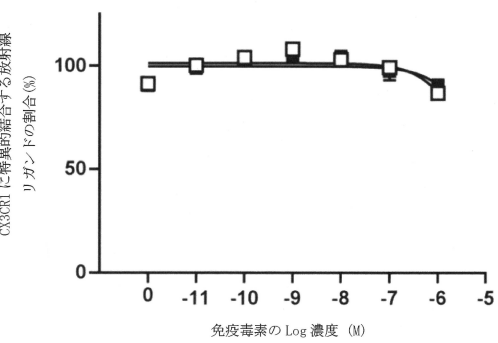
WO2008 / 003327

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

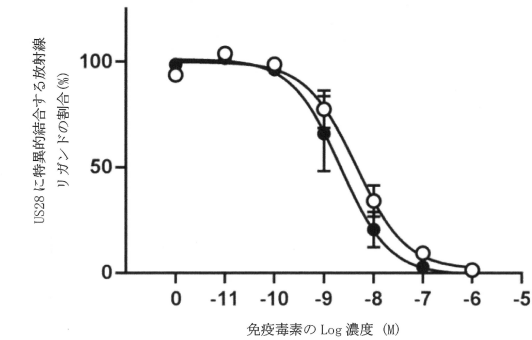
20

30

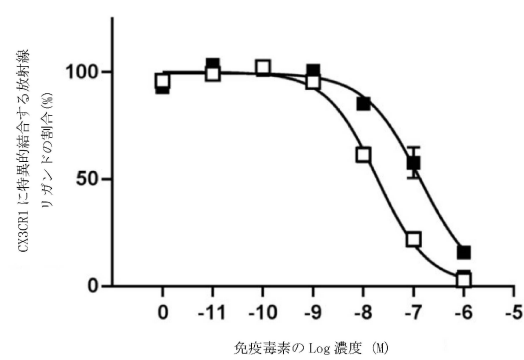
40

50

【図 3】

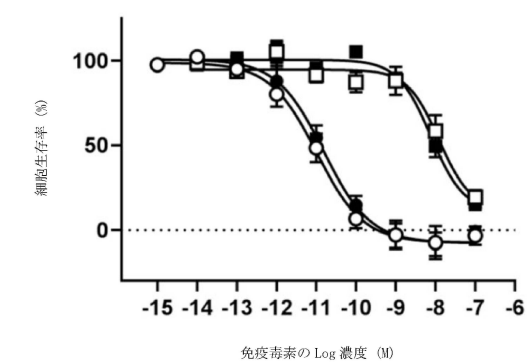


【図 4】

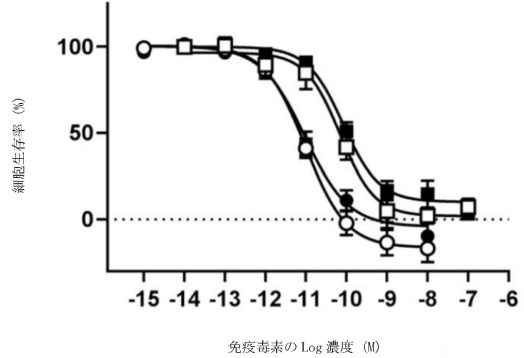


10

【図 5】



【図 6】



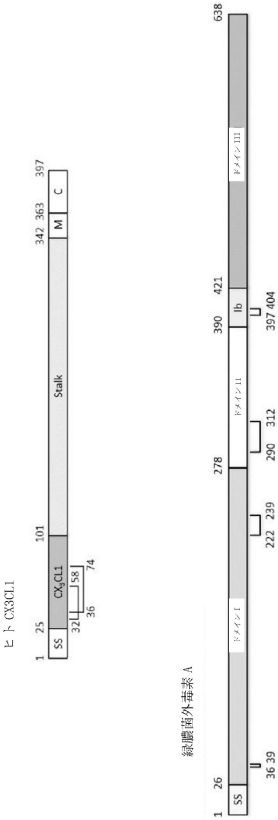
20

30

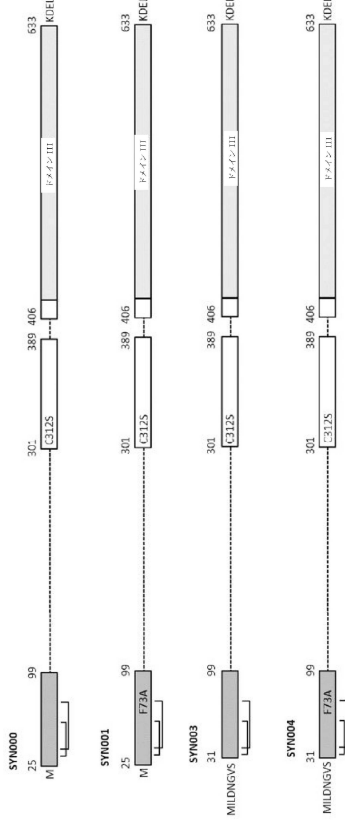
40

50

【図 7】



【図 8】



【配列表】

2022540877000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/067785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/21 C07K14/52 A61K47/64 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATJA SPIESS ET AL: "Novel Chemokine-Based Immunotoxins for Potent and Selective Targeting of Cytomegalovirus Infected Cells", JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2017, 30 January 2017 (2017-01-30), pages 1-12, XP055655094, US ISSN: 2314-8861, DOI: 10.1155/2017/4069260 figures 2-5	1-15
A	WO 2010/079063 A2 (UNIV PARIS CURIE [FR]; GOROCHOV GUY [FR] ET AL.) 15 July 2010 (2010-07-15) claims 3,9,12	1-15
☐ 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
8 September 2020		18/09/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lonnoy, Olivier

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/067785

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010079063 A2	15-07-2010	CA 2746976 A1	15-07-2010
		EP 2358738 A2	24-08-2011
		JP 2012511921 A	31-05-2012
		US 2012141538 A1	07-06-2012
		WO 2010070394 A1	24-06-2010
		WO 2010079063 A2	15-07-2010

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	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
		C 1 2 N	15/62	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,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,N
I,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

(72)発明者 ローゼンキルデ, メッテ, マリエ

デンマーク国 2 9 0 0 ヘルプ、オレ オルセンス アレー 3 0

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC35 CC41 EE41 EE59 FF34
4C084 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB33 ZC75
4C085 AA13 AA14 AA21 AA27 EE01 EE03
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA11 CA40 DA01 DA83
EA20 FA72 FA74 GA22 GA23