

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-534352

(P2020-534352A)

(43) 公表日 令和2年11月26日(2020.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/74 (2006.01)	C O 7 K 14/74 Z N A	4 C O 7 6
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 4
C07K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 5
C07K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	4 H O 4 5
C07K 14/55 (2006.01)	C O 7 K 14/55	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 193 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-536495 (P2020-536495)
 (86) (22) 出願日 平成30年9月6日(2018.9.6)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年5月1日(2020.5.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/049803
 (87) 国際公開番号 W02019/051127
 (87) 国際公開日 平成31年3月14日(2019.3.14)
 (31) 優先権主張番号 62/555,559
 (32) 優先日 平成29年9月7日(2017.9.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/609,082
 (32) 優先日 平成29年12月21日(2017.12.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 520079360
 キュー バイオファーマ, インコーポレー
 テッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 3 9 ケンブリッジ エリー ストリ
 ート 2 1
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ロナルド ディー. ザ サード セイデル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 3 9 ケンブリッジ エリー ストリ
 ート 2 1 シー/オー キュー バイオ
 ファーマ, インコーポレーテッド

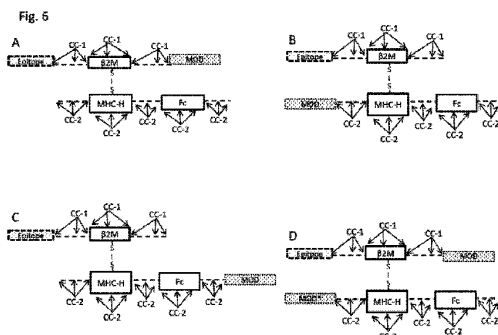
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンジュゲーション部位を有する T 細胞調節多量体ポリペプチド及びその使用方法

(57) 【要約】

本開示は、同種共免疫調節ポリペプチド(「同種MOD」)に対して低減された結合親和性を呈するように選択され得る免疫調節ポリペプチド(「MOD」)と、エピトープペプチド等の、エピトープとしての役目を果たすことができる分子を共有結合性で結合させるための箇所を含む、T細胞調節多量体ポリペプチド(「T細胞MMP」)を提供する。ひとたびエピトープ分子が結合すると、結果として生じるT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、エピトープ選択的/特異的様態で、IL-2、またはIL-2Rに対して低減された結合親和性を呈するIL-2バリエーション等の免疫調節ペプチドをT細胞に送達することによって、T細胞の活性を調節するために有用である。

【選択図】図6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T 細胞調節多量体ポリペプチド (T 細胞 M M P) であって、

a)

i) N 末端及び C 末端を有する第 1 の主要組織適合複合体 (M H C) ポリペプチド

、

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) N 末端から C 末端の順に、

i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) 任意選択で免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチドまたは非 I g ポリペプチド足場、

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 前記第 1 のポリペプチドに結合したもしくはその内部にある第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位、及び / または前記第 2 のポリペプチドに結合したもしくはその内部にある第 2 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位と、

d) 1 つまたは複数の免疫調節ポリペプチド (M O D) と、を含み、前記 1 つまたは複数の M O D のうちの少なくとも 1 つが、

A) 前記第 1 のポリペプチドの前記 C 末端に、

B) 前記第 2 のポリペプチドの前記 N 末端に、

C) 前記第 2 のポリペプチドの前記 C 末端に、または

D) 前記第 1 のポリペプチドの前記 C 末端及び前記第 2 のポリペプチドの前記 N 末端にあり、

前記 1 つまたは複数の M O D の各々が、独立して選択される野生型またはバリエーション M O D である、前記 T 細胞調節多量体ポリペプチド (T 細胞 M M P) 。

【請求項 2】

前記第 1 及び第 2 の M H C ポリペプチドが、M H C クラス I ポリペプチドであり、前記第 1 の M H C ポリペプチドが、

その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない、N 末端及び C 末端を有するベータ - 2 - ミクログロブリン (「 2 M 」) ポリペプチド、

その N 末端上にリンカーをもつ 2 M ポリペプチド、

その C 末端上にリンカーをもつ 2 M ポリペプチド、または

その N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ 2 M ポリペプチド、

を含む、請求項 1 に記載の T 細胞 M M P 。

【請求項 3】

前記第 2 のポリペプチドが、

その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない第 2 の M H C ポリペプチド (例えば、M H C クラス I 重鎖 (「 M H C - H 」) ポリペプチドを含む) 、

その N 末端上にリンカーをもつ第 2 の M H C ポリペプチド、

その C 末端上にリンカーをもつ第 2 の M H C ポリペプチド、または

その N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ第 2 の M H C ポリペプチド、

を含む、請求項 2 に記載の T 細胞 M M P 。

【請求項 4】

前記第 2 のポリペプチドが、免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチドまたは非 I g ポリペプチド足場をさらに含む、請求項 3 に記載の T 細胞 M M P 。

【請求項 5】

前記 T 細胞 M M P が、独立して選択される 1 つまたは複数の野生型及び / またはバリエーション M O D ポリペプチドを含む、請求項 3 に記載の T 細胞 M M P 。

【請求項 6】

前記 T 細胞 M M P が、独立して選択される 1 つまたは複数の野生型及び / またはバリエーション M O D ポリペプチドを含む、請求項 3 に記載の T 細胞 M M P 。

ントMODポリペプチドを含み、前記1つまたは複数のバリエーションMODポリペプチドのうちの少なくとも1つが、同種MOD（その同種MOD）に対して、対応する野生型MODの前記同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈し、バイオレイヤー干渉法（「BLI」）によって測定したときの、i）対照T細胞MMP-エピトープコンジュゲート（ここで、前記対照は、野生型MODを含む）の同種MODに対する結合親和性対、ii）前記野生型MODのバリエーションを含む本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの前記同種MODに対する結合親和性の比が、少なくとも1.5:1であるか、または1.5:1~10⁶:1の範囲内にある、請求項3に記載のT細胞MMP。

【請求項7】

前記野生型MODポリペプチドが、IL-2、4-1BBL、PD-L1、CD70、CD80、CD86、ICOS-L、OX-40L、FasL、JAG1、TGF- β 、ICAM、及びPD-L2からなる群から独立して選択され、前記バリエーションMODポリペプチドが、それらのバリエーションである、請求項6に記載のT細胞MMP。

10

【請求項8】

前記第1及び第2の化学コンジュゲーション部位が、

- a) 酵素的修飾配列として作用するペプチド配列（例えば、スルファターゼモチーフ）、
- b) 非天然アミノ酸及び/またはセレノシステイン、
- c) 操作されたアミノ酸の化学コンジュゲーション部位、
- d) 炭水化物もしくはオリゴ糖部分、及び/または
- e) IgGヌクレオチド結合部位、

20

から独立して選択される、請求項1~7のいずれか1項に記載のT細胞MMP。

【請求項9】

前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、酵素的修飾配列を含む、請求項8に記載のT細胞MMP。

【請求項10】

前記1つまたは複数の第1または第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、スルファターゼモチーフである、請求項9に記載のT細胞MMP。

【請求項11】

前記スルファターゼモチーフが、配列X1Z1X2Z2X3Z3、X1(C/S)X2(P/A)X3Z3、X1CX2PX3Z3、またはCX2PX3Rを含み、ここで、

30

Z1が、システインまたはセリンであり、

Z2が、プロリン残基またはアラニン残基のいずれかであり、

Z3が、塩基性アミノ酸であり、

X1が、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、硫黄含有アミノ酸、または極性非荷電アミノ酸であり、但し、前記スルファターゼモチーフが前記ポリペプチドの前記N末端にある場合、X1が存在することを条件とし、

X2及びX3が独立して、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、極性非荷電アミノ酸、または硫黄含有アミノ酸である、

40

請求項10に記載のT細胞MMP。

【請求項12】

前記第1または前記第2の化学コンジュゲーション部位としてfGlyアミノ酸残基を含む、請求項11に記載のT細胞MMP。

【請求項13】

請求項8に記載のT細胞MMPを含み、かつエピトープをさらに含む、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートであって、前記エピトープが、第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位で、または第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位で、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドに直接、またはスペーサーもしくはリンカーを介して間接的にコンジュゲートされている、前記T細胞MMP-エピトープコ

50

ンジュゲート。

【請求項 14】

前記エピトープが、スパーサーまたはリンカーを介して前記第 1 のポリペプチド (polypeptide)、または前記第 2 のポリペプチドにコンジュゲートされている (conjugated)、請求項 13 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

【請求項 15】

前記エピトープが、がんエピトープ、ウイルスエピトープ、または自己エピトープである、請求項 13 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

【請求項 16】

前記エピトープが、HPV CMV または HBV エピトープから選択されるウイルスエピトープである、請求項 15 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

【請求項 17】

a) 請求項 15 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと、
b) 薬学的に許容される賦形剤と、
を含む、組成物。

【請求項 18】

有効量の前記 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを、それを必要とする個体に投与するための医薬の製造に向けた、請求項 15 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの使用。

【請求項 19】

インビトロでのまたは個体へのインビボでの、エピトープ選択的またはエピトープ選択的 / 特異的様態での免疫調節ポリペプチド (MOD) の標的 T 細胞への送達方法において使用するための医薬の製造に向けた、請求項 15 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの使用であって、

前記医薬を前記 T 細胞にインビトロで接触させること、または

前記医薬を前記個体に投与すること、を含み、

前記標的 T 細胞が、前記 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する前記エピトープに特異的である、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2017 年 9 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 555, 559 号、2017 年 12 月 21 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 609, 082 号、及び 2018 年 1 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 615, 402 号の利益を主張するものである。

【0002】

本願は、EFS - web を介して電子的に提出された配列表を含み、これはハードコピー及びコンピュータ可読形式 (CRF) の両方としての役目を果たすものであり、2018 年 9 月 3 日に作成され、196, 180 バイトのサイズであり、参照によりその全体が本明細書に援用される「123640 - 8001WO00 __ seq l i s t . t x t」と題されるファイルからなる。

【0003】

序論

適応免疫応答には、T 細胞の表面上に存在する T 細胞受容体 (TCR) の、主要組織適合複合体 (MHC、ヒトにおいてはヒト白血球抗原 (HLA) 複合体とも称される) によって抗原提示細胞 (APC) の表面上に非共有結合性で提示される低分子ペプチド抗原との結合 (e n g a g e m e n t) が関与する。この結合は、免疫系の標的化機構を表し、T 細胞調節 (活性化または阻害) 及びエフェクター機能に必須の分子間相互作用である。エピトープ特異的な細胞の標的化に続いて、標的化 T 細胞は、APC 上に見出される共刺

10

20

30

40

50

激タンパク質の、T細胞上の相対する共刺激タンパク質との結合を通して活性化される。両方のシグナル、すなわち、エピトープ/T C R結合、及びA P C共刺激タンパク質のT細胞共刺激タンパク質との結合が、T細胞の特異性及び活性化または阻害を駆動するために必要とされる。T C Rは、所与のエピトープに特異的であるが、共刺激タンパク質は、エピトープ特異的ではなく、代わりに、全般的に、全てのT細胞上または大きなT細胞サブセット上で発現される。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、一実施形態では、M H C受容体の一部分及び少なくとも1つの免疫調節ポリペプチド（本明細書で「MODポリペプチド」または単に「MOD」とも称される）を含む、T細胞調節多量体ポリペプチド（1つの「T細胞M M P」または複数の「T細胞M M P」）を提供する。T細胞M M Pに存在するMODのうちのいずれか1つまたは複数は、野生型であっても、または、その細胞（例えば、T細胞表面）結合パートナー/受容体（全般的に「同種MOD（Co-MOD）」と称される）に対して低減された結合親和性を呈するバリエーションであってもよい。T細胞M M Pは、標的エピトープを含む分子（例えば、ペプチドまたは炭水化物等の非ペプチド）がT細胞受容体をもつ細胞への提示のために共有結合され得る、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を含む。エピトープの連結用の化学コンジュゲーション部位を含むT細胞M M Pは、提示されるエピトープに特異的なT細胞の活性を調節し得るT細胞M M P - エピトープコンジュゲートを迅速に調製するために、したがって、これらのT細胞が関与する個体における免疫応答を調節するために有用である。T細胞M M P及びそれらのエピトープコンジュゲートは、具体的な標的エピトープと共送達するための、化学療法剤等の生理活性物質（ペイロード）のコンジュゲーションのための部位を追加的に含んでもよい。したがって、T細胞M M P - エピトープコンジュゲートは、免疫調節ペプチド（例えば、I L - 2、4 - 1 B B L、F a s L、T G F、C D 7 0、C D 8 0、C D 8 6、O X 4 0 L、I C O S - L、I C A M、J A G 1、もしくはそれらの断片、またはそれらの改変された（変異した）バリエーション）及び/またはペイロード（例えば、化学療法薬）をエピトープ特異的様態で細胞に送達するための手段と見なされ得る。

【0005】

本明細書に記載される実施形態では、T細胞M M Pは、会合したエピトープペプチドの不在下であっても、細胞内輸送中及び/または多量体ポリペプチドを発現する細胞による分泌後にT細胞M M Pの安定化を補助する、修飾を含んでもよい。本明細書に記載される実施形態では、T細胞M M Pは、M H C - I₁ヘリックスのカルボキシル末端とM H C - I₂₋₁ヘリックスのアミノ末端とを連結する修飾を含んでもよい。かかる修飾には、これらのヘリックスの示された領域を連結するジスルフィド結合による連結（d i s u l f i d e l i n k a g e s）の形成をもたらす、システイン残基の挿入が含まれる。例えば、M H C - Iのアミノ酸84（Y84C置換）及び139（A139C置換）、またはヘリックスを形成する配列に対して同等の位置でのシステイン残基の挿入により、T細胞M M Pを安定化する一助となるジスルフィド結合による連結が形成され得る。例えば、Z . H e i n e t a l . (2 0 1 4) , J o u r n a l o f C e l l S c i e n c e 1 2 7 : 2 8 8 5 - 2 8 9 7を参照されたい。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】化学カップリング（「CC」により表される）によって - 2ミクログロブリン（2 M）ポリペプチド配列に結合させたエピトープをもつ本開示のT細胞M M Pのある実施形態による、エピトープ非特異的T細胞と対比したエピトープ特異的T細胞の優先的な活性化を図示する。

【0007】

【図2 A】免疫グロブリンF cポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号1～12）を提供する。

10

20

30

40

50

【図 2 B】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【図 2 C】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【図 2 D】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【図 2 E】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【図 2 F】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【図 2 G】免疫グロブリン F c ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号 1 ~ 1 2）を提供する。

【0008】

【図 3 A】ヒト白血球抗原（HLA）クラス I 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。図 3 A のエントリ：3 A . 1 は、HLA - A アルファ鎖（HLA - A * 0 1 : 0 1 : 0 1 : 0 1）（NCBI 受託 NP _ 0 0 1 2 2 9 6 8 7 . 1）（配列番号 1 3 4）であり、エントリ 3 A . 2 は、HLA - A * 1 1 0 1（配列番号 1 3 5）からのものであり、エントリ 3 A . 3 は、HLA - A * 2 4 0 2（配列番号 1 3 6）からのものであり、エントリ 3 A . 4 は、HLA - A * 3 3 0 3（配列番号 1 3 7）からのものである。

【図 3 B】ヒト白血球抗原（HLA）クラス I 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。

【図 3 C】ヒト白血球抗原（HLA）クラス I 重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。シグナル配列であるアミノ酸 1 ~ 2 4 は、太字にされ、下線を引かれている。

【0009】

【図 3 D】それらのリーダー配列を含まずかつ膜貫通ドメイン領域を含まない、11 個の成熟 MHC クラス I 重鎖ペプチド配列のアライメントを示す。アライメントされた配列には、ヒト（huma）HLA - A、配列番号 1 4 0（配列番号 1 3 4 もまた参照されたい）；HLA - B、配列番号 1 4 1（配列番号 1 3 8 を参照されたい）；HLA - C、配列番号 1 4 2（配列番号 1 3 9 を参照されたい）；HLA - A * 0 2 0 1、配列番号 1 4 3；マウス H 2 K タンパク質配列、配列番号 1 4 4；HLA - A の 3 つのバリエーション（バリエーション 2、バリエーション 2 C、及びバリエーション 2 C P、配列番号 1 4 5 ~ 1 4 7）；3 つのヒト（huma）HLA - A バリエーション（HLA - A * 1 1 0 1（HLA - A 1 1）、配列番号 1 4 8；HLA - A * 2 4 0 2（HLA - A 2 4）、配列番号 1 4 9；及び HLA - A * 3 3 0 3（HLA - A 3 3）、配列番号 1 5 0 が含まれる。HLA - A * 0 2 0 1 は、HLA - A のバリエーションである。HLA - A（バリエーション 2）として記されるのは、HLA - A の Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C バリエーションである。HLA - A（バリエーション 2 C）として記される 7 番目の HLA - A 配列は、8 4 位、1 3 9 位、及び 2 3 6 位が C 残基で置換された HLA - A を示し、8 番目の配列は、先行する配列の C 末端に 1 つの追加的なプロリンが追加されている。9 番目から 11 番目の配列は、それぞれ HLA - A 1 1（HLA - A * 1 1 0 1）、HLA - A 2 4（HLA - A * 2 4 0 2）、及び HLA - A 3 3（HLA - A * 3 3 0 3）からのものであり、これらはある特定のアジア人集団においてよく見られる。アライメントにおいて、結合されたエピトープペプチドの不在下で MHC - 2 M 複合体を安定化するためのジスルフィド結合の形成のためにその位置のアミノ酸の代わりにシステイン残基が挿入され得る、複数の箇所（成熟タンパク質の 8 4 及び 1 3 9）が示される。また、アライメントにおいて、（成熟ポリペプチドの）2 3 6 位も示され、これは、（例えば、成熟ポリペプチドの a a 1 2 で）2 M と鎖内ジスルフィド結合を形成することができるシステイン残基で置き換えられ得る。これらの箇所の各々の上には矢印が現れ、当該残基は、太字にされている。残基 8 4、1 3 9、及び 2 3 6 の両側に位置するボックスは、a a クラス 1、a a クラス 2、a a クラス 3、a a クラス 4、a a クラス 5、及び a a クラス 6 と表される（図においてそれぞれ a a c 1 から

10

20

30

40

50

a a c 6として示される)、5つの残基からなるこれらの6つの組のそれぞれの側にある5つのアミノ酸からなる群を示し、これらは、(i)任意の天然型アミノ酸または(ii)プロリンもしくはグリシンを除く任意の天然型アミノ酸から独立して選択される1~5つのアミノ酸で置き換えられ得る。

【0010】

【図4】Homo sapiens (NP_004039.1、配列番号151)、Pan troglodytes (NP_001009066.1、配列番号152)、Macaca mulatta (NP_001040602.1、配列番号153)、Bos Taurus (NP_776318.1、配列番号154)、及びMus musculus (NP_033865.2、配列番号155)由来の2M前駆体(すなわち、リーダー配列を含む)の複数のアミノ酸配列のアライメントを提供する。下線を引かれたアミノ酸1~20は、シグナルペプチド(リーダー配列と称されることがある)である。

10

【0011】

【図5】A~Dとして記される4つのT細胞MMPの実施形態を提供する。各実例において、T細胞MMPは、N末端及びC末端を有し、第1の主要組織適合複合体(MHC)ポリペプチド(MHC-1)を含む、第1のポリペプチドと、N末端及びC末端ならびに第2のMHCポリペプチド(MHC-2)を有し、任意選択で免疫グロブリン(Fc)ポリペプチドまたは非Igポリペプチド足場を含む、第2のポリペプチドとを含む。示される実施形態では、第1及び第2のポリペプチドは、ジスルフィド結合によって連結されて示されるが、T細胞MMPは、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間にジスルフィド結合による連結または任意の他の共有結合性の連結を必要とするものではない。T細胞MMPはまた、破線(- - -)により示される、独立して選択されるリンカー配列を含んでもよい。T細胞MMPの第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドの両方は、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を含む。第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位(CC-1)及び第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位(CC-2)に対するいくつかの可能性のある箇所が、矢印により示される。独立して選択される1つまたは複数のMODのための箇所(例えば、それぞれのMODの間に任意選択的なアミノ酸リンカーを有して順に接続された1つ、2つ、3つ、またはそれよりも多くのMODを含む配列)は、点描のボックス内の「MOD」により示される。MODは、本開示の他の箇所でMOD*により表される、バリエーションMODを含有してもよい。Aにおいて、MOD(複数可)は、第1のポリペプチドのC末端に位置し、Bにおいて、MOD(複数可)は、第2のポリペプチドのN末端に位置し、Cにおいて、MOD(複数可)は、第2のポリペプチドのC末端に位置し、Dにおいて、複数のMOD(これらは同じであっても、または異なってもよい)は、第1のポリペプチドのC末端及び第2のポリペプチドのN末端に位置する。

20

30

【0012】

【図6】A~Hとして記される、図5における実施形態と相似するT細胞MMPエピトープコンジュゲートの8つの実施形態を提供する。図5にあるように、第1のポリペプチドは、N末端及びC末端を有し、このうち第1のMHCポリペプチドは、-2-ミクログロブリンポリペプチド(MHCクラスI重鎖(MHC-H)と相互作用し、T細胞受容体にエピトープを提示することが可能な2M)を含むものとして与えられる。第2のポリペプチドは、N末端及びC末端、MHC-Hポリペプチドを有し、任意選択で、免疫グロブリン(Fc)ポリペプチドまたは非Igポリペプチド足場を含む。T細胞MMPエピトープコンジュゲートの第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを繋ぐ任意選択的なジスルフィド結合は、A~Dにおいて、2Mペプチド配列とMHC-Hペプチド配列とを接続するように示され、破線(- - -)により示される、独立して選択される任意選択的なリンカー配列は、必須ではない。E~Hにおいては、A~Dにある複合体が繰り返されるが、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを繋ぐジスルフィド結合は、MHC-Hペプチド配列を、エピトープと2Mペプチド配列との間に介在するリンカー配列に繋ぐように示される(例えば、MHC-H鎖配列の84位のCys残基から(図3を参照さ

40

50

れたい)、介在するリンカーへの結合)。T細胞MMPの第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドの両方はまた、エピトープのコンジュゲーションのために採用される部位に加えて、1つまたは複数の化学コンジュゲーション部位を含んでもよい。かかるCC-1及びCC-2に対する可能性のある箇所が、矢印により示される。1つまたは複数の免疫調節ポリペプチド(MODまたはバリエーションMODのいずれか)は、図5に記載される通りである。

【0013】

【図7】T細胞MMPから形成される2つの二量体の例を提供する。「A」と標示される二量体は、図6において「A」と標示されるT細胞MMPの2つを二量体化した結果である。「B」と標示される二量体は、図6において「B」と標示されるT細胞MMPの2つを二量体化した結果である。示されるような実施形態は、それぞれのポリペプチドの間に1つまたは複数のジスルフィド結合を含み、これらの各々は任意選択的なものである。加えて、Fc領域または結合した任意選択的なリンカーにおけるCC-2部位のサブセットのみが示される。

10

【0014】

【図8】米国特許第9,310,374号から適合された、アルデヒド含有ポリペプチドと反応するヒドラジニンドールの略図を示す。

【0015】

【図9】パートAでは、FGE酵素の作用を通じた化学コンジュゲーション部位(fGly残基)を生じさせるための箇所としてスルファターゼモチーフを有する第1のポリペプチドを有する、T細胞MMPのマップを示す。Bにおいて、図9は、ヒトMHCクラスIHLA-A重鎖ポリペプチドのアミノ末端に結合した縦一列に並んだIL-2MOD、続いてヒトIgG1Fcポリペプチドを有する、T細胞MMPの第2のポリペプチドを示す。

20

【0016】

【図10A】N末端からC末端へと、下線及び太字で示されるヒトIL-2シグナル配列を有する、一連のHLA A*1101重鎖構築物を示す。

【図10B】N末端からC末端へと、下線及び太字で示されるヒトIL-2シグナル配列を有する、一連のHLA A*1101重鎖構築物を示す。

【図10C】N末端からC末端へと、下線及び太字で示されるヒトIL-2シグナル配列を有する、一連のHLA A*1101重鎖構築物を示す。

30

【図10D】N末端からC末端へと、下線及び太字で示されるヒトIL-2シグナル配列を有する、一連のHLA A*1101重鎖構築物を示す。シグナル(リーダー)配列には、MOD(ヒトIL-2として示される)または「任意選択的なペプチドリンカー-免疫調節ポリペプチド-任意選択的なペプチドリンカー」が続く。MODが指定されない場合、それは任意の所望のMODであってもよい。配列の残りの部分は、3つのシステイン置換(Y84C、A139C、A236C)を有するHLA A*1101 H鎖配列、リンカー、及び2つのアミノ酸置換(L234A、L235A)を有するhIgG1Fcである。アスタリスクは、配列の終止を示す。

【0017】

40

【図11A】ヒト2Mポリペプチド配列を含む一連の構築物を示す。

【図11B】ヒト2Mポリペプチド配列を含む一連の構築物を示す。

【図11C】ヒト2Mポリペプチド配列を含む一連の構築物を示す。

【図11D】ヒト2Mポリペプチド配列を含む一連の構築物を示す。

【図11E】ヒト2Mポリペプチド配列を含む一連の構築物を示す。構築物は、N末端からC末端へと、リーダー配列MSRSVALAVLALLSLSGLEA(太字にされ、下線を引かれている)、実施例1及び2に記載されるような任意選択的なリンカー及びスルファターゼ部位及び独立して選択される別のリンカー((リンカー)₀₋₄X1Z1X2Z2X3Z3(リンカー)₀₋₄)、ならびにR12Cアミノ酸修飾を有するヒト2M配列

50

【化 1】

(IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGF
 HPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTE
 FTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM)

を含む。哺乳類細胞における、図 10 にあるペプチド等の MHC クラス I 重鎖含有ポリペプチドとの共発現により、T 細胞 MMP を産出した後、スルファターゼ配列は、ホルミルグリシン残基を含有するように酵素的に修飾される。次いで、T 細胞 MMP のホルミルグリシンを、例えばそれらのカルボキシル末端でヒドラジニル基（例えば、ヒドラジニルインドール基）をもつように修飾された、HBV ペプチド（例えば、図 11A ~ 11E に示されるような）と反応させることによって、T 細胞 MMP コンジュゲートが調製され得る。

10

【0018】

定義

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを指す。故に、この用語には、1 本鎖、2 本鎖、または多重鎖 DNA または RNA、ゲノム DNA、cDNA、DNA-RNA ハイブリッド、あるいはプリン塩基及びピリミジン塩基または他の天然の、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0019】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、コード化及び非コード化アミノ酸、化学的もしくは生化学的に修飾されたまたは誘導体化されたアミノ酸、ならびに修飾ペプチド骨格を有するポリペプチドが含まれ得る、任意の長さのポリマー形態のアミノ酸を指す。

【0020】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対してある特定の「配列同一性」パーセントを有し、これはつまり、アライメントされたとき、当該 2 つの配列を比較した際に塩基またはアミノ酸のパーセンテージが同じであり、かつ同じ相対的位置にあるということである。配列同一性は、いくつかの異なる方式で決定することができる。配列同一性を決定するには、種々の好都合な方法、ならびに、ワールド・ワイド・ウェブを介して ncbi.nlm.nih.gov/BLAST、ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/、ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/、及び mafft.cbrc.jp/alignment/software/ を含めたサイトにて利用可能な、コンピュータプログラム（例えば、BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFT 等）を用いて、配列をアライメントすることができる。例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-10 を参照されたい。別途定めのない限り、配列アライメントは、BLAST を用いて作成される。

30

40

【0021】

「アミノ酸（単数）」及び「アミノ酸（複数）」という用語は、それぞれ「aa」及び「aas」と略称される。天然型アミノ酸（単数）または天然型アミノ酸（複数）とは、別途定めのない限り、L (Leu、ロイシン)、A (Ala、アラニン)、G (Gly、グリシン)、S (Ser、セリン)、V (Val、バリン)、F (Phe、フェニルアラニン)、Y (Tyr、チロシン)、H (His、ヒスチジン)、R (Arg、アルギニン)、N (Asn、アスパラギン)、E (Glu、グルタミン酸)、D (Asp、アスパラギン)、C (Cys、システイン)、Q (Gln、グルタミン)、I (Ile、イソロイシン)、M (Met、メチオニン)、P (Pro、プロリン)、T (Thr、トレオニン)、K (Lys、リジン)、及び W (Trp、トリプトファン)（全て L 体のものである）

50

）を意味する。セレノシステイン及びヒドロキシプロリンは両方とも、それらが包含されることが意図されるあらゆる事例において具体的に言及される、天然型アミノ酸である。

【0022】

非天然アミノ酸は、上記に列挙した天然型アミノ酸、セレノシステイン、及びヒドロキシプロリン以外の任意のアミノ酸である。

【0023】

本明細書で使用される「化学コンジュゲーション」とは、共有結合の形成を意味する。本明細書で使用される「化学コンジュゲーション部位」とは、ポリペプチドへの共有結合の形成において必要とされるかまたはそれを補助する任意の前後関係にある要素（例えば、周囲のアミノ酸配列）を含む、共有結合が形成され得るポリペプチド内の箇所を意味する。したがって、群内のあるアミノ酸において酵素的修飾、及び最終的に共有結合の形成を導くアミノ酸の群を含む部位もまた、化学コンジュゲーション部位と称され得る。一部の事例では、前後関係から明確となろうが、化学コンジュゲーション部位という用語は、共有結合の形成または化学修飾がすでに起こった箇所を指して使用されてもよい。

【0024】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、タンパク質における、類似した側鎖を有するアミノ酸残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンからなり、脂肪族 - ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びトレオニンからなり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンからなり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンからなり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンからなり、酸性側鎖を有するアミノ酸の群は、グルタミン酸及びアスパラギン酸からなり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンからなる。例となる保存的アミノ酸置換の群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン - グリシン、及びアスパラギン - グルタミンである。

【0025】

本明細書で使用される「免疫シナプス (immunological synapse)」または「免疫シナプス (immune synapse)」という用語は全般的に、適応免疫応答において相互作用している2つの免疫細胞間の天然の境界面、例えば、APC、または標的T細胞と、エフェクター細胞、例えば、リンパ球、エフェクターT細胞、天然キラー細胞等との間の境界面を指す。APCとT細胞との間の免疫シナプスは全般的に、例えば、Bromley et al., Ann Rev Immunol. 2001; 19: 375 - 96に記載されるように、T細胞抗原受容体と1つまたは複数のMHC分子との相互作用によって開始される。同文献の開示は参照により本明細書に援用される。

【0026】

「T細胞」には、ヘルパーT細胞 (CD4⁺細胞)、細胞傷害性T細胞 (CD8⁺細胞)、制御性T細胞 (Tレグ)、及びNK-T細胞を含めた、CD3を発現する全ての種類の免疫細胞が含まれる。

【0027】

別途定めのない限り、本明細書で使用されるとき、「第1の主要組織適合複合体 (MHC) ポリペプチド」または「第1のMHCポリペプチド」という用語、ならびに「第2のMHCポリペプチド」、「MHC重鎖」、及び「MHC-H」という用語は、MHCクラスI受容体の要素を指す。

【0028】

「MOD」(共免疫調節ポリペプチドまたは共刺激ポリペプチドとも呼ばれる)は、この用語が本明細書で使用されるとき、T細胞上の「同種MOD」(同種共免疫調節ポリペプチドまたは同種共刺激ポリペプチドとも呼ばれる)に特異的に結合して、それによって、例えばペプチドが負荷されたMHCポリペプチドとのTCR/CD3複合体の結合によ

10

20

30

40

50

って提供される一次シグナルに加えて、増殖、活性化、分化等を含むが、これらに限定されないT細胞の応答を媒介するシグナルを提供する、APC（例えば、樹状細胞、B細胞等）上のポリペプチド、またはAPC上のポリペプチドの一部を含む。MODには、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、Fasリガンド（FasL）、誘導性共刺激リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンボトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体、及びB7-H3に特異的に結合するリガンドが含まれるが、これらに限定されない。MODはまた、とりわけ、限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及びCD83に特異的に結合するリガンド等の、T細胞上に存在する同種MODに特異的に結合する抗体（またはFab等のその抗原結合部分）も包含する。

【0029】

T細胞MMPの「免疫調節ドメイン」（「MOD」）は、MODとして作用するT細胞MMPのポリペプチドである。

【0030】

本明細書で使用される「異種」とは、それぞれ天然の核酸またはタンパク質に見出されないヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

【0031】

本明細書で使用される「組換え」とは、特定の核酸（DNAまたはRNA）が、天然系に見出される内在性核酸から区別可能な構造的コード配列または非コード配列を有する構築物をもたらす、クローニング、制限、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、及び/またはライゲーションステップの種々の組み合わせの産物であることを意味する。ポリペプチドをコードするDNA配列を、cDNA断片から、または一連の合成オリゴヌクレオチドから組み立てて、細胞内または無細胞転写・翻訳系に含まれる組換え転写単位から発現させることが可能である合成核酸を提供することができる。

【0032】

「組換え発現ベクター」及び「DNA構築物」という用語は、ベクター及び少なくとも1つのインサートを含むDNA分子を指すように本明細書で互換的に使用される。組換え発現ベクターは、通常は、インサート（複数可）を発現させる及び/または伝播させる目的で、または他の組換えヌクレオチド配列の構築目的で生成される。インサート（複数可）は、プロモーター配列に作動可能に連結される場合もあれば、されない場合もあり、またDNA制御配列に作動可能に連結される場合もあれば、されない場合もある。

【0033】

本明細書で使用されるとき、「親和性」という用語は、2つの作用物質（例えば、抗体及び抗原）の可逆的結合に関する平衡定数を指し、解離定数（ K_D ）として表される。親和性は、無関係のアミノ酸配列に対する抗体の親和性よりも少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも6倍高い、少なくとも7倍高い、少なくとも8倍高い、少なくとも9倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも40倍高い、少なくとも50倍高い、少なくとも60倍高い、少なくとも70倍高い、少なくとも80倍高い、少なくとも90倍高い、少なくとも100倍高い、もしくは少なくとも1,000倍高い、またはそれよりも高い可能性がある。標的タンパク質に対する抗体の親和性は、例えば、約100ナノモル濃度（nM）～約0.1nM、約100nM～約1ピコモル濃度（pM）、もしくは約100nM～約1フェムトモル濃度（fM）、またはそれよりも高い可能性がある。本明細書で使用されるとき、「結合活性」という用語は、2つ以上の作用物質の複合体の、希釈後の解離に対する抵抗性を指す。「免疫反応性」及び「優先的に結合する」という用語は、抗体及び/または抗原結合断片に関して本明細書で互換

10

20

30

40

50

的に使用される。

【0034】

本明細書で使用される「結合」（例えば、1つもしくは複数のMODを含むT細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲート等の分子の、1つまたは複数のポリペプチド（例えば、T細胞受容体及びT細胞上の同種共免疫調節ポリペプチド（同種MOD）への結合を参照しての）は、分子間の非共有結合性の相互作用（複数可）を指す。非共有結合性の結合は、例えば、塩橋及び水架橋等の相互作用を含めた、静電気、疎水性、イオン性、及び/または水素結合相互作用に起因する、2つの分子間の直接の会合を指す。非共有結合性の結合による相互作用は全般的に、 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、または 10^{-12} M未満の解離定数（ K_D ）を特徴とする。「親和性」は、非共有結合性の結合の強度を指し、増加した結合親和性がより低い K_D に相関する。「特異的結合」は全般的に、例えば、リガンド分子とその結合部位または「受容体」との間の、少なくとも約 10^{-7} Mまたはそれよりも高い親和性（例えば、 5×10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、もしくは 10^{-12} M未満、及びそれよりも高い親和性、または $10^{-7} \sim 10^{-9}$ もしくは $10^{-9} \sim 10^{-12}$ の範囲内）での結合を指す。「非特異的結合」は全般的に、リガンドの、その指定される結合部位または「受容体」以外の何らかへの、典型的には約 10^{-7} M未満の親和性での結合（例えば、約 10^{-6} M未満、約 10^{-5} M未満、約 10^{-4} M未満の親和性での結合）を指す。しかしながら、一部の文脈、例えば、TCRとペプチド/MHC複合体との間の結合においては、「特異的結合」は、 $1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ 、または $100 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ の範囲内にあり得る。本明細書で使用される「共有結合」とは、2つの異なる分子間の1つまたは複数の共有結合性の化学結合の形成を意味する。

【0035】

「処置」、「処置すること」等の用語は、所望の薬理作用及び/または生理作用を得ることを全般的に意味するように本明細書で使用される。この作用は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防する（preventing）という点で予防的（prophylactic）であってもよく、及び/または疾患及び/または疾患に起因し得る有害作用に対する部分的もしくは完全な治癒の点で治療的であってもよい。本明細書で使用される「処置」とは、哺乳動物における疾患または症状のあらゆる処置を網羅するものであり、これには、（a）疾患もしくは症状にかかる素因があり得るが、まだそれを有すると診断されていない対象において疾患もしくは症状が起こることを予防すること、（b）疾患もしくは症状を阻害すること、すなわち、その発症を停止させること、及び/または（c）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすこと、が含まれる。治療剤は、疾患または損傷の前、その最中、及び/またはその後投与されてもよい。処置が患者の望ましくない臨床症状を安定化するかまたは低減する、継続中の疾患の処置が、特に目的となる。かかる処置は、罹患した組織における完全な機能喪失の前に行われることが望ましい。対象となる療法は、疾患の症候性の段階中、及び一部の事例では疾患の症候性の段階後に投与されることが望ましいであろう。

【0036】

「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、診断、処置、または療法が所望される任意の哺乳動物対象を指す。哺乳動物には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、ウサギ類（例えば、ウサギ）、有蹄類（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギ等）等が含まれる。

【0037】

本発明がさらに説明される前に、本発明が説明される特定の実施形態に限定されず、したがって、当然のことながら、異なり得ることを理解されたい。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で使用される専門用語が特定の実施形態を説明することを目的とするにすぎず、限定することを意図していないことも理解されたい。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 8 】

値の範囲が提供される場合、この範囲が、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、その範囲の上限と下限との間の各介在値を下限の小数点第 1 位まで含み、その定められる範囲内の任意の他の定められる値または介在値が本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は独立して、当該より小さい範囲に含まれてもよく、これらもまた、定められる範囲内の任意の具体的に除外される境界値に制約されつつ、本発明に包含される。ある範囲が上限及び下限を含む場合、これらの境界値のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

【 0 0 3 9 】

別途規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実践または試験において、本明細書に記載の方法及び材料と同様または同等の任意の方法及び材料もまた使用することができるが、好ましい方法及び材料がここでは記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、それらの刊行物が引用される関連となる方法及び / または材料を開示し、説明するために、参照により本明細書に援用される。

10

【 0 0 4 0 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「 a 」、 「 a n 」、及び「 t h e 」は、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、複数形の指示対象を含むことに留意しなければならない。故に、例えば、「多量体 T 細胞調節ポリペプチド (単数) 」への言及は、複数のかかるポリペプチドを含み、「 (t h e) 免疫調節ポリペプチド」または「 (t h e) M O D 」への言及は、 1 つまたは複数の免疫調節ポリペプチド及び当業者に既知のその均等物への言及を含み、その他も同様である。特許請求の範囲がいずれの任意選択的な要素をも除外するように起草され得ることにさらに留意されたい。したがって、この陳述は、請求項の要素の列挙に関連しての「単に」、「のみ」等といった排他的用語の使用、または「否定的」限定の使用のための先行基礎 (a n t e c e d e n t b a s i s) としての役目を果たすことを意図する。

20

【 0 0 4 1 】

明確さのために別個の実施形態の関連において記載される、本発明のある特定の長がまた、単一の実施形態において組み合わせで提供されてもよいことが理解される。それとは逆に、簡潔さのために単一の実施形態の関連において記載される、本発明の種々の長がまた、別個にまたは任意の好適な部分的組み合わせで提供されてもよい。本発明に関する実施形態の全ての組み合わせが、あたかもありとあらゆる組み合わせが個々にかつ明示的に開示されているかのように本発明によって具体的に包含され、本明細書に開示される。加えて、種々の実施形態及びその要素の全ての部分的組み合わせもまた、あたかもありとあらゆるかかる部分的組み合わせが個々にかつ明示的に本明細書に開示されているかのように本発明によって具体的に包含され、本明細書に開示される。

30

【 0 0 4 2 】

本明細書で考察される刊行物は、本願の出願日前に単にそれらが開示されるために提供される。本明細書には、先願発明に基づいて本発明がかかる刊行物に先行する権利がないことが認められると解釈されるものは何もない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行物の日付とは異なる場合があり、実際の刊行物の日付は独立して確認する必要がある。

40

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 3 】

I . エピトープ結合のための化学コンジュゲーション部位を有する T 細胞調節多量体ポリペプチド (T 細胞 M M P)

本開示は、 T 細胞の活性を調節するのに有用である T 細胞 M M P 及びそれらのエピトープコンジュゲート、ならびにそれらの調製方法及び個体における免疫応答を調節する際のそれらの使用方法を提供する。 T 細胞 M M P は、独立して選択される 1 つまたは複数の野

50

生型MODポリペプチド及び／またはそれらの同種MODに対して低減された結合親和性を呈するバリエーションMODポリペプチド、ならびにエピトープ及びペイロードをカップリングするための化学コンジュゲーション部位を含んでもよい。2つの種類のポリペプチド（第1のポリペプチド及び第2のポリペプチド）を含み、これらのポリペプチドのうち少なくとも1つが、化学療法剤等のペイロード及び／またはTCRに結合し得る材料（例えば、エピトープペプチド及びヌルペプチド（null peptide））の結合（例えば、共有結合性の結合）のための化学コンジュゲーション部位を含む、ヘテロ二量体であるT細胞MMPが本開示に含まれる。また、エピトープ及び／またはペイロード（例えば、化学療法薬）に化学的にコンジュゲートされたT細胞MMPも本開示に含まれる。T細胞MMPに存在するMOD（複数可）の種類に応じて、TCRに特異的なエピトープがT細胞MMP上に存在する場合、T細胞は、例えば、クローン増大を含めた活性化を受けることによって応答し得る（例えば、IL-2、4-1BBL、及び／またはCD80等の活性化型MODがT細胞MMPに組み込まれる場合）。代替として、T細胞は、CD86及び／またはPD-L1等のMODがT細胞MMPに組み込まれる場合、T細胞活性を下方制御する（例えば、自己免疫反応を遮断する）阻害を受けてもよい。MODはいずれのエピトープにも特異的ではないため、T細胞の活性化または阻害は、T細胞MMPのT細胞への結合がMHC-エピトープ-TCR間相互作用から強力に影響を受けるように、またはさらにはそれに支配されるように、同種MODに対して低減された親和性を有するバリエーションMODをT細胞MMPに組み込むことによって、エピトープ特異的相互作用の方へ傾けることができる。

10

20

【0044】

本明細書に記載される実施形態では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、代用APCとして機能し、適応免疫応答を模倣する。T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲート複合体において提示される共有結合されたエピトープにより、T細胞の表面上に存在するTCRに結合することによって、それを行う。この結合は、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに、エピトープ特異的細胞の標的化を達成する能力を提供する。本明細書に記載される実施形態では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートはまた、T細胞上の相対する共刺激タンパク質（同種MOD）に結合する少なくとも1つのMODも保有する。次いで、両方のシグナル、すなわち、TCRへのエピトープ/MHC結合及び同種MODへのMOD結合が、所望のT細胞特異性と、阻害または活性化/増殖のいずれかとの両方を駆動する。

30

【0045】

化学コンジュゲーション部位を有するT細胞MMPは、治療用途、診断用途、及び研究用途での材料を調製するために異なるエピトープ及び／またはペイロードが挿入され得る、プラットフォームとしての用途がある。化学コンジュゲーション部位を含むかかるT細胞MMPは、エピトープ含有材料（例えば、ペプチド）をT細胞MMPに迅速に挿入し、該エピトープに特異的なTCRをもつT細胞の活性化または阻害に関して試験することを可能にするため、診断薬及び治療薬の迅速な調製を可能にする。

【0046】

ある実施形態では、かかるT細胞MMPの化学コンジュゲーション部位を利用して、化学療法剤または酵素等のペイロードをT細胞MMPに結合させてもよい。付加されたエピトープの不在下で、結果として生じる複合体は、特に、T細胞MMPがFc足場の組み込みに起因して多量体（例えば、二量体または高次構造）を形成する場合、抗体と同様の様式で用いて、ペイロードを送達させてもよい。エピトープの欠如に起因して、T細胞MMP-ペイロードコンジュゲートのMODは、異なる細胞に対するそれらの結合特異性及び当該複合体の結合活性によって、ペイロードを受け取ることになる細胞を規定することになる。

40

【0047】

ある実施形態では、T細胞増殖を刺激するバリエーションMOD及びエピトープがT細胞MMPに組み込まれる場合、T細胞を少なくとも1つの濃度のT細胞MMPに接触させるこ

50

とにより、該エピトープに特異的なTCRを有するT細胞の活性化において(T細胞増殖またはZAP-70活性(例えば、Wang, et al., Cold Spring Harbor perspectives in biology 2.5(2010): a002279を参照されたい)によって測定したとき)、該エピトープに特異的なTCRを有しない同じ濃度のT細胞MMPに接触させたT細胞と比較して、少なくとも2倍(例えば、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、50、75、または100倍)の差異が誘導される。

【0048】

ある実施形態では、T細胞活性化を阻害するバリエーションMOD及びエピトープがT細胞MMPに組み込まれる場合、T細胞を少なくとも1つの濃度のT細胞MMPに接触させることにより、(T細胞増殖によって測定したとき)T細胞の活性化がエピトープ特異的様態で阻止される。

10

【0049】

エピトープが組み込まれたT細胞MMPの特異性は、結合への該エピトープ及びMODの相対的寄与度に左右されよう。MODが結合相互作用を支配する場合、該エピトープに特異的なT細胞へのT細胞MMPの特異性は、該エピトープがMODよりも全体的結合エネルギーに多く寄与することによって結合相互作用を支配する場合のT細胞MMP複合体と比べて、低減されよう。該エピトープに特異的なTCRに対するエピトープの寄与度が高ければ高いほど、T細胞MMPの特異性はそのT細胞型に対して高くなる。エピトープがそのTCRに対して強力な親和性を有する場合、それらの同種MODに対して低減された親和性を有するバリエーションMODの使用が、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのエピトープ選択的相互作用に有利となり、また、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートにコンジュゲートされ得る任意のペイロードの選択的送達を容易にしよう。

20

【0050】

エピトープを組み込むため及びエピトープ特異的であるT細胞MMPを調製するための構造として有用であることに加えて、エピトープを欠いているか、またはヌルペプチドを含有するかのいずれかとして説明されるT細胞MMPは、T細胞MMPに存在するMOD及び/またはバリエーションMODに対する受容体をもつ標的細胞にペイロードを送達するために採用されてもよい。

【0051】

30

ある実施形態では、エピトープを欠いた(またはヌルペプチドを含有する)、T細胞の活性化及び/または増殖に対して阻害性のMODをもつT細胞MMPが、T細胞MMPに存在するMODまたはバリエーションMODに対する1つまたは複数の受容体を含有するT細胞の模擬物質(simulators)として使用されてもよい。かかる刺激性T細胞MMPを用いて、それが結合するT細胞にペイロード(例えば、化学的にコンジュゲートされた化学療法薬)を同時に送達してもよい。

【0052】

ある実施形態では、エピトープを欠いた(またはヌルペプチドを含有する)、T細胞の活性化及び/または増殖に対して阻害性のMODをもつT細胞MMPが、免疫反応を抑制する(例えば、移植片対宿主または宿主対移植片拒絶反応を予防する)ために、免疫抑制薬として、単独で、またはシクロスポリン等の他の免疫抑制薬と組み合わせて使用されてもよい。かかる阻害性T細胞MMPを用いて、それが結合するT細胞にペイロード(例えば、化学的にコンジュゲートされた化学療法薬)を同時に送達してもよい。

40

【0053】

本開示は、T細胞の活性を調節するために、したがって、個体における免疫応答を調節するために有用である、T細胞MMPを提供する。T細胞MMPは、同種MODに対して低減された結合親和性を呈するMODを含む。

【0054】

I. A. T細胞MMP

本明細書に記載されるT細胞MMPフレームワークは、第1のポリペプチド鎖または第

50

2 のポリペプチド鎖のいずれかの上に少なくとも 1 つの化学コンジュゲーション部位を含む。

【0055】

ある実施形態では、本開示は、a) 第 1 の MHC ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチドと、b) 第 2 の MHC ポリペプチドを含む第 2 のポリペプチドと、c) 第 1 及び第 2 のポリペプチドのうちの少なくとも一方が化学コンジュゲーション部位を含むことと、d) 少なくとも 1 つの MOD と、を含むヘテロ二量体を含み、該第 1 及び / または第 2 のポリペプチドが少なくとも 1 つの MOD (例えば、1 つ、2 つ、3 つ、またはそれよりも多く) を含む、T 細胞 MMP を提供する。任意選択で、第 1 または第 2 のポリペプチドは、Ig Fc ポリペプチドまたは非 Ig 足場を含む。独立して選択される、MOD のうちの 1 つまたは複数は、同種 MOD に対して、対応する野生型 MOD の同種 MOD に対する親和性と比較して低減された親和性を呈するバリエーション MOD であってもよい。本開示はまた、エピトープ (例えば、エピトープをもつペプチド) が化学コンジュゲーション部位に (直接または間接的に) 共有結合されて、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを形成する、T 細胞 MMP も提供する。かかる実施形態では、本開示の T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在するエピトープ (例えば、エピトープペプチド) は、少なくとも 100 μ M (例えば、少なくとも 10 μ M、少なくとも 1 μ M、少なくとも 100 nM、少なくとも 10 nM、または少なくとも 1 nM) の親和性で、T 細胞上の T 細胞受容体 (TCR) に結合し得る。T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートは、該 T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートが第 2 の T 細胞に結合する親和性よりも少なくとも 25 % 高い親和性で、第 1 の T 細胞に結合し得、ここで、第 1 の T 細胞は、その表面上に同種 MOD、及び少なくとも 100 μ M の親和性で該エピトープに結合する TCR を発現し、第 2 の T 細胞は、その表面上に同種 MOD を発現するが、その表面上に、少なくとも 100 μ M (例えば、少なくとも 10 μ M、少なくとも 1 μ M、少なくとも 100 nM、少なくとも 10 nM、または少なくとも 1 nM) の親和性で該エピトープに結合する TCR は発現しない。

10

20

【0056】

ある実施形態では、本開示は、ヘテロ二量体の T 細胞 MMP (これは、ヘテロ二量体のより高いレベルでの多量体、二量体、三量体等を形成し得る) であって、

a) i) 第 1 の MHC ポリペプチドを含む、第 1 のポリペプチドと、

b) N 末端から C 末端の順に、i) 第 2 の MHC ポリペプチド、及び ii) 任意選択的な免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチド足場または非 Ig ポリペプチド足場を含む、第 2 のポリペプチドと、

30

c) 第 1 のポリペプチドに結合したもしくはその内部にある第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位、及び / または第 2 のポリペプチドに結合したもしくはその内部にある第 2 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位と、

d) 1 つまたは複数の免疫調節ポリペプチド (MOD) と、を含み、該 1 つまたは複数の MOD のうちの少なくとも 1 つが、

A) 第 1 のポリペプチドの C 末端に (例えば、図 5 または 6 における A を参照されたい)、

40

B) 第 2 のポリペプチドの N 末端に (例えば、図 5 または 6 における B を参照されたい)、

C) 第 2 のポリペプチドの C 末端に (例えば、図 5 または 6 における C を参照されたい)、または

D) 第 1 のポリペプチドの C 末端及び第 2 のポリペプチドの N 末端にあり (例えば、図 5 または 6 における D を参照されたい)、

該 1 つまたは複数の MOD の各々が、独立して選択される野生型またはバリエーション MOD である、該ヘテロ二量体の T 細胞 MMP を提供する。

【0057】

かかる T 細胞 MMP フレームワークは、エピトープ (例えば、ポリペプチドエピトープ

50

）を、第 1 及び第 2 の M H C ポリペプチドのうちの少なくとも一方に結合された第 1 または第 2 の化学コンジュゲーション部位のうちの 1 つへの連結を通して共有結合性で結合させて、T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートを形成させ得る、プラットフォームとして作用する。これは、T 細胞 M M P の関連において T 細胞上の T 細胞受容体（T C R）に提示するための、異なるエピトープのフレームワークへの容易な導入を可能にする。ペイロード（例えば、化学療法薬）を同様に、第 1 または第 2 の化学コンジュゲーション部位のうちの 1 つ（例えば、エピトープの結合に採用されない部位）への共有結合性の結合によって、T 細胞 M M P に結合させることができる。

【0058】

多量体化が可能な免疫グロブリン（I g）F c ポリペプチドまたは非 I g ポリペプチド足場が採用される場合、T 細胞 M M P は、多量体化し得る。該複合体は、二量体（例えば、図 7 を参照されたい）、三量体、四量体、または五量体の形態であってもよい。T 細胞 M M P の多量体を含む組成物はまた、単量体を含んでもよく、したがって、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、またはそれらのいずれかの組み合わせ（例えば、単量体及び二量体の混合物）を含んでもよい。

【0059】

ある実施形態では、M O D は、任意選択でエピトープを含む T 細胞 M M P において提示される、独立して選択される野生型 M O D またはバリエーション M O D である。ある実施形態では、M O D は、エピトープ特異的 T 細胞の活性化 / 増殖を刺激することが可能な 1 つまたは複数の M O D またはバリエーション M O D（例えば、I L - 2、4 - 1 B B L、及び / または C D 8 0）である。別の実施形態では、M O D は、T 細胞の活性化 / 増殖を阻害することが可能な 1 つまたは複数の M O D またはバリエーション M O D（例えば、F A S - L 及び / または P D - L 1）である。好適なエピトープをもつ T 細胞 M M P と併用されるとき、かかる活性化型 M O D または阻害性 M O D は、特に M O D がバリエーション M O D であり、M H C - エピトープ - T C R 間相互作用が T 細胞 M M P と T 細胞との相互作用を支配するのに十分に強力である場合、エピトープ特異的 T 細胞作用の能力がある。

【0060】

I . A . 1 T 細胞 M M P における第 1 及び第 2 の化学コンジュゲーション部位の箇所
エピトープ（例えば、エピトープ含有ペプチド）及び / またはペイロードを組み込む化学コンジュゲーション反応に供される前に、本明細書に記載される T 細胞 M M P は、少なくとも 1 つの化学コンジュゲーション部位を含む。T 細胞 M M P が 1 つよりも多くの化学コンジュゲーション部位を含む場合、第 1 のポリペプチド上にコンジュゲーション部位（第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位）が 2 つ以上、第 2 のポリペプチド上にコンジュゲーション部位（第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位）が 2 つ以上、または第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位が少なくとも 1 つ及び第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位が少なくとも 1 つ、存在してもよい。1 つよりも多くの化学コンジュゲーション部位が T 細胞 M M P 分子に存在する各事例において、これらの部位は独立して選択され、コンジュゲーションのために同じまたは異なる化学反応、アミノ酸配列、または化学基を採用してもよい。第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位（C C - 1 として示される）及び第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位（C C - 1 として示される）に対する箇所のいくつかの例が、図 5 ~ 7 に示される。

【0061】

複数の実施形態では、T 細胞 M M P の第 1 のポリペプチドは、その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない第 1 の M H C ポリペプチド、その N 末端上にリンカーをもつ第 1 の M H C ポリペプチド、その C 末端上にリンカーをもつ第 1 の M H C ポリペプチド、またはその N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ第 1 の M H C ポリペプチドを含む。第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つは、a) 第 1 の M H C ポリペプチドの配列に結合しているか（例えば、N 末端または C 末端で）、もしくははその配列内にあり、このとき、第 1 の M H C ポリペプチドが、その N 末端及

10

20

30

40

50

びC末端上にリンカーを有しない、b)第1のMHCポリペプチドの配列に結合しているか、もしくはその配列内にあり、ここで、第1のMHCポリペプチドが、そのN末端及びC末端上にリンカーを含む、c)第1のMHCポリペプチドのN末端上のリンカーの配列に結合しているか、もしくはその配列内にある、及び/またはd)第1のMHCポリペプチドのC末端上のリンカーの配列に結合しているか、もしくはその配列内にある。T細胞MMPの第1のポリペプチドの追加的な化学コンジュゲーション部位が、第1のMHCポリペプチドまたはそれに結合した任意のリンカー内を含めた、第1のポリペプチド上の任意の箇所に(それに結合して、またはその内部に)存在してもよい(例えば、化学コンジュゲーション用の部位としての役目を果たす1つよりも多くの酵素修飾配列)。かかる実施形態では、第1のMHCポリペプチドは、下記に記載されるような2Mポリペプチド配列を含んでもよい。

10

【0062】

複数の実施形態では、T細胞MMPの第2のポリペプチドは、そのN末端及びC末端上にリンカーを有しない第2のMHCポリペプチド、そのN末端上にリンカーをもつ第2のMHCポリペプチド、そのC末端上にリンカーをもつ第2のMHCポリペプチド、またはそのN末端及びC末端上にリンカーをもつ第2のMHCポリペプチドを含む。第2のポリペプチドの1つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つは、a)第2のMHCポリペプチドの配列に結合しているか(例えば、N末端またはC末端で)、もしくはその配列内にあり、このとき、第2のMHCポリペプチドが、そのN末端及びC末端上にリンカーを有しない、b)第2のMHCポリペプチドの配列に結合しているか、もしくはその配列内にあり、ここで、第2のMHCポリペプチドが、そのN末端及びC末端上にリンカーを含む、c)第2のMHCポリペプチドのN末端上のリンカーの配列に結合しているか、もしくはその配列内にある、及び/またはd)第2のMHCポリペプチドのC末端上のリンカーの配列に結合しているか、もしくはその配列内にある。加えて、第2のポリペプチドが、免疫グロブリン(Fc)ポリペプチドaa配列または非Igポリペプチド足場を、それに結合した追加的なリンカーと共に含有する場合、第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位は、第2のMHCポリペプチド、免疫グロブリンポリペプチド、ポリペプチド足場、または結合したリンカーに結合しているか、またはその内部にあってもよい。T細胞MMPの第2のポリペプチドの追加的な化学コンジュゲーション部位が、第2のMHCポリペプチドまたはそれに結合した任意のリンカー内を含めた、第2のポリペプチド上の任意の箇所に(それに結合して、またはその内部に)存在してもよい(例えば、化学コンジュゲーション用の部位としての役目を果たす1つよりも多くの酵素修飾配列)。かかる実施形態では、第2のMHCポリペプチドは、下記に記載されるようなMHC重鎖(MHC-H)ポリペプチド配列を含んでもよい。

20

30

【0063】

ある実施形態では、第1及び第2のMHCポリペプチドは、MHCクラスIポリペプチドであるように選択されてもよく、このうち第1のMHCポリペプチドが2Mポリペプチド配列を含み、第2のポリペプチドがMHC重鎖配列を含み、第1または第2のポリペプチド上に少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位が存在する。ある実施形態では、T細胞MMPにおける1つまたは複数の第1の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つは、2Mポリペプチド、またはそのN末端もしくはC末端に結合したリンカーのいずれかに結合しているか(N末端またはC末端での結合を含む)、またはそれらのいずれかの内部にあってもよい。ある実施形態では、T細胞MMPにおける第2のポリペプチドの1つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つは、MHC-Hポリペプチド、MHC-HポリペプチドのN末端もしくはC末端に結合したリンカーに結合しているか(N末端またはC末端での結合を含む)、もしくはその内部にあってもよく、または、存在する場合、免疫グロブリン(Fc)ポリペプチド(または非Igポリペプチド足場)もしくはそれに結合したリンカーに結合しているか、もしくはその内部にあってもよい。かかるMHCクラスIポリペプチド構築物の別の実施形態では、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドの両方が、少なくとも1つの化学コンジュゲ

40

50

ション部位を含む。

【 0 0 6 4 】

T細胞MMPが2Mポリペプチド配列を含む場合、この配列は、図4に記載されるアミノ酸配列のうちの1つに対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有し得る。2Mポリペプチドは、図4に記載されるアミノ酸配列の一部分に対して同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、80、100、または110個の連続アミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでもよい。化学コンジュゲーション配列は、2Mポリペプチドに結合し得るか（例えば、N末端及び/またはC末端またはそれに結合したリンカーで）、または2Mポリペプチド内にあり得る。

10

【 0 0 6 5 】

T細胞MMPがMHC-Hポリペプチドを含む場合、それは、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C重鎖であってもよい。ある実施形態では、MHC-Hポリペプチドは、図3A～3Dのうちの1つに記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含んでもよい。MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、図3A～3Dに記載されるアミノ酸配列の一部分に対して同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、80、100、150、200、250、300、または330個の連続アミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでもよい。化学コンジュゲーション配列は、MHC-Hポリペプチドに結合し得るか（例えば、N末端及び/またはC末端またはそれに結合したリンカーで）、またはその内部にあり得る。

20

【 0 0 6 6 】

T細胞MMPの第2のポリペプチドは、多量体化するための構造及びその能力をT細胞MMP（またはそのエピトープコンジュゲート）に提供し、加えて、化学コンジュゲーションのための可能性のある箇所を提供する、分子足場の一部として作用し得るIgFcポリペプチド配列を含んでもよい。一部の実施形態では、IgFcポリペプチドは、IgG1Fcポリペプチド、IgG2Fcポリペプチド、IgG3Fcポリペプチド、IgG4Fcポリペプチド、IgAFcポリペプチド、またはIgMFcポリペプチドである。かかる実施形態では、IgFcポリペプチドは、図2A～2Dのうちの1つに図示されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、98、もしくは99%、またはさらには100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。IgFcポリペプチドは、図2にあるアミノ酸配列の一部分に対して同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、60、80、100、120、140、160、180、200、または220個の連続アミノ酸を有する配列を含んでもよい。ある実施形態では、第2のポリペプチドがIgG1Fcポリペプチドを含む場合、このポリペプチドはまた、N297A、L234A、L235A、L234F、L235E、及びP331Sから選択される1つまたは複数のアミノ酸置換を含んでもよい。かかる一実施形態では、IgG1Fcポリペプチドは、単独で、または第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位と組み合わせてのいずれかで、L234A及びL235A置換を含む。化学コンジュゲーション部位は、N末端及び/またはC末端にまたはそれに結合したリンカーに位置し/そこで結合し得るか、あるいはIgFcポリペプチド内にあり得る。

30

40

【 0 0 6 7 】

I . A . 2 T細胞MMPの化学コンジュゲーション部位

T細胞MMPの第1及び第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位は、T細胞MMPポリペプチドの一方または両方のいずれかへの共有結合性の連結の形成を可能にする試薬及び/または酵素等の触媒での処理時に修飾され得る、任意の好適な部位であってもよい。ある実施形態では、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドのいずれかに導入された化学コンジュゲーション部位が1つのみ存在する。別の実施形態では、各々第1及び第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位は、それぞれのポリペプチド上

50

に 1 種類のみコンジュゲーション部位（異なるコンジュゲーション部位）が存在することにより、異なる分子がこれらのポリペプチドの各々に選択的にコンジュゲートされることを可能にするように選択される。他の実施形態では、例えば、エピトープ分子及び 1 つまたは複数のペイロード分子の両方が T 細胞 MMP に組み込まれる対象となる場合、第 1 及び / または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーションの 1 つよりも多くのコピーが T 細胞 MMP に導入されてもよい。例えば、T 細胞 MMP は、第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位（例えば、エピトープをコンジュゲートするため）を 1 つ、及びペイロード分子を送達するための第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位を複数、有してもよい。

【0068】

複数の実施形態では、第 1 及び第 2 の化学コンジュゲーション部位は、

a) 酵素修飾配列として作用する、第 1 または第 2 のポリペプチドに結合したまたはその内部にあるペプチド配列（例えば、スルファターゼ、ソルターゼ、及び / またはトランスグルタミナーゼ配列）、

b) 第 1 または第 2 のポリペプチドに結合したまたはその内部にある非天然アミノ酸及び / またはセレノシステイン、

c) 操作されたアミノ酸の化学コンジュゲーション部位、

d) 第 1 または第 2 のポリペプチドに結合した炭水化物またはオリゴ糖部分、及び

e) 第 1 または第 2 のポリペプチドに結合したまたはその内部にある I g G ヌクレオチド結合部位、

から独立して選択されてもよい。

【0069】

I . A . 2 . 1 スルファターゼモチーフ

化学コンジュゲーション部位を提供する手段として酵素的修飾が選定されるような実施形態では、1 つまたは複数の第 1 及び第 2 の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、スルファターゼモチーフを含んでもよい。スルファターゼモチーフは、通常は 5 または 6 アミノ酸の長さであり、例えば、米国特許第 9,540,438 号及び米国特許公開第 2017/0166639 A1 号に記載され、同特許は参照により援用される。該モチーフの挿入は、アルデヒドタグ付きまたはアルデヒドタグを有すると称されることがある、タンパク質またはポリペプチドの形成をもたらす。該モチーフは、ホルミルグリシン生成酵素（複数可）（「FGE（単数）」または「FGE（複数）」）によって作用を引き起こされて、該モチーフにおけるシステインまたはセリンをホルミルグリシン残基（「fGly」、ただし「FGLy」と表されることもある）に変換し得、このホルミルグリシン残基は、選択的（例えば、部位特異的）化学コンジュゲーション反応に利用され得るアルデヒド含有アミノ酸である。したがって、本明細書で使用されるとき、「アルデヒドタグ」または「アルデヒドタグ付き」ポリペプチドは、未変換のスルファターゼモチーフを含むアミノ酸配列、ならびに、該モチーフのシステイン残基またはセリン残基が FGE の作用によって fGly に変換されたスルファターゼモチーフを含むアミノ酸配列を指す。加えて、アミノ酸配列の関連においてスルファターゼモチーフが提供される場合、それは未変換のモチーフを含有するアミノ酸配列（例えば、ポリペプチド）ならびにその fGly 含有相対物の両方の開示を提供するものとして理解される。ひとたび（例えば、T 細胞 MMP の）ポリペプチドに組み込まれると、fGly 残基は、チオセミカルバジド基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、及びヒドラジノ基を含むが、これらに限定されない様々な反応性基を含む分子（例えば、エピトープペプチド）と反応させられて、fGly 残基を介した当該ペプチドと当該分子との間の共有結合を有するコンジュゲート（例えば、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲート）を形成し得る。

【0070】

複数の実施形態では、スルファターゼモチーフは、少なくとも 5 または 6 aa 残基であるが、例えば、5 ~ 16（例えば、6 ~ 16、5 ~ 14、6 ~ 14、5 ~ 12、6 ~ 12、5 ~ 10、6 ~ 10、5 ~ 8、または 6 ~ 8）aa の長さであることができる。スルフ

10

20

30

40

50

ァターゼモチーフは、16、14、12、10、または8アミノ酸残基未満の長さに限定され得る。

【0071】

ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、式(I)に示される配列を含有し、
 $X1Z1X2Z2X3Z3$ (I) (配列番号45)、式中、

Z1は、システインまたはセリンであり、

Z2は、プロリン残基またはアラニン残基のいずれか(これはまた「P/A」により表され得る)であり、

Z3は、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン、またはヒスチジン、通常はリジン)、または脂肪族アミノ酸(アラニン、グリシン、ロイシン、バリン、イソロイシン、またはプロリン、通常はA、G、L、V、またはI)であり、

X1は、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、硫黄含有アミノ酸、または極性非荷電アミノ酸(すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外)、通常はL、M、V、S、またはT、より通常はL、M、S、またはVであり、但し、スルファターゼモチーフが標的ポリペプチドのN末端にある場合、X1が存在することを条件とし、

X2及びX3は独立して、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、極性非荷電アミノ酸、または硫黄含有アミノ酸(すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外)、通常はS、T、A、V、G、またはC、より通常はS、T、A、V、またはGである。

【0072】

したがって、一実施形態では、FGly含有ポリペプチドは、式Iを有するスルファターゼモチーフを用いて調製されてもよく、式中、

Z1は、システインまたはセリンであり、

Z2は、プロリン残基またはアラニン残基であり、

Z3は、脂肪族アミノ酸または塩基性アミノ酸であり、

X1は、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であるが、但し、スルファターゼモチーフがポリペプチドのN末端にある場合、X1が存在することを条件とし、

X2及びX3は、各々独立して、任意のアミノ酸であり、該配列は、溶媒が接近可能なIg定常領域のループ領域内にあるか、またはそれに隣接し、かつ該配列は、Ig重鎖のC末端にはない。

【0073】

アルデヒドタグが標的ポリペプチドのN末端以外の箇所に存在する場合、スルファターゼモチーフのX1は、標的ポリペプチドが組み込まれる配列のアミノ酸によって提供されてもよい。したがって、一部の実施形態では、該モチーフが標的ポリペプチドのN末端以外の箇所に存在する場合、スルファターゼモチーフは、下記式のものであってもよく、

$(C/S)X2(P/A)X3Z3$ 、式(II) (配列番号46)、式中、X1は不在であり、X2、X3、及びZ3は、上記で定義した通りである。

【0074】

スルファターゼモチーフを含有するペプチドが、真核生物FGEによる、例えば、真核細胞、または真核生物FGEを用いた無細胞系におけるfgly含有ペプチドの発現及び変換による、fgly含有ペプチドへの変換用に調製されようとする場合、真核生物FGEによる変換に応じやすいスルファターゼモチーフが有利に採用され得る。一般に、真核生物FGEによる変換に応じやすいスルファターゼモチーフは、上記の式(I) (例えば、 $X1CX2PX3Z3$ 、配列番号47)、及び $CX2PX3Z3$ 、配列番号48 (上記の式(II)により包含される)における、それぞれZ1及びZ2にシステイン及びプロリンを含有する。これらのモチーフをもつペプチドは、「SUMF1型」FGEによって修飾することができる。

【0075】

ある実施形態では、F G E が真核生物 F G E である場合、スルファターゼモチーフは、下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでもよい。

X 1 C X 2 P X 3 R または C X 2 P X 3 R (配列番号 4 7 及び 4 8、ここで、Z 3 は、R であり、X 1 は、存在するかまたは不在である)、

X 1 C X 2 P X 3 K または C X 2 P X 3 K (配列番号 4 7 及び 4 8、ここで、Z 3 は、K であり、X 1 は、存在するかまたは不在である)、

X 1 C X 2 P X 3 H または C X 2 P X 3 H (配列番号 4 7 及び 4 8、ここで、Z 3 は、H であり、X 1 は、存在するかまたは不在である)、

X 1 C X 2 P X 3 L または C X 2 P X 3 L (配列番号 4 7 及び 4 8、ここで、Z 3 は、L であり、X 1 は、存在するかまたは不在である)、(ここで、X 1、X 2 及び X 3 は、上記で定義した通りである)。

【 0 0 7 6 】

ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、配列 X 1 C (X 2) P (X 3) Z 3 (配列番号 4 7 を参照されたい) を含み、ここで、

X 1 は、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であるが、但し、スルファターゼモチーフがポリペプチドの N 末端にある場合、X 1 が存在することを条件とし、

X 2 及び X 3 は、独立して選択されるセリン残基、トレオニン残基、アラニン残基、またはグリシン残基である。

【 0 0 7 7 】

原核生物 F G E による変換に応じやすい、式 (I) 及び式 (I I) のスルファターゼモチーフは、多くの場合、Z 1 にシステインまたはセリン及び Z 2 にプロリンを含有し、これらは、それぞれ「 S U M P I 型」F G E または「 A t s B 型」F G E のいずれかによって修飾されてもよい。原核生物 F G E による変換を受けやすい、式 (I) または (I I) の他のスルファターゼモチーフは、Z 1 にシステインまたはセリン、及び Z 2 にプロリンまたはアラニン (これらの各々は独立して選択される) を含有し、該配列の残りのアミノ酸が式 (I) 及び (I I) に関して記載される通りであり、これらは、例えば、C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s (システイン型酵素)、K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e (セリン型酵素) 由来の F G E、または M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s の F G E による修飾を受けやすい。

【 0 0 7 8 】

スルファターゼモチーフは、T 細胞 M M P (またはそのエピトープコンジュゲート) の第 1 または第 2 のポリペプチド上の任意の所望の箇所に組み込まれてもよい。スルファターゼモチーフを用いて、エピトープ (例えば、エピトープ提示ペプチド) を組み込むだけでなく、ペイロード (例えば、薬物及び診断分子とのコンジュゲートの形成において) もまた組み込んでよい。ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、第 1 及び第 2 の M H C ポリペプチド (例えば、M H C - H 及び 2 M ポリペプチド)、足場または I g F c、ならびにこれらの要素に隣接するリンカーを含めた、T 細胞 M M P (またはそのエピトープコンジュゲート) の第 1 または第 2 のポリペプチドにおける任意の要素の末端またはその付近で付加されてもよい。複数の実施形態では、スルファターゼモチーフは、2 M、M H C クラス I 重鎖、及び / または F c I g ポリペプチドに組み込まれてもよい。ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、第 1 の M H C ポリペプチド (例えば、2 M ポリペプチド) のアミノ末端またはそれに結合したリンカーの付近またはその箇所で、第 1 のポリペプチドに組み込まれてもよい。ある実施形態では、第 1 のポリペプチドが 2 M ポリペプチド配列を含む場合、スルファターゼモチーフ X 1 (C / S) X 2 P X 3 Z 3 (配列番号 4 5、ここで、Z 1 は C または S であり、Z 2 は P である) を 2 M 配列の N 末端またはその付近で組み込んで、例えば、直接またはリンカーを通してのいずれかでのエピトープの化学コンジュゲーションを可能にしてもよい。例として、図 4 に示されるような 2 - ミクログロブリンの成熟配列は、2 0 アミノ酸のリーダー配列から始まり、成熟ポリペプチドは、最初の配列 I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S . . . (

成熟ポリペプチドは、最初の配列 I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S . . . (

配列番号 151 ~ 155 の aa 残基 21 ~ 31) から始まり、2 M ポリペプチドの残りの部分にわたって継続する。したがって、2 M の N 末端領域におけるアミノ酸に連結された (リンカーの有無にかかわらず) スルファターゼモチーフは、例えば、下記のように示され得るか、

【表 1】

X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 - I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 45 が β 2 M 配列に連結	X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 - リンカー - I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 45 が介在する (i n t e r v e n i n) リンカーにより β 2 M 配列に連結	10
X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 - (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 45 が β 2 M 配列に連結	X 1 C X 2 P X 3 Z 3 - (R T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 47 が β 2 M 配列に連結	
X 1 C X 2 P X 3 Z 3 - I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 47 が β 2 M 配列に連結	X 1 C X 2 P X 3 Z 3 - リンカー - I Q (R / K) T P (K / Q) I Q V Y S... ; 配列番号 47 が介在する (i n t e r v e n i n) リンカーにより β 2 M 配列に連結	20

またはヒト 2 M リーダー配列 M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号 151 の aa 1 ~ 20) 及び任意選択的なリンカー (例えば、リンカーペプチド) と共に下記に示されるようなものであり得、

(配列番号 151 の aa 1 ~ 20) - リンカー - (配列番号 45 または 47) - (2 M 配列)

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 - リンカー - I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 C X 2 P X 3 I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 C X 2 P X 3 Z 3 - リンカー - I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、もしくは

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 C X 2 P X 3 R T P (K / Q) I Q V Y S . . . 、

ここで、存在する場合、リンカーは、独立して選択されるアミノ酸配列 (例えば、A A A G G (配列番号 75) または (G G G G S)_n (ここで、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である) (配列番号 76) 等の、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリセリン、及びポリ - G l y 等の 1 ~ 50 aa) を含んでもよい。示されるリンカーは、存在しても、または不在であってもよく、2 つのリンカーが示される場合、それら同じであっても、または異なってもよい。

【0079】

ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、図 4 に示される配列 (例えば、図 4 に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸 21 で開始し、それらの C 末端で終わる成熟 2 M ポリペプチドのうちのいずれかの配列) に対して少なくとも 85 % (例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 %、またはさらには 100 %) 50

のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む 2 Mポリペプチドを有する第 1 または第 2 のポリペプチドにおいて、T 細胞 M M P（またはそのエピトープコンジュゲート）に組み込まれるか、またはそれに結合している（例えば、ペプチドリinkerを介して）。この実施形態の目的において、2 Mポリペプチドの配列同一性は、付加されたスルファターゼモチーフ及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく、図 4 にある 2 Mポリペプチドの対応する部分と比べて決定される。

【0080】

ある実施形態では、スルファターゼモチーフが、図 4 に示される配列（例えば、図 4 に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸 21 で開始し、それらの C 末端で終わる成熟 2 Mポリペプチドのうちのいずれかの配列）と比較して 1 ~ 15 個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個）のアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化を含む 2 Mポリペプチド配列を有する第 1 または第 2 のポリペプチドを有する、T 細胞 M M P（またはそのエピトープコンジュゲート）に組み込まれるか、またはそれに結合しており（例えば、N 末端、C 末端、または N 末端及び C 末端の両方における独立して選択される 1 つまたは複数のペプチドリinkerを介して）、ここでのアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化は、付加された A₂₋₅ または G₂₋₅ モチーフ及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく評定される。この実施形態の目的において、2 Mポリペプチドにおけるアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化は、スルファターゼモチーフのアミノ酸及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく、図 4 にある 2 Mポリペプチドの対応する部分と比べて決定される。かかる一実施形態では、スルファターゼモチーフ（例えば、上述の式 X₁Z₁X₂Z₂X₃Z₃、(C/S)X₂(P/A)X₃Z₃、X₁CX₂PX₃R、または X₁CX₂PX₃L のもの）は、図 4 に示される配列等の成熟 2 M配列の、アミノ末端の 15 個のアミノ酸のうちのいずれかを置き換えてもよいし、及び/またはそれらの間に挿入されてもよい。

【0081】

別の実施形態では、式 (I) 配列番号 45 または (II) 配列番号 46 のスルファターゼモチーフは、第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位として Ig Fc 領域に組み込まれるか、またはそれに結合していてもよい（例えば、ペプチドリinkerを介して）。ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、スルファターゼモチーフ配列の付加前に図 2 に示される配列の対応する部分と比べて少なくとも 85 %（例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 %、またはさらには 100 %）のアミノ酸配列同一性を有する配列に組み込まれる。かかる一実施形態では、スルファターゼモチーフは、例えば、エピトープ及び/またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0082】

別の実施形態では、配列番号 45（式 (I)）または配列番号 46（式 II）のスルファターゼモチーフは、化学コンジュゲーション部位として MHC - Hポリペプチド配列に組み込まれてもよい。ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、スルファターゼモチーフ配列の付加前に図 3 に示される配列の対応する部分と比べて少なくとも 85 %（例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 %、またはさらには 100 %）のアミノ酸配列同一性を有する、MHC - H配列に組み込まれる。かかる一実施形態では、スルファターゼモチーフは、例えば、エピトープ及び/またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0083】

別の実施形態では、配列番号 45（式 (I)）または配列番号 46（式 II）のスルファターゼモチーフの 1 つまたは複数のコピーは、第 2 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位として Ig Fc 領域に組み込まれてもよい。かかる一実施

10

20

30

40

50

形態では、それらは、例えば、エピトープ及び/またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0084】

上記に示されたように、アルデヒドタグのスルファターゼモチーフは、少なくとも5または6アミノ酸残基であるが、例えば、5～16アミノ酸の長さであることができる。該モチーフは、アルデヒドタグがスルファターゼモチーフ及び「補助的モチーフ」の両方を含むように、N末端及びC末端の一方または両方で追加的な残基を含有し得る。ある実施形態では、スルファターゼモチーフは、C末端の補助的モチーフ（すなわち、該モチーフのZ3位に続く）を含み、またAALLTGR（配列番号49）、SQLLTGR（配列番号50）、AAFM TGR（配列番号51）、AAFLTGR（配列番号52）、及びGSLFTGR（配列番号53）からなる群から選択されるアミノ酸配列の連続残基のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つ全てを含んでもよい。多数の他の補助的モチーフ（*moifs*）が記載されている。補助的モチーフのアミノ酸残基は、アルデヒドタグのスルファターゼモチーフのFGE媒介性変換に必要とされるものではなく、故に、任意選択的なものにすぎず、本明細書に記載されるアルデヒドタグから具体的に除外されてもよい。

10

【0085】

米国特許第9,540,438号は、スルファターゼモチーフの、Fc領域ポリペプチドを含めた種々の免疫グロブリン配列への組み込みについて考察しており、スルファターゼモチーフならびにFcポリペプチド及び他のポリペプチドの修飾についてのその教示に関して参照により本明細書に援用される。この特許はまた、FGE酵素、及びfGly残基を形成させる際のそれらの使用、ならびにエピトープ及びペイロード等の分子のfGly残基へのカップリングに関連する化学反応についてのその手引きに関しても、参照により援用される。

20

【0086】

スルファターゼモチーフの組み込みは、該モチーフをコードする核酸配列を、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドをコードする核酸における所望の箇所で組み込むことによって、遂行されてもよい。下記で考察されるように、該核酸配列は、転写制御配列（複数可）（プロモーター）の制御下に配置され、その発現を導く制御要素が提供されてもよい。発現タンパク質は、発現及び部分精製または完全精製の後に、1つまたは複数のFGEで処理されてもよい。代替として、スルファターゼモチーフを認識するFGEを発現する細胞における核酸の発現が、該モチーフのシステインまたはセリンのfGly（これはオキソアラニン（*oxoalanine*）と呼ばれることがある）への変換をもたらす。2つ以上の異なるスルファターゼモチーフが存在する場合（例えば、第1及び第2のスルファターゼモチーフ）、細胞発現の最中に各モチーフの変換を実施するか、または細胞発現及び部分精製もしくは完全精製の後に各モチーフの変換を実施することもまた可能である。2つ以上のFGE酵素を用いて、これらFGEの各々によって異なるモチーフが選択的に及び複数のモチーフが優先的に変換されるようにしながら、細胞発現の最中に少なくとも1つのスルファターゼモチーフを、及び部分精製もしくは完全精製の後に少なくとも1つのスルファターゼモチーフを順次に変換するか、または発現後にスルファターゼモチーフをfGly残基に別個に変換することもまた可能である。下記で考察されるように、異なるスルファターゼモチーフを別個に変換して、それらを順次の様式でエピトープ及び/またはペイロードに化学的にカップリングする能力は、スルファターゼカップリングを用いて、異なるモチーフの箇所で異なるエピトープまたはペイロードを組み込むことを可能にする。

30

40

【0087】

未変換のスルファターゼモチーフを有する、または細胞がfGly含有ポリペプチド配列を変換するための好適なFGEを発現する、ポリペプチドの生産用の宿主細胞には、原核生物及び真核生物のものが含まれる。非限定的な例としては、*Escherichia*

50

coli 株、*Bacillus* 菌種（例えば、*B. subtilis* 等）、酵母または真菌（例えば、*S. cerevisiae*、*Pichia* 菌種等）が挙げられる。昆虫及び脊椎動物等の高等生物、特に哺乳動物に由来する宿主細胞を含めた、他の宿主細胞の例としては、CHO 細胞、HEK 細胞等（例えば、American Type Culture Collection (ATCC) 番号 CCL-2）、CHO 細胞（例えば、ATCC 番号 CRL 9618 及び CRL 9096）、CHO DG44 細胞、CHO-K1 細胞（ATCC CCL-61）、293 細胞（例えば、ATCC 番号 CRL-1573）、Vero 細胞、NIH 3T3 細胞（例えば、ATCC 番号 CRL-1658）、Hn h-7 細胞、BHK 細胞（例えば、ATCC 番号 CCL10）、PC12 細胞（ATCC 番号 CRL 1721）、COS 細胞、COS-7 細胞（ATCC 番号 CRL 1651）、RAT1 細胞、マウス L 細胞（ATCC 番号 CCLI.3）、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞（ATCC 番号 CRL 1573）、HL Hep G2 細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0088】

様々な FGE が、スルファターゼモチーフにおけるシステインまたはセリンの、fGly への変換（酸化）のために採用されてもよい。本明細書で使用されるとき、ホルミルグリシン生成酵素、または FGE という用語は、スルファターゼモチーフのシステインまたはセリンの、fGly への変換を触媒する fGly 生成酵素を指す。米国特許第 9,540,438 号で考察されるように、同文献は、多くの場合、該モチーフのシステインを fGly に変換する酵素に関してホルミルグリシン生成酵素という用語を使用する一方で、スルファターゼモチーフにおけるセリンを fGly に変換する酵素は、Ats-B 様と称される。

【0089】

FGE は、好気性及び嫌気性の 2 つの区分に分類され得る。真核酵素（例えば、ヒト酵素）を含む、好気性酵素は、システイン残基を fGly に変換し、ここで、システインは全般的に、式 $X_1CX_2PX_3Z_3$ （配列番号 47）のスルファターゼモチーフの関連にある。真核生物 FGE は、「SUMF1 型」のものであり、ヒトにおいては SUMF1 遺伝子によってコードされる嫌気性酵素は、ほとんどの場合は原核生物源（例えば、*Clostridium perfringens*、*Klebsiella pneumoniae*、または *Mycobacterium tuberculosis*）由来の AtsB 型のものであり、好気性形態とは異なる機構を用いてそれらのスルファターゼモチーフにおけるシステインまたはセリンを fGly に変換可能であるように思われる。

【0090】

セリンまたはシステインの fGly への変換を触媒する能力は、酵素及びスルファターゼモチーフに左右される。FGE がセリン及びシステインを変換する能力における差異の故に、異なるスルファターゼモチーフが異なる化学コンジュゲーション部位として使用され得ることが可能である。例えば、T 細胞 MMP に、真核生物好気性 SUMF1 型 FGE による変換に応じやすいシステイン含有部位及び AtsB 型 FGE による変換に応じやすいセリン含有部位の両方をコードする配列を組み込むことが可能であり得る。SUMF1 型 FGE を発現する真核細胞における発現後、システインモチーフは、fGly 残基をもつようになり、この fGly がエピトープまたはペイロードとの 1 回目の化学コンジュゲーションに供されてもよい。1 回目の化学コンジュゲーションに続いて、T 細胞 MMP コンジュゲートは、無細胞系において AtsB 型セリン型酵素で処理され、次いで、セリン含有モチーフから生産された fGly は、1 回目の化学コンジュゲーションにおいて使用された分子と同じまたはそれとは異なる分子との化学コンジュゲーションに供することができる。

【0091】

上述に照らして、本開示は、上記で考察されたように第 1 または第 2 のポリペプチド鎖の配列に組み込まれた 1 つまたは複数の fGly 残基を含む、T 細胞 MMP を提供する。fGly 残基は、例えば、配列 $X_1(fGly)X_2Z_2X_3Z_3$ の関連にあってもよく

、ここで、f G l y は、ホルミルグリシン残基であり、Z 2、Z 3、X 1、X 2、及びX 3 は、上記の式 (I) に定義される通りである。

【 0 0 9 2 】

化学コンジュゲーション後、T細胞MMPは、配列X 1 (f G l y ') X 2 Z 2 X 3 Z 3 の関連にある、第1または第2のポリペプチド鎖の配列に組み込まれた1つまたは複数のf G l y ' 残基を含み、ここで、f G l y ' 残基は、化学反応を経た、今では共有結合性で結合した部分 (例えば、エピトープまたはペイロード) を有する、ホルミルグリシンである。

【 0 0 9 3 】

f G l y を含有する化学コンジュゲーション部位でのカップリング対象となる分子のチオセミカルバジド、アミノオキシ、ヒドラジド、またはヒドラジノ誘導体の使用を含むが、これらに限定されない、いくつかの化学反応及び市販の試薬を利用して、分子 (例えば、エピトープまたはペイロード) をf G l y 残基にコンジュゲートすることができる。例えば、チオセミカルバジド、アミノオキシ、ヒドラジド、ヒドラジノ、またはヒドラジニル官能基 (例えば、ペプチドのアミノ酸に直接、またはPEG等のリンカーを介して結合した) をもつエピトープ (例えば、エピトープペプチド) 及び/またはペイロードを、T細胞MMPのf G l y を含有する第1または第2のポリペプチドと反応させて、共有結合性で連結したエピトープを形成させることができる。同様に、例えば、ビオチンヒドラジドを連結剤として用いて、薬物及び治療薬等のペイロードを導入することができる。

【 0 0 9 4 】

ある実施形態では、ペプチド (例えば、エピトープ含有ペプチド) は、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドに組み込まれたf G l y 残基と反応する求核試薬含有部分 (例えば、アミノオキシ部分またはヒドラジド部分) を組み込むように修飾される。この反応は、T細胞MMP及びペプチド (例えば、エピトープまたはペイロード) が共有結合性で連結された (例えば、ヒドラゾンまたはオキシム連結によって) コンジュゲートの形成をもたらす (例えば、米国特許第9, 238, 878号及び同第7, 351, 797号、<http://www.interchim.fr/ft/J/JV2290.pdf> (2017年9月2日にアクセス) にて入手可能なInterchem, Amino oxy & Aldehyde PEO/PEG reagents for Bio rthogonal Conjugation and Labeling Featu ring Oxime Formation (日付なし) を参照されたい)。

【 0 0 9 5 】

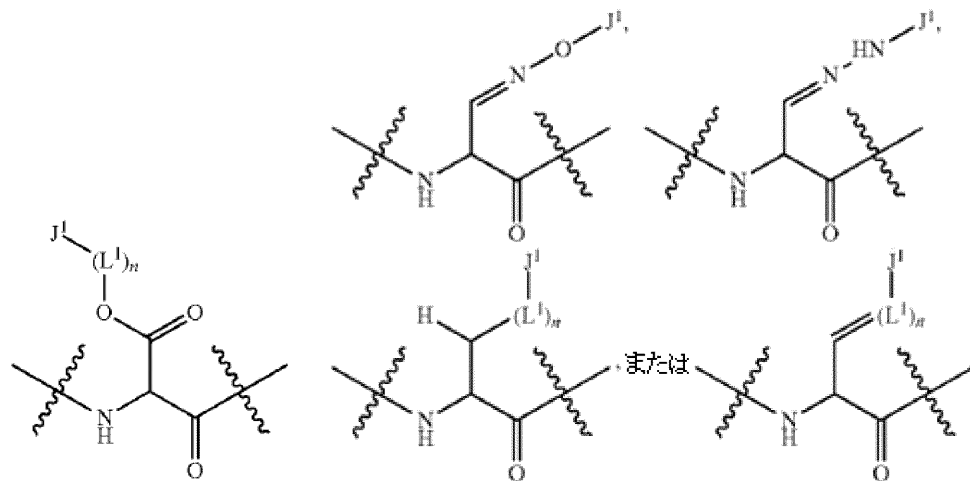
ある実施形態では、チオセミカルバジド基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、またはヒドラジノ基をもつエピトープ (例えば、ペプチドエピトープ) 及び/またはペイロードが、T細胞MMPのf G l y を含有する第1及び/または第2のポリペプチドと反応させられる。この反応は、T細胞MMPと、エピトープ及び/またはペイロードとの間での共有結合の形成をもたらす。米国特許第9, 540, 438号及び米国特許公開第2017/0166639 A1号で考察されるように、結果として生じるコンジュゲートは、下記の形態の構造 (修飾アミノ酸残基) を含有してもよく、

10

20

30

【化 2】



10

20

30

40

50

ここで、

J¹ は、共有結合された部分であり、

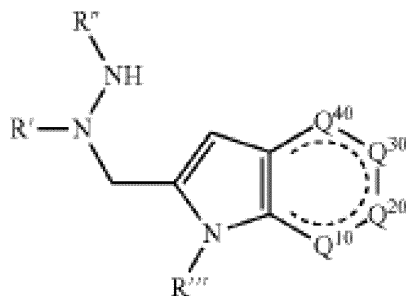
各 L¹ は、アルキレン、置換アルキレン、アルケニレン、置換アルケニレン、アルキニレン、置換アルキニレン、アリーレン、置換アリーレン、シクロアルキレン、置換シクロアルキレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、置換ヘテロシクレン、アシル、アミド、アシルオキシ、ウレタニレン (urethaneylene)、チオエステル、スルホニル、スルホンアミド、スルホニルエステル、-O-、-S-、-NH-、及び置換アミンから独立して選択される二価部分であり、

n は、ゼロから 40 (例えば、1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 30、または 30 ~ 40) から選択される数である。

【0096】

ある実施形態では、エピトープ及び/またはペイロードは、f G l y アミノ酸残基をもつ T 細胞 M M P へのそれらの共有結合性の結合を可能にする、環状置換基 (例えば、インドール) をもつヒドラジニル基を含めた、共有結合されたヒドラジニル基を含むように修飾されてもよい。一実施形態では、ヒドラジニル (hydrazinal) 化合物は、式 (I I I) の化合物であり、

【化 3】



(I I I)

式中、式 (F o r m u l a) (I I I) の目的において、

R' , ' ' は、f G l y 含有ポリペプチドにコンジュゲートされる対象となる、目的とするペイロードまたはエピトープであり得、

R' 及び R' ' は、各々独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、カルボキシル、カルボキシルエステル、アシル、アシルオキシ、アシルアミノ、アミノアシル、アルキルアミド、置換アルキルアミド、スルホニル、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、シ

クロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクリル、及び置換ヘテロシクリルを含むが、これらに限定されない、任意の所望の置換基であり得、

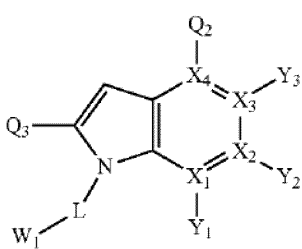
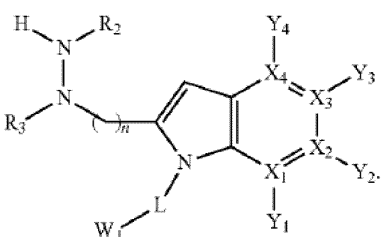
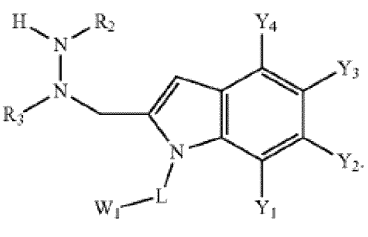
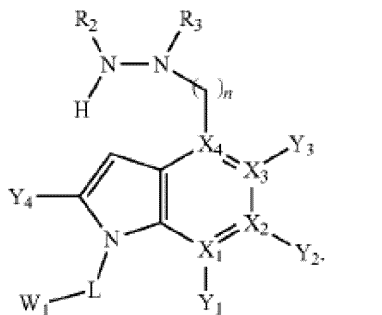
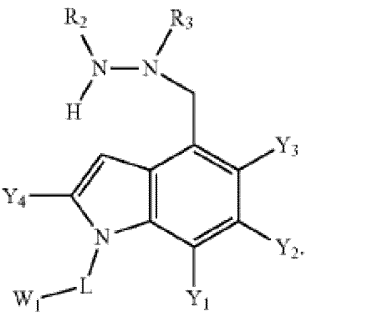
Q^1 、 Q^2 、 Q^3 、及び Q^4 は、 CR^{11} 、 NR^{12} 、N、O、またはSであり得、

Q^1 、 Q^2 、 Q^3 、及び Q^4 のうちの1つは、任意選択的であり、 R^{11} 及び R^{12} は、任意の所望の置換基（例えば、アルキル）であり得る。米国特許公開第2015/035222号を参照されたい。

【0097】

他の実施形態では、修飾エピトープ及びペイロード（例えば、薬物及び/または診断剤）のヒドラジニル基は、式（IV）、（V）、（Va）、（VI）、または（VIa）によって与えられる構造を有する。米国特許第9,310,374号を参照されたく、同特許は、ペプチド及びポリペプチドを伴うコンジュゲートを含めた生物学的コンジュゲートの形成におけるヒドラジニル化合物の調製及び使用についてのその教示に関して参照により援用される。

【表2】

<div style="text-align: center;">  <p>(IV)</p> </div>	
<div style="text-align: center;">  <p>(V)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>(Va)</p> </div>
<div style="text-align: center;">  <p>(VI)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>(VIa)</p> </div>

式中、この節で列挙される式（IV）、（V）、（Va）、（VI）、または（VIa）の目的において、

Q_2 及び Q_3 のうちの一方は、 $-(CH_2)_nNR_3NHR_2$ であり、他方は、 Y_4 であり、

n は、0 または 1 であり、

R_2 及び R_3 は、各々独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、カルボキシル、カルボキシルエステル、アシル、アシルオキシ、アシルアミノ、アミノアシル、アルキルアミド、置換アルキルアミド、スルホニル、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、シク

ロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクリル、及び置換ヘテロシクリルから選択され、

X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 は、各々独立して、C、N、O、及びSから選択され、

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、及び Y_4 は、各々独立して、水素、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、カルボキシル、カルボキシルエステル、アシル、アシルオキシ、アシルアミノ、アミノアシル、アルキルアミド、置換アルキルアミド、スルホニル、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクリル、及び置換ヘテロシクリルから選択され、

Lは、任意選択的なリンカーであり、

W_1 は、エピトープ（例えば、エピトープポリペプチド）、薬物、診断剤、または他のペイロードから選択される。

【0098】

これらの構造に該当するヒドラジニルインドールの、アルデヒド官能化ペプチドとの例となる反応は、図8に概略的に示される。

【0099】

ある実施形態では、 Q_2 は、 $-(CH_2)_nNR_3NHR_2$ であり、 Q_3 は、 Y_4 である。ある実施形態では、 Q_3 は、 $-(CH_2)_nNR_3NHR_2$ であり、 Q_2 は、 Y_4 である。ある実施形態では、 n は、1である。ある実施形態では、 R_2 及び R_3 は、各々独立して、アルキル及び置換アルキルから選択される。一部の実施形態では、 R_2 及び R_3 は各々、メチルである。ある実施形態では、 X_1 、 X_2 、 X_3 、及び X_4 は各々、Cである。ある実施形態では、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、及び Y_4 は各々、Hである。

【0100】

ある実施形態では、Lは存在し、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アミノ、置換アミノ、カルボキシル、カルボキシルエステル、アシルアミノ、アルキルアミド、置換アルキルアミド、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクリル、及び置換ヘテロシクリルから選択される基を含む。一部の実施形態では、Lは存在し、ポリマーを含む。一部の実施形態では、該ポリマーは、ポリエチレングリコールである。

【0101】

式(IV)、(V)、(Va)、(VI)、または(VIa)の目的において、

1. 「アルキル」は、1～10個の炭素原子、好ましくは1～6個の炭素原子を有する、一価飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。この用語には、例として、メチル(CH_3-)、エチル(CH_3CH_2-)、 n -プロピル($CH_3CH_2CH_2-$)、イソプロピル($(CH_3)_2CH-$)、 n -ブチル($CH_3CH_2CH_2CH_2-$)、イソブチル($(CH_3)_2CHCH_2-$)、sec-ブチル($(CH_3)(CH_3CH_2)CH-$)、t-ブチル($(CH_3)_3C-$)、 n -ペンチル($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$)、及びネオペンチル($(CH_3)_3CCH_2-$)等の直鎖状及び分岐状ヒドロカルビル基が含まれる。

2. 「置換アルキル」という用語は、アルキル鎖における1個または複数の炭素原子が、 $-O-$ 、 $-N-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)_n-$ （ここで、 n は、0～2である）、または $-NR-$ （ここで、 R は、水素またはアルキルである）等のヘテロ原子で任意選択で置き換えられており、かつアルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロア

10

20

30

40

50

リールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ アリール、 $-SO_2-$ ヘテロアリール、及び $-NR^aR^b$ （ここで、 R^a 及び R^b は、同じであっても、または異なってもよく、水素、任意選択で置換されるアルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、及び複素環式基（heterocyclic）から選定される）からなる群から選択される1～5つの置換基を有する、本明細書で定義されるようなアルキル基を指す。

3. 「アルキレン」は、直鎖または分岐状のいずれかであり、任意選択で、 $-O-$ 、 $-NR^{10}-$ 、 $-NR^{10}C(O)-$ 、 $-C(O)NR^{10}-$ 等から選択される1つまたは複数の基が介在する、好ましくは1～6個、より好ましくは1～3個の炭素原子を有する、二価脂肪族ヒドロカルビル基を指す。この用語には、例として、メチレン（ $-CH_2-$ ）、エチレン（ $-CH_2CH_2-$ ）、 n -プロピレン（ $-CH_2CH_2CH_2-$ ）、イソプロピレン（ $-CH_2CH(CH_3)-$ ）、（ $-C(CH_3)_2CH_2CH_2-$ ）、（ $-C(CH_3)_2CH_2C(O)-$ ）、（ $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH-$ ）、（ $-CH(CH_3)CH_2-$ ）等が含まれる。

4. R^{10} は、Hまたはアルキル（例えば、H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、または $-CH_2CH_2CH_3$ ）である。

5. 「置換アルキレン」は、1～3個の水素が下記の「置換（される）」の定義において炭素に関して記載されるような置換基で置き換えられた、アルキレン基を指す。

6. 「アルカン」という用語は、本明細書で定義されるようなアルキル基及びアルキレン基を指す。

7. 「アルキルアミノアルキル」、「アルキルアミノアルケニル」、及び「アルキルアミノアルキニル」という用語は、 $R'NHR''$ という基を指し、ここで、 R' は、本明細書で定義されるようなアルキル基であり、 R'' は、本明細書で定義されるようなアルキレン基、アルケニレン基、またはアルキニレン基である。

8. 「アルカリール（alkaryl）」または「アラルキル」という用語は、 $-$ アルキレン-アリール及び置換アルキレン-アリールという基を指し、ここで、アルキレン、置換アルキレン、及びアリールは、本明細書で定義される。

9. 「アルコキシ」は、 $-O-$ アルキルという基を指し、ここで、アルキルは、本明細書で定義される通りである。アルコキシには、例として、メトキシ、エトキシ、 n -プロポキシ、イソプロポキシ、 n -ブトキシ、 t -ブトキシ、 sec -ブトキシ、 n -ペントキシ等が含まれる。「アルコキシ」という用語はまた、アルケニル- $O-$ 、シクロアルキル- $O-$ 、シクロアルケニル- $O-$ 、及びアルキニル- $O-$ という基も指し、ここで、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、及びアルキニルは、本明細書で定義される通りである。

10. 「置換アルコキシ」という用語は、置換アルキル- $O-$ 、置換アルケニル- $O-$ 、置換シクロアルキル- $O-$ 、置換シクロアルケニル- $O-$ 、及び置換アルキニル- $O-$ という基を指し、ここで、置換アルキル、置換アルケニル、置換シクロアルキル、置換シクロアルケニル、及び置換アルキニルは、本明細書で定義される通りである。

11. 「アルコキシアミノ」という用語は、 $-NH-$ アルコキシという基を指し、ここで、アルコキシは、本明細書で定義される。

12. 「ハロアルコキシ」という用語は、アルキル基上の1個または複数の水素原子がハロ基で置換された、アルキル- $O-$ という基を指し、例として、トリフルオロメトキシ等といった基が含まれる。

13. 「ハロアルキル」という用語は、アルキル基上の1個または複数の水素原子がハロ基で置換された、上述のような置換アルキル基を指す。かかる基の例としては、限定されないが、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロエチル等といったフルオロアルキル基が挙げられる。

14. 「アルキルアルコキシ」という用語は、 $-$ アルキレン- $O-$ アルキル、アルキレ

10

20

30

40

50

ン - O - 置換アルキル、置換アルキレン - O - アルキル、及び置換アルキレン - O - 置換アルキルという基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルキレン、及び置換アルキレンは、本明細書で定義される通りである。

15. 「アルキルチオアルコキシ」という用語は、- アルキレン - S - アルキル、アルキレン - S - 置換アルキル、置換アルキレン - S - アルキル、及び置換アルキレン - S - 置換アルキルという基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルキレン、及び置換アルキレンは、本明細書で定義される通りである。

16. 「アルケニル」は、2 ~ 6 個の炭素原子、好ましくは2 ~ 4 個の炭素原子を有し、かつ少なくとも1つ、好ましくは1 ~ 2 つの不飽和二重結合の部位を有する、直鎖または分岐状ヒドロカルビル基を指す。この用語には、例として、ビ - ビニル、アリル、及びブタ - 3 - エン - 1 - イルが含まれる。シス及びトランス異性体またはこれらの異性体の混合物が、この用語に含まれる。

17. 「置換アルケニル」という用語は、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、- SO - アルキル、- SO - 置換アルキル、- SO - アリール、- SO - ヘテロアリール、- SO₂ - アルキル、- SO₂ - 置換アルキル、- SO₂ - アリール、及び- SO₂ - ヘテロアリールから選択される1 ~ 5 つの置換基、または1 ~ 3 つの置換基を有する、本明細書で定義されるようなアルケニル基を指す。

18. 「アルキニル」は、2 ~ 6 個の炭素原子、好ましくは2 ~ 3 個の炭素原子を有し、かつ少なくとも1つ、好ましくは1 ~ 2 つの不飽和三重結合の部位を有する、直鎖または分岐状一価ヒドロカルビル基を指す。かかるアルキニル基の例としては、アセチレニル (- C ≡ CH)、及びプロパルギル (- CH₂ - C ≡ CH) が挙げられる。

19. 「置換アルキニル」という用語は、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、- SO - アルキル、- SO - 置換アルキル、- SO - アリール、- SO - ヘテロアリール、- SO₂ - アルキル、- SO₂ - 置換アルキル、- SO₂ - アリール、及び- SO₂ - ヘテロアリールから選択される1 ~ 5 つの置換基、または1 ~ 3 つの置換基を有する、本明細書で定義されるようなアルキニル基を指す。

20. 「アルキニルオキシ」は、- O - アルキニルという基を指し、ここで、アルキニルは、本明細書で定義される通りである。アルキニルオキシには、例として、エチニルオキシ、プロピニルオキシ等が含まれる。

21. 「アシル」は、H - C (O) - 、アルキル - C (O) - 、置換アルキル - C (O) - 、アルケニル - C (O) - 、置換アルケニル - C (O) - 、アルキニル - C (O) - 、置換アルキニル - C (O) - 、シクロアルキル - C (O) - 、置換シクロアルキル - C (O) - 、シクロアルケニル - C (O) - 、置換シクロアルケニル - C (O) - 、アリール - C (O) - 、置換アリール - C (O) - 、ヘテロアリール - C (O) - 、置換ヘテロアリール - C (O) - 、ヘテロシクリル - C (O) - 、及び置換ヘテロシクリル - C (O) - という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、

アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。例えば、アシルには、「アセチル」基 $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ が含まれる。

22. 「アシルアミノ」は、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ アルキル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換アルキル、 $\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ シクロアルキル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換シクロアルキル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ シクロアルケニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換シクロアルケニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ アルケニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換アルケニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ アルキニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換アルキニル、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ アリール、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換アリール、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ ヘテロアリール、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換ヘテロアリール、 $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 複素環式基、及び $-\text{NR}^{20}\text{C}(\text{O})$ 置換複素環式基という基を指し、ここで、 R^{20} は、水素またはアルキルであり、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

23. 「アミノカルボニル」または「アミノアシル」という用語は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ という基を指し、ここで、 R^{21} 及び R^{22} は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基からなる群から選択され、また R^{21} 及び R^{22} は、任意選択で、それに結合した窒素と一緒に繋がって、複素環基または置換複素環基を形成し、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

24. 「アミノカルボニルアミノ」は、 $-\text{NR}^{21}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{22}\text{R}^{23}$ という基を指し、ここで、 R^{21} 、 R^{22} 、及び R^{23} は、水素、アルキル、アリール、もしくはシクロアルキルから独立して選択されるか、または2つのR基が繋がって、ヘテロシクリル基を形成する。

25. 「アルコキシカルボニルアミノ」という用語は、 $-\text{NRC}(\text{O})\text{OR}$ という基を指し、ここで、各Rは独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、ここで、アルキル、置換アルキル、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルは、本明細書で定義される通りである。

26. 「アシルオキシ」という用語は、アルキル- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、置換アルキル- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、シクロアルキル- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、置換シクロアルキル- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、アリール- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、ヘテロアリール- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、及びヘテロシクリル- $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルは、本明細書で定義される通りである。

27. 「アミノスルホニル」は、 $-\text{SO}_2\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ という基を指し、ここで、 R^{21} 及び R^{22} は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基からなる群から選択され、また R^{21} 及び R^{22} は、任意選択で、それに結合した窒素と一緒に繋がって、複素環基または置換複素環基を形成し、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及

び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

28. 「スルホニルアミノ」は、 $-NR^{21}SO_2R^{22}$ という基を指し、ここで、 R^{21} 及び R^{22} は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基からなる群から選択され、また R^{21} 及び R^{22} は、任意選択で、それに結合した原子と一緒に繋がって、複素環基または置換複素環基を形成し、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

29. 「アリール」または「Ar」は、単環（例えば、フェニル基に存在する）または複数の縮合環を有する環系（かかる芳香環系の例としては、ナフチル、アントリル、及びインダニルが挙げられる）を有する、6～18個の炭素原子の一個芳香族炭素環基を指し、この縮合環は、芳香族である場合もあれば、芳香族でない場合もあるが、但し、結合点が芳香環の原子を介するものであることを条件とする。この用語には、例として、フェニル及びナフチルが含まれる。アリール置換基に関する定義によって別途制約されない限り、かかるアリール基は、任意選択で、置換されて、アシルオキシ、ヒドロキシ、チオール、アシル、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、置換アルキル、置換アルコキシ、置換アルケニル、置換アルキニル、置換シクロアルキル、置換シクロアルケニル、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アシルアミノ、アルカリール、アリール、アリーロキシ、アジド、カルボキシル、カルボキシルアルキル、シアノ、ハロゲン、ニトロ、ヘテロアリール、ヘテロアリーロキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、アミノアシルオキシ、オキシアシルアミノ、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、チオアリーロキシ、チオヘテロアリーロキシ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール、 $-SO_2-$ ヘテロアリール、及びトリハロメチルから選択される1～5つの置換基、または1～3つの置換基を有する、「置換アリール」基を形成し得る。

30. 「アリーロキシ」は、 $-O-$ アリールという基を指し、ここで、アリールは、本明細書で定義される通りであり、これには、例として、同じく本明細書で定義されるような任意選択で置換されるアリール基を含む、フェノキシ、ナフトキシ等が含まれる。

31. 「アミノ」は、 $-NH_2$ という基を指す。

32. 「置換アミノ」という用語は、 $-NRR$ という基を指し、ここで、各 R は独立して、水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アルケニル、置換アルケニル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルからなる群から選択されるが、但し、少なくとも1つの R が水素ではないことを条件とする。

33. 「アジド」という用語は、 $-N_3$ という基を指す。

34. 「カルボキシル」、「カルボキシ」、または「カルボキシレート」は、 $-CO_2H$ またはその塩を指す。

35. 「カルボキシルエステル」もしくは「カルボキシエステル」、または「カルボキシルアルキル」もしくは「カルボキシルアルキル」という用語は、 $-C(O)O-$ アルキル、 $-C(O)O-$ 置換アルキル、 $-C(O)O-$ アルケニル、 $-C(O)O-$ 置換アルケニル、 $-C(O)O-$ アルキニル、 $-C(O)O-$ 置換アルキニル、 $-C(O)O-$ アリール、 $-C(O)O-$ 置換アリール、 $-C(O)O-$ シクロアルキル、 $-C(O)O-$ 置換シクロアルキル、 $-C(O)O-$ シクロアルケニル、 $-C(O)O-$ 置換シクロアルケニル、 $-C(O)O-$ ヘテロアリール、 $-C(O)O-$ 置換ヘテロアリール、 $-C(O)O-$ 複素環式基、及び $-C(O)O-$ 置換複素環式基という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロア

ルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

36. 「(カルボキシルエステル)オキシ」または「カーボネート」は、 $-O-C(O)-O-$ アルキル、 $-O-C(O)-O-$ 置換アルキル、 $-O-C(O)-O-$ アルケニル、 $-O-C(O)-O-$ 置換アルケニル、 $-O-C(O)-O-$ アルキニル、 $-O-C(O)-O-$ 置換アルキニル、 $-O-C(O)-O-$ アリール、 $-O-C(O)-O-$ 置換アリール、 $-O-C(O)-O-$ シクロアルキル、 $-O-C(O)-O-$ 置換シクロアルキル、 $-O-C(O)-O-$ シクロアルケニル、 $-O-C(O)-O-$ 置換シクロアルケニル、 $-O-C(O)-O-$ ヘテロアリール、 $-O-C(O)-O-$ 置換ヘテロアリール、 $-O-C(O)-O-$ 複素環式基、及び $-O-C(O)-O-$ 置換複素環式基という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

10

37. 「シアノ」または「ニトリル」は、 $-CN$ という基を指す。

38. 「シクロアルキル」は、単環式環、または縮合系、架橋系、及びらせん(spiraling)系を含めた多環式環を有する、3~10個の炭素原子の環状アルキル基を指す。好適なシクロアルキル基の例としては、例えば、アダマンチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル等が挙げられる。かかるシクロアルキル基には、例として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル等といった単環構造、またはアダマンタニル等といった多環構造が含まれる。

20

39. 「置換シクロアルキル」という用語は、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール、及び $-SO_2-$ ヘテロアリールから選択される1~5つの置換基、または1~3つの置換基を有する、シクロアルキル基を指す。

30

40. 「シクロアルケニル」は、単環または多環を有し、かつ少なくとも1つの二重結合、好ましくは1~2つの二重結合を有する、3~10個の炭素原子の非芳香族環状アルキル基を指す。

41. 「置換シクロアルケニル」という用語は、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、ケト、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール、及び $-SO_2-$ ヘテロアリールから選択される1~5つの置換基、または1~3つの置換基を有する、シクロアルケニル基を指す。

40

42. 「シクロアルキニル」は、単環または多環を有し、かつ少なくとも1つの三重結合を有する、5~10個の炭素原子の非芳香族シクロアルキル基を指す。

50

43. 「シクロアルコキシ」は、 $-O-$ シクロアルキルを指す。

44. 「シクロアルケニルオキシ」は、 $-O-$ シクロアルケニルを指す。

45. 「ハロ」または「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、及びヨードを指す。

46. 「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、 $-OH$ という基を指す。

47. 「ヘテロアリール」は、環内の1～10個の炭素原子等の1～15個の炭素原子と、酸素、窒素、及び硫黄からなる群から選択される1～10個のヘテロ原子との芳香族基を指す。かかるヘテロアリール基は、単環（ピリジニル、イミダゾリル、またはフリル等）または環系における複数の縮合環（例えば、インドリジニル、キノリニル、ベンゾフラン、ベンズイミダゾリル、またはベンゾチエニル等の基にあるような）を有することができる、ここで、環系内の少なくとも1つの環は、芳香族であるが、但し、結合点が芳香環の原子を介するものであることを条件とする。ある特定の実施形態では、ヘテロアリール基の窒素及び/または硫黄環原子（複数可）は、任意選択で酸化されて、 N -オキシド（ $N-O$ ）部分、スルフィニル部分、またはスルホニル部分を提供する。この用語には、例として、ピリジニル、ピロリル、インドリル、チオフェニル、及びフラニルが含まれる。ヘテロアリール置換基に関する定義によって別途制約されない限り、かかるヘテロアリール基は、任意選択で置換されて、アシルオキシ、ヒドロキシ、チオール、アシル、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、置換アルキル、置換アルコキシ、置換アルケニル、置換アルキニル、置換シクロアルキル、置換シクロアルケニル、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アシルアミノ、アルカリール、アリール、アリールオキシ、アジド、カルボキシル、カルボキシルアルキル、シアノ、ハロゲン、ニトロ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、アミノアシルオキシ、オキシアシルアミノ、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール及び $-SO_2-$ ヘテロアリール、ならびにトリハロメチルから選択される1～5つの置換基、または1～3つの置換基を有する、「置換ヘテロアリール」基を形成することができる。

48. 「ヘテロアラルキル」という用語は、 $-$ アルキレン-ヘテロアリールという基を指し、ここで、アルキレン、及びヘテロアリールは、本明細書で定義される。この用語には、例として、ピリジルメチル、ピリジルエチル、インドリルメチル等が含まれる。

49. 「ヘテロアリールオキシ」は、 $-O-$ ヘテロアリールを指す。

50. 「複素環」、「複素環式基」、「ヘテロシクロアルキル」、及び「ヘテロシクリル」は、単環、または縮合系、架橋系、及びスピロ環系を含めた複数の縮合環を有し、かつ1～10個のヘテロ原子を含む3～20個の環原子を有する、飽和または不飽和基を指す。これらの環原子は、窒素、硫黄、または酸素からなる群から選択され、ここで、縮合環系において、環のうちの1つまたは複数は、シクロアルキル、アリール、またはヘテロアリールであることができるが、但し、結合点が非芳香族環を介するものであることを条件とする。ある特定の実施形態では、複素環基の窒素及び/または硫黄原子（複数可）は、任意選択で酸化されて、 N -オキシド部分、 $-S(O)-$ 部分、または $-SO_2-$ 部分を提供する。

51. 複素環及びヘテロアリールの例としては、アゼチジン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、ジヒドロインドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチルピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナントロリン、イソチアゾール、フェナジン、イソキサゾール、フェノキサジン、フェノチアジン、イミダゾリジン、イミダゾリン、ペペリジン、ペペラジン、インドリン、フタルイミド、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、4, 5, 6, 7-テトラヒドロベンゾ[*b*]チオフェン、チアゾール、チアゾリジン、チオフェン、ベンゾ[*b*]チオフェ

10

20

30

40

50

ン、モルホリニル、チオモルホリニル（チアモルホリニルとも称される）、1, 1 - ジオキソチオモルホリニル、ピペリジニル、ピロリジン、テトラヒドロフラニル等が挙げられるが、これらに限定されない。

52. 複素環置換基に関する定義によって別途制約されない限り、かかる複素環基は、任意選択で、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアミノアシル、アジド、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、オキソ、チオケト、カルボキシル、カルボキシルアルキル、チオアリールオキシ、チオヘテロアリールオキシ、チオヘテロシクロオキシ、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、 $-SO-$ アルキル、 $-SO-$ 置換アルキル、 $-SO-$ アリール、 $-SO-$ ヘテロアリール、 $-SO_2-$ アルキル、 $-SO_2-$ 置換アルキル、 $-SO_2-$ アリール、 $-SO_2-$ ヘテロアリール、及び縮合複素環から選択される1～5つ、または1～3つの置換基で置換され得る。

53. 「ヘテロシクリルオキシ」は、 $-O-$ ヘテロシクリルという基を指す。

54. 「ヘテロシクリルチオ」という用語は、複素環式基 $-S-$ という基を指す。

55. 「ヘテロシクレン」という用語は、本明細書で定義されるような複素環から形成されるジラジカル基を指す。

56. 「ヒドロキシアミノ」という用語は、 $-NHOH$ という基を指す。

57. 「ニトロ」は、 $-NO_2$ という基を指す。

58. 「オキソ」は、 $(=O)$ という原子を指す。

59. 「スルホニル」は、 SO_2- アルキル、 SO_2- 置換アルキル、 SO_2- アルケニル、 SO_2- 置換アルケニル、 SO_2- シクロアルキル、 SO_2- 置換シクロアルキル、 SO_2- シクロアルケニル、 SO_2- 置換シクロアルケニル、 SO_2- アリール、 SO_2- 置換アリール、 SO_2- ヘテロアリール、 SO_2- 置換ヘテロアリール、 SO_2- 複素環式基、及び SO_2- 置換複素環式基という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。スルホニルには、例として、メチル $-SO_2-$ 、フェニル $-SO_2-$ 、及び4-メチルフェニル $-SO_2-$ が含まれる。

60. 「スルホニルオキシ」は、 $-OSO_2-$ アルキル、 OSO_2- 置換アルキル、 OSO_2- アルケニル、 OSO_2- 置換アルケニル、 OSO_2- シクロアルキル、 OSO_2- 置換シクロアルキル、 OSO_2- シクロアルケニル、 OSO_2- 置換シクロアルケニル、 OSO_2- アリール、 OSO_2- 置換アリール、 OSO_2- ヘテロアリール、 OSO_2- 置換ヘテロアリール、 OSO_2- 複素環式基、及び OSO_2- 置換複素環式基という基を指し、ここで、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環式基、及び置換複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

61. 「アミノカルボニルオキシ」という用語は、 $-OC(O)NR_2$ という基を指し、ここで、各Rは独立して、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、ヘテロアリール、または複素環式基であり、アルキル、置換アルキル、アリール、ヘテロアリール、及び複素環式基は、本明細書で定義される通りである。

62. 「チオール」は、 $-SH$ という基を指す。

63. 「チオキソ」、または「チオケト」という用語は、 $(=S)$ という原子を指す。

64. 「アルキルチオ」または「チオアルコキシ」という用語は、 $-S-$ アルキルという基を指し、ここで、アルキルは、本明細書で定義される通りである。ある特定の実施形態では、硫黄は、 $-S(O)-$ に酸化されてもよい。スルホキシドは、1つまたは複数の

立体異性体として存在してもよい。

65. 「置換チオアルコキシ」という用語は、-S-置換アルキルという基を指す。

66. 「チオアリールオキシ」という用語は、アリール-S-という基を指し、ここで、アリール基は、同じく本明細書で定義される任意選択で置換されるアリール基を含めて、本明細書で定義される通りである。

67. 「チオヘテロアリールオキシ」という用語は、ヘテロアリール-S-という基を指し、ここで、ヘテロアリール基は、同じく本明細書で定義されるような任意選択で置換されるアリール基を含めて、本明細書で定義される通りである。

68. 「チオヘテロシクロオキシ」という用語は、ヘテロシクリル-S-という基を指し、ここで、ヘテロシクリル基は、同じく本明細書で定義されるような任意選択で置換されるヘテロシクリル基を含めて、本明細書で定義される通りである。

69. 本明細書における開示に加えて、「置換(される)」という用語は、指定される基またはラジカルを修飾するように使用されるとき、指定される基またはラジカルの1個または複数の水素原子が各々、互いから独立して、下記で定義されるような同じまたは異なる置換基で置き換えられることもまた意味し得る。

70. 本明細書で個々の用語に対して開示される基に加えて、指定される基またはラジカルにおける飽和炭素原子上の1個または複数の水素(単一の炭素上の任意の2個の水素は、=O、=NR⁷⁰、=N-OR⁷⁰、=N₂、または=Sで置き換えられ得る)を置換するための置換基は、別途指定されない限り、-R⁶⁰、ハロ、=O、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-NR⁸⁰R⁸⁰、トリハロメチル、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-SO₂R⁷⁰、-SO₂O⁻M⁺、-SO₂R⁷⁰、-OSO₂R⁷⁰、-OSO₂O⁻M⁺、-OSO₂OR⁷⁰、-P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂、-P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)₂、-C(O)R⁷⁰、-C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-C(O)O⁻M⁺、-C(O)OR⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、-C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OC(O)O⁻M⁺、-OC(O)OR⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰CO₂⁻M⁺、-NR⁷⁰CO₂R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰、及び-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰であり、ここで、R⁶⁰は、任意選択で置換されるアルキル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、及びヘテロアリールアルキルからなる群から選択され、各R⁷⁰は独立して、水素もしくはR⁶⁰であり、各R⁸⁰は独立して、R⁷⁰であるか、または、代替として、2つのR⁸⁰が、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、5員、6員、もしくは7員ヘテロシクロアルキルを形成し、これは任意選択で、O、N、及びSからなる群から選択される(このうちNは、-HまたはC₁~C₃アルキル置換を有してもよい)同じまたは異なる追加的なヘテロ原子のうちの1~4個を含んでもよく、各M⁺は、正味単一の正電荷を有する対イオンである。各M⁺は独立して、例えば、K⁺、Na⁺、Li⁺等のアルカリイオン、⁺N(R⁶⁰)₄等のアンモニウムイオン、または[Ca²⁺]_{0.5}、[Mg²⁺]_{0.5}、もしくは[Ba²⁺]_{0.5}等のアルカリ土類イオン(「_{0.5}」とは、かかる二価アルカリ土類イオンに対する対イオンのうちの一方が本発明の化合物のイオン化形態であり得、他方が塩化物等の典型的な対イオンであり得るか、または本明細書に開示される2つのイオン化化合物が、かかる二価アルカリ土類イオンに対する対イオンとしての役目を果たし得るか、または本発明の二重イオン化(doubly ionized)化合物が、かかる二価アルカリ土類イオンに対する対イオンとしての役目を果たし得ることを意味する)であってもよい。具体的な例として、-NR⁸⁰R⁸⁰は、-NH₂、-NH-アルキル、N-ピロリジニル、N-ピペラジニル、4N-メチル-ピペラジン-1-イル、及びN-モルホリニルを含むことを意図する。

71. 本明細書における開示に加えて、「置換」アルケン基、アルキン基、アリール基

、及びヘテロアリアル基における不飽和炭素原子上の水素に対する置換基は、別途指定されない限り、 $-R^{60}$ 、ハロ、 $-O-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-S-M^+$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、トリハロメチル、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SO_2R^{70}$ 、 $-SO_3-M^+$ 、 $-SO_3R^{70}$ 、 $-OSO_2R^{70}$ 、 $-OSO_3-M^+$ 、 $-OSO_3R^{70}$ 、 $-PO_3-2(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O-M^+$ 、 $-P(O)(OR^{70})_2$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-CO_2-M^+$ 、 $-CO_2R^{70}$ 、 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ 、 $-OC(O)R^{70}$ 、 $-OC(S)R^{70}$ 、 $-OCO_2-M^+$ 、 $-OCO_2R^{70}$ 、 $-OC(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)R^{70}$ 、 $-NR^{70}CO_2-M^+$ 、 $-NR^{70}CO_2R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ 、及び $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ であり、ここで、 R^{60} 、 R^{70} 、 R^{80} 、及び M^+ は、先に定義した通りであるが、但し、置換アルケンまたはアルキンの場合、置換基が $-O-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、または $-S-M^+$ ではないことを条件とする。

10

72. 本明細書で個々の用語に対して開示される基に加えて、「置換」ヘテロアルキル基及びシクロヘテロアルキル基における窒素原子上の水素に対する置換基は、別途指定されない限り、 $-R^{60}$ 、 $-O-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-S-M^+$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、トリハロメチル、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(O)_2R^{70}$ 、 $-S(O)_2O-M^+$ 、 $-S(O)_2R^{70}$ 、 $-OS(O)_2R^{70}$ 、 $-OS(O)_2O-M^+$ 、 $-OS(O)_2R^{70}$ 、 $-P(O)(O^-)_2(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O-M^+$ 、 $-P(O)(OR^{70})(OR^{70})$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-C(O)OR^{70}$ 、 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ 、 $-OC(O)R^{70}$ 、 $-OC(S)R^{70}$ 、 $-OC(O)OR^{70}$ 、 $-OC(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ 、及び $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ であり、ここで、 R^{60} 、 R^{70} 、 R^{80} 、及び M^+ は、先に定義した通りである。

20

【0102】

30

ある実施形態では、f G l y 含有ポリペプチドにコンジュゲートされる対象となるエピトープ（例えば、ペプチドエピトープ）及び/またはペイロードは、式（III）、（IV）、（V）、（Va）、（VI）、または（VIa）の形態を有する。一部の実施形態では、エピトープは、式（III）、（IV）、（V）、（Va）、（VI）、または（VIa）の化合物において共有結合される。かかる一実施形態では、該エピトープは、エピトープ（例えば、ウイルスまたはがんエピトープ）のa a配列を含むペプチドである。ある実施形態では、ペプチドエピトープは、約4 a a ~ 約20 a a（例えば、4 a a、5 a a、6 a a、7 a a、8 a a、9 a a、10 a a、11 a a、12 a a、13 a a、14 a a、15 a a、16 a a、17 a a、18 a a、19 a a、または20 a a）長の長さを有する。

40

【0103】

本開示は、T細胞MMP-エピトープコンジュゲート及び/またはT細胞MMP-ペイロードコンジュゲートの調製方法であって、

a) セリンまたはシステインを含むスルファターゼモチーフ（例えば、上記で考察されたX1CX2PX3Z3（配列番号47）、CX1PX2Z3（配列番号48）等の、式（I）または（II）のスルファターゼモチーフ）をコードする配列を、T細胞MMPの第1のポリペプチド及び/または第2のポリペプチドをコードする核酸に組み込むことと

b) スルファターゼモチーフを含有する第1のポリペプチド及び/または第2のポリペプチドを、

50

i) FGEを発現して、スルファターゼモチーフのセリンもしくはシステインをfGlyに変換する細胞において発現させ、fGlyを含有する第1のポリペプチド及び/または第2のポリペプチドを別個にもしくはT細胞MMPとして部分的にもしくは完全に精製すること、あるいは

ii) スルファターゼモチーフのセリンもしくはシステインをfGlyに変換するFGEを発現しない細胞において発現させ、fGly残基を含有するT細胞MMPを精製するか、もしくは部分的に精製し、精製したもしくは部分的に精製したT細胞MMPを、スルファターゼモチーフのセリンもしくはシステインをfGly残基に変換するFGEに接触させることと、

c) fGlyを含有する第1及び/または第2のポリペプチドを別個に、またはT細胞-MMPの一部として、fGlyのアルデヒドとエピトープ及び/またはペイロードとの間で共有結合を形成する基で官能化されたエピトープ及び/またはペイロードに接触させることと、を含み、

それによってT細胞MMP-エピトープコンジュゲート及び/またはT細胞MMPペイロードコンジュゲートを形成させる、該方法を提供する。

かかる方法において、エピトープ(エピトープ含有分子)及び/またはペイロードは、アルデヒド基と選択的に反応する任意の好適な官能基によって官能化されてもよい。かかる基は、例えば、チオセミカルバジド、アミノオキシ、ヒドラジド、及びヒドラジノからなる群から選択されてもよい。複数の実施形態では、エピトープ及び/またはペイロードは、式(I II)、(I V)、(V)、(V a)、(V I)、または(V I a)のヒドラジニル化合物の一部である。かかる一実施形態では、スルファターゼモチーフは、2 M a a配列を含むT細胞MMPの第1のポリペプチドに、2 M配列内、またはそれに結合したリンカー内のいずれかで(例えば、N末端の10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100 a a以内で)組み込まれる。ある実施形態では、スルファターゼモチーフが、図4に示される2 M配列に対して少なくとも85%(例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%)の配列同一性を有する2 M a a配列を含む、第1または第2のポリペプチドに組み込まれる(例えば、ここでの同一性は、スルファターゼモチーフ配列を含めることなく、またはその付加前に算出される)。例えば、スルファターゼモチーフは、シグナル配列と成熟ペプチドの配列との間、または成熟ペプチドのN末端に配置されてもよく、該モチーフは、ペプチドリンカーによって2 M配列(複数可)から隔離されてもよい。

【0104】

T細胞MMP-エピトープコンジュゲート及び/またはT細胞MMPペイロードコンジュゲートの調製方法に関する他の実施形態では、配列番号45(式(I))または配列番号46のスルファターゼモチーフが、第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位として第2のポリペプチドのIgFc領域に組み込まれてもよい。ある実施形態では、スルファターゼモチーフが、スルファターゼモチーフ配列の付加前に図2に示される配列に対して少なくとも85%(例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%)のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む配列に組み込まれる。

【0105】

T細胞MMP-エピトープコンジュゲート及び/またはT細胞MMPペイロードコンジュゲートの調製方法の別の実施形態では、配列番号45(式(I))または配列番号46のスルファターゼモチーフが、化学コンジュゲーション部位としてMHCクラスI重鎖ポリペプチドに組み込まれてもよい。

【0106】

T細胞MMP-エピトープコンジュゲート及び/またはT細胞MMPペイロードコンジュゲートの調製方法のある実施形態では、スルファターゼモチーフが、図3に示される配列に対して少なくとも85%(例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%)のアミノ酸配列同一性を有する配列に組み込まれる(例

10

20

30

40

50

えば、ここでの配列同一性は、スルファターゼモチーフ配列を含めることなく、またはその付加前に算出される)。かかる一実施形態では、スルファターゼモチーフは、例えば、エピトープ及び/またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0107】

I . A . 2 . 2 ソルターゼA酵素部位

エピトープ(例えば、エピトープの配列を含むペプチド)及びペイロードは、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドのN末端及び/またはC末端で、これらの箇所ですルターゼAコンジュゲーション用の部位を組み込むことによって、結合させてもよい。

【0108】

ソルターゼAは、C末端ペンタペプチド配列LP(X5)TG/A(配列番号54、このうちX5は任意の単一アミノ酸であり、G/Aはグリシンまたはアラニンである)を認識し、この配列内のトレオニンとコンジュゲーションパートナーのN末端におけるグリシンまたはアラニンとの間でアミド結合を作り出す。有利なことに、これらの認識配列は、いずれかのコンジュゲーションパートナーに組み込まれて、第1または第2のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかが化学コンジュゲーション部位としての役目を果たすことを可能にし得る。さらに、LP(X5)TG/A配列は、いずれの非天然アミノ酸も必要とせず、多様な細胞型における多種多様な条件下でT細胞MMPに対する発現が実行されることを可能にする。ソルターゼAによる酵素的ライゲーションの可能性のある不利点は、それが、グルタミン側鎖の、リジン等のアルキル級アミンへのカップリングをもまた触媒し得る、細菌トランスグルタミナーゼ(mTG)を採用するという点である。細菌mTGは、天然IgG1においてグルタミン残基を修飾することができないように思われるが、採用されるときポリペプチド配列の二次修飾をもたらす場合がある。

【0109】

エピトープまたはペイロードをT細胞MMPの第1または第2のポリペプチドのカルボキシル末端に結合させる場合、LP(X5)TG/Aが、所望のペプチド(複数可)のカルボキシル末端部分に導入操作される。露出したグリシンまたはアラニンの連なり(例えば、Staphylococcus aureus由来のソルターゼAを用いる場合は(G)₃₋₅(配列番号55及び56)、またはStreptococcus pyogenes由来のソルターゼAを用いる場合は(A)₃₋₅(配列番号57及び58))が、エピトープを含むペプチド(またはそれに結合したリンカー)、ペプチドペイロード(またはそれに結合したリンカー)、または非ペプチドエピトープもしくはペイロードに共有結合性で結合したペプチドのN末端に導入操作される。

【0110】

エピトープまたはペイロードをT細胞MMPの第1または第2のポリペプチドのアミノ末端に結合させる場合、露出したグリシン(例えば、(G)_{2,3,4}、または5)またはアラニン(例えば、(A)_{2,3,4}、または5)の連なりが、所望のポリペプチド(複数可)のN末端に現れるように操作され、LP(X5)TG/Aが、エピトープを含むペプチド(またはそれに結合したリンカー)、ペプチドペイロード(またはそれに結合したリンカー)、または非ペプチドエピトープもしくはペイロードに共有結合性で結合したペプチドのカルボキシル末端部分に導入操作される。

【0111】

ソルターゼAをアミノ操作及びカルボキシル操作ペプチドと組み合わせることにより、LP(X5)TG/A配列においてThr残基とGly/Ala残基との間の切断がもたらされて、カルボキシル標識ペプチドとのチオエステル中間体が形成される。N末端で修飾されたポリペプチドによる求核攻撃により、カルボキシル修飾ポリペプチド-LP(X5)TG/A-アミノ修飾ポリペプチドという形態の、共有結合性でカップリングされた複合体の形成がもたらされ、ここで、「*」は、LP(X5)TG/Aモチーフのトレオニン

10

20

30

40

50

と、N末端修飾ペプチドのグリシンまたはアラニンとの間で形成される結合を表す。上述に照らして、本開示は、

第1及び/または第2のポリペプチドのカルボキシ末端における少なくとも1つのLP(X5)TG/Aアミノ酸配列(例えば、そのN末端においてオリゴグリシンまたはオリゴアラニンで修飾されたエピトープペプチドとのカップリング用)、

第1及び/または第2のポリペプチドのアミノ末端における少なくとも1つのオリゴグリシン(例えば、(G)₂、₃、₄、または₅) (例えば、そのN末端においてLP(X5)TG/Aアミノ酸配列で修飾されたエピトープポリペプチドとのカップリング用)、

第1及び/または第2のポリペプチドのアミノ末端における少なくとも1つのオリゴアラニン(例えば、(A)₂、₃、₄、または₅) (例えば、そのN末端においてLP(X5)TG/Aアミノ酸配列で修飾されたエピトープポリペプチドとのカップリング用)、

第1及び/または第2のポリペプチドにおける少なくとも1つのLP(X5)TA(例えば、LPET A、配列番号54(ここで、X5はEであり、終わりの位置はAである))アミノ酸配列(例えば、そのN末端においてオリゴグリシンまたはオリゴアラニンで修飾されたエピトープペプチドとのカップリング用)、及び/または

第1及び/または第2のポリペプチドにおける少なくとも1つのLP(X5)TG(例えば、LPETG、配列番号54(ここで、X5はEであり、終わりの位置はGである))アミノ酸配列(例えば、そのN末端においてオリゴグリシンまたはオリゴアラニンで修飾されたエピトープペプチドとのカップリング用)、

を有するT細胞MMPを含有する組成物、及びその使用を企図する。

【0112】

LP(X5)TG/Aの代わりに、LPETGG(配列番号59)ペプチドがS. aureusソルターゼAカップリングに使用されてもよく、またはLPETAA(配列番号60)ペプチドがS. pyogenesソルターゼAカップリングに使用されてもよい。コンジュゲーション反応は依然として、トレオニンとアミノ末端オリゴグリシンまたはオリゴアラニンペプチドとの間で起こって、カルボキシ修飾ポリペプチド-LP(X5)TG/A-アミノ修飾ポリペプチドを産出し、ここで、「*」は、トレオニンと、N末端修飾ペプチドのグリシンまたはアラニンとの間で形成される結合を表す。

【0113】

一実施形態では、T細胞MMPの第1のポリペプチドが2Mポリペプチドを含む場合、第1のポリペプチドは、ポリペプチドのN末端で、または第1のポリペプチドに結合したポリペプチドリンカー(例えば、リンカーは、第1のポリペプチドと共翻訳され、第1のポリペプチドのN末端にある)のN末端で、オリゴグリシン(例えば、(G)₂、₃、₄、または₅)またはオリゴアラニン(例えば、(A)₂、₃、₄、または₅)を含有する。オリゴグリシンまたはオリゴアラニンをソルターゼAによる化学コンジュゲーション部位として用いて、そのカルボキシ末端領域にLP(X5)TG/Aをもつポリペプチドを含むエピトープにそれをコンジュゲートすることによって、エピトープ分子をT細胞MMPに導入してもよい。例として、図4に示されるような2Mの配列は、20アミノ酸のリーダー配列から始まり、成熟ポリペプチドは、最初の配列IQRTP(K/Q)IQVYSから始まり、当該ポリペプチドの残りの部分にわたって継続する。配列番号54、59、及び69のソルターゼモチーフは、例えば、下記のように、

A₂₋₅もしくはG₂₋₅-リンカー-IQ(R/K)TP(K/Q)IQVYS...

A₂₋₅もしくはG₂₋₅-リンカー-Q(R/K)TP(K/Q)IQVYS...、または

A₂₋₅もしくはG₂₋₅-リンカー-(R/K)TP(K/Q)IQVYS...、
(A₂₋₅またはG₂₋₅については配列番号55~58、ならびに2M配列については配列番号151~155及び図4を参照されたい)、

あるいはヒトリーダー配列MSRSVALAVLALLSLSGLEA(配列番号151及び図4を参照されたい)と共に下記に示されるように、

MSRSVALAVLALLSLSGLEA(A₂₋₅またはG₂₋₅)-リンカー-IQ(R/K)TP(K/Q)IQVYS...

MSRSVALAVLALLSLSGLEA(A₂₋₅またはG₂₋₅)-リンカー-Q(R/K)TP(K/Q)IQVYS...

または

MSRSVALAVLALLSLSGLEA(A₂₋₅またはG₂₋₅)-リンカー-(R/K)TP(K/Q)IQVYS...

その中に導入されてもよく、ここで、存在する場合、リンカーは、独立して選択されるアミノ酸配列（例えば、AAGG（配列番号75）または（GGGS）_n（ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である）（配列番号76）等の、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリセリン、及びポリ-Gly等の1～50個のアミノ酸）、または化学基（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール等）を含んでもよい。リンカーは、存在しても、または不在であってもよく、2つのリンカーが示される場合、それら同じであっても、または異なってもよい。

10

【0114】

そのN末端にオリゴグリシンをもつポリペプチドが、細胞に基づく系における発現によって調製され、その発現細胞によってリーダー配列及び/またはリンカーのいずれの部分も除去されないか、または完全には除去されない場合、トロニン切断部位（Leu-Val-Pro-Arg-Gly、配列番号61）が、グリシンに先行するように挿入されてもよい。トロニンはArg残基とGly残基との間を切断するので、これにより、ポリペプチドにおいて他のトロニン部位が何ら存在しないことを条件として、切断後にグリシンが、オリゴグリシンで標識され、コンジュゲートされるようにタンパク質分子上に露出することが確実となる。

20

【0115】

ある実施形態では、A₂₋₅またはG₂₋₅モチーフが、図4に示される配列（例えば、図4に示される全配列、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟ポリペプチドの配列のいずれか）に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する配列を含むポリペプチドに組み込まれ、ここでの配列同一性は、付加されたA₂₋₅またはG₂₋₅モチーフ及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく評価される。

30

【0116】

ある実施形態では、A₂₋₅またはG₂₋₅モチーフが、図4に示される配列（例えば、図4に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟ポリペプチド配列のうちのいずれか）と比較して1～15個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個）のアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化を有する2M配列を含むポリペプチドに組み込まれ、ここでのアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化は、付加されたA₂₋₅またはG₂₋₅モチーフ及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく評価される。かかる一実施形態では、A₂₋₅またはG₂₋₅モチーフは、図4に示される配列等の成熟2M配列の、アミノ末端の15個（例えば、1～5、5～10、または10～15個）のアミノ酸のうちのいずれかを置き換えてもよいし、及び/またはそれらの間に挿入されてもよい。

40

【0117】

I.A.2.3 トランスグルタミナーゼ酵素部位

トランスグルタミナーゼ(mTG)は、グルタミン残基の側鎖上のアミド基と、一級アミンドナー（例えば、ポリペプチドにおけるリジン残基の側鎖上で見出されるもの等の、一級アルキルアミン）との間での共有結合の形成を触媒する。トランスグルタミナーゼは、エピトープ及びペイロードをT細胞MMPに直接、または遊離一級アミンを含むリンカーを介して間接的にいずれかでコンジュゲートするために採用されてもよい。したがって

50

、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドに存在するグルタミン残基は、それらがStreptoveriticillium mobaraenseトランスグルタミナーゼ等の酵素によって接近可能である場合、化学コンジュゲーション部位と見なされ得る。その酵素(EC 2.3.2.13)は、リジンの-アミノ基へのグルタミンの-アシル転移を触媒する、安定なカルシウム非依存性酵素である。しかしながら、配列に現れるグルタミン残基は、酵素的修飾用に常に接近可能であるわけではない。限定された接近性は、修飾が起こり得る箇所の数を限定するため、有利であり得る。例えば、細菌mTGは全般的に、天然IgG1においてグルタミン残基を修飾することができないが、Schibliと共同研究者(Jeger, S., et al. Angew Chem (Int Engl). 2010; 49: 99957及びDennler P, et al. Bioconjug Chem. 2014; 25(3): 569-78)は、IgG1をN297において脱グリコシル化することによりグルタミン残基Q295が接近可能となり、抗体薬物コンジュゲートを作り出すための酵素的ライゲーションが可能となることを見出した。さらに、N297からQ297へのIgG1変異体を生産することにより、トランスグルタミナーゼによる酵素標識用の2つの部位を導入する。

10

20

30

40

50

【0118】

T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドが、化学コンジュゲーション部位として採用され得るグルタミンを含有しない(例えば、それがトランスグルタミナーゼにとって接近可能でないか、または所望の箇所に配置されていない)場合、トランスグルタミナーゼの基質として作用し得るグルタミン残基、または接近可能なグルタミンを含む配列(「グルタミントグ」または「Qタグ」と称されることがある)が、ポリペプチドに組み込まれてもよい。付加されたグルタミンまたはQタグは、第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位または第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位として作用し得る。米国特許公開2017/0043033 A1は、グルタミン残基及びQタグの組み込み、ならびにポリペプチドを修飾するためのトランスグルタミナーゼの使用について記載しており、これらの教示に関して本明細書に援用される。

【0119】

グルタミン残基及びQタグの組み込みは、ペプチドを合成することにより化学的に、または当該ポリペプチドをコードする核酸を修飾して、細胞もしくは無細胞系において修飾核酸を発現させることによって、遂行され得る。

【0120】

ある実施形態では、第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位がグルタミンまたはQタグである場合、このグルタミンまたはQタグは、上述の第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位または第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位に関して示される箇所のうちのいずれかにあってよい。

【0121】

ある実施形態では、付加されたグルタミン残基またはQタグは、第1のMHCポリペプチド、または、存在する場合、第1のMHCポリペプチドに結合したリンカーの配列に結合しているか(例えば、N末端またはC末端で)、またはその配列内にある。第1のポリペプチドの追加的な化学コンジュゲーション部位が、T細胞MMPの第1のポリペプチド上の任意の箇所に(それに結合して、またはその内部に)存在してもよい。かかる一実施形態では、T細胞MMPの第1のMHCポリペプチドは、2Mポリペプチドであり、付加されたグルタミンまたはQタグが、図4に提供される成熟2Mポリペプチド配列(これは20塩基対のシグナル配列を除外する)(または図4にある成熟2Mポリペプチドに対して少なくとも85%、90%、95%、98%、99、またはさらには100%の配列同一性を有するペプチド)のN末端から20、15、または10アミノ酸以内に組み込まれている。別の実施形態では、グルタミンまたはQタグは、図4に提供される成熟2Mポリペプチドのうちの1つのN末端に結合したポリペプチドリナーに存在する。

【0122】

ある実施形態では、付加されたグルタミン残基またはQタグは、T細胞MMPの第2の

ポリペプチドの配列に結合しているか（例えば、N末端またはC末端で）、またはその配列内にあり、例えば、第2のMHCポリペプチド（例えば、MHC-Hポリペプチド）、または、存在する場合、第2のMHCポリペプチドに直接もしくは間接的に結合したFc足場ペプチドもしくはリンカーの末端またはその内部にある。第2のポリペプチドの追加的な化学コンジュゲーション部位が、T細胞MMPの第2のポリペプチド上の任意の箇所に（それに結合して、またはその内部に）存在してもよい。一実施形態では、第2のMHCポリペプチドは、MHC-Hポリペプチドであり、第2のポリペプチドは、Fcポリペプチドを含み、付加されたグルタミンまたはQタグが、MHC-HまたはFcポリペプチド配列内に組み込まれている。別の実施形態では、グルタミンまたはQタグは、MHC-HポリペプチドとFcポリペプチドとの間のポリペプチドリンカー内、またはFcポリペプチドのカルボキシル末端に結合したリンカー内に存在する。

10

【0123】

複数の実施形態では、グルタミン含有タグは、LQG、LLQGG（配列番号62）、LLQG（配列番号63）、LSLSQG（配列番号64）、及びLLQLQG（配列番号65）（多数の他の例が利用可能である）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0124】

一級アミン基を含有する、または一級アミン基を含有するように修飾されたペイロード及びエピトープを、トランスグルタミナーゼ触媒反応においてアミンドナーとして用いて、グルタミン残基（例えば、Qタグにおけるグルタミン残基）と、エピトープまたはペイロードとの間で共有結合を形成させてもよい。

20

【0125】

エピトープまたはペイロードが、それがアミンドナーとして作用することを可能にするのに好適な一級アミンを含まない場合、エピトープまたはペイロードは、アミン基を組み込むように化学的に修飾（例えば、リジン、アミノカプロン酸、カダベリン等への連結によって一級アミンを組み込むように修飾）されてもよい。エピトープまたはペイロードがペプチドを含み、アミンドナーとして作用するための一級アミンを必要とする場合、トランスグルタミナーゼと共に一級アミンが作用し得るリジン、または他のアミン含有化合物が、当該ペプチドに組み込まれてもよい。一級アミン基を提供し得、かつアルファアミノ酸鎖に組み込まれるか、またはその末端にあり得る他のアミン含有化合物には、ホモリジン、2,7-ジアミノヘプタン酸、及びアミノヘプタン酸が含まれるが、これらに限定されない。代替として、エピトープまたはペイロードは、好適なアミン基を含むペプチドまたは非ペプチドリンカーに結合していてもよい。好適な非ペプチドリンカーの例としては、アルキルリンカー及びPEG（ポリエチレングリコール）リンカーが挙げられる。

30

【0126】

トランスグルタミナーゼは、様々な源から得ることができ、これには、哺乳類肝臓（例えば、モルモット肝臓）；真菌（例えば、Oomycetes、Actinomyces、Saccharomyces、Candida、Cryptococcus、Monascus、またはRhizopusトランスグルタミナーゼ）；粘菌（例えば、Physarum polycephalumトランスグルタミナーゼ）；及び/または細菌（例えば、Streptovorticillium mobarensis、Streptovorticillium griseocarneum、Streptovorticillium ladakanum、Streptomyces mobarensis、Streptomyces viridis、Streptomyces ladakanum、Streptomyces caniferus、Streptomyces platensis、Streptomyces hygrosopius、Streptomyces netropsis、Streptomyces fradiae、Streptomyces roseovortivillatus、Streptomyces cinnamomeus、Streptomyces griseocarneum、Streptomyces lavendulae、Strept

40

50

omyces lividans、Streptomyces lydicus、S. mobarensis、Streptomyces sioyansis、Actinomadura 菌種、Bacillus circulans、Bacillus subtilis、Corynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium glutamicum、Clostridium、Enterobacter 菌種、Micrococcus) 由来の酵素が含まれる。一部の実施形態では、トランスグルタミナーゼは、酵素の立体構造変化を誘導して、酵素活性を可能にするのにカルシウムを必要としない、カルシウム非依存性トランスグルタミナーゼである。

【0127】

他の第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位及び第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位に関して上記で考察されたように、グルタミンまたはQタグは、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチド上の任意の所望の箇所に組み込まれてもよい。ある実施形態では、グルタミンまたはQタグは、第1及び第2のMHCポリペプチド(例えば、MHC-H及び2Mポリペプチド)、足場またはIgFc、ならびにこれらの要素に隣接するリンカーを含めた、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドにおける任意の要素の末端またはその付近で付加されてもよい。

【0128】

一実施形態では、T細胞MMPの第1のポリペプチドが2Mポリペプチド配列を含む場合、第1のポリペプチドは、ポリペプチドのN末端に、または第1のポリペプチドに結合したポリペプチドリンカー(例えば、リンカーは、第1のポリペプチドのN末端に結合している)のN末端に、グルタミンまたはQタグを含有する。グルタミンまたはQタグを化学コンジュゲーション部位として用いて、トランスグルタミナーゼによりアミドドナーとして使用され得る、一級アミンをもつエピトープ、または一級アミンを含むリンカーに結合されたエピトープにそれをコンジュゲートすることによって、エピトープ分子をT細胞MMPに導入してもよい。例として、図4に示されるような2Mの配列は、20アミノ酸のリーダー配列から始まり、成熟ポリペプチドは、最初の配列IQRTP(K/Q)IQVYSから始まり、当該ポリペプチドの残りの部分にわたって継続する。上記に示されたその他のQタグを代表し、かつその他のQタグによって置換可能である、アミノ酸配列LLQG(配列番号63)を有するQタグが、下記に示されるように、

Qタグ-リンカー-IQRTP(K/Q)IQVYS...

LLQG-リンカー-IQRTP(K/Q)IQVYS...

LLQG-リンカー-QRTP(K/Q)IQVYS.....、もしくは

LLQG-リンカー-RTP(K/Q)IQVYS...

(2M配列については配列番号151~155を参照されたい)

またはヒトリーダー配列MSRSVALAVLALLSLSGLEA(配列番号151及び図4を参照されたい)と共に下記に示されるように、

MSRSVALAVLALLSLSGLEA-リンカー-Qタグ-リンカー-IQRTP(K/Q)IQVYS...

MSRSVALAVLALLSLSGLEA-リンカー-LLQG-リンカー-IQRTP(K/Q)IQVYS...

MSRSVALAVLALLSLSGLEA-リンカー-LLQG-リンカー-QRTP(K/Q)IQVYS.....、もしくは

MSRSVALAVLALLSLSGLEA-リンカー-LLQG-リンカー-RTP(K/Q)IQVYS...

2MのN末端で組み込まれ得、ここで、存在する場合、リンカーは、独立して選択されるアミノ酸配列(例えば、AAGG(配列番号75)または(GGGGS)_n(ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である)(配列番号76)等の、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリセリン、及びポリ-Gly等の1~50個のアミノ酸)、または化学基(例えば、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール等)を含んでもよい。リンカーは、存在しても、または不在であってもよく、2つのリンカーが

示される場合、それら同じであっても、または異なってもよい。

【0129】

ある実施形態では、Qタグモチーフが、図4に示される配列（例えば、図4に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟2Mポリペプチドのうちのいずれかの配列）に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する2M配列を含むポリペプチドに組み込まれ、ここでの同一性は、付加されたQタグモチーフ及び存在する任意のリンカー配列を考慮することなく評価される。

【0130】

ある実施形態では、Qタグモチーフは、図4に示される配列（図4に示される全配列、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟ポリペプチドの配列のいずれか）と比較して1～15個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個）のアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化を有する配列に組み込まれる。変化は、Qタグモチーフ及び存在する任意のリンカー配列のアミノ酸を考慮することなく評価される。かかる一実施形態では、Qタグモチーフは、図4に示される配列等の成熟2M配列の、アミノ末端の15個（例えば、1～5、5～10、または10～15個）のアミノ酸のうちのいずれかを置き換えてもよく、及び/またはそれらの間に挿入されてもよい。

【0131】

代替として、T細胞MMPに現れるMHC-H鎖配列に現れるグルタミン残基のうちのいずれか1つ、2つ、または3つの周りの配列が、Qタグのそれと一致するように修飾され、エピトープまたはペイロードの付加用の化学コンジュゲーション部位として使用されてもよい。

【0132】

別の実施形態では、グルタミンまたはQタグは、第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位としてIgFc領域に組み込まれてもよい。かかる一実施形態では、それらは、例えば、エピトープ及び/またはペイロードの、直接、または一級アミンをもつペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0133】

I . A . 2 . 4 化学コンジュゲーション部位としてのセレノシステイン及び非天然アミノ酸

T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドにおいて部位特異的コンジュゲーション部位を提供するための1つの戦略は、当該ポリペプチドに存在する他のアミノ酸とは明確に異なる反応性を有するアミノ酸の挿入を採用する。かかるアミノ酸には、非天然アミノ酸であるアセチルフェニルアラニン（p-アセチル-L-フェニルアラニン、pAcPhe）、パラアジド（parazido）フェニルアラニン、及びプロピニル-チロシン、ならびに天然型アミノ酸であるセレノシステイン（Sec）が含まれるが、これらに限定されない。

【0134】

米国特許公開第20140051836 A1号においてThanosらは、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-セリン、L-ドパ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、及びp-プロパルギルオキシ-フェニルアラニンを含む、いくつかの他の非天然アミノ酸について考察している。他の非天然アミノ酸は、アミノ、カ

10

20

30

40

50

ルボキシ、アセチル、ヒドラジノ、ヒドラジド、セミカルバジド、スルファニル、アジド、及びアルキニルを含めた反応性基を含む。例えば、米国特許公開第20140046030 A1号を参照されたい。

【0135】

実験室でのポリペプチドの直接合成に加えて、転写 - 翻訳系を利用して非天然アミノ酸をタンパク質及びポリペプチドに組み込むための、終止コドンを利用する2つの方法が開発されてきた。第1の方法は、オパール終止コドンであるUGAをセレノシステイン (Sec) 挿入配列と対合することによってSecを組み込む。第2の方法は、全般的にアンバー、オーカー、またはオパール終止コドンの使用により非天然アミノ酸をポリペプチドに組み込む。固有のコドン、まれなコドン、非天然コドン、5塩基コドン、及び4塩基コドン等の、他の種類のコドンの使用、ならびにナンセンス及びフレームシフト抑制の使用もまた報告されてきた。例えば、米国特許公開第20140046030 A1号及びRodriguez et al., PNAS 103(23)8650-8655(2006)を参照されたい。例として、非天然アミノ酸アセチルフェニルアラニンが、インビボまたは無細胞転写 - 翻訳系においてtRNA / アミノアシルtRNAシンテターゼ対を用いて、アンバーコドンで組み込まれてもよい。

10

【0136】

セレノシステイン及び非天然アミノ酸の両方の組み込みは、必要な終止コドン (複数可) をT細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドの核酸コード配列に所望の箇所 (複数可) で導入操作することを必要とし、その後、当該コード配列を用いて、インビボまたは無細胞転写 - 翻訳系においてT細胞MMPの第1または第2のポリペプチド鎖を発現させる。

20

【0137】

インビボ系は全般的に、生体直交型の化学コンジュゲーション部位として作用する非天然アミノ酸をポリペプチド及びタンパク質に組み込むために操作された細胞株に依存する。例えば、「In vivo incorporation of unnatural amino acids」と題される、国際公開出願第2002/085923号を参照されたい。インビボでの非天然アミノ酸の組み込みは、宿主細胞における全ての内在性tRNA及びシンテターゼに直交型である、tRNAとアミノアシルtRNAシンテターゼ (aaRS) との対に依存する。選定の非天然アミノ酸は、細胞培養または発酵中に培地に補充されるため、細胞透過性及び安定性が重要な考慮事項となる。

30

【0138】

荷電tRNAが提供された種々の無細胞合成系もまた利用して、非天然アミノ酸を組み込んでもよい。かかる系には、米国公開特許出願第20160115487A1号、Gubens et al., RNA. 2010 Aug; 16(8):1660-1672、Kim, D. M. and Swartz, J. R. Biotechnol. Bioeng. 66:180-8(1999)、Kim, D. M. and Swartz, J. R. Biotechnol. Prog. 16:385-90(2000)、Kim, D. M. and Swartz, J. R. Biotechnol. Bioeng. 74:309-16(2001)、Swartz et al., Methods Mol. Biol. 267:169-82(2004)、Kim, D. M. and Swartz, J. R. Biotechnol. Bioeng. 85:122-29(2004)、Jewett, M. C. and Swartz, J. R., Biotechnol. Bioeng. 86:19-26(2004)、Yin, G. and Swartz, J. R., Biotechnol. Bioeng. 86:188-95(2004)、Jewett, M. C. and Swartz, J. R., Biotechnol. Bioeng. 87:465-72(2004)、Voloshin, A. M. and Swartz, J. R., Biotechnol. Bioeng. 91:516-21(2005)に記載されるものが含まれる。

40

【0139】

50

ひとたび T 細胞 M M P の第 1 または第 2 のポリペプチドに組み込まれると、組み込まれたセレノシステインまたは非天然アミノ酸と反応性の基をもつエピトープ及び / またはペイロードが、好適な条件下で T 細胞 M M P に接触させられて、共有結合を形成する。例として、p A c P h e のケト基は、オキシムカップリングを介して、アルコキシ - アミンに対して反応性であり、アルコシアミン含有エピトープ及び / またはペイロードに直接、またはアルコシアミン含有リンカーを介してエピトープ及びペイロードに間接的にコンジュゲートされ得る。セレノシステインは、例えば、一級ヨウ化アルキル（例えば、リンカーとして使用され得るヨードアセトアミド）、マレイミド、及びメチルスルホンフェニルオキサジアゾール基と反応する。したがって、これらの基をもつ、またはこれらの基をもつリンカーに結合されたエピトープ及び / またはペイロードが、セレノシステインをもつポリペプチド鎖に共有結合され得る。

10

【 0 1 4 0 】

他の第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位及び第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位に関して上記で考察されたように、セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸は、T 細胞 M M P の第 1 または第 2 のポリペプチド上の任意の所望の箇所に組み込まれてもよい。ある実施形態では、セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸は、第 1 及び第 2 の M H C ポリペプチド（例えば、M H C - H 及び 2 M ポリペプチド）、足場または I g F c、ならびにこれらの要素に隣接するリンカーを含めた、T 細胞 M M P の第 1 または第 2 のポリペプチドにおける任意の要素の末端またはその付近で付加されてもよい。複数の実施形態では、セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸は、2 M、M H C クラス I 重鎖、及び / または F c I g ポリペプチドに組み込まれてもよい。ある実施形態では、セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸は、第 1 の M H C ポリペプチド（例えば、2 M ポリペプチド）のアミノ末端またはそれに結合したリンカーの付近またはその箇所で、第 1 のポリペプチドに組み込まれてもよい。例えば、第 1 のポリペプチドが 2 M 配列を含む場合、セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸を 2 M 配列の N 末端またはその付近で組み込んで、例えば、直接またはリンカーを通してのいずれかでのエピトープの化学コンジュゲーションを可能にしてもよい。例として、図 4 に示されるような 2 M の配列は、20 アミノ酸のリーダー配列から始まり、成熟ポリペプチドは、最初の配列 I Q R T P (K / Q) I Q V Y S から始まり、当該ポリペプチドの残りの部分にわたって継続する。セレノシステイン及び / または非天然アミノ酸（「」により表される）は、例えば、下記のように、

20

30

I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . , - リンカー - I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . ,

- リンカー - Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . , もしくは - リンカー - R T P (K / Q) I Q V Y S . . . ,

またはヒトリーダー配列 M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (2 M 配列については配列番号 1 5 1 ~ 1 5 5 及び図 4 を参照されたい) と共に下記に示されるように、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . ,

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - - リンカー - I Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . ,

40

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - - リンカー - Q R T P (K / Q) I Q V Y S . . . , もしくは

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - - リンカー - R T P (K / Q) I Q V Y S . . . ,

その中に導入されてもよく、ここで、存在する場合、リンカーは、独立して選択されるアミノ酸配列（例えば、A A A G G (配列番号 7 5) または (G G G G S) _n (ここで、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である) (配列番号 7 6) 等の、ポリグリシン、ポリアラニン、ポリセリン、及びポリ - G l y 等の 1 ~ 50 個のアミノ酸)、または化学基（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール等）を含ん

50

でもよい。リンカーは、存在しても、または不在であってもよく、2つのリンカーが示される場合、それら同じであっても、または異なってもよい。

【0141】

ある実施形態では、セレノシステイン及び/または非天然アミノ酸は、図4に示される2M配列(例えば、図4に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟2Mポリペプチドのうちのいずれかの配列)に対して少なくとも85%(例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%)のアミノ酸配列同一性を有する2M配列を含むポリペプチドに組み込まれ、ここでの配列同一性は、付加されたセレノシステイン及び/または非天然アミノ酸ならびに存在する任意のリンカー配列を考慮することなく評価される。

10

【0142】

ある実施形態では、セレノシステイン及び/または非天然アミノ酸は、図4に示される2M配列(例えば、図4に示される完全長配列のうちのいずれか、またはアミノ酸21で開始し、それらのC末端で終わる成熟2Mポリペプチドのうちのいずれかの配列)と比較して1~15個(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個)のアミノ酸の欠失、挿入、及び/または変化を有する2M配列を含むポリペプチドに組み込まれる。変化は、セレノシステイン及び/または非天然アミノ酸ならびに存在する任意のリンカー配列のアミノ酸を考慮することなく評価される。かかる一実施形態では、セレノシステイン及び/または非天然アミノ酸は、図4に示される配列等の成熟2M配列の、アミノ末端の15個のアミノ酸のうちのいずれかを置き換えてもよく、及び/またはそれらの間に挿入されてもよい。

20

【0143】

他の実施形態では、セレノシステイン及び/または非天然アミノ酸は、化学コンジュゲーション部位として、MHC-H鎖またはIgFcポリペプチド配列(それに結合したリンカーを含む)を含むポリペプチドに組み込まれてもよい。かかる一実施形態では、それらは、例えば、T細胞MMPにコンジュゲートされるエピトープ及び/またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の部位として利用されてもよい。

【0144】

I. A. 2. 5 操作されたアミノ酸の化学コンジュゲーション部位

30

天然型アミノ酸の側鎖に、またはポリペプチドの末端に存在する様々な官能基(例えば、-SH、-NH₃、-OH、-COOH等)のうちのいずれも、化学コンジュゲーション部位として使用され得る。これには、それぞれN-ヒドロキシスクシンイミド官能基及びマレイミド官能基を含む試薬によって容易に修飾可能である、リジン及びシステインの側鎖が含まれる。かかるアミノ酸残基を利用することの主な不利点は、生成物の可変性及び不均一性の可能性である。例えば、IgGは、80個を超えるリジンを有し、このうち20個超が、溶媒が接近可能な部位にある。例えば、McComb and Owen, AAPS J. 117(2): 339-351を参照されたい。システインは、それよりは広範に分布していない傾向にある。それらは、ジスルフィド結合に関与する傾向にあり、接近不可能で、化学コンジュゲーション部位を配置することが望ましい場所に位置していない場合がある。したがって、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドの選択的修飾のために、所望の箇所で非天然型アミノ酸を組み込むように第1及び/または第2のポリペプチドを操作することが可能である。操作は、ポリペプチドの直接化学合成の形態をとってもよく(例えば、適切にブロッキングしたアミノ酸のカップリングによって)、及び/またはポリペプチドをコードする核酸の配列を修飾し、それを細胞もしくは無細胞系において発現させることによるものでもよい。したがって、本明細書は、転写/翻訳、ならびに第1及び/または第2のポリペプチドの翻訳された部分のC末端またはN末端に、化学コンジュゲーション部位(例えば、エピトープまたはペプチドのための)として使用する対象となる非天然または天然(セレノシステインを含む)アミノ酸をもつ操作されたポリペプチドを繋ぐことによる、T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペ

40

50

プチドの全てまたは一部の調製を含み、かつそれらを実現する。操作されたペプチドは、上記でエピトープペプチドに関して記載されるようなソルターゼの使用を含めた、任意の好適な方法によって繋がれてもよく、リンカーペプチド配列を含んでもよい。ある実施形態では、操作されたペプチドは、ソルターゼコンジュゲーションに役立ち得る、及び/またはリンカー配列の一部としての役割を果たし得る、2、3、4、または5つのアラニンまたはグリシンからなる配列を含んでもよい。

【0145】

一実施形態では、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドは、図4に示されるような2M配列、図2に示されるようなIgFc配列、または図3に示されるようなMHCクラスI重鎖ポリペプチドに導入操作された、化学コンジュゲーション部位として使用する対象となる少なくとも1つの天然型アミノ酸を含有する。ある実施形態では、化学コンジュゲーション部位として使用する対象となる少なくとも1つの天然型アミノ酸は、図4に示されるような2M配列、図2に示されるようなIgFc配列、または図3に示されるようなMHCクラスI重鎖ポリペプチドに対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに導入操作される。ある実施形態では、化学コンジュゲーション部位として使用する対象となる少なくとも1つの天然型アミノ酸は、図4に示されるような成熟2M配列、図2に示されるようなIgFc配列、または図3に示されるようなMHCクラスI重鎖ポリペプチドの少なくともアミノ末端の10、20、30、40、50、60、または70個のアミノ酸との、少なくとも90%（例えば、少なくとも93%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する2Mアミノ酸配列を含む、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドに導入操作される。別の実施形態では、化学コンジュゲーション部位として使用する対象となる少なくとも1つの天然型アミノ酸は、図4に示されるような2M配列、図2に示されるようなIgFc配列、または図3に示されるようなMHCクラスI重鎖配列に対して100%のアミノ酸配列同一性を有する、少なくとも30、40、50、60、70、80、90、または100アミノ酸の連続配列を含むポリペプチドに導入操作される。天然型アミノ酸がポリペプチドに導入操作される、上記で言及した実施形態のうちのいずれかにおいて、アミノ酸は、アルギニン、リジン、システイン、セリン、トレオニン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、及びアスパラギンからなる群から選択されてもよい。別のかかる実施形態では、アミノ酸は、リジン、システイン、セリン、トレオニン、及びグルタミンからなる群から選択される。別のかかる実施形態では、アミノ酸は、リジン、グルタミン、及びシステインからなる群から選択される。ある実施形態では、アミノ酸は、システインである。ある実施形態では、アミノ酸は、リジンであり、別の実施形態では、アミノ酸は、グルタミンである。

【0146】

当業者に既知の任意の方法を用いて、ペイロードまたはエピトープを、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドに導入操作されたアミノ酸にカップリングしてもよい。例として、マレイミドを利用して、スルフヒドリルにカップリングしてもよく、N-ヒドロキシスクシンイミドを利用して、アミン基にカップリングしてもよく、酸無水物または塩化物を用いて、アルコールまたはアミンにカップリングしてもよく、脱水剤を用いて、アルコールまたはアミンをカルボン酸基カップリングしてもよい。したがって、かかる化学反応を用いることで、エピトープまたはペイロードが、第1及び/または第2のポリペプチド上の箇所に直接、またはリンカー（例えば、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性クロスリンカー）を通して間接的にカップリングされ得る。例として、マレイミドアミノ酸を含むエピトープペプチド（またはペプチド含有ペイロード）は、天然型であるまたはT細胞MMPに導入操作された化学コンジュゲーション部位（例えば、システイン残基）のスルフヒドリルにコンジュゲートすることができる。ディールス・アルダー/レトロディールス・アルダー保護スキームを用いることで、固相ペプチド合成技法を用いてマレイミドアミノ酸をペプチド（例えば、エピトープペプチド）に直接組み込むことが可能である。

例えば、Koehler, Kenneth Christopher (2012), "Development and Implementation of Clickable Amino Acids," Chemical & Biological Engineering Graduate Theses & Dissertations, 31、https://scholar.colorado.edu/chbe_gradetds/31を参照されたい。したがって、一実施形態では、エピトープペプチドは、T細胞MMPの結合ポケットに存在するシステインにカップリングされるマレイミドアミノ酸を含む。マレイミドはまた、マレイミドをペプチドに結合させるクロスリンカー（例えば、マレイミドを、例えばペプチドリジン上のアミン基に結合させることができる、ヘテロ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミド-マレイミドクロスリンカー）を用いて、エピトープペプチドに付加されてもよい。ある実施形態では、少なくとも1つ（例えば、1つまたは2つ）のマレイミドアミノ酸を有するエピトープペプチドが、5位、7位、59位、84位、116位、139位、167位、168位、170位、及び/または171位から選択される任意の1つまたは複数（例えば、1つまたは2つ）のアミノ酸位置でシステイン残基（例えば、Y7C、Y59C、Y84C、Y116C、A139C、W167C、L168C、R170C、及びY171C置換）を有するMHC重鎖にコンジュゲートされ、ここでの番号付けは、図3Dにある通りである。ある実施形態では、少なくとも1つ（例えば、1つまたは2つ）のマレイミドアミノ酸を有するエピトープペプチドが、7位、84位、及び/または116位から選択される任意の1つまたは複数（例えば、1つまたは2つ）のアミノ酸位置でシステイン残基（例えば、Y7C、Y84C、及びY116C置換）を有するMHC重鎖にコンジュゲートされ、ここでの番号付けは、図3Dにある通りである。ある実施形態では、少なくとも1つ（例えば、1つまたは2つ）のマレイミドアミノ酸を有するエピトープペプチドが、84位及び/または116位から選択される任意の1つまたは複数（例えば、1つまたは2つ）のアミノ酸位置でシステイン残基（例えば、Y84C及び/またはY116C置換）を有するMHC重鎖にコンジュゲートされ、ここでの番号付けは、図3Dにある通りである。

【0147】

T細胞MMPに化学コンジュゲートを作り出すために、一对のスルフヒドリル基が同時に採用されてもよい。かかる実施形態では、ジスルフィド結合を有する、または互いに近接する箇所に導入操作された2つのシステイン（またはセレノシステイン）を有するT細胞MMPが、ビス-チオールリンカーの使用を通じた化学コンジュゲーション部位として利用されてもよい。Godwinと共同研究者によって記載される、ビス-チオールリンカーは、その場所で架橋基を形成することによってジスルフィド結合の還元に関連する不安定性を回避すると同時に、別の分子（これはエピトープまたはペイロードであり得る）の組み込みを可能にする。例えば、Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugatesと題される、Badescu G, et al., (2014), Bioconjug Chem., 25(6): 1124-36を参照されたく、これは親水性リンカー（例えば、PEG（ポリエチレングリコール）リンカー）を組み込む、ビス-スルホン試薬の使用について記載している。

【0148】

T細胞MMPがジスルフィド結合を含む場合、ビス-チオールリンカーを用いて、全般的に化学量論量またはほぼ化学量論量のジチオール還元剤（例えば、ジチオスレイトール）によりこの結合を還元し、リンカーが両方のシステイン残基と反応することを可能にすることによって、エピトープまたはペイロードを組み込んでもよい。複数のジスルフィド結合が存在する場合、化学量論量またはほぼ化学量論量の還元剤の使用が、1つの部位での選択的修飾を可能にし得る。例えば、Brocchini, et al., Adv. Drug Delivery Rev. (2008) 60: 3-12を参照されたい。T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチドが一对のシステイン及び/またはセレノシステイン（例えば、1つのセレノシステインと1つのシステイン）を含まない場合、そ

れらをポリペプチドに導入操作して（システインまたはセレノシステインの一方または両方を導入することによって）、ビス-チオールリンカーと相互作用し得る一対の残基を提供してもよい。システイン及び／またはセレノシステインは、ビス-チオールリンカーがそれらを架橋できるような位置に置かれるべきである（例えば、2つのシステインがジスルフィド結合を形成可能な箇所）。システイン及びセレノシステインの任意の組み合わせが採用され得る（すなわち、2つのシステイン、2つのセレノシステイン、または1つのセレノシステインと1つのシステイン）。システイン及び／またはセレノシステインが両方とも、T細胞MMPの第1及び／または第2のポリペプチド上に存在してもよい。代替として、システイン及び／またはセレノシステインは、第1のポリペプチド上に存在してもよく、ビス-チオールリンカー反応におけるそれらの相対物が、T細胞MMPの第2のポリペプチド上に存在してもよい。

10

【0149】

ある実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインが、一対のシステイン及び／またはセレノシステインの付加前に図4に示される配列に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する2M配列を含む、T細胞MMPの第1または第2のポリペプチドに、またはこれらの配列のうちの1つに結合したペプチドリリンカーに組み込まれる。かかる一実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインは、例えば、エピトープ及び／またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の、ビス-チオールリンカーのカップリング部位として利用されてもよい。一実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインは、T細胞MMPの第1のポリペプチドのアミノ末端から10、20、30、40、または50アミノ酸以内に位置する。

20

【0150】

別の実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインが、第2のポリペプチドに組み込まれたIgFc配列に組み込まれて、化学コンジュゲーション部位を提供する。ある実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインが、一対のシステインまたはセレノシステインの付加前に図2に示される配列に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有するIgFc配列を含むポリペプチドに、またはこれらの配列のうちの1つに結合したペプチドリリンカーに組み込まれる。かかる一実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインは、例えば、エピトープ及び／またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の、ビス-チオールリンカーのカップリング部位として利用されてもよい。

30

【0151】

別の実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインが、化学コンジュゲーション部位として、MHCクラスI重鎖ポリペプチド配列を含むポリペプチドに組み込まれる。ある実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインが、一対のシステインまたはセレノシステインの付加前に図3に示される配列に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する配列を含むポリペプチドに、またはこれらの配列のうちの1つに結合したペプチドリリンカーに組み込まれる。かかる一実施形態では、一対のシステイン及び／またはセレノシステインは、例えば、エピトープ及び／またはペイロードの、直接、またはペプチドもしくは化学リンカーを通して間接的のいずれかでのコンジュゲーション用の、ビス-チオールリンカーのカップリング部位として利用されてもよい。

40

【0152】

T細胞MMPに化学コンジュゲートを作り出すために、一対のスルフィドリル基が同時に採用されてもよい。かかる実施形態では、ジスルフィド結合を有する、または互いに近

50

接する箇所に導入操作された２つのシステイン（またはセレノシステイン）を有するＴ細胞ＭＭＰが、ビス－チオールリンカーの使用を通じた化学コンジュゲーション部位として利用されてもよい。

【０１５３】

I . A . 2 . 6 他化学コンジュゲーション部位

炭水化物の化学コンジュゲーション部位

細胞発現によって調製される多くのタンパク質は、付加された炭水化物（例えば、哺乳類細胞において発現される抗体に付加される種類のオリゴ糖）を含有する。したがって、Ｔ細胞ＭＭＰの第１及び／または第２のポリペプチドが細胞発現によって調製される場合、炭水化物が存在し、グリコール－コンジュゲーション反応において部位選択的化學コンジュゲーション部位として利用可能であってもよい。McCombs and Owen, AAPS Journal, (2015) 17(2): 339-351、及びその中で引用される参考文献は、抗体への分子のグリコール－コンジュゲーションのための炭水化物残基の使用について記載している。

10

【０１５４】

炭水化物残基の付加及び修飾は、炭水化物を改変する化学物質（例えば、アルデヒド基を導入する、過ヨウ素酸塩）の使用を通して、または化学コンジュゲーション部位として使用するための化学反応性の炭水化物もしくは炭水化物類似体を組み込むことができる酵素（例えば、フコシルトランスフェラーゼ）の作用によって、エクスピボで実施されてもよい。

20

【０１５５】

ある実施形態では、既知のグリコシル化部位を有するIgFc足場の組み込みを用いて、部位特異的化學コンジュゲーション部位を導入してもよい。

【０１５６】

本開示は、化學コンジュゲーション（グリコール－コンジュゲーション）部位として炭水化物を有するＴ細胞ＭＭＰ及びそれらのエピトープコンジュゲートを含み、かつそれらを実現する。本開示はまた、エピトープとの、ならびに薬物及び診断剤等の他の分子とのコンジュゲートを形成する際のかかる分子の使用、ならびに医療処置方法及び医療診断方法におけるこれらの分子の使用も含み、かつそれらを実現する。

30

【０１５７】

ヌクレオチド結合部位

ヌクレオチド結合部位は、結合部位に共有結合性で連結し得る紫外線反応性部分の使用を通して、部位特異的官能化を提示する。Bilgicer et al., Bioconjug Chem, 2014; 25(7): 1198-202は、ヌクレオチド結合部位でIgGに共有結合性で連結され得るインドール－３－酪酸（IBA）部分の使用について報告した。ヌクレオチド結合部位を形成するのに必要とされる配列の組み込みによって、反応性ヌクレオチドをもつ好適に修飾されたエピトープ及び／または他の分子（例えば、薬物または診断剤）とのＴ細胞ＭＭＰの化學コンジュゲートが、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートを調製するために採用されてもよい。

40

【０１５８】

本開示は、化學コンジュゲーション部位としてヌクレオチド結合部位を有するＴ細胞ＭＭＰを含み、かつそれを実現する。本開示はまた、エピトープとの、ならびに薬物及び診断剤等の他の分子とのコンジュゲートを形成する際のかかる分子の使用、ならびに処置方法及び診断方法におけるこれらの分子の使用も含み、かつそれらを実現する。

【０１５９】

I . A . 2 . 7 Ｔ細胞ＭＭＰ、エピトープ、及びMODの結合及び特性

本開示は、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートを提供する。一実施形態では、本開示は、a) 第１のポリペプチドと、b) 第２のポリペプチドとを含む、Ｔ細胞ＭＭＰエピトープコンジュゲートを提供し、該多量体ポリペプチドの第１及び第２のポリペプチドは、エピトープ、第１のMHCポリペプチド、第２のMHCポリペプチド、及び任意選択

50

で免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチドまたは非 I g 足場を含む。別の実施形態では、本開示はまた、 a) N 末端から C 末端の順に、 i) エピトープ、 i i) 第 1 の M H C ポリペプチドを含む、第 1 のポリペプチドと、 b) N 末端から C 末端の順に、 i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び i i) 任意選択で I g F c ポリペプチドまたは非 I g 足場を含む、第 2 のポリペプチドとを含む、 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートも提供する。上記に列挙した構成要素に加えて、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの第 1 及び第 2 のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、 1 つまたは複数 (例えば、少なくとも 1 つ) の M O D を含む。 1 つまたは複数の M O D は、 A) 第 1 のポリペプチドの C 末端、 B) 第 2 のポリペプチドの N 末端、 C) 第 2 のポリペプチドの C 末端、及び / または D) 第 1 のポリペプチドの C 末端及び第 2 のポリペプチドの N 末端に位置する。ある実施形態では、 1 つまたは複数の M O D のうちの少なくとも 1 つ (例えば、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つ) は、同種 M O D に対して、対応する野生型 M O D の同種 M O D に対する親和性と比較して低減された親和性を呈するバリエーション M O D である。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 0 】

ある実施形態では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープは、少なくとも $100 \mu\text{M}$ (例えば、少なくとも $10 \mu\text{M}$ 、少なくとも $1 \mu\text{M}$ 、少なくとも 100nM 、少なくとも 10nM 、または少なくとも 1nM) の親和性で、 T 細胞上の T 細胞受容体 (T C R) に結合する。ある実施形態では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートは、該 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが第 2 の T 細胞に結合する親和性よりも少なくとも 25 % 高い親和性で、第 1 の T 細胞に結合し、ここで、第 1 の T 細胞は、その表面上に同種 M O D、及び少なくとも $100 \mu\text{M}$ の親和性で該エピトープに結合する T C R を発現し、第 2 の T 細胞は、その表面上に同種 M O D を発現するが、その表面上に、少なくとも $100 \mu\text{M}$ (例えば、少なくとも $10 \mu\text{M}$ 、少なくとも $1 \mu\text{M}$ 、少なくとも 100nM 、少なくとも 10nM 、または少なくとも 1nM) の親和性で該エピトープに結合する T C R は発現しない。

【 0 1 6 1 】

一部の事例では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープは、約 10^{-4}M ~ 約 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、約 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ~ 約 10^{-5}M 、約 10^{-5}M ~ 約 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、約 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ~ 約 10^{-6}M 、約 10^{-6}M ~ 約 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、約 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ ~ 約 10^{-7}M 、約 10^{-7}M ~ 約 10^{-8}M 、または約 10^{-8}M ~ 約 10^{-9}M の親和性で、 T 細胞上の T C R に結合する。別の表現をすれば、一部の事例では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープは、約 $0.1 \mu\text{M}$ ~ 約 $0.5 \mu\text{M}$ 、約 $0.5 \mu\text{M}$ ~ 約 $1 \mu\text{M}$ 、約 $1 \mu\text{M}$ ~ 約 $5 \mu\text{M}$ 、約 $5 \mu\text{M}$ ~ 約 $10 \mu\text{M}$ 、約 $10 \mu\text{M}$ ~ 約 $25 \mu\text{M}$ 、約 $25 \mu\text{M}$ ~ 約 $50 \mu\text{M}$ 、約 $50 \mu\text{M}$ ~ 約 $75 \mu\text{M}$ 、または約 $75 \mu\text{M}$ ~ 約 $100 \mu\text{M}$ の親和性で、 T 細胞上の T C R に結合する。

【 0 1 6 2 】

ある実施形態では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するバリエーション M O D は、対応する野生型 M O D の同種 M O D に対する親和性よりも少なくとも 10 % 低い、少なくとも 15 % 低い、少なくとも 20 % 低い、少なくとも 25 % 低い、少なくとも 30 % 低い、少なくとも 35 % 低い、少なくとも 40 % 低い、少なくとも 45 % 低い、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い親和性で、その同種 M O D に結合する。

【 0 1 6 3 】

一部の事例では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するバリエーション M O D は、同種 M O D に対して、 1nM ~ 100nM 、または 100nM ~ $100 \mu\text{M}$ である結合親和性を有する。例えば、一部の事例では、本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在するバリエーション M O D は、同種 M O D に対して、約 1nM ~ 約 5nM 、約 5nM ~ 約 10nM 、約 10nM ~ 約 50nM 、約 50nM ~ 約 100nM 、

約 100 nM ~ 約 150 nM、約 150 nM ~ 約 200 nM、約 200 nM ~ 約 250 nM、約 250 nM ~ 約 300 nM、約 300 nM ~ 約 350 nM、約 350 nM ~ 約 400 nM、約 400 nM ~ 約 500 nM、約 500 nM ~ 約 600 nM、約 600 nM ~ 約 700 nM、約 700 nM ~ 約 800 nM、約 800 nM ~ 約 900 nM、約 900 nM ~ 約 1 μ M、約 1 μ M ~ 約 5 μ M、約 5 μ M ~ 約 10 μ M、約 10 μ M ~ 約 15 μ M、約 15 μ M ~ 約 20 μ M、約 20 μ M ~ 約 25 μ M、約 25 μ M ~ 約 50 μ M、約 50 μ M ~ 約 75 μ M、または約 75 μ M ~ 約 100 μ M である結合親和性を有する。一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP に存在するバリエーション MOD は、同種 MOD に対して、約 1 nM ~ 約 5 nM、約 5 nM ~ 約 10 nM、約 10 nM ~ 約 50 nM、約 50 nM ~ 約 100 nM である結合親和性を有する。

10

【0164】

MOD のその同種 MOD に対して低減された親和性と、エピトープの TCR に対する親和性との組み合わせは、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの向上された選択性を実現しながらも、依然として MOD の活性を可能にする。例えば、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープ以外のエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD、を発現する第 2 の T 細胞への結合と比較して、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD、の両方を発現する第 1 の T 細胞に選択的に結合する。例えば、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、それが第 2 の T 細胞に結合する親和性よりも少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 200% (2 倍)、少なくとも 250% (2.5 倍)、少なくとも 500% (5 倍)、少なくとも 1,000% (10 倍)、少なくとも 1,500% (15 倍)、少なくとも 2,000% (20 倍)、少なくとも 2,500% (25 倍)、少なくとも 5,000% (50 倍)、少なくとも 10,000% (100 倍)、または 100 倍超高い親和性で、第 1 の T 細胞に結合する。

20

【0165】

一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートは、それを必要とする個体に投与されたとき、エピトープ特異的 T 細胞の応答及びエピトープ非特異的 T 細胞の応答の両方を誘導する。本開示の T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートは、それを必要とする個体に投与されたとき、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD、の両方を発現する第 1 の T 細胞の活性を調節することによって、エピトープ特異的 T 細胞の応答を誘導する。T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートはまた、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープ以外のエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD を発現する第 2 の T 細胞の活性を調節することによって、エピトープ非特異的 T 細胞の応答も誘導する。エピトープ特異的 T 細胞の応答対エピトープ非特異的 T 細胞の応答の比は、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、または少なくとも 100 : 1 である。エピトープ特異的 T 細胞の応答対エピトープ非特異的 T 細胞の応答の範囲は、約 2 : 1 ~ 約 5 : 1、約 5 : 1 ~ 約 10 : 1、約 10 : 1 ~ 約 15 : 1、約 15 : 1 ~ 約 20 : 1、約 20 : 1 ~ 約 25 : 1、約 25 : 1 ~ 約 50 : 1、約 50 : 1 ~ 約 100 : 1、または 100 : 1 超である。T 細胞の「活性を調節すること」には、i) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞を活性化させること、ii) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞の細胞傷害活性を誘導すること、iii) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞による細胞毒素 (例えば、パーフォリン、

30

40

50

【 0 1 6 6 】

10

I . A . 2 . 8 結合親和性の決定

20

30

40

50

ド(「標的」)から、及び*i i*)内部参照層から、の2つの表面から反射された白色光の干渉パターンを分析する。バイオセンサチップに結合させた分子(「分析物」、例えば、同種MOD、抗HLA抗体)の数の変化が、干渉パターンにシフトを引き起こし、この干渉パターンのシフトをリアルタイムで測定することができる。標的/分析物間相互作用の親和性を記述する2つの運動項は、会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)である。これらの2つの項の比(k_d/k_a)が親和性定数 K_D をもたらす。このアッセイはまた、精製した野生型MODまたはそのバリエーションMODをバイオセンサ上に固定化して実施することもでき、その間、同種MODをいくつかの異なる濃度で適用して、MODとその同種MODとの間の結合パラメータを決定する。

【0169】

故に、同種MOD(例えば、IL-2R)の、野生型MOD(例えば、IL-2)及びバリエーションMOD(例えば、本明細書に開示されるようなIL-2バリエーション)の両方との、または野生型もしくはバリエーションMODを含有するT細胞MMP(またはそのエピトープコンジュゲート)との結合親和性を決定することにより、野生型分子及びバリエーション分子の相対的結合親和性を決定することが可能となる。つまり、バリエーションMODのその受容体(その同種MOD)に対する結合親和性が、野生型MODの同じ同種MODに対する結合親和性と比べて低減されるかどうか、及び、そうであれば、野生型の同種MODの結合親和性からの低減パーセンテージを決定することができる。

【0170】

BLIアッセイは、マルチウェルプレートで実行される。アッセイを実行するには、プレートのレイアウトを定め、アッセイステップを定め、バイオセンサをOctet Data Acquisitionソフトウェアに割り当てる。バイオセンサアセンブリを含水させる。含水させたバイオセンサアセンブリ及びアッセイプレートをOctet機器で10分間平衡化する。ひとたびデータを取得すると、取得したデータをOctet Data Analysisソフトウェアにロードする。データをProcessingウィンドウで、参照減算、y軸合わせ、段階間補正、及びSavitzky-Golayフィルタリングのための方法を指定することにより処理する。データをAnalysisウィンドウで、分析するためのステップ(会合及び解離)を指定し、曲線当てはめモデル(1:1)、当てはめ法(グローバル)、及び目的とするウィンドウ(秒単位)を選択することにより分析する。当てはめの質(quality of fit)を評価する。各データトレース(分析物濃度)についての K_D 値は、3倍範囲内にある場合、平均化することができる。 K_D エラー値は、親和性定数値の1桁以内にあるべきである。 R^2 値は、0.95を上回るべきである。例えば、Abdiche et al. (2008), J. Anal. Biochem., 377:209を参照されたい。

【0171】

本明細書で別途定めのない限り、本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの同種MODに対する親和性、または対照T細胞MMP-エピトープコンジュゲート(ここで、対照T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、野生型MODを含む)の同種MODに対する親和性は、上述のようにBLIを用いて決定される。同様に、MOD及びその同種MODポリペプチドの親和性は、上述のようにBLIを用いて決定することができる。

【0172】

一部の事例では、BLI(上述の通り)によって測定したときの、*i*)対照T細胞MMP-エピトープコンジュゲート(ここで、対照は、野生型MODを含む)の同種MODに対する結合親和性対、*i i*)野生型MODのバリエーションを含む本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの同種MODに対する結合親和性の比は、少なくとも1.5:1、少なくとも2:1、少なくとも5:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも50:1、少なくとも100:1、少なくとも500:1、少なくとも 10^2 :1、少なくとも 5×10^2 :1、少なくとも 10^3 :1、少なくとも 5×10^3 :1、少なくとも 10^4 :1、少なくとも 10^5 :1

、または少なくとも $10^6 : 1$ である。一部の事例では、B L I によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート（ここで、対照は、野生型 M O D を含む）の同種 M O D に対する結合親和性対、i i) 野生型 M O D のバリエーションを含む本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの同種 M O D に対する結合親和性の比は、 $1.5 : 1 \sim 10^6 : 1$ 、例えば、 $1.5 : 1 \sim 10 : 1$ 、 $10 : 1 \sim 50 : 1$ 、 $50 : 1 \sim 10^2 : 1$ 、 $10^2 : 1 \sim 10^3 : 1$ 、 $10^3 : 1 \sim 10^4 : 1$ 、 $10^4 : 1 \sim 10^5 : 1$ 、または $10^5 : 1 \sim 10^6 : 1$ の範囲内にある。

【0173】

例として、対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが野生型 I L - 2 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが M O D としてバリエーション I L - 2 ポリペプチド（野生型 I L - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて $1 \sim 10$ 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、B L I によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの I L - 2 受容体（すなわち、同種 M O D）に対する結合親和性対、i i) 本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの I L - 2 受容体（すなわち、同種 M O D）に対する結合親和性の比は、少なくとも $1.5 : 1$ 、少なくとも $2 : 1$ 、少なくとも $5 : 1$ 、少なくとも $10 : 1$ 、少なくとも $15 : 1$ 、少なくとも $20 : 1$ 、少なくとも $25 : 1$ 、少なくとも $50 : 1$ 、少なくとも $100 : 1$ 、少なくとも $500 : 1$ 、少なくとも $10^2 : 1$ 、少なくとも $5 \times 10^2 : 1$ 、少なくとも $10^3 : 1$ 、少なくとも $5 \times 10^3 : 1$ 、少なくとも $10^4 : 1$ 、少なくとも $10^5 : 1$ 、または少なくとも $10^6 : 1$ である。一部の事例では、対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが野生型 I L - 2 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが M O D としてバリエーション I L - 2 ポリペプチド（野生型 I L - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて $1 \sim 10$ 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、B L I によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの I L - 2 受容体（すなわち、同種 M O D）に対する結合親和性対、i i) 本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの I L - 2 受容体に対する結合親和性の比は、 $1.5 : 1 \sim 10^6 : 1$ 、例えば、 $1.5 : 1 \sim 10 : 1$ 、 $10 : 1 \sim 50 : 1$ 、 $50 : 1 \sim 10^2 : 1$ 、 $10^2 : 1 \sim 10^3 : 1$ 、 $10^3 : 1 \sim 10^4 : 1$ 、 $10^4 : 1 \sim 10^5 : 1$ 、または $10^5 : 1 \sim 10^6 : 1$ の範囲内にある。

【0174】

別の例として、対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが野生型 P D - L 1 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが M O D としてバリエーション P D - L 1 ポリペプチド（野生型 P D - L 1 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて $1 \sim 10$ 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、B L I によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの P D - 1 ポリペプチド（すなわち、同種 M O D）に対する結合親和性対、i i) 本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの P D - 1 ポリペプチドに対する結合親和性の比は、少なくとも $1.5 : 1$ 、少なくとも $2 : 1$ 、少なくとも $5 : 1$ 、少なくとも $10 : 1$ 、少なくとも $15 : 1$ 、少なくとも $20 : 1$ 、少なくとも $25 : 1$ 、少なくとも $50 : 1$ 、少なくとも $100 : 1$ 、少なくとも $500 : 1$ 、少なくとも $10^2 : 1$ 、少なくとも $5 \times 10^2 : 1$ 、少なくとも $10^3 : 1$ 、少なくとも $5 \times 10^3 : 1$ 、少なくとも $10^4 : 1$ 、少なくとも $10^5 : 1$ 、または少なくとも $10^6 : 1$ である。

【0175】

別の例として、対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが野生型 C D 8 0 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートが M O D としてバリエーション C D 8 0 ポリペプチド（野生型 C D 8 0 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて $1 \sim 10$ 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、B L I によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの C T L A 4 ポリペプチド（すなわち、同種 M O D）に対する結合親和性対、i i) 本開示の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの C T L A 4 ポリペプチドに対する結合親和性の比は、少なくとも $1.5 : 1$ 、少なくと

10

20

30

40

50

も 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である。

【0176】

別の例として、対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが野生型 CD80 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが MOD としてバリエーション CD80 ポリペプチド（野生型 CD80 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて 1 ~ 10 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、BLI によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの CD28 ポリペプチド（すなわち、同種 MOD）に対する結合親和性対、ii) 本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの CD28 ポリペプチドに対する結合親和性の比は、少なくとも 1.5 : 1、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である。

【0177】

別の例として、対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが野生型 4-1BB ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが MOD としてバリエーション 4-1BB ポリペプチド（野生型 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて 1 ~ 10 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、BLI によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの 4-1BB ポリペプチド（すなわち、同種 MOD）に対する結合親和性対、ii) 本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの 4-1BB ポリペプチドに対する結合親和性の比は、少なくとも 1.5 : 1、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である。

【0178】

別の例として、対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが野生型 CD86 ポリペプチドを含み、かつ本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが MOD としてバリエーション CD86 ポリペプチド（野生型 CD86 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて 1 ~ 10 個のアミノ酸置換を含む）を含む場合、BLI によって測定したときの、i) 対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの CD28 ポリペプチド（すなわち、同種 MOD）に対する結合親和性対、ii) 本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの CD28 ポリペプチドに対する結合親和性の比は、少なくとも 1.5 : 1、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である。

【0179】

本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの標的 T 細胞に対する結合親和性は、以下の状態で測定することができる。A) 本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを、その表面上に、i) 野生型親 MOD に結合する同種 MOD、及び ii) 該エピトープに結合する TCR、を発現する標的 T 細胞に接触させて（ここで、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、エピトープタグまたは蛍光標識を含む）、それにより T 細胞

10

20

30

40

50

胞 MMP - エピトープコンジュゲートが標的 T 細胞に結合するようにすること、B) T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートが未標識である場合、標的 T 細胞が結合した T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを、エピトープタグに結合する蛍光標識した結合剤（例えば、蛍光標識した抗体）に接触させて、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート / 標的 T 細胞 / 結合剤複合体を生成すること、C) フローサイトメトリーを用いて、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート / 標的 T 細胞 / 結合剤複合体の平均蛍光強度 (MFI) を測定すること。エピトープタグは、例えば、FLAG タグ、ヘマグルチニンタグ、c-myc タグ、ポリ (ヒスチジン) タグ等であり得る。様々な濃度の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート (ライブラリメンバー) にわたって測定された MFI が、親和性の尺度を提供する。様々な濃度の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート (ライブラリメンバー) にわたって測定された MFI が、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの半数効果濃度 (EC_{50}) を提供する。一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの標的 T 細胞に対する EC_{50} は、nM 範囲にあり、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの対照 T 細胞 (ここで、対照 T 細胞は、その表面上に、i) 野生型親 MOD に結合する同種 MOD、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープには結合しない T 細胞受容体を発現する) に対する EC_{50} は、 μ M 範囲にある。一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの対照 T 細胞に対する EC_{50} 対、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの標的 T 細胞に対する EC_{50} の比は、少なくとも 1.5 : 1、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも (at least) 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である。本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの対照 T 細胞に対する EC_{50} 対、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの標的 T 細胞に対する EC_{50} の比は、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの選択性の式である。

【0180】

一部の事例では、先行段落に記載されるように測定したときに、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート (ライブラリメンバー) の、i) 野生型親 MOD に結合する同種 MOD、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーに存在するエピトープ以外のエピトープに結合する TCR、を含む対照 T 細胞に対する結合と比較して、標的 T 細胞に対して選択的結合を呈する。

【0181】

二量体化された多量体 T 細胞調節ポリペプチド

本開示の T 細胞 MMP は、それらに化学的にコンジュゲートされたエピトープを有するものを含めて、二量体化され得、すなわち、本開示は、本開示の多量体 T 細胞 MMP の二量体を含む、多量体ポリペプチドを提供する。故に、本開示は、A) 第 1 のヘテロ二量体であって、a) i) ペプチドエピトープ、及び ii) 第 1 の MHC ポリペプチドを含む、第 1 のポリペプチド、ならびに b) 第 2 の MHC ポリペプチドを含む、第 2 のポリペプチド、を含み、該第 1 のヘテロ二量体が 1 つまたは複数の MOD を含む、該第 1 のヘテロ二量体と、B) 第 2 のヘテロ二量体であって、a) i) ペプチドエピトープ、及び ii) 第 1 の MHC ポリペプチドを含む、第 1 のポリペプチド、ならびに b) 第 2 の MHC ポリペプチドを含む、第 2 のポリペプチド、を含み、該第 2 のヘテロ二量体が 1 つまたは複数の MOD を含む、該第 2 のヘテロ二量体と、を含み、該第 1 のヘテロ二量体及び第 2 のヘテロ二量体が、互いに共有結合性で連結している、多量体 T 細胞 MMP を提供する。一部の事例では、該 2 つの多量体 T 細胞 MMP は、アミノ酸配列が互いに同一である。一部の事例では、第 1 のヘテロ二量体及び第 2 のヘテロ二量体は、第 1 のヘテロ二量体の第 2 のポリペプチドの C 末端領域及び第 2 のヘテロ二量体の第 2 のポリペプチドの C 末端領域を介して、互いに共有結合性で連結している。一部の事例では、第 1 のヘテロ二量体及び第 2

のヘテロ二量体は、第1のヘテロ二量体の第2のポリペプチドのC末端アミノ酸及び第2のヘテロ二量体の第2のポリペプチドのC末端領域を介して、互いに共有結合性で連結しており、例えば、一部の事例では、第1のヘテロ二量体の第2のポリペプチドのC末端アミノ酸及び第2のヘテロ二量体の第2のポリペプチドのC末端領域は、直接またはリンカーを介してのいずれかで互いに連結されている。リンカーは、ペプチドリinkerであり得る。該ペプチドリinkerは、1aa~200aa（例えば、1aa~5aa、5aa~10aa、10aa~25aa、25aa~50aa、50aa~100aa、100aa~150aa、または150aa~200aa）の長さを有し得る。一部の事例では、第1のヘテロ二量体のペプチドエピトープ及び第2のヘテロ二量体のペプチドエピトープは、同じアミノ酸配列を含む。一部の事例では、第1及び第2のヘテロ二量体の第1のMHCポリペプチドは、MHCクラスI 2Mであり、第1及び第2のヘテロ二量体の第2のMHCポリペプチドは、MHCクラスI重鎖である。一部の事例では、第1のヘテロ二量体のMOD及び第2のヘテロ二量体のMODは、同じアミノ酸配列を含む。一部の事例では、第1のヘテロ二量体のMOD及び第2のヘテロ二量体のMODは、対応する野生型親MODと比較して1~10個のアミノ酸置換を含むバリエーションMODであり、ここで、1~10個のアミノ酸置換は、バリエーションMODの同種MODへの低減された親和性での結合をもたらす。一部の事例では、第1のヘテロ二量体のMOD及び第2のヘテロ二量体のMODは、IL-2、4-1BBL、PD-L1、CD70、CD80、CD86、ICOS-L、OX-40L、FasL、JAG1（CD339）、TGFB、ICAM、及びそれらのバリエーションMOD（例えば、対応する野生型親MODと比較して1~10個のアミノ酸置換を有するバリエーションMOD）からなる群から選択される。好適なMHCポリペプチド、MOD、及びペプチドエピトープの例が下記に記載される。

10

20

【0182】

二量体に加えて、本開示のT細胞MMP及びT細胞MMPエピトープコンジュゲートは、三量体、四量体、または五量体を含めたより高次の複合体を形成し得る。T細胞MMPの多量体を含む組成物はまた、単量体等のより低次の複合体を含んでもよく、したがって、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、またはそれらのいずれかの組み合わせ（例えば、単量体及び二量体の混合物）を含んでもよい。

【0183】

I. B. T細胞MMPのMHCポリペプチド

30

上述のように、T細胞MMP及びT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、MHCポリペプチドを含む。本開示の目的において、「主要組織適合複合体（MHC）ポリペプチド」という用語は、ヒトMHC（ヒト白血球抗原（HLA）とも称される）ポリペプチド、齧歯類（例えば、マウス、ラット等）MHCポリペプチド、及び他の哺乳類種（例えば、ウサギ類、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、有蹄類（例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ等）のMHCポリペプチド等を含めた、種々の種のMHCクラスIポリペプチドを含むことを意図する。「MHCポリペプチド」という用語は、MHCクラスIポリペプチド（例えば、 α -2ミクログロブリン及びMHCクラスI重鎖及び/またはそれらの部分）を含むことを意図する。

【0184】

40

上述のように、本明細書に記載されるT細胞MMP及びT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの第1及び第2のMHCポリペプチドは、MHCクラスIポリペプチドである（例えば、一部の事例では、第1のMHCポリペプチドは、MHCクラスI 2M（2M）ポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドは、MHCクラスI重鎖（H鎖）（「MHC-H」）である）。ある実施形態では、T細胞MMP（またはそのエピトープコンジュゲート）における2M配列及びMHC-H鎖配列の両方がヒト起源のものである。別途明示的定めのない限り、本明細書に記載されるT細胞MMPは、MHCクラスI分子の膜アンカードメイン（膜貫通領域）、またはその分子のうち、結果として生じるT細胞MMPもしくはそのペプチドを、それが発現される細胞（例えば、哺乳類細胞等の真核細胞）に係留するのに十分な一部を含むことを意図しない。

50

【 0 1 8 5 】

一部の事例では、T細胞MMPまたはT細胞MMP - エピトープコンジュゲートのMHCポリペプチドは、HLAクラスIポリペプチド、例えば、2Mポリペプチド、またはHLAクラスI重鎖ポリペプチドである。T細胞MMPまたはそれらのエピトープコンジュゲートに含めることができるHLAクラスI重鎖ポリペプチドには、HLA - A重鎖ポリペプチド、HLA - B重鎖ポリペプチド、HLA - C重鎖ポリペプチド、HLA - E重鎖ポリペプチド、HLA - F重鎖ポリペプチド、及びHLA - G重鎖ポリペプチド、あるいは、図3A、3B、3C、及び/または3Dに図示されるヒトHLA重鎖ポリペプチドのうちのいずれかのアミノ酸配列のアミノ酸25～365に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それらは、1～30、1～5、5～10、10～15、15～20、20～25、または25～30個のアミノ酸の挿入、欠失、及び/または置換を含んでもよい）を含む、ポリペプチドが含まれる。

10

例として、多量体ポリペプチドのMHCクラスI重鎖ポリペプチドは、図3Aに図示されるヒトHLA - A重鎖ポリペプチドのうちのいずれかのアミノ酸配列のアミノ酸25～365に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み得る。

20

【 0 1 8 6 】

I . B . 1 MHCクラスI重鎖

HLA - A (H L A - A * 0 1 : 0 1 : 0 1 : 0 1)

ある実施形態では、T細胞MMPまたはT細胞MMP - エピトープコンジュゲートのMHCクラスI重鎖ポリペプチドは、HLA - A * 0 1 : 0 1 : 0 1 : 0 1のアミノ酸配列（図3DにあるHLA - A（配列番号140））、またはその配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1～25、1～5、5～10、10～15、15～20、20～25、または25～30個のアミノ酸の挿入、欠失、及び/または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA - A重鎖ポリペプチドが、図3DにあるHLA - Aと標示される配列に対して100%未満の同一性を有する場合、それは、84位、139位、及び/または236位のうちの1つまたは複数において、下記から選択される置換を含んでもよい。84位におけるチロシンからアラニン（Y84A）、84位におけるチロシンからシステイン（Y84C）、139位におけるアラニンからシステイン（A139C）、及び236位におけるアラニンからシステインへの置換（A236C）。Y84A置換は、MHC結合ポケットの一端を開き、リンカー（存在する場合）がポケットの端部から「入り込む（thread）」ことができるようにし、より多様な大きさのエピトープ（例えば、エピトープ配列をもつより長いペプチド）がポケットに収まり、T細胞MMPによって提示されることを許容する。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA - A重鎖ポリペプチドは、Y84A変異及びA236C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA - A重鎖ポリペプチドは、Y84C変異及びA139C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA - A重鎖ポリペプチドは、Y84C変異、A139C変異、及びA236C変異を含む。

30

40

【 0 1 8 7 】

HLA - A * 0 2 0 1

ある実施形態では、T細胞MMPまたはT細胞MMP - エピトープコンジュゲートのMHCクラスI重鎖ポリペプチドは、図3Dに提供されるHLA - A * 0 2 0 1のアミノ酸配列（配列番号143）、またはその配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%

50

、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、もしくは 100 % のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1 ~ 25、1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、または 25 ~ 30 個のアミノ酸の挿入、欠失、及び / または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 0201 重鎖ポリペプチドが、図 3 D にある HLA - A * 0201 と標示される配列に対して 100 % 未満の同一性を有する場合、それは、84 位、139 位、及び / または 236 位のうちの 1 つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。84 位におけるチロシンからアラニン（Y84A）、84 位におけるチロシンからシステイン（Y84C）、139 位におけるアラニンからシステイン（A139C）、及び 236 位におけるアラニンからシステインへの置換（A236C）。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 0201 重鎖ポリペプチドは、Y84A 変異及び A236C 変異を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 0201 重鎖ポリペプチドは、Y84C 変異及び A139C 変異を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 0201 重鎖ポリペプチドは、Y84C 変異、A139C 変異、及び A236C 変異を含む。

10

【0188】

HLA - A * 1101

ある実施形態では、T 細胞 MMP または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの MHC クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 3 D に提供される HLA - A * 1101 のアミノ酸配列（配列番号 148）、またはその配列に対して少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、もしくは 100 % のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1 ~ 25、1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、または 25 ~ 30 個のアミノ酸の挿入、欠失、及び / または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 1101 重鎖ポリペプチドが、図 3 D にある HLA - A * 1101 と標示される配列に対して 100 % 未満の同一性を有する場合、それは、84 位、139 位、及び / または 236 位のうちの 1 つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。84 位におけるチロシンからアラニン（Y84A）、84 位におけるチロシンからシステイン（Y84C）、139 位におけるアラニンからシステイン（A139C）、及び 236 位におけるアラニンからシステインへの置換（A236C）。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 1101 重鎖ポリペプチドは、Y84A 変異及び A236C 変異を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 1101 重鎖ポリペプチドは、Y84C 変異及び A139C 変異を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 1101 重鎖ポリペプチドは、Y84C 変異、A139C 変異、及び A236C 変異を含む。

20

30

【0189】

HLA - A * 2402

ある実施形態では、T 細胞 MMP または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの MHC クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 3 D に提供される HLA - A * 2402 のアミノ酸配列（配列番号 149）、またはその配列に対して少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、もしくは 100 % のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1 ~ 25、1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、または 25 ~ 30 個のアミノ酸の挿入、欠失、及び / または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA - A * 2402 重鎖ポリペプチドが、図 3 D にある HLA - A * 2402 と標示される配列に対して 100 % 未満の

40

50

同一性を有する場合、それは、８４位、１３９位、及び／または２３６位のうちの１つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。８４位におけるチロシンからアラニン（Ｙ８４Ａ）、８４位におけるチロシンからシステイン（Ｙ８４Ｃ）、１３９位におけるアラニンからシステイン（Ａ１３９Ｃ）、及び２３６位におけるアラニンからシステインへの置換（Ａ２３６Ｃ）。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊２４０２重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ａ変異及びＡ２３６Ｃ変異を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊２４０２重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ｃ変異及びＡ１３９Ｃ変異を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊２４０２重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ｃ変異、Ａ１３９Ｃ変異、及びＡ２３６Ｃ変異を含む。

10

【０１９０】

ＨＬＡ－Ａ＊３３０３

ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートのＭＨＣクラスⅠ重鎖ポリペプチドは、図３Ｄに提供されるＨＬＡ－Ａ＊３３０３のアミノ酸配列（配列番号１５０）、またはその配列に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、１～２５、１～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、または２５～３０個のアミノ酸の挿入、欠失、及び／または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊３３０３重鎖ポリペプチドが、図３ＤにあるＨＬＡ－Ａ＊３３０３と標示される配列に対して１００％未満の同一性を有する場合、それは、８４位、１３９位、及び／または２３６位のうちの１つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。８４位におけるチロシンからアラニン（Ｙ８４Ａ）、８４位におけるチロシンからシステイン（Ｙ８４Ｃ）、１３９位におけるアラニンからシステイン（Ａ１３９Ｃ）、及び２３６位におけるアラニンからシステインへの置換（Ａ２３６Ｃ）。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊３３０３重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ａ変異及びＡ２３６Ｃ変異を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊３３０３重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ｃ変異及びＡ１３９Ｃ変異を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ａ＊３３０３重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ｃ変異、Ａ１３９Ｃ変異、及びＡ２３６Ｃ変異を含む。

20

30

【０１９１】

ＨＬＡ－Ｂ

ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートのＭＨＣクラスⅠ重鎖ポリペプチドは、ＨＬＡ－Ｂのアミノ酸配列（配列番号１４１）（図３ＤにあるＨＬＡ－Ｂ）、またはその配列に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、１～２５、１～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、または２５～３０個のアミノ酸の挿入、欠失、及び／または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ｂ重鎖ポリペプチドが、図３ＤにあるＨＬＡ－Ｂと標示される配列に対して１００％未満の同一性を有する場合、それは、８４位、１３９位、及び／または２３６位のうちの１つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。８４位におけるチロシンからアラニン（Ｙ８４Ａ）、８４位におけるチロシンからシステイン（Ｙ８４Ｃ）、１３９位におけるアラニンからシステイン（Ａ１３９Ｃ）、及び２３６位におけるアラニンからシステインへの置換（Ａ２３６Ｃ）。ある実施形態では、Ｔ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートのＨＬＡ－Ｂ重鎖ポリペプチドは、Ｙ８４Ａ変異及びＡ２３６Ｃ変異を含む。ある実施形態では、

40

50

は、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-B重鎖ポリペプチドは、Y84C変異及びA139C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-B重鎖ポリペプチドは、Y84C変異、A139C変異、及びA236C変異を含む。

【0192】

HLA-C

ある実施形態では、T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのMHCクラスI重鎖ポリペプチドは、HLA-Cのアミノ酸配列（配列番号142）（図3DにあるHLA-C）、またはその配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1~25、1~5、5~10、10~15、15~20、20~25、または25~30個のアミノ酸の挿入、欠失、及び/または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-C重鎖ポリペプチドが、図3DにあるHLA-Cと標示される配列に対して100%未満の同一性を有する場合、それは、84位、139位、及び/または236位のうちの1つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。84位におけるチロシンからアラニン（Y84A）、84位におけるチロシンからシステイン（Y84C）、139位におけるアラニンからシステイン（A139C）、及び236位におけるアラニンからシステインへの置換（A236C）。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-C重鎖ポリペプチドは、Y84A変異及びA236C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-C重鎖ポリペプチドは、Y84C変異及びA139C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLA-C重鎖ポリペプチドは、Y84C変異、A139C変異、及びA236C変異を含む。

【0193】

マウスH2K

ある実施形態では、T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのMHCクラスI重鎖ポリペプチドは、マウスH2Kのアミノ酸配列（配列番号144）（図3DにあるマウスH2K）、またはその配列に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有する配列（例えば、それは、1~25、1~5、5~10、10~15、15~20、20~25、または25~30個のアミノ酸の挿入、欠失、及び/または置換を含んでもよい）を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのマウスH2K重鎖ポリペプチドが、図3DにあるマウスH2Kと標示される配列に対して100%未満の同一性を有する場合、それは、84位、139位、及び/または236位のうちの1つまたは複数において、下記から選択される変異を含んでもよい。84位におけるチロシンからアラニン（Y84A）、84位におけるチロシンからシステイン（Y84C）、139位におけるアラニンからシステイン（A139C）、及び236位におけるアラニンからシステインへの置換（A236C）。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのマウスH2K重鎖ポリペプチドは、Y84A変異及びA236C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのマウスH2K重鎖ポリペプチドは、Y84C変異及びA139C変異を含む。ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのマウスH2K重鎖ポリペプチドは、Y84C変異、A139C変異、及びA236C変異を含む。

【0194】

116位及び167位における置換

任意のMHCクラスI重鎖配列（HLA-A（HLA-A*01:01:01:01）、HLA-A*0201、HLA-A*1101、HLA-A*2402、HLA-A*

3303、HLA-B、HLA-C、及びマウスH2Kに関して上記で開示したものを含む)は、116位におけるシステイン置換(Y116C、マレイミドペプチドとの反応によって等でエピトープペプチドを係留するためのチオールを提供する)及び/または167位におけるアラニン置換(W167A)もしくはシステイン置換(W167C)のうちの一方をさらに含んでもよい。MHC-H結合ポケットの一端を開く置換(例えば、84位におけるまたはその同等物、例えばY84A)と同様に、167位におけるアラニンもしくはグリシンの置換またはその同等物(例えば、W167A置換)は、MHC結合ポケットの他端を開いて、T細胞MMPエピトープコンジュゲートによって提示され得るより多様な(例えば、より長い長さの)エピトープペプチドを許容する溝を作り出す。84位及び167位における置換またはそれらの同等物(例えば、W167AまたはW167Gと組み合わせたY84A)を組み合わせて使用して、MHC-H鎖の結合ポケットを修飾してもよい。167位におけるシステインの配置(例えば、W167C変異)またはその同等物は、エピトープペプチドを係留するためのチオール残基を提供する)。116位及び167位におけるシステイン置換を別個に使用して、エピトープ(例えば、エピトープペプチド)を係留するか、または組み合わせて使用して、2箇所(例えば、エピトープ含有ペプチドの端部)でエピトープを係留してもよい。116位及び/または167位における変異は、上述の84位、139位、及び/または236位における任意の1つまたは複数の変異と組み合わせられてもよい。

10

【0195】

置換の組み合わせ

20

アミノ酸84及び139が両方ともシステインである場合、それらは、エピトープペプチドが負荷されていない場合であってもMHCクラス1タンパク質を安定化し、真核細胞による翻訳及び外分泌を許容し得る、鎖内ジスルフィド結合を形成し得る。84位がC残基である場合、それはまた、2Mポリペプチド(例えば、エピトープ-GCGGS(G₄S)_n(配列番号133)成熟2Mポリペプチド、配列番号151~155を参照されたい)のN末端に結合したリンカーと鎖内ジスルフィド結合を形成することができる。アミノ酸236がシステインである場合、それは、その位置でR12C置換を含むバリアント2Mポリペプチドのアミノ酸12におけるシステインと鎖内ジスルフィド結合を形成することができる。T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートに組み込まれ得る、MHCクラス1重鎖配列の修飾のいくつかの可能性のある組み合わせが、以下の表に示される。表に提供される残基84、139、及び236における置換の任意の組み合わせは、表に提供される116位及び167位における置換の任意の組み合わせと組み合わせられてもよい。

30

T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートに組み込まれ得る、MHCクラス1重鎖配列の修飾のいくつかの組み合わせ

【表 3】

コ ト ハ シ	塩 基 配 列 (図 3 D よ り)	配 列 番 号	配列 同一性 範囲**	a a 8 4 位、1 3 9 位、及び／また は 2 3 6 位におけ る具体的な 置換	1 1 6 位及 び／または 1 6 7 位に おける置換
1	H L A - A	1 4 0	1 0 0 %	なし	なし
2	H L A - A	1 4 0	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もし くは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、 1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、も しくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／ま たは置換)	なし、Y 8 4 C、 Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、 (Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、 Y 1 1 6 C、 W 1 6 7 A、 W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
3	H L A - B	1 4 1	1 0 0 %	なし	なし
4	H L A - B	1 4 1	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もし くは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、 1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、も しくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／ま たは置換)	なし、Y 8 4 C、 Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、 (Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、 Y 1 1 6 C、 W 1 6 7 A、 W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
5	H L A - C	1 4 2	1 0 0 %	なし	なし
6	H L A - C	1 4 2	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9	なし、Y 8 4 C、 Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、	なし、 Y 1 1 6 C、 W 1 6 7 A、

10

20

30

40

D ト H	塩基配列 (図 3 D よ り)	配列 番号	配列 同一性 範囲**	a a 8 4 位、1 3 9 位、及び／また は 2 3 6 位におけ る具体的な 置換	1 1 6 位及 び／または 1 6 7 位に おける置換
			8 % ~ 9 9 . 8 %、もし くは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、 1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、も しくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／ま たは置換)	(Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
7	H L A - A * 0 2 0 1	1 4 3	1 0 0 %	なし	なし
8	H L A - A * 0 2 0 1	1 4 3	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もし くは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、 1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、も しくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／ま たは置換)	なし、Y 8 4 C、 Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、 (Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、 Y 1 1 6 C、 W 1 6 7 A、 W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
9	マウス H 2 K	1 4 4	1 0 0 %	なし	なし
1 0	マウス H 2 K	1 4 4	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もし くは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、 1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、も しくは 2 0 ~ 2 5 個の a	なし、Y 8 4 C、 Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、 (Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、 Y 1 1 6 C、 W 1 6 7 A、 W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)

10

20

30

40

ド ト ハ	塩基配列 (図3Dより)	配列番号	配列同一性 範囲**	a a 8 4 位、1 3 9 位、及び／または 2 3 6 位における具体的な置換	1 1 6 位及び／または 1 6 7 位における置換
			a 挿入、欠失、及び／または置換)		
1 1	H L A - A * 1 1 0 1	1 4 8	1 0 0 %	なし	なし
1 2	H L A - A * 1 1 0 1	1 4 8	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もしくは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、もしくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／または置換)	なし、Y 8 4 C、Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、(Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、Y 1 1 6 C、W 1 6 7 A、W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
1 3	H L A - A * 2 4 0 2	1 4 9	1 0 0 %	なし	なし
1 4	H L A - A * 2 4 0 2	1 4 9	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もしくは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、もしくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／または置換)	なし、Y 8 4 C、Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、(Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、Y 1 1 6 C、W 1 6 7 A、W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)
1 5	H L A - A * 3 3 0 3	1 5 0	1 0 0 %	なし	なし

10

20

30

40

図 3 D	塩基配列 (図 3 D より)	配列番号	配列同一性範囲**	a a 8 4 位、1 3 9 位、及び／または 2 3 6 位における具体的な置換	1 1 6 位及び／または 1 6 7 位における置換
1 6	H L A - A * 3 3 0 3	1 5 0	7 5 % ~ 9 9 . 8 %、8 0 % ~ 9 9 . 8 %、8 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 0 % ~ 9 9 . 8 %、9 5 % ~ 9 9 . 8 %、9 8 % ~ 9 9 . 8 %、もしくは 9 9 % ~ 9 9 . 8 %、または 1 ~ 2 5、1 ~ 5、5 ~ 1 0、1 0 ~ 1 5、1 5 ~ 2 0、もしくは 2 0 ~ 2 5 個の a a 挿入、欠失、及び／または置換)	なし、Y 8 4 C、Y 8 4 A、A 1 3 9 C、A 2 3 6 C、(Y 8 4 A 及び A 2 3 6 C)、(Y 8 4 C 及び A 1 3 9 C)、または (Y 8 4 C、A 1 3 9 C、及び A 2 3 6 C)	なし、Y 1 1 6 C、W 1 6 7 A、W 1 6 7 C、または (Y 1 1 6 C 及び W 1 6 7 C)

10

20

* * 配列同一性範囲は、図 3 D に列挙される配列の対応する部分と比べての、T 細胞 M M P に組み込まれた M H C - H ポリペプチド配列の配列同一性における許容範囲である。

【 0 1 9 6 】

I . B . 2 M H C クラス I 2 - ミクログロビン (M i c r o g l o b i n s) 及び M H C - H ポリペプチドとの組み合わせ

多量体ポリペプチドの 2 M ポリペプチドは、ヒト 2 M ポリペプチド、非ヒト霊長類 2 M ポリペプチド、マウス 2 M ポリペプチド等であり得る。一部の事例では、2 M ポリペプチドは、図 4 に図示される 2 M アミノ酸配列に対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、2 M ポリペプチドは、図 4 に図示される 2 M アミノ酸配列のアミノ酸 2 1 ~ 1 1 9 に対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。

30

【 0 1 9 7 】

一部の事例では、M H C ポリペプチドは、参照 M H C ポリペプチド (ここで、参照 M H C ポリペプチドは、野生型 M H C ポリペプチドであり得る) と比べて単一アミノ酸置換を含み、ここで、単一アミノ酸置換は、あるアミノ酸をシステイン (C y s) 残基で置換する。かかるシステイン残基は、T 細胞 M M P またはそのエピトープコンジュゲートの第 1 のポリペプチドの M H C ポリペプチドに存在する場合、第 2 のポリペプチド鎖に存在するシステイン残基とジスルフィド結合を形成し得る。

40

【 0 1 9 8 】

一部の事例では、多量体ポリペプチドの第 1 のポリペプチドにおける第 1 の M H C ポリペプチド、及び／または多量体ポリペプチドの第 2 のポリペプチドにおける第 2 の M H C ポリペプチドは、あるアミノ酸をシステインで置換するアミノ酸置換を含み、ここで、第 1 の M H C ポリペプチドにおける置換システインが、第 2 の M H C ポリペプチドにおけるシステインとジスルフィド結合を形成するか、第 1 の M H C ポリペプチドにおけるシステインが、第 2 の M H C ポリペプチドにおける置換システインとジスルフィド結合を形成す

50

るか、または第 1 の M H C ポリペプチドにおける置換システインが、第 2 の M H C ポリペプチドにおける置換システインとジスルフィド結合を形成する。

【 0 1 9 9 】

例えば、一部の事例では、H L A 2 M 及び H L A クラス I 重鎖における以下の残基対のうちの 1 つが、システインで置換される（ここで、残基番号は、成熟ポリペプチドの残基番号である）：1） 2 M 残基 1 2、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 6；2） 2 M 残基 1 2、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 7；3） 2 M 残基 8、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 4；4） 2 M 残基 1 0、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 5；5） 2 M 残基 2 4、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 6；6） 2 M 残基 2 8、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 2；7）

2 M 残基 9 8、H L A クラス I 重鎖残基 1 9 2；8） 2 M 残基 9 9、H L A クラス I 重鎖残基 2 3 4；9） 2 M 残基 3、H L A クラス I 重鎖残基 1 2 0；1 0） 2 M 残基 3 1、H L A クラス I 重鎖残基 9 6；1 1） 2 M 残基 5 3、H L A クラス I 重鎖残基 3 5；1 2） 2 M 残基 6 0、H L A クラス I 重鎖残基 9 6；1 3） 2 M 残基 6 0、H L A クラス I 重鎖残基 1 2 2；1 4） 2 M 残基 6 3、H L A クラス I 重鎖残基 2 7；1 5） 2 M 残基 A r g 3、H L A クラス I 重鎖残基 G l y 1 2 0；1 6） 2 M 残基 H i s 3 1、H L A クラス I 重鎖残基 G l n 9 6；1 7） 2 M 残基 A s p 5 3、H L A クラス I 重鎖残基 A r g 3 5；1 8） 2 M 残基 T r p 6 0、H L A クラス I 重鎖残基 G l n 9 6；1 9） 2 M 残基 T r p 6 0、H L A クラス I 重鎖残基 A s p 1 2 2；2 0） 2 M 残基 T y r 6 3、H L A クラス I 重鎖残基 T y r 2 7；2 1） 2 M 残基 L y s 6、H L A クラス I 重鎖残基 G l u 2 3 2；2 2） 2 M 残基 G l n 8、H L A クラス I 重鎖残基 A r g 2 3 4；2 3） 2 M 残基 T y r 1 0、H L A クラス I 重鎖残基 P r o 2 3 5；2 4） 2 M 残基 S e r 1 1、H L A クラス I 重鎖残基 G l n 2 4 2；2 5） 2 M 残基 A s n 2 4、H L A クラス I 重鎖残基 A l a 2 3 6；2 6） 2 M 残基 S e r 2 8、H L A クラス I 重鎖残基 G l u 2 3 2；2 7） 2 M 残基 A s p 9 8、H L A クラス I 重鎖残基 H i s 1 9 2；及び 2 8） 2 M 残基 M e t 9 9、H L A クラス I 重鎖残基 A r g 2 3 4。

M H C / H L A クラス I 重鎖のアミノ酸の番号付けは、シグナルペプチドを含めずに、成熟 M H C / H L A クラス I 重鎖を参照している。例えば、シグナルペプチドを含む、図 3 A に図示されるアミノ酸配列において、G l y 1 2 0 は、G l y 1 4 4 であり、G l n 9 6 は、G l n 1 2 0 であり、その他も同様である。一部の事例では、2 M ポリペプチドは、R 1 2 C 置換を含み、H L A クラス I 重鎖は、A 2 3 6 C 置換を含む。そのような事例では、ジスルフィド結合は、2 M ポリペプチドの C y s - 1 2 と H L A クラス I 重鎖の C y s - 2 3 6 との間で形成する。例えば、一部の事例では、成熟 H L A - A アミノ酸配列の残基 2 3 6（すなわち、図 3 A に図示されるアミノ酸配列の残基 2 6 0）が、C y s で置換される。一部の事例では、成熟 H L A - B アミノ酸配列の残基 2 3 6（すなわち、図 3 B に図示されるアミノ酸配列の残基 2 6 0）が、C y s で置換される。一部の事例では、成熟 H L A - C アミノ酸配列の残基 2 3 6（すなわち、図 3 C に図示されるアミノ酸配列の残基 2 6 0）が、C y s で置換される。一部の事例では、図 4 に図示されるアミノ酸配列の残基 3 2（成熟 2 M の A r g - 1 2 に対応する）が、C y s で置換される。

【 0 2 0 0 】

別個に、または、T 細胞 M M P の第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチド（上記で考察された）との間で鎖内ジスルフィド結合を形成するために使用され得る、2 M 及び H L A クラス I 重鎖ポリペプチドにおけるシステイン残基の対に加えて、T 細胞 M M P またはそのエピトープコンジュゲートの H L A - 重鎖は、1 ヘリックスのカルボキシル末端部分の中へ置換されたシステインと、2 - 1 ヘリックスのアミノ末端部分におけるシステインとの間で鎖内ジスルフィド結合を形成するようにシステインで置換されてもよい。かかるジスルフィド結合は、結合されたエピトープペプチド（またはヌルペプチド）の不在下で、T 細胞 M M P を安定化し、真核細胞によるその細胞プロセス及び外分泌を許容する。一実施形態では、1 ヘリックスのカルボキシル末端部分は、M H C クラス I 重鎖のおよそアミノ酸 7 9 位からおよそアミノ酸 8 9 位までであり、2 - 1 ヘリックスのアミ

ノ末端部分は、およそアミノ酸 134 位からアミノ酸 144 位までである（これらのアミノ酸位置は、それらのリーダー配列を含めずに重鎖の配列に基づいて決定される（例えば、図 3 D を参照されたい）。かかる一実施形態では、ジスルフィド結合は、MHC クラス I 重鎖の 83 位、84 位、または 85 位に位置するシステインと、138 位、139 位、または 140 位のうちのいずれかに位置するシステインとの間にある。例えば、ジスルフィド結合は、アミノ酸 83 で MHC クラス I 重鎖に組み込まれたシステインと、138 位、139 位、または 140 位のうちのいずれかに位置するアミノ酸におけるシステインとから形成されてもよい。代替として、ジスルフィド結合は、84 位で挿入されたシステインと、138 位、139 位、もしくは 140 位のうちのいずれかで挿入されたシステインとの間、または 85 位で挿入されたシステインと、138 位、139 位、もしくは 140 位のうちのいずれか 1 つにおけるシステインとの間で形成されてもよい。ある実施形態では、MHC クラス I 重鎖の鎖内ジスルフィド結合は、84 位及び 139 位で重鎖配列の中へ置換されたそれぞれのシステインの間にある（例えば、重鎖配列は、図 3 D に記載される重鎖配列のうちの 1 つであり得る）。上述のように、84 及び 139 におけるシステイン間のジスルフィド結合を含めた、MHC クラス I の鎖内ジスルフィド結合のうちのいずれも、MHC クラス I 重鎖 236 位と、例えば図 4 に示されるような成熟 2 M ポリペプチド配列（そのリーダーを欠いた）の 12 位との間の結合を含む、鎖内ジスルフィド結合と組み合わせられてもよい。

10

【0201】

別の実施形態では、鎖内ジスルフィド結合は、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの MHC - H 配列において、図 3 D に与えられる配列のアミノ酸 79 位 ~ 89 位の領域の中へ置換されたシステインと、アミノ酸 134 位 ~ 144 位の領域の中へ置換されたシステインとの間で形成されてもよい。かかる実施形態では、MHC クラス I 重鎖配列は、1 ヘリックスのカルボキシル末端部分と、2 - 1 ヘリックスのアミノ末端部分との間でジスルフィド結合を形成するシステインの前または後に、1 ~ 5 個のアミノ酸の挿入、欠失、及び / または置換を有し得る。任意の挿入されるアミノ酸は、天然型アミノ酸またはプロリン及びアラニンを除く天然型アミノ酸から選択され得る。

20

【0202】

ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの 2 M ポリペプチドは、NP__004039.1、NP__001009066.1、NP__001040602.1、NP__776318.1、または NP__033865.2（配列番号 151 ~ 155）のうちのいずれか 1 つの成熟 2 M ポリペプチド配列（a a s 21 ~ 119）を含む。

30

【0203】

一部の事例では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの HLA クラス I 重鎖ポリペプチドは、図 3 D に記載される HLA - A、HLA - B、または HLA - C 配列のうちのいずれか 1 つを含む。これらの重鎖配列のうちのいずれかは、84 位及び 139 位にシステイン置換をさらに含んでもよく、これらが鎖内ジスルフィド結合を形成してもよい。

40

【0204】

ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートの 2 M ポリペプチドは、図 4 にある配列のうちのいずれか 1 つの成熟 2 M ポリペプチド配列（a a s 21 ~ 119）を含み、これは、R12C 置換をさらに含む。

【0205】

ある実施形態では、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートは、R12C 置換を有する成熟 2 M ポリペプチド配列（例えば、図 4 にある配列のうちのいずれか 1 つの a a s 21 ~ 119）を含む、第 1 のポリペプチドと、236 位にシステインをもつ、図 3 D にある HLA - A、HLA - B、または HLA - C 重鎖配列のうちのいずれか 1 つを含む、第 2 のポリペプチドとを含む。かかる実施形態では、鎖内ジスルフィド結合は、12 位及び 236 位におけるそれぞれのシステインの間で形成し得る。加えて、これらの

50

重鎖配列のうちのいずれかは、84位及び139位にシステイン置換をさらに含んでもよく、これらが鎖内ジスルフィド結合を形成してもよい。

【0206】

一部の事例では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLAクラスI重鎖ポリペプチドは、HLA-A*0201(図3D)のアミノ酸配列を含む。一部の事例では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLAクラスI重鎖ポリペプチドは、A236C置換を有するHLA-A*0201(図3D)のアミノ酸配列を含む。一部の事例では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのHLAクラスI重鎖ポリペプチドは、Y84A及びA236C置換を有するHLA-A*0201(図3D)のアミノ酸配列を含む。

10

【0207】

ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートは、R12C置換を有するNP__004039.1(図4を参照されたい)のアミノ酸残基21~119を含む、第1のポリペプチドと、図3DにあるHLA-A0201(HLA-A2)配列を含む、第2のポリペプチドとを含む。かかる一実施形態では、HLA-A0201配列は、A236C置換を有する。別のかかる実施形態では、HLA-A0201配列は、Y84C及びA139C置換を有する。別のかかる実施形態では、HLA-A0201配列は、Y84C、A139C、及びA236C置換を有する。示されるように、Y84C及びA139C置換を有するMHC-H配列は、安定化する鎖内ジスルフィド結合を形成し得、236位のシステインは、成熟2Mポリペプチドの12位のシステインに結合し得る。

20

【0208】

ある実施形態では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートは、R12C置換を有するNP__004039.1(図4を参照されたい)のアミノ酸残基21~119を含む、第1のポリペプチドと、第2のポリペプチドとを含み、HLAクラスI重鎖ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列、

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDA
ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVK AHSQTHRVDL(a
aクラスタ1){C}(aaクラスタ2)AGSHTVQRM YGCDVGS DWRFL
RGYHQYAYDGKDYIALKEDLR SW(aaクラスタ3){C}(aaクラ
スタ4)HKWEAAHVAEQLRAYLEGT C VEWLRRYLENGKETLQ
RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLR C WALSFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPA GDGT FQKWA AVVVP SGQEQR YTCH
VQHEGLPKPLTLR WEP(配列番号156)、を含むか、または、

30

第1のポリペプチドは、下記の配列、

IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HP S D I E V
DLLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTE
KDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM(配列番号157)、を含み

、第2のポリペプチドは、下記のアミノ酸(amino acid)配列、

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDA
ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVK AHSQTHRVDL(a
aクラスタ1){C}(aaクラスタ2)AGSHTVQRM YGCDVGS DWRFL
RGYHQYAYDGKDYIALKEDLR SW(aaクラスタ3){C}(aaクラ
スタ4)HKWEAAHVAEQLRAYLEGT C VEWLRRYLENGKETL
QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLR C WALSFYPAEITLTWQR
DGEDQTQDTELVETRPA GDGT FQKWA AVVVP SGQEQR YTCH
VQHEGLPKPLTLR WEP(配列番号158)、を含み

40

ここで、{C}として示されるシステイン残基は、1ヘリックスと2-1ヘリックスとの間でジスルフィド結合を形成し、(C)残基は、2Mポリペプチドシステインと、

50

1 2 位においてジスルフィド結合を形成する。

【0209】

a a クラスタ 1、a a クラスタ 2、a a クラスタ 3、a a クラスタ 4、a a クラスタ 5、及び a a クラスタ 6 の各出現例は独立して、1 ~ 5 つのアミノ酸残基であるように選択され、これらのアミノ酸残基は、各々独立して、i) 任意の天然型 (タンパク新生) アミノ酸、または i i) プロリンもしくはグリシンを除く任意の天然型アミノ酸から選択される。

【0210】

ある実施形態では、

a a クラスタ 1 は、アミノ酸配列 G T L R G であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、L が I、V、A、または F によって置き換えられた) ものであり得、

a a クラスタ 2 は、アミノ酸配列 Y N Q S E であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、N が Q によって置き換えられ、Q が N によって置き換えられ、及び / または E が D によって置き換えられた) ものであり得、

a a クラスタ 3 は、アミノ酸配列 T A A D M であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、T が S によって置き換えられ、A が G によって置き換えられ、D が E によって置き換えられ、及び / または M が L、V、もしくは I によって置き換えられた) ものであり得、

a a クラスタ 4 は、アミノ酸配列 A Q T T K であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、A が G によって置き換えられ、Q が N によって置き換えられ、または T が S によって置き換えられ、及び / または K が R もしくは Q によって置き換えられた) ものであり得、

a a クラスタ 5 は、アミノ酸配列 V E T R P であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、V が I もしくは L によって置き換えられ、E が D によって置き換えられ、T が S によって置き換えられ、及び / または R が K によって置き換えられた) ものであり得、及び / または

a a クラスタ 6 は、アミノ酸配列 G D G T F であるか、またはその配列のうち 1 つもしくは 2 つのアミノ酸が欠失しているか、もしくは他の天然型アミノ酸で置換された (例えば、D が E によって置き換えられ、T が S によって置き換えられ、または F が L、W、もしくは Y によって置き換えられた) ものであり得る。

【0211】

一部の事例では、2 M ポリペプチドは、下記のアミノ酸配列、

I Q R T P K I Q V Y S C H P A E N G K S N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L
K N G E R I E K V E H S D L S F S K D W S F Y L L Y Y T E F T P T E K D E Y A C
R V N H V T L S Q P K I V K W D R D M (配列番号 157)、を含む。

【0212】

一部の事例では、本開示の T 細胞 M M P の第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドは、i) 第 1 のポリペプチド鎖におけるペプチドエピトープ及び 2 M ポリペプチドを接続するリンカー (例えば、エピトープがリンカー及び 2 M 配列の N 末端側に配置されて) に存在する C y s 残基と、i i) 第 2 のポリペプチド鎖における M H C クラス I 重鎖に存在する C y s 残基とを通して、互いにジスルフィド結合で連結されている。一部の事例では、M H C クラス I 重鎖に存在する C y s 残基は、Y 84 C 置換として導入された C y s である。一部の事例では、第 1 のポリペプチド鎖におけるペプチドエピトープ及び 2 M ポリペプチドを接続するリンカーは、G C G G S (G₄S)_n であり、ここで、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、または 9 (配列番号 133) である (例えば、エピトープ - G C G G S (G₄S)_n - 成熟 2 M ポリペプチド)。例えば、一部の事例では、リンカーは、アミノ酸配列 G C G G S G G G S G G G S G G G S (配列番号 78)

を含む。別の例として、リンカーは、アミノ酸配列 G C G G S G G G S G G G S (配列番号 79) を含む。かかるジスルフィド結合で連結された第 1 及び第 2 のポリペプチドの例が、図 6 E ~ 6 H に概略的に図示される。

【0213】

I. C. 足場ポリペプチド

T 細胞 MMP 及び T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、Fc ポリペプチドを含み得るか、または別の好適な足場ポリペプチドを含み得る。

【0214】

好適な足場ポリペプチドには、抗体ベースの足場ポリペプチド及び非抗体ベースの足場が含まれる。非抗体ベースの足場には、例えば、アルブミン、XTEN (延長組換え (extended recombinant)) ポリペプチド、トランスフェリン、Fc 受容体ポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド (例えば、Hassouneh et al. (2012) Methods Enzymol. 502: 215 を参照されたい; 例えば、(Val-Pro-Gly-X-Gly、配列番号 159) (ここで、X は、プロリン以外の任意のアミノ酸である) のペンタペプチド繰り返し単位を含むポリペプチド)、アルブミン結合ポリペプチド、絹様ポリペプチド (例えば、Valluzzi et al. (2002) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 357: 165 を参照されたい)、絹エラスチン様ポリペプチド (SELP、例えば、Megeed et al. (2002) Adv Drug Deliv Rev. 54: 1075 を参照されたい) 等が含まれる。好適な XTEN ポリペプチドには、例えば、WO2009/023270、WO2010/091122、WO2007/103515、US2010/0189682、及び US2009/0092582 に開示されるものが含まれる (Schellenberger et al. (2009) Nat Biotechnol. 27: 1186 もまた参照されたい)。好適なアルブミンポリペプチドには、例えば、ヒト血清アルブミンが含まれる。

【0215】

好適な足場ポリペプチドは、一部の事例では、半減期を延長するポリペプチドであろう。故に、一部の事例では、好適な足場ポリペプチドは、足場ポリペプチドを欠いた対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期 (例えば、血清半減期) を増加させる。例えば、一部の事例では、足場ポリペプチドは、足場ポリペプチドを欠いた対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期を、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 50%、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍、または 100 倍超増加させる。例として、一部の事例では、Fc ポリペプチドは、Fc ポリペプチドを欠いた対照多量体ポリペプチドと比較して、多量体ポリペプチドのインビボ半減期 (血清半減期) を、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 50%、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍、または 100 倍超増加させる。

【0216】

I. D. Fc ポリペプチド

一部の事例では、T 細胞 MMP (またはその対応する T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート) の第 1 及び / または第 2 のポリペプチド鎖は、ポリペプチド内にある、またはそれに結合した (例えば、末端で、またはリンカーによって結合した) 1 つまたは複数の化学コンジュゲーション部位を含むように修飾され得る、Fc ポリペプチドを含む。T 細胞 MMP または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの Fc ポリペプチドは、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、または IgM に由来し得、これは、ヒトポリペプチド配列、ヒト化ポリペプチド配列、合成重鎖定常領域またはコンセンサス重鎖定常領域の Fc 領域ポリペプチドを含有してもよい。複数の実施形態では、Fc ポリペプチドは、ヒ

10

20

30

40

50

トIgG1Fc、ヒトIgG2Fc、ヒトIgG3Fc、ヒトIgG4Fc、ヒトIgAFc、ヒトIgDFc、ヒトIgEFc、ヒトIgMFc等に由来し得る。別途定めのない限り、T細胞MMP及びそれらのエピトープコンジュゲートで使用されるFcポリペプチドは、膜貫通アンカードメイン、または膜貫通アンカードメインうち、T細胞MMPもしくはそのエピトープコンジュゲートを細胞膜に係留するのに十分な一部分を含まない。一部の事例では、Fcポリペプチドは、図2A～2Gに図示されるFc領域のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、Fc領域は、図2Aに図示されるヒトIgG1Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、Fc領域は、図2Aに図示されるヒトIgG1Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、かつN77の置換を含み、例えば、Fcポリペプチドは、N77A置換を含む。一部の事例では、Fcポリペプチドは、図2Aに図示されるヒトIgG2Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図2Aに図示されるヒトIgG2Fcポリペプチドのアミノ酸99～325に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、Fcポリペプチドは、図2Aに図示されるヒトIgG3Fcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図2Aに図示されるヒトIgG3Fcポリペプチドのアミノ酸19～246に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、Fcポリペプチドは、図2Bに図示されるヒトIgMFcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図2Bに図示されるヒトIgMFcポリペプチドに対するアミノ酸1～276に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。一部の事例では、Fcポリペプチドは、図2Cに図示されるヒトIgAFcポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含み、例えば、Fcポリペプチドは、図2Cに図示されるヒトIgAFcポリペプチドに対するアミノ酸1～234に対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む

。

【0217】

一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、アスパラギン以外のアミノ酸によるN297の置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2C（N297A置換を含むヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、ロイシン以外のアミノ酸によるL234の置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、ロイシン以外のアミノ酸によるL235の置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。

10

。

【0218】

一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2Eに図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2Fに図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2G（L234A置換及びL235A置換を含むヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、プロリン以外のアミノ酸によるP331の置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含み、一部の事例では、この置換は、P331S置換である。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、ロイシン以外のアミノ酸によるL234及びL235における置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、ロイシン以外のアミノ酸によるL234及びL235における置換、ならびにプロリン以外のアミノ酸によるP331の置換を除いて、図2A（ヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、図2B（L234F、L235E、及びP331S置換を含むヒトIgG1 Fc）に図示されるアミノ酸配列を含む。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するFcポリペプチドは、L234A及びL235A置換を含むIgG1 Fcポリペプチドである。

20

30

【0219】

I・E・リンカー

T細胞MMP（及びそれらのT細胞MMP-エピトープコンジュゲート）は、例えば、下記のうちのいずれか1つまたは複数の間に介在する独立して選択される1つまたは複数のリンカーペプチドを含み得る。i）MHCポリペプチドとIg Fcポリペプチドとの間（かかるリンカーは、本明細書で「L1リンカー」と称される）、ii）MHCポリペプチドとMODとの間（かかるリンカーは、本明細書で「L2リンカー」と称される、iii）第1のMODと第2のMODとの間（かかるリンカーは、本明細書で「L3リンカー」と称される）（例えば、第1のバリエーション4-1BB Lポリペプチドと第2のバリエーション4-1BB Lポリペプチドとの間、または第2のバリエーション4-1BB Lポリペプチドと第3のバリエーション4-1BB Lポリペプチドとの間）、iv）コンジュゲーション部位またはペプチド抗原（コンジュゲートされた「エピトープ」ペプチド）とMHCクラスIポリペプチド（例えば、2M）との間、v）MHCクラスIポリペプチドと二量体化ポリペプチド（例えば、二量体化する対の第1または第2のメンバー）との間、及びvi）二量体化ポリペプチド（例えば、二量体化する対の第1または第2のメンバー）とIg Fcポリペプチドとの間。

40

【0220】

好適なリンカー（「スペーサー」とも称される）は、容易に選択することができ、1aa～25aa、3aa～20aa、2aa～15aa、3aa～12aa、4aa～10

50

aa、5aa~9aa、6aa~8aa、または7aa~8aa等のいくつかの好適な長さのうちのいずれかのものであり得る。複数の実施形態では、好適なリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25aaの長さであり得る。一部の实例では、リンカーは、25aa~50aaの長さ、例えば、25~30、30~35、35~40、40~45、または45~50aaの長さを有する。

【0221】

例となるリンカーには、グリシンポリマー(G)_n、グリシン-セリンポリマー(例えば、(GS)_n、($SGSGS$)_n(配列番号66)、及び($GGGS$)_n(配列番号67)を含み、ここで、nは、少なくとも1(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野で既知の他の柔軟なリンカーが含まれる。グリシンポリマー及びグリシン-セリンポリマーが両方とも使用され得る。 Gly 及び Ser の両方は、比較的構造をとらず(unstructured)、したがって、構成要素間の天然テザーとしての役目を果たすことができる。グリシンポリマーは、アラニンよりもさらに顕著にファイ-プサイ空間に接近し、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限が少ない(*Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142(1992)*)を参照されたい)。例となるリンカーはまた、 $GGSG$ (配列番号68)、 $GGSGG$ (配列番号69)、 $SGSGS$ (配列番号70)、 $SGSGG$ (配列番号71)、 $GGGS$ (配列番号72)、 $SGSSG$ (配列番号73)等を含むが、これらに限定されないアミノ酸配列をも含み得る。例となるリンカーは、例えば、 $Gly(Ser_4)_n$ (配列番号74)を含み得、ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列AAGG(配列番号75)を含む。

【0222】

一部の实例では、リンカーは、アミノ酸配列($GGGS$)_n(配列番号76)を含み、ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一部の实例では、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートの第1のポリペプチドに存在するリンカーポリペプチドは、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートのエピトープまたは第2のポリペプチドに存在するシステイン残基とジスルフィド結合を形成し得る、システイン残基を含む。一部の实例では、例えば、リンカーは、アミノ酸配列GCGGS(G_4S)_n(ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、または9である)(配列番号133)、

【化4】

$GCGASGGGSGGGGS$ (配列番号77)、
配列 $GCGSGGGGSGGGGSGGGGS$ (配列番号78)、または配列 $GCGSGGGGSGGGGS$ (配列番号79)

を含む。

【0223】

上述のポリペプチドリinkerを含めたリンカーは、T細胞MMP(またはそのエピトープコンジュゲート)の第1または第2のポリペプチドにカップリングされたペイロードの間に存在してもよい。上記に列挙したポリペプチドリinkerに加えて、ペイロードまたはエピトープ(例えば、ペプチド)を第1及び/または第2のポリペプチドに結合させるために使用されるリンカーは、非ペプチドであり得る。かかる非ペプチドリinkerには、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含むポリマーが含まれる。下記に列挙されるリンカー等の、二官能性架橋剤によるカップリングからもたらされるリンカーを含めた他のリンカーもまた利用されてもよい。

【0224】

I.F. エピトープ

本明細書に記載される化学コンジュゲーション部位及び化学反応は、ペプチド（エピトープ提示ペプチド）及び非ペプチドエピトープの両方の、T細胞MMPへの組み込みを可能にする。ポリペプチドエピトープに加えて、エピトープには、例えば糖ペプチドが含まれ得る。

【0225】

ある実施形態では、多量体ポリペプチドに存在するエピトープは、約4aa～約25aaの長さを有し得、例えば、該エピトープは、4aa～10aa、10aa～15aa、15aa～20aa、または20aa～25aaの長さを有し得る。例えば、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに存在するエピトープは、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa、または25aaの長さを有し得る。一部の事例では、多量体ポリペプチドに存在するエピトープは、5aa～10aa、例えば、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、または10aaの長さを有する。

10

【0226】

ある実施形態では、多量体ポリペプチドに存在するエピトープは、T細胞によって特異的に結合され、すなわち、該エピトープは、エピトープ特異的T細胞によって特異的に結合される。エピトープ特異的T細胞は、参照アミノ酸配列を有するエピトープに結合するが、参照アミノ酸配列とは異なるエピトープには実質的に結合しない。例えば、エピトープ特異的T細胞は、参照アミノ酸配列を有するエピトープに結合し、参照アミノ酸配列とは異なるエピトープには、仮に結合したとしても、 10^{-6} M未満、 10^{-5} M未満、または 10^{-4} M未満の親和性で結合する。エピトープ特異的T細胞は、それが特異性をもつエピトープに、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、少なくとも 10^{-9} M、または少なくとも 10^{-10} Mの親和性で結合することができる。

20

【0227】

好適なペプチド/ポリペプチドエピトープには、がん関連抗原に存在するエピトープが含まれるが、これらに限定されない。がん関連抗原は、当該技術分野で既知である。例えば、Cheever et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15: 5323を参照されたい。がん関連抗原には、-葉酸受容体、炭酸脱水酵素IX (CAIX)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44v7/8、がん胎児性抗原 (CEA)、上皮糖タンパク質2 (EGP-2)、上皮糖タンパク質40 (EGP-40)、葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児型アセチルコリン受容体、ガングリオシド抗原GD2、Her2/neu、IL-13R- α 2、カップパ軽鎖、LeY、L1細胞接着分子、黒色腫関連抗原 (MAGE)、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、NKGD2リガンド、がん胎児性抗原 (h5T4)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、血管内皮成長因子受容体-2 (VEGF-R2) (例えば、Vigneron et al. (2013) Cancer Immunity 13: 15、及びVigneron (2015) BioMed Res. Int'l Article ID 948501を参照されたい)、及び上皮成長因子受容体 (EGFR) vIIIポリペプチド (例えば、Wong et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2965、及びMiao et al. (2014) PLoS One 9: e94281を参照されたい) が含まれるが、これらに限定されない。一部の事例では、該エピトープは、ヒトパピローマウイルスE7抗原エピトープである (例えば、Ramos et al. (2013) J. Immunother. 36: 66を参照されたい)。

30

40

【0228】

一部の事例では、好適なペプチドエピトープは、MUC1ポリペプチド、ヒトパピローマウイルス (HPV) E6ポリペプチド、LMP2ポリペプチド、HPV E7ポリペプチド、上皮成長因子受容体 (EGFR) vIIIポリペプチド、HER-2/neuポリペプチド、黒色腫抗原ファミリーA、3 (MAGE A3) ポリペプチド、p53ポリペ

50

プチド、変異体 p 5 3 ポリペプチド、NY - ESO - 1 ポリペプチド、葉酸ヒドロラーゼ
 (前立腺特異的膜抗原、PSMA) ポリペプチド、がん胎児性抗原 (CEA) ポリペプチ
 ド、T細胞に認識される黒色腫抗原 (メラノ A / MART 1) ポリペプチド、Ras ポリ
 ペプチド、gp 100 ポリペプチド、プロテイナーゼ 3 (PR 1) ポリペプチド、bcr
 - abl ポリペプチド、チロシナーゼポリペプチド、サバイビンポリペプチド、前立腺特
 異抗原 (PSA) ポリペプチド、hTERT ポリペプチド、肉腫転座切断点ポリペプチド
 、滑膜肉腫 X (SSX) 切断点ポリペプチド、EphA2 ポリペプチド、酸性ホスファタ
 ーゼ、前立腺 (PAP) ポリペプチド、黒色腫アポトーシス阻害因子 (ML - IAP) ポリ
 ペプチド、アルファ - フェトプロテイン (AFP) ポリペプチド、上皮細胞接着分子 (E
 pCAM) ポリペプチド、ERG (TMPRSS2 ETS 融合) ポリペプチド、NA 10
 17 ポリペプチド、ペアードボックス 3 (PAX3) ポリペプチド、未分化リンパ腫キナ
 ーゼ (ALK) ポリペプチド、アンドロゲン受容体ポリペプチド、サイクリン B 1 ポリペ
 プチド、N - myc がん原遺伝子 (MYCN) ポリペプチド、Ras ホモログ遺伝子ファ
 ミリーメンバー C (RhoC) ポリペプチド、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (TRP -
 2) ポリペプチド、メソテリンポリペプチド、前立腺幹細胞抗原 (PSCA) ポリペプチ
 ド、黒色腫関連抗原 1 (MAGE A1) ポリペプチド、チトクロム P450 1B1 (CYP1B1)
 ポリペプチド、胎盤特異的タンパク質 1 (PLAC1) ポリペプチド、BORIS ポリペプチド
 (別名、CCCCC 結合因子または CTCF)、ETV6 - AML ポリペプチド、乳癌抗原 NY - BR - 1
 ポリペプチド (アンキリン反復ドメイン含有タン 20
 パク質 30A とも称される)、Gタンパク質シグナル伝達調節因子 (RGS5) ポリペ
 プチド、T細胞に認識される扁平上皮細胞癌抗原 (SART3) ポリペプチド、炭酸脱水酵
 素 IX ポリペプチド、ペアードボックス 5 (PAX5) ポリペプチド、OY - TES1 (精
 巣抗原; 別名、アクロシン結合タンパク質) ポリペプチド、精子タンパク質 17 ポリペ
 プチド、リンパ球細胞特異的タンパク質 - チロシンキナーゼ (LCK) ポリペプチド、高
 分子量黒色腫関連抗原 (HMW - MAA)、Aキナーゼアンカータンパク質 4 (AKAP
 - 4)、滑膜肉腫 X 切断点 2 (SSX2) ポリペプチド、X 抗原ファミリーメンバー 1 (X
 AGE1) ポリペプチド、B7 ホモログ 3 (B7H3; 別名、CD276) ポリペプチ
 ド、レグマインポリペプチド (LGMN1; 別名、アスバラギニルエンドペプチダーゼ)
 、Ig 及び EGF 相同性ドメインを有するチロシンキナーゼ (tyrosine kinase with Ig and EGF
 homology domains) 2 (Tie - 2、別名、アンジオポエチン 1 受容体) ポリペプチド、P 抗原ファミリーメンバー
 4 (PAGE4) ポリペプチド、血管内皮成長因子受容体 2 (VEGF2) ポリペプチド、MAD - CT - 1
 ポリペプチド、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) ポリペプチド、血小板由来成長因子受容体ベータ (PDGF)
 ポリペプチド、MAD - CT - 2 ポリペプチド、Fos 関連抗原 1 (FOSL) ポリペプチド、またはウィルムス腫瘍 1 (WT
 - 1) ポリペプチドの、約 4 aa ~ 約 20 aa (例えば、4 aa、5 aa、6 aa、7 aa、8 aa、9 aa、10 aa、11 aa、12 aa、13 aa、14 aa、15 aa、16 aa、17 aa、18 aa、19 aa、または 20 aa) 長のペプチド断片である。
 【0229】

がん関連抗原のアミノ酸配列は、当該技術分野で既知である。例えば、MUC1 (GenBank CAA56734)、LMP2 (GenBank CAA47024)、HPV E6 (GenBank AAD33252)、HPV E7 (GenBank AHG99480)、EGFRvIII (GenBank NP_001333870)、HER - 2 / neu (GenBank AAI67147)、MAGE - A3 (GenBank AAH11744)、p53 (GenBank BAC16799)、NY - ESO - 1 (GenBank CAA05908)、PSMA (GenBank AAH25672)、CEA (GenBank AAA51967)、メラノ / MART1 (GenBank NP_005502)、Ras (GenBank NP_001123914)、gp100 (GenBank AAC60634)、bcr - abl (GenBank AAB60388)、チロシナーゼ (GenBank AAB60319)、サバ 40
 40

イピン (GenBank AAC51660)、PSA (GenBank CAD54617)、hTERT (GenBank BAC11010)、SSX (GenBank NP_001265620)、Eph2A (GenBank NP_004422)、PAP (GenBank AAH16344)、ML-IAP (GenBank AAH14475)、AFP (GenBank NP_001125)、EpCAM (GenBank NP_002345)、ERG (TMPRSS2 ETS融合) (GenBank ACA81385)、PAX3 (GenBank AAI01301)、ALK (GenBank NP_004295)、アンドロゲン受容体 (GenBank NP_000035)、サイクリンB1 (GenBank CAO99273)、MYCN (GenBank NP_001280157)、RhoC (GenBank AAH52808)、TRP-2 (GenBank AAC60627)、メソテリン (GenBank AAH09272)、PSCA (GenBank AAH65183)、MAGE A1 (GenBank NP_004979)、CYP1B1 (GenBank AAM50512)、PLAC1 (GenBank AAG22596)、BORIS (GenBank NP_001255969)、ETV6 (GenBank NP_001978)、NY-BR1 (GenBank NP_443723)、SART3 (GenBank NP_055521)、炭酸脱水酵素IX (GenBank EAW58359)、PAX5 (GenBank NP_057953)、OY-TES1 (GenBank NP_115878)、精子タンパク質17 (GenBank AAK20878)、LCK (GenBank NP_001036236)、HMW-MAA (GenBank NP_001888)、AKAP-4 (GenBank NP_003877)、SSX2 (GenBank CAA60111)、XAGE1 (GenBank NP_001091073)、XP_001125834、XP_001125856、及びXP_001125872)、B7H3 (GenBank NP_001019907、XP_947368、XP_950958、XP_950960、XP_950962、XP_950963、XP_950965、及びXP_950967)、LGMN1 (GenBank NP_001008530)、TIE-2 (GenBank NP_000450)、PAGE4 (GenBank NP_001305806)、VEGFR2 (GenBank NP_002244)、MAD-CT-1 (GenBank NP_005893 NP_056215)、FAP (GenBank NP_004451)、PDGF (GenBank NP_002600)、MAD-CT-2 (GenBank NP_001138574)、FOSL (GenBank NP_005429)、及びWT-1 (GenBank NP_000369)を参照されたい。これらのポリペプチドはまた、Cheever et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15:5323、及びその中で引用される参考文献、Wagner et al. (2003) J. Cell. Sci. 116:1653、Matsui et al. (1990) Oncogene 5:249、Zhang et al. (1996) Nature 383:168でも考察される。

【0230】

一部の事例では、該エピトープは、ウイルス、マイコプラズマ属 (例えば、Mycoplasma pneumoniae)、または細菌病原体等の感染症の病原体のエピトープである。一部の事例では、エピトープがウイルスエピトープである場合、該エピトープは、コアタンパク質、初期タンパク質、後期タンパク質、DNAもしくはRNAポリメラーゼ、または外殻タンパク質に由来する。例えば、一部の事例では、ウイルスエピトープは、パピローマウイルス (例えば、ヒトパピローマウイルス (HPV)) または肝炎ウイルス (例えば、肝炎Aウイルスまたは肝炎Bウイルス (HBV)) 由来のペプチドエピトープである。別の実施形態では、該エピトープは、サイトメガロウイルス (「CMV」) に由来する。

【0231】

ある実施形態では、該エピトープがHPVウイルスである場合、それはヒトパピローマ

初期タンパク質に由来する。かかる一実施形態では、該エピトープは、HPV E6ポリペプチド、HPV E7ポリペプチド、HPV 16初期タンパク質7 (HPV 16 E7) のアミノ酸82~90 (HPV 16 E7 / 82~90、LLMGTLGI V、配列番号80) に由来する。ある実施形態では、該エピトープは、HPV 16 E7のアミノ酸86~93 (TLGIVCPI、配列番号81) である。ある実施形態では、該エピトープは、HPV 16 E7のアミノ酸11~20 (YMLDLQPETT、配列番号82) である。ある実施形態では、該エピトープは、HPV 16 E7のアミノ酸11~19 (YMLDLQPETT、配列番号83) である。追加の好適なHPVエピトープについては、例えば、Ressing et al. ((1995) J. Immunol. 154: 5934) を参照されたい。

10

【0232】

一部の事例では、該エピトープは、肝炎Bウイルス (HBV) エピトープである。いくつかのHBVエピトープが当該技術分野で既知である。例えば、Desmond et al. (2008) Antiviral Therapy 13: 161、Lumley et al. (2016) Wellcome Open Res. 1: 9、及びKefalakes et al. (2015) Hepatology 62: 47を参照されたい。本開示のT細胞MMPエピトープコンジュゲートへの組み込みに好適なHBVペプチドは、HBV遺伝子型A、HBV遺伝子型B、HBV遺伝子型C、またはHBV遺伝子型Dを含めた種々のHBV遺伝子型のうちのいずれかに由来するHBVペプチドであり得る。本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、種々のHBV遺伝子型型のうちのいずれかに由来するHBVペプチドであり得る。本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、 5×10^{-9} Mで、少なくとも 10^{-9} M、 5×10^{-10} Mで、または少なくとも 10^{-10} Mの親和性で、MHC複合体に結合し得、MHC複合体と複合体化されたときにTCRによって結合される。

20

【0233】

本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、約4aa~約25aaの長さを有し得、例えば、該エピトープは、4aa~10aa、9aa~15aa、10aa~15aa、15aa~20aa、または20aa~25aaの長さを有し得る。例えば、本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa、または25aaの長さを有し得る。

30

【0234】

一部の事例では、本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、MHCクラスI拘束HBVペプチド (例えば、それは、特定のHLAクラスI対立遺伝子に拘束される) である。例えば、一部の事例では、本開示のT細胞MMPへの組み込みに好適なHBVペプチドは、HLA-A、例えば、HLA-A2、HLA-A11 (HLA-A*1101)、HLA-A*2402、またはHLA-A3303 (例えば、図3を参照されたい) に拘束される。別の例として、一部の事例では、本開示のT細胞MMPエピトープコンジュゲートへの組み込みに好適なHBVペプチドは、HLA-Bに拘束される。別の例として、一部の事例では、本開示のT細胞MMPエピトープコンジュゲートへの組み込みに好適なHBVペプチドは、HLA-Cに拘束される。

40

【0235】

本明細書に記載されるT細胞MMPエピトープコンジュゲートへの組み込みに好適なHBVペプチドの中には、HBVエンベロープペプチド、HBVプレコア/コアペプチド、ポリメラーゼペプチド、及びHBV X-タンパク質ペプチドがある。いくつかのHBVエピトープが当該技術分野で既知である。例えば、Desmond et al. (2008) Antiviral Therapy 13: 161、Lumley et al. (2016) Wellcome Open Res. 1: 9、及びKefalakes

50

et al. (2015) Hepatology 62:47を参照されたい。本開示のT細胞MMPエピトープコンジュゲートへの組み込みに好適なHBVペプチドは、少なくとも 10^{-7} M、少なくとも 10^{-8} M、 5×10^{-9} Mで、少なくとも 10^{-9} M、 5×10^{-10} Mで、または少なくとも 10^{-10} Mの親和性で、MHCクラスI複合体に結合し得、MHC複合体と複合体化されたときにTCRによって結合される。本明細書に提供されるHBVエピトープの表は、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに組み込まれるエピトープペプチドの全てまたは一部を形成し得るペプチド配列を含有する、HBVエピトープの非限定的な実施形態を挙げる。

HBVエピトープの表

【表4】

番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号	番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号
1	HBVコアタンパク質由来のFLPSDFFP SV	10～12	84	26	ATVELLSFL-PSDFFP SV	17～19	109
2	HBVポリメラーゼ由来のGLSRYVARLG	10～12	85	27	LP SDFFP SV	9～11	110
3	HBVポリメラーゼ由来のKLHL YSHPI	9～11	86	28	CLTFGRETV	9～11	111

10

20

番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号	番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号
4	H B V ポリメラー ゼ由来の F L L S	9 ~ 1 1	8 7	2	V L E Y L V S F G V	1 0 ~ 1 2	1 1 2
5	H B V ポリメラー ゼ由来の A L M P L Y A C I	9 ~ 1 1	8 8	3	E Y L V S F G V W	9 ~ 1 1	1 1 3
6	H B V ポリメラー ゼ由来の S L Y A D S P S V	9 ~ 1 1	8 9	3	I L S T L P E T T V	1 0 ~ 1 2	1 1 4
7	S T L P E T T V V	9 ~ 1 1	9 0	3	S T L P E T T V V R R	1 1 - 1 3	1 1 5
8	L I M P A R F Y P K	1 0 ~ 1 2	9 1	3	N V S I P W T H K	9 ~ 1 1	1 1 6
9	A I M P A R F Y P K	1 0 ~ 1 2	9 2	3	K V G N F T G L Y	9 ~ 1 1	1 1 7
1 0	Y V N V N M G L K	9 ~ 1 1	9 3	3	G L Y S S T V P V		1 1 8
1 1	P L G F F P D H	8 ~ 1 0	9 4	3	T L W K A G I L Y K	1 0 ~ 1 2	1 1 9
1 2	M Q W N S T A L H - Q A L Q D P	1 5 ~ 1 7	9 5	3	T P A R V T G G V F	1 0 ~ 1 2	1 2 0
1 3	L L D P R V R G L	9 ~ 1 1	9 6	3	L V V D F S Q F S R	1 0 ~ 1 2	1 2 1
1 4	S I L S K T G D P V	1 0 ~ 1 2	9 7	3	G L S R Y V A R L	9 ~ 1 1	1 2 2
1 5	V L Q A G F F L L	9 ~ 1 1	9 8	4	S I A C S V V R R	9 ~ 1 1	1 2 3
1 6	F L L T R I L T I	9 ~ 1 1	9 9	4	Y M D D V V L G A	9 ~ 1 1	1 2 4
1 7	F L G G T P V C L	9 ~ 1 1	1 0 0	4	Q A F T F S P T Y K	9 ~ 1 1	1 2 5
1 8	L L C L I F L L V	9 ~ 1 1	1 0 1	4	K Y T S F P W L L	9 ~ 1 1	1 2 6
1 9	L V L L D Y Q G M L	1 0 ~ 1 1	1 0 2	4	I L R G T S F V Y V	1 0 ~ 1 2	1 2 7
2 0	L L D Y Q G M L P V	1 0 ~ 1 2	1 0 3	4	H L S L R G L F V	9 ~ 1 1	1 2 8
2 1	I P I P S S W A F	9 ~ 1 1	1 0 4	4	V L H K R T L G L	9 ~ 1 1	1 2 9
2	W L S L L V P F	9 ~ 1 1	1 0	4	G L S A M S T	1 0 ~ 1	1 3

10

20

30

40

番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号	番号	配列	a a 残基 単位での 長さ	配列 番号
2	V		5	7	TDL	2	0
2	GLSPTVWL	10 ~ 1	10	4	CLFKDWE	9 ~ 11	13
3	SV	2	6	8	EL		1
2	SIVSPFIP	9 ~ 11	10	4	VLGGCRH	9 ~ 11	13
4	LL		7	9	KL		2
2	ILSPFLPL	9 ~ 11	10	5	STLPETT	9 ~ 11	16
5	L		8	0	VV		7

10

【0236】

I. G. 免疫調節ポリペプチド (MOD)

好適なMODポリペプチドが、同種MODに対して低減された親和性を呈するドメインとして、T細胞MMPに組み込まれてもよい。MODポリペプチドは、野生型免疫調節ドメインから1aa~10aaの差異を有し得る。例えば、一部の事例では、本開示のT細胞MMPに存在するバリエーションMODポリペプチドは、アミノ酸配列において、対応する野生型MODから、例えば、1aa、2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、または20aa（例えば、1aa~5aa、5aa~10aa、または10aa~20aa）だけ異なってもよい。例として、一部の事例では、本開示のT細胞MMPに存在するバリエーションMODポリペプチドは、対応する参照（例えば、野生型）MODと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個（例えば、1~5、2~5、3~5、5~10、または10~20個）のアミノ酸置換を有し、及び/またはそれを含む。一部の事例では、T細胞MMPに存在するバリエーションMODポリペプチドは、対応する参照（例えば、野生型）MODと比較して、単一アミノ酸置換を含む。一部の事例では、T細胞MMPに存在するバリエーションMODは、対応する野生型参照（例えば、野生型MOD）と比べて、1~2個のaa置換、1~3個のaa置換、1~4個のaa置換、1~5個のaa置換、1~6個のaa置換、1~7個のaa置換、1~8個のaa置換、1~9個のaa置換、1~10個のaa置換、1~11個のaa置換、1~12個のaa置換、1~13個のaa置換、1~14個のaa置換、1~15個のaa置換、1~16個のaa置換、1~17個のaa置換、1~18個のaa置換、1~19個のaa置換、または1~20個のaa置換を含む。

20

30

【0237】

上記で考察されたように、本開示のT細胞MMP（及び/またはそれらのエピトープコンジュゲート）への、ドメイン（MODポリペプチド）としての組み込みに好適なバリエーションMODは、同種MODに対して、対応する野生型MODの同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈するものを含む。好適なバリエーションMODは、例えば、走査型変異誘発（例えば、アラニン、セリン、またはグリシン走査型変異誘発）等の変異誘発によって識別することができる。

40

【0238】

例となるMODと同種MODとの対には、以下の表に列挙されるエントリ（a）~（r）が含まれるが、これらに限定されない。

例となるMODと同種MODとの対

【表 5】

a) 4-1 BBL (MOD) と 4-1 BB (同種MOD)、	k) CD40 (MOD) と CD40L (同種MOD)、
b) PD-L1 (MOD) と PD1 (同種MOD)、	l) CD83 (MOD) と CD83L (同種MOD)、
c) IL-2 (MOD) と IL-2 受容体 (同種MOD)、	m) HVEM (CD270) (MOD) と CD160 (同種MOD)、
d) CD80 (MOD) と CD28 (同種MOD)、	n) JAG1 (CD339) (MOD) と Notch (同種MOD)、
e) CD86 (MOD) と CD28 (同種MOD)、	o) JAG1 (CD339) (MOD) と CD46 (同種MOD)、
f) OX40L (CD252) (MOD) と OX40 (CD134) (同種MOD)、	p) CD70 (MOD) と CD27 (同種MOD)、
g) Fas リガンド (MOD) と Fas (同種MOD)、	q) CD80 (MOD) と CTLA4 (同種MOD)、及び
h) ICOS-L (MOD) と ICOS (同種MOD)、	r) CD86 (MOD) と CTLA4 (同種MOD)
i) ICAM (MOD) と LFA-1 (同種MOD)、	
j) CD30L (MOD) と CD30 (同種MOD)、	

10

20

【0239】

一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP に存在するバリエーション MOD は、同種 MOD に対して、100 nM ~ 100 μM である結合親和性を有する。例えば、一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP (またはそのエピトープコンジュゲート) に存在するバリエーション MOD ポリペプチドは、同種 MOD に対して、約 100 nM ~ 約 150 nM、約 100 nM ~ 約 500 nM、約 150 nM ~ 約 200 nM、約 200 nM ~ 約 250 nM、約 250 nM ~ 約 300 nM、約 300 nM ~ 約 350 nM、約 350 nM ~ 約 400 nM、約 400 nM ~ 約 500 nM、約 500 nM ~ 約 600 nM、約 500 nM ~ 約 1 μM、約 600 nM ~ 約 700 nM、約 700 nM ~ 約 800 nM、約 800 nM ~ 約 900 nM、約 900 nM ~ 約 1 μM、約 1 μM ~ 約 5 μM、約 1 μM ~ 約 25 μM、約 5 μM ~ 約 10 μM、約 10 μM ~ 約 15 μM、約 15 μM ~ 約 20 μM、約 20 μM ~ 約 25 μM、約 25 μM ~ 約 50 μM、約 25 μM ~ 約 100 μM、約 50 μM ~ 約 75 μM、または約 75 μM ~ 約 100 μM である結合親和性を有する (例えば、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートは、同種 MOD に対して結合親和性を有するバリエーション MOD を含む)。

30

40

【0240】

I . G . 1 野生型及びバリエーション PD-L1 MOD

1 つの非限定的な例として、一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP に存在するバリエーション MOD ポリペプチドは、バリエーション PD-L1 ポリペプチドである。野生型 PD-L1 は、PD1 に結合する。

【0241】

野生型ヒト PD-L1 ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含み得る。MRIFAVFI FMTYWHLLNAFT VTPPKDLYVV EYGSNM TIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNII IQFVHG EEDLK VQHS S YRQRARLLKD QLS LGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCM

50

ISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVD PVTSE H
ELTCQAEGY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREE
KL FNVSTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE L
VIPGNI LNVSIKICLT LSPST (配列番号13)。

【0242】

野生型ヒトPD-L1外部ドメインは、以下のアミノ酸配列を含み得る。FT VTV
PKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGN
AALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NA
PYNKINQR ILVVD PVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTS
S DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTSTLRIN TTTNE
IFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPGNI LNVSIKI (配列番号
14)。

10

【0243】

野生型PD-1ポリペプチド(NCBI受託番号NP_005009.2、aas21
~288)は、以下のアミノ酸配列を含み得る。PGWFLDSPDR PWNPTTF
SPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPS
NQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV
VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTE
RRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LV
LLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVF
S VDYGE LDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPS
GMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番
号15)。

20

【0244】

一部の事例では、MODポリペプチドとして採用され得る、バリエーションPD-L1ポリ
ペプチドは、その同種MOD PD-1 (例えば、配列番号15に記載されるアミノ酸配
列を含むPD-1ポリペプチド)に対して、配列番号13または配列番号14に記載され
るアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペプチドの結合親和性と比較して低減された結合親
和性を呈する。例えば、ある実施形態では、本開示のバリエーションPD-L1ポリペプチド
は、配列番号13または配列番号14に記載されるアミノ酸配列を含むPD-L1ポリペ
プチドの結合親和性よりも少なくとも10%低い、少なくとも15%低い、少なくとも2
0%低い、少なくとも25%低い、少なくとも30%低い、少なくとも35%低い、少な
くとも40%低い、少なくとも45%低い、少なくとも50%低い、少なくとも55%低
い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも
75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少
なくとも95%低い、または95%超低結合親和性で、PD-1 (例えば、配列番号1
5に記載されるアミノ酸配列を含むPD-1ポリペプチド)に結合する。

30

【0245】

ある実施形態では、バリエーションPD-L1ポリペプチドは、PD-1に対して、1nM
~1μMである結合親和性を有する。一部の事例では、本開示のバリエーションPD-L1
ポリペプチドは、PD-1に対して、100nM~100μMである結合親和性を有する。
別の例として、一部の事例では、バリエーションPD-L1ポリペプチドは、PD1 (例えば
、配列番号15に記載されるアミノ酸配列を含むPD1ポリペプチド)に対して、約10
0nM~約150nM、約150nM~約200nM、約200nM~約250nM、約
250nM~約300nM、約300nM~約350nM、約350nM~約400nM
、約400nM~約500nM、約500nM~約600nM、約600nM~約700
nM、約700nM~約800nM、約800nM~約900nM、約900nM~約1
μM、約1μM~約5μM、約5μM~約10μM、約10μM~約15μM、約15μ
M~約20μM、約20μM~約25μM、約25μM~約50μM、約50μM~約7

40

50

5 μ M、または約 75 μ M ~ 約 100 μ M である結合親和性を有する。

【0246】

一部の事例では、バリエーション PD-L1 ポリペプチドは、配列番号 1 または配列番号 2 に記載される PD-L1 アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーション PD-L1 ポリペプチドは、配列番号 13 または配列番号 14 に記載される PD-L1 アミノ酸配列と比較して、2 ~ 10 個のアミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーション PD-L1 ポリペプチドは、配列番号 13 または配列番号 14 に記載される PD-L1 アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸置換を有する。

【0247】

好適な PD-L1 バリエーションには、以下のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0248】

【化 5】

FT VTVPK~~X~~LYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AAL
IVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLK
D QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYK
RITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTS
LRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVI PGNI L
NVS I K I (配列番号 14)

(ここで、X は、Asp 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、Ala である。一部の事例では、X は、Arg である。

【0249】

好適な PD-L1 バリエーションには、以下のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0250】

【化 6】

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AAL
~~X~~VYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLK
D QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYK
RITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTS
LRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVI PGNI L
NVS I K I (配列番号 14)

(ここで、X は、Ile 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、Asp である。

【0251】

好適な PD-L1 バリエーションには、以下のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0252】

【化 7】

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AAL
 IVYWEME DKNIIQFVHG E~~X~~DLKVQHSS YRQRARLLK
 D QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYK
 RITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
 PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVST
 LRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPGNI L
 NVSIKI (配列番号14)

10

(ここで、Xは、Glu以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Argである。

【0253】

I . G . 2 野生型及びバリエーションCD80 MOD

一部の事例では、本開示のT細胞MMPに存在するバリエーションMODポリペプチドは、バリエーションCD80ポリペプチドである。野生型CD80は、CD28に結合する。

【0254】

ヒトCD80の外部ドメインの野生型アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

【0255】

VIHVTKEVKEVATLSC GHNVSV EELA QTRIYWQKEK
 K M V L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V I L A L R
 P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V T L S V K A D F P
 T P S I S D F E I P T S N I R R I I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E
 E L N A I N T T V S Q D P E T E L Y A V S S K L D F N M T T N H S F M C
 L I K Y G H L R V N Q T F N W N T T K Q E H F P D N (配列番号16)。

20

【0256】

野生型CD28アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。MLRLLLLALNL F P
 S I Q V T G N K I L V K Q S P M L V A Y D N A V N L S C K Y S Y N L F S R
 E F R A S L H K G L D S A V E V C V V Y G N Y S Q Q L Q V Y S K T G F N
 C D G K L G N E S V T F Y L Q N L Y V N Q T D I Y F C K I E V M Y P P P
 Y L D N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L F P G P S K P F W V L V V
 V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M N M
 T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S (配列番号17)。一部の
 事例では、本開示のT細胞MMPがバリエーションCD80ポリペプチドを含む場合、同種M
 ODは、配列番号18のアミノ酸配列を含むCD28ポリペプチドである。

30

【0257】

野生型CD28アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。MLRLLLLALNL F P
 S I Q V T G N K I L V K Q S P M L V A Y D N A V N L S W K H L C P S P L F
 P G P S K P F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K
 R S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y
 R S (配列番号17)。

40

【0258】

野生型CD28アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。MLRLLLLALNL F P
 S I Q V T G K H L C P S P L F P G P S K P F W V L V V V G G V L A C Y S L
 L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K
 H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S (配列番号19)。

【0259】

一部の事例では、バリエーションCD80ポリペプチドは、CD28に対して、配列番号16に記載されるアミノ酸配列を含むCD80ポリペプチドのCD28に対する結合親和性と比較して低減された結合親和性を呈する。例えば、一部の事例では、バリエーションCD8

50

0 ポリペプチドは、配列番号 16 に記載されるアミノ酸配列を含む CD80 ポリペプチドの CD28 (例えば、配列番号 17、18、または 19 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む CD28 ポリペプチド) に対する結合親和性よりも少なくとも 10 % 低い、少なくとも 15 % 低い、少なくとも 20 % 低い、少なくとも 25 % 低い、少なくとも 30 % 低い、少なくとも 35 % 低い、少なくとも 40 % 低い、少なくとも 45 % 低い、少なくとも 50 % 低い、少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70 % 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なくとも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で、CD28 に結合する。

【0260】

一部の事例では、バリエーション CD80 ポリペプチドは、CD28 に対して、100 nM ~ 100 μM である結合親和性を有する。別の例として、一部の事例では、本開示のバリエーション CD80 ポリペプチドは、CD28 (例えば、配列番号 17、配列番号 18、または配列番号 19 に記載されるアミノ酸配列を含む CD28 ポリペプチド) に対して、約 100 nM ~ 150 nM、約 150 nM ~ 約 200 nM、約 200 nM ~ 約 250 nM、約 250 nM ~ 約 300 nM、約 300 nM ~ 約 350 nM、約 350 nM ~ 約 400 nM、約 400 nM ~ 約 500 nM、約 500 nM ~ 約 600 nM、約 600 nM ~ 約 700 nM、約 700 nM ~ 約 800 nM、約 800 nM ~ 約 900 nM、約 900 nM ~ 約 1 μM、約 1 μM ~ 約 5 μM、約 5 μM ~ 約 10 μM、約 10 μM ~ 約 15 μM、約 15 μM ~ 約 20 μM、約 20 μM ~ 約 25 μM、約 25 μM ~ 約 50 μM、約 50 μM ~ 約 75 μM、または約 75 μM ~ 約 100 μM である結合親和性を有する。

【0261】

一部の事例では、バリエーション CD80 ポリペプチドは、配列番号 16 に記載される CD80 アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーション CD80 ポリペプチドは、配列番号 16 に記載される CD80 アミノ酸配列と比較して、2 ~ 10 個のアミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーション CD80 ポリペプチドは、配列番号 16 に記載される CD80 アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸置換を有する。

【0262】

いくつかの好適な CD80 バリエーションには、以下のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % (20 個未満の置換)、少なくとも 95 % (10 個未満の置換)、少なくとも 97 % (6 個未満の置換)、少なくとも 98 % (4 個未満の置換)、少なくとも 99 % (2 個未満の置換)、または少なくとも 99.5 % (1 個の置換) のアミノ酸配列同一性の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0263】

【化 8】

VIHVTK EVKEVATLSC GH^XVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 16)

(ここで、X は、Asn 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、Ala である。

【0264】

【化 9】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDIT~~X~~NLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

10

(ここで、Xは、Asn以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0265】

【化 10】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS ~~X~~IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

20

(ここで、Xは、Ile以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0266】

【化 11】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVL~~X~~ YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

30

(ここで、Xは、Lys以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0267】

【化 12】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS ~~X~~DPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

40

50

(ここで、Xは、G l n以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l aである。

【0268】

【化13】

VIHVTKEVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QXPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

10

(ここで、Xは、A s p以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l aである。

【0269】

【化14】

VIHVTKEVKEVATLSC GHNVSVEEXA QTRIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

20

(ここで、Xは、L e u以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l aである。

【0270】

【化15】

VIHVTKEVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

30

(ここで、Xは、T y r以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l aである。

【0271】

40

【化 1 6】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYW~~X~~KEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

10

(ここで、Xは、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【 0 2 7 2】

【化 1 7】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
K~~X~~VLTMMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

20

(ここで、Xは、M e t 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【 0 2 7 3】

【化 1 8】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KM~~X~~LTMMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

30

(ここで、Xは、V a l 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【 0 2 7 4】

【化 1 9】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MN~~X~~WPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
6)

40

(ここで、Xは、I l e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a

50

である。

【0275】

【化20】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEXKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

10

(ここで、Xは、Tyr以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0276】

【化21】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFXITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
FPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

20

(ここで、Xは、Asp以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0277】

【化22】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK
KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
XPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号1
6)

30

(ここで、Xは、Phe以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0278】

40

【化 2 3】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSV EELA QTRIYWQKEK
 KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
 RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
 FPTPSISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
 NGE ELNAINTTV \mathbf{X} QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
 SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
 6)

10

(ここで、 \mathbf{X} は、Ser 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 \mathbf{X} は、Ala である。

【0 2 7 9】

【化 2 4】

VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSV EELA QTRIYWQKEK
 KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILAL
 RPSD EGTYESCVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA D
 FPT \mathbf{X} SISDF EIPTSNIIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLE
 NGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NH
 SFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (配列番号 1
 6)

20

(ここで、 \mathbf{X} は、Pro 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 \mathbf{X} は、Ala である。

【0 2 8 0】

I . G . 3 野生型及びバリエーション CD 8 6 MOD

一部の实例では、本開示の T 細胞 MMP に存在するバリエーション MOD ポリペプチドは、バリエーション CD 8 6 ポリペプチドである。野生型 CD 8 6 は、CD 2 8 に結合する。

【0 2 8 1】

野生型ヒト CD 8 6 の全外部ドメインのアミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

30

【化 2 5】

PLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVVFWDQENL
 VLNEVYLGKEKFDSVHSKYM \mathbf{N} RTSF \mathbf{D} S \mathbf{D} S \mathbf{W} TLRLHNLQI
 KDKGLYQCI \mathbf{I} H \mathbf{H} KKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEI
 VPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTI
 EYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCI
 LETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号 2 0)

40

【0 2 8 2】

野生型ヒト CD 8 6 の Ig V ドメインのアミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

【化 2 6】

PLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVVFWDQENL
 VLNEVYLGKEKFDSVHSKYM \mathbf{N} RTSF \mathbf{D} S \mathbf{D} S \mathbf{W} TLRLHNLQI
 KDKGLYQCI \mathbf{I} H \mathbf{H} KKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 2 1)

【0 2 8 3】

50

一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、CD28に対して、配列番号20または配列番号21に記載されるアミノ酸配列を含むCD86ポリペプチドのCD28に対する結合親和性と比較して低減された結合親和性を呈する。例えば、一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号20または配列番号21に記載されるアミノ酸配列を含むCD86ポリペプチドのCD28（例えば、配列番号17、18、または19のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含むCD28ポリペプチド）に対する結合親和性よりも少なくとも10%低い、少なくとも15%低い、少なくとも20%低い、少なくとも25%低い、少なくとも30%低い、少なくとも35%低い、少なくとも40%低い、少なくとも45%低い、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性で、CD28に結合する。

10

【0284】

一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、CD28に対して、100nM～100μMである結合親和性を有する。別の例として、一部の事例では、本開示のバリエーションCD86ポリペプチドは、CD28（例えば、配列番号17、18、または19のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含むCD28ポリペプチド）に対して、約100nM～150nM、約150nM～約200nM、約200nM～約250nM、約250nM～約300nM、約300nM～約350nM、約350nM～約400nM、約400nM～約500nM、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、約900nM～約1μM、～約1μM～約5μM、約5μM～約10μM、約10μM～約15μM、約15μM～約20μM、約20μM～約25μM、約25μM～約50μM、約50μM～約75μM、または約75μM～約100μMである結合親和性を有する。

20

【0285】

一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号20に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号20に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、2～10個のアミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号20に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換を有する。

30

【0286】

一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号21に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号21に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、2～10個のアミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションCD86ポリペプチドは、配列番号21に記載されるCD86アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換を有する。

【0287】

好適なCD86バリエーションには、以下のアミノ酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

40

【0288】

【化 27】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMN~~X~~RTSFDSWSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISSLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

(ここで、Xは、Asn以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala 10
である。

【0289】

【化 28】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSF~~X~~SDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISSLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

20

(ここで、Xは、Asp以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0290】

【化 29】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS~~X~~TLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISSLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

30

(ここで、Xは、Trp以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0291】

【化 30】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDSWSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIH~~X~~KKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISSLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

40

(ここで、Xは、His以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0292】

【化 3 1】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMXRTSFDSDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)
 (ここで、Xは、Asn以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

【0293】

【化 3 2】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSF~~X~~SDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)
 (ここで、Xは、Asp以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

【0294】

【化 3 3】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDS~~X~~TLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)
 (ここで、Xは、Trp以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

【0295】

【化 3 4】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIH~~X~~KKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)
 (ここで、Xは、His以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

【0296】

【化 3 5】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 L~~X~~LNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
 IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
 IEYDGMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFC
 ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号 20)
 (ここで、Xは、Val以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

【0297】

【化 3 6】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
 L~~X~~LNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)
 (ここで、Xは、Val以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
 である。

である。

【0298】

【化37】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFW~~X~~DQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFDPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

10

(ここで、Xは、Gln以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0299】

【化38】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFW~~X~~DQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号20)

20

(ここで、Xは、Gln以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0300】

【化39】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVV~~X~~WQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFDPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

30

(ここで、Xは、Phe以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0301】

【化40】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVV~~X~~WQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号20)

40

(ここで、Xは、Phe以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0302】

【化 4 1】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVH SKYMNRTSFDSDSWT~~X~~RLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFDPDVT SNMTIFC

I LETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号 20)

10

(ここで、Xは、Leu以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0303】

【化 4 2】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVH SKYMNRTSFDSDSWT~~X~~RLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)

(ここで、Xは、Leu以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

20

【0304】

【化 4 3】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVH SK~~X~~MNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFDPDVT SNMTIFC
I LETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号 20)

30

(ここで、Xは、Tyr以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0305】

【化 4 4】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVH SK~~X~~MNRTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号 20)

(ここで、Xは、Tyr以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

40

【0306】

【化 4 5】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVH SKYMX~~1~~RTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIH~~X~~₂KKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFDPDVT SNMTIFC
I LETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号 20)

50

(ここで、 X_1 は、 Asn 以外の任意のアミノ酸であり、第 2 の X_2 は、 His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 及び X_2 は両方とも、 Ala である。

【0307】

【化46】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYM X_1 RTSFDSDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIH X_2 KKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号20)

(ここで、 X_1 は、 Asn 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、 His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 及び X_2 は両方とも、 Ala である。

10

【0308】

【化47】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRRTSF X_1 SDSWTLRLHNLQ

IKDKGLYQCIIH X_2 KKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

20

(ここで、 X_1 は、 Asp 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、 His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、 Ala であり、かつ X_2 は、 Ala である。

【0309】

【化48】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRRTSF X_1 SDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIH X_2 KKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号20)

30

(ここで、 X_1 は、 Asn 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、 His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 及び X_2 は両方とも、 Ala である。

【0310】

【化49】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNNQSLSELVVFWQDQEN
LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYM X_1 RTSF X_2 SDSWTLRLHNLQ
IKDKGLYQCIIH X_3 KKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPE
IVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNST
IEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFC
ILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPPDHIP (配列番号20)

40

(ここで、 X_1 は、 Asn 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、 Asp 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、 His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、 Ala であり、 X_2 は、 Ala であり、かつ X_3 は、 Ala である。

【0311】

【化50】

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSSELVVFWQDQEN
 LVLNEVYLGKEKFDSVHSKYM~~X~~1RTSF~~X~~2SDSWTLRLHNLQ
 IKDKGLYQCI~~I~~H~~X~~3KKPTGMIRIHQMNSELSVL (配列番号21)

(ここで、X₁は、Asn以外の任意のアミノ酸であり、X₂は、Asp以外の任意のアミノ酸であり、X₃は、His以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、X₁は、Alaであり、X₂は、Alaであり、かつX₃は、Alaである。

【0312】

I . G . 4 野生型及びバリエーション4 - 1 B B L MOD

10

一部の实例では、本開示のT細胞MMPに存在するバリエーションMODポリペプチドは、バリエーション4 - 1 B B Lポリペプチドである。野生型4 - 1 B B Lは、4 - 1 B B (C D 1 3 7) に結合する。

【0313】

野生型4 - 1 B B Lアミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

【化51】

MEYASDASLD

PEAPWPPAPR ARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLA C

20

PWAVSGARA SPGSAASPR L REGPELSPDD PAGLLDL
 RQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TG
 GLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGS
 GS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EAR
 NSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHLHTEA RARHAWQLT

Q GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番号22)

【0314】

一部の实例では、バリエーション4 - 1 B B Lポリペプチドは、ヒト4 - 1 B B Lの腫瘍壊死因子(TNF)相同性ドメイン(THD)のバリエーションである。

30

【0315】

ヒト4 - 1 B B LのTHDの野生型アミノ酸配列は、例えば、以下のような配列番号23 ~ 25のうちの1つであり得る。

【0316】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAG
 VSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVV
 AGE GSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS
 EARN S AFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHLHTEA RARHAW
 QLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番号23)、

40

【0317】

D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGL
 AGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
 VVAGE GSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPA
 SS EARN S AFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHLHTEA RARH
 AWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番号24)
)、または

【0318】

D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGL
 AGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R

50

V V A G E G S G S V S L A L H L Q P L R S A A G A A A L A L T V D L P P A
S S E A R N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H
A W Q L T Q G A T V L G L F R V T P E I P A (配列番号 25) 。

【 0319 】

野生型 4 - 1 B B アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。M G N S C Y N I V A T
L L L V L N F E R T R S L Q D P C S N C P A G T F C D N N R N Q I C S P C
P P N S F S S A G G Q R T C D I C R Q C K G V F R T R K E C S S T S N A
E C D C T P G F H C L G A G C S M C E Q D C K Q G Q E L T K K G C K D C
C F G T F N D Q K R G I C R P W T N C S L D G K S V L V N G T K E R D V V
C G P S P A D L S P G A S S V T P P A P A R E P G H S P Q I I S F F L A
L T S T A L L F L L F F L T L R F S V V K R G R K K L L Y I F K Q P F M R
P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L (配列番号 26) 。

一部の
実例では、本開示の T 細胞 MMP がバリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドを含む場合、同
種 MOD は、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む 4 - 1 B B ポリペプチドである。

10

【 0320 】

一部の事例では、バリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、4 - 1 B B に対して、配列
番号 22 ~ 25 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む 4 - 1 B B L ポリペプチド
の結合親和性と比較して低減された結合親和性を呈する。例えば、一部の事例では、本開
示のバリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、同じ条件下でアッセイされたとき、配列番
号 22 ~ 25 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む 4 - 1 B B L ポリペプチドの
4 - 1 B B ポリペプチド (例えば、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む 4 - 1
B B ポリペプチド) に対する結合親和性よりも少なくとも 10 % 低い、少なくとも 15 %
低い、少なくとも 20 % 低い、少なくとも 25 % 低い、少なくとも 30 % 低い、少なくと
も 35 % 低い、少なくとも 40 % 低い、少なくとも 45 % 低い、少なくとも 50 % 低い、
少なくとも 55 % 低い、少なくとも 60 % 低い、少なくとも 65 % 低い、少なくとも 70
% 低い、少なくとも 75 % 低い、少なくとも 80 % 低い、少なくとも 85 % 低い、少なく
とも 90 % 低い、少なくとも 95 % 低い、または 95 % 超低い結合親和性で、4 - 1 B B
に結合する。

20

【 0321 】

一部の事例では、バリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、4 - 1 B B に対して、10
nM ~ 100 μM である結合親和性を有する。別の例として、一部の事例では、バリア
ント 4 - 1 B B L ポリペプチドは、4 - 1 B B (例えば、配列番号 26 に記載されるアミ
ノ酸配列を含む 4 - 1 B B ポリペプチド) に対して、約 100 nM ~ 150 nM、約 15
0 nM ~ 約 200 nM、約 200 nM ~ 約 250 nM、約 250 nM ~ 約 300 nM、約
300 nM ~ 約 350 nM、約 350 nM ~ 約 400 nM、約 400 nM ~ 約 500 nM
、約 500 nM ~ 約 600 nM、約 600 nM ~ 約 700 nM、約 700 nM ~ 約 800
nM、約 800 nM ~ 約 900 nM、約 900 nM ~ 約 1 μM、~ 約 1 μM ~ 約 5 μM、
約 5 μM ~ 約 10 μM、約 10 μM ~ 約 15 μM、約 15 μM ~ 約 20 μM、約 20 μM
~ 約 25 μM、約 25 μM ~ 約 50 μM、約 50 μM ~ 約 75 μM、または約 75 μM ~
約 100 μM である結合親和性を有する。

30

40

【 0322 】

一部の事例では、バリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、配列番号 22 ~ 25 のうち
の 1 つに記載される 4 - 1 B B L アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。
一部の事例では、バリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、配列番号 22 ~ 25 のうちの
1 つに記載される 4 - 1 B B L アミノ酸配列と比較して、2 ~ 10 個のアミノ酸置換を有
する。一部の事例では、バリエーション 4 - 1 B B L ポリペプチドは、配列番号 22 ~ 25 の
うちの 1 つに記載される 4 - 1 B B L アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7
、8、9、または 10 個のアミノ酸置換を有する。

【 0323 】

好適な 4 - 1 B B L バリエーションには、以下のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つに対し

50

て少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0324】

【化52】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYXEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

(ここで、Xは、Lys以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0325】

【化53】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWXLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

(ここで、Xは、Gln以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0326】

【化54】

PAGLLDLRQG XFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

(ここで、Xは、Met以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Alaである。

【0327】

【化55】

PAGLLDLRQG MXXAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

(ここで、Xは、Phe以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala

である。

【0328】

【化56】

PAGLLDLRQG MFA~~X~~LVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

10

(ここで、Xは、Gln以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0329】

【化57】

PAGLLDLRQG MFAQ~~X~~VVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

20

(ここで、Xは、Leu以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0330】

【化58】

PAGLLDLRQG MFAQL~~X~~AQNV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

30

(ここで、Xは、Val以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0331】

【化59】

PAGLLDLRQG MFAQLVA~~X~~NV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

40

(ここで、Xは、Gln以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、Alaである。

【0332】

50

【化 6 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQXV LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、A s n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【 0 3 3 3】

【化 6 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQN~~X~~ LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、V a l 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 3 4】

【化 6 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV ~~X~~LLIDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 3 5】

【化 6 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV L~~X~~IDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 3 6】

【化 6 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLXDGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、I l e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【0 3 3 7】

【化 6 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLI XGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、A s p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 3 8】

【化 6 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLID XPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 3 9】

【化 6 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGG XLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、P r o 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 4 0】

【化 6 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPXSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【 0 3 4 1】

【化 6 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLXWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 4 2】

【化 7 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSX Y SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、T r p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 4 3】

【化 7 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWX SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、T y r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 4 4】

【化 7 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY **X**DPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、X は、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a 10
である。

【0 3 4 5】

【化 7 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY **SX**PGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番

20

号 2 3)

(ここで、X は、A s p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 4 6】

【化 7 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY **SDX**GLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、X は、P r o 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 4 7】

【化 7 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY **SDP****X**LA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、X は、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 4 8】

【化 7 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGXA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【0 3 4 9】

【化 7 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
XVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 0】

【化 7 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GXSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、V a l 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 1】

【化 7 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVXL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 2】

【化 8 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GV~~S~~ TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、X は、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a 10
である。

【 0 3 5 3】

【化 8 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL ~~X~~GGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、X は、T h r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【 0 3 5 4】

【化 8 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL T~~X~~GGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、X は、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【 0 3 5 5】

【化 8 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TG~~X~~L SYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、X は、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【 0 3 5 6】

【化 8 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGXSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

10

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 7】

【化 8 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLXYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 8】

【化 8 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSXKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、T y r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【0 3 5 9】

【化 8 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKXDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、G l u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、Xは、A l a
である。

【0 3 6 0】

【化 8 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKE~~X~~T KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、A s p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【0 3 6 1】

【化 8 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKED~~X~~ KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、T h r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 6 2】

【化 9 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT ~~X~~ELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、L y s 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 6 3】

【化 9 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT K~~X~~LVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、G l u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 6 4】

10

20

30

40

【化 9 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYV~~X~~FQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、X は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

10

【0 3 6 5】

【化 9 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVF~~X~~QLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、X は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 6 6】

【化 9 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFF~~X~~LELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番

30

号 2 3)

(ここで、X は、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 6 7】

【化 9 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQ~~X~~ELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、X は、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a
である。

【0 3 6 8】

【化 9 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLXLR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、G l u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

10

【 0 3 6 9】

【化 9 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLEXR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 7 0】

【化 9 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELX R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、A r g 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 7 1】

【化 9 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR X
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、A r g 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 7 2】

【化100】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
XVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

(ここで、Xは、Val以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

10

【0373】

【化101】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VXAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

20

(ここで、Xは、Val以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0374】

【化102】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAXEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

30

(ここで、Xは、Gly以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0375】

【化103】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGXGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号23)

40

(ここで、Xは、Glu以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0376】

【化 1 0 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEXSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a 10
である。

【 0 3 7 7】

【化 1 0 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGXGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 7 8】

【化 1 0 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVXLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、A s p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 7 9】

【化 1 0 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDXPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 8 0】

【化 1 0 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLX
P ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、Pro以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

10

【0 3 8 1】

【化 1 0 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
AXS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、Ser以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 3 8 2】

【化 1 1 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASX EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、Ser以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 3 8 3】

【化 1 1 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS XARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、Glu以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 3 8 4】

【化 1 1 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EA~~X~~NSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、A r g 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

10

【 0 3 8 5】

【化 1 1 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EAR~~X~~SAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、A s n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 8 6】

【化 1 1 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARN~~X~~AFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、S e r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 8 7】

【化 1 1 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARN~~S~~A~~X~~GFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番

40

号 2 3)

(ここで、Xは、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【 0 3 8 8】

【化 1 1 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAG~~X~~ RLGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

10

【0 3 8 9】

【化 1 1 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ ~~X~~ LGVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、A r g 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 9 0】

【化 1 1 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ R~~X~~GVHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、L e u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 9 1】

【化 1 1 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RL~~X~~VHLHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
である。

【0 3 9 2】

【化 1 2 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLG~~X~~HLTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、Val 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala

10

【0 3 9 3】

【化 1 2 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLG~~V~~~~X~~LHTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala

【0 3 9 4】

【化 1 2 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLG~~V~~~~H~~~~X~~HTEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、Leu 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala

【0 3 9 5】

【化 1 2 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLG~~V~~~~H~~~~L~~~~X~~TEA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala

【0 3 9 6】

【化 1 2 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLH~~X~~EA RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、Thr 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

10

【0 3 9 7】

【化 1 2 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHT~~X~~A RA
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、Glu 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 3 9 8】

【化 1 2 6】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA ~~X~~A
RHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、Arg 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 3 9 9】

【化 1 2 7】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
~~X~~HAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、Arg 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 4 0 0】

【化 1 2 8】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
R~~X~~AWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

(ここで、Xは、His 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

10

【0 4 0 1】

【化 1 2 9】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAXQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

20

(ここで、Xは、Trp 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 4 0 2】

【化 1 3 0】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQ~~X~~TQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

30

(ここで、Xは、Leu 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 4 0 3】

【化 1 3 1】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RA
RHAWQL~~X~~Q GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
号 2 3)

40

(ここで、Xは、Thr 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、Ala
である。

【0 4 0 4】

【化 1 3 2】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
 GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
 VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
 ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
 RHAWQLT**X** GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
 号 2 3)

(ここで、Xは、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
 である。

10

【 0 4 0 5】

【化 1 3 3】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
 GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
 VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
 ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
 RHAWQLTQ **X**ATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
 号 2 3)

20

(ここで、Xは、G l y 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
 である。

【 0 4 0 6】

【化 1 3 4】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
 GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
 VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
 ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
 RHAWQLTQ G**A****X**VLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
 号 2 3)

30

(ここで、Xは、T h r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
 である。

【 0 4 0 7】

【化 1 3 5】

PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLA
 GVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR R
 VVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPP
 ASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RA
 RHAWQLTQ GAT**X**LGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (配列番
 号 2 3)

40

(ここで、Xは、V a l 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a
 である。

【 0 4 0 8】

I . G . 5 I L - 2 バリエント

一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP に存在するバリエント MOD ポリペプチドは、

50

バリエーション IL - 2 ポリペプチドである。野生型 IL - 2 は、IL - 2 受容体 (IL - 2 R)、すなわち、IL - 2 R、IL - 2 R、及び IL - 2 R を含むヘテロ三量体ポリペプチドに結合する。

【0409】

野生型 IL - 2 アミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

【化136】

A P T S S S T K K T Q

L Q L **E H** L L L **D** L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T **F K F Y** M P K K

A T E L K H L Q C L E E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L

I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W

I T F C **Q** S I I S T L T (配列番号 27)

10

【0410】

野生型 IL 2 は、細胞の表面上の IL 2 受容体 (IL 2 R) に結合する。IL 2 受容体は、一部の事例では、アルファ鎖 (IL - 2 R ; CD 25 と称される)、ベータ鎖 (IL - 2 R ; CD 122 と称される)、及びガンマ鎖 (IL - 2 R ; CD 132 と称される) を含むヘテロ三量体ポリペプチドである。ヒト IL - 2 R、IL 2 R、及び IL - 2 R のアミノ酸配列は、以下の通りであり得る。

【0411】

20

ヒト IL - 2 R : E L C D D D D P P E I P H A T F K A M A Y K E G T M L N C

E C K R G F R R I K S G S L Y M L C T G N S S H S S W D N Q C Q C T S S

A T R N T T K Q V T P Q P E E Q K E R K T T E M Q S P M Q P V D Q A S L

P G H C R E P P P W E N E A T E R I Y H F V V G Q M V Y Y Q C V Q G Y R A

L H R G P A E S V C K M T H G K T R W T Q P Q L I C T G E M E T S Q F P

G E E K P Q A S P E G R P E S E T S C L V T T T D F Q I Q T E M A A T M

E T S I F T T E Y Q V A V A G C V F L L I S V L L L S G L T W Q R R Q R K

S R R T I (配列番号 28)。

【0412】

30

ヒト IL - 2 R : V N G T S Q F T C F Y N S R A N I S C V W S Q D G A L

Q D T S C Q V H A W P D R R R W N Q T C E L L P V S Q A S W A C N L I L

G A P D S Q K L T T V D I V T L R V L C R E G V R W R V M A I Q D F K P F

E N L R L M A P I S L Q V V H V E T H R C N I S W E I S Q A S H Y F E R

H L E F E A R T L S P G H T W E E A P L L T L K Q K Q E W I C L E T L T P

D T Q Y E F Q V R V K P L Q G E F T T W S P W S Q P L A F R T K P A A L

G K D T I P W L G H L L V G L S G A F G F I I L V Y L L I N C R N T G P

W L K K V L K C N T P D P S K F F S Q L S S E H G G D V Q K W L S S P F P

S S S F S P G G L A P E I S P L E V L E R D K V T Q L L L Q Q D K V P E

P A S L S S N H S L T S C F T N Q G Y F F F H L P D A L E I E A C Q V Y

F T Y D P Y S E E D P D E G V A G A P T G S S P Q P L Q P L S G E D D A Y

C T F P S R D D L L L F S P S L L G G P S P P S T A P G G S G A G E E R

M P P S L Q E R V P R D W D P Q P L G P P T P G V P D L V D F Q P P P E

L V L R E A G E E V P D A G P R E G V S F P W S R P P G Q G E F R A L N A

R L P L N T D A Y L S L Q E L Q G Q D P T H L V (配列番号 29)。

40

【0413】

ヒト IL - 2 R : L N T T I L T P N G N E D T T A D F F L T T M P T D S L

S V S T L P L P E V Q C F V F N V E Y M N C T W N S S S E P Q P T N L T

L H Y W Y K N S D N D K V Q K C S H Y L F S E E I T S G C Q L Q K K E I

H L Y Q T F V V Q L Q D P R E P R R Q A T Q M L K L Q N L V I P W A P E N

L T L H K L S E S Q L E L N W N N R F L N H C L E H L V Q Y R T D W D H

50

SWTEQ SVDYRHKFSL PSVDGQKRYT FRVRSRFNPL C
GSAQHWSEW SHPIHWGSNT SKENPFLFAL EAVVISVG
SM GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV TEYH
GNFSAW SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPPKGG
ALGEGPGASP CNQHSPYWAP PCYTTLKPET (配列番号30)。

【0414】

一部の事例では、本開示のT細胞MMPがバリエーションIL-2ポリペプチドを含む場合、同種MODは、配列番号28、29、及び30のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、IL-2Rである。

【0415】

一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、IL-2Rに対して、配列番号27に記載されるアミノ酸配列を含むIL-2ポリペプチドの結合親和性と比較して低減された結合親和性を呈する。例えば、一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、同じ条件下でアッセイされたとき、配列番号27に記載されるアミノ酸配列を含むIL-2ポリペプチドのIL-2R (例えば、配列番号28~30に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むIL-2R) に対する結合親和性よりも少なくとも10%低い、少なくとも15%低い、少なくとも20%低い、少なくとも25%低い、少なくとも30%低い、少なくとも35%低い、少なくとも40%低い、少なくとも45%低い、少なくとも50%低い、少なくとも55%低い、少なくとも60%低い、少なくとも65%低い、少なくとも70%低い、少なくとも75%低い、少なくとも80%低い、少なくとも85%低い、少なくとも90%低い、少なくとも95%低い、または95%超低い結合親和性で、IL-2Rに結合する。

【0416】

一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、IL-2Rに対して、100nM~100μMである結合親和性を有する。別の例として、一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、IL-2R (例えば、配列番号28~30に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むIL-2R) に対して、約100nM~150nM、約150nM~約200nM、約200nM~約250nM、約250nM~約300nM、約300nM~約350nM、約350nM~約400nM、約400nM~約500nM、約500nM~約600nM、約600nM~約700nM、約700nM~約800nM、約800nM~約900nM、約900nM~約1μM、~約1μM~約5μM、約5μM~約10μM、約10μM~約15μM、約15μM~約20μM、約20μM~約25μM、約25μM~約50μM、約50μM~約75μM、または約75μM~約100μMである結合親和性を有する。

【0417】

一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、配列番号27に記載されるIL-2アミノ酸配列と比較して、単一アミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、配列番号27に記載されるIL-2アミノ酸配列と比較して、2~10個のアミノ酸置換を有する。一部の事例では、バリエーションIL-2ポリペプチドは、配列番号27に記載されるIL-2アミノ酸配列と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換を有する。

【0418】

好適なIL-2バリエーションMODポリペプチドには、以下のアミノ酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドが含まれる。

【0419】

10

20

30

40

【化 1 3 7】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKL
TRML T^XKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a である。

【 0 4 2 0】

10

【化 1 3 8】

APTSSSTKKT QLQLEHLLL^X LQMILNGINN YKNPKL
TRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X は、A s p 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a である。

【 0 4 2 1】

20

【化 1 3 9】

APTSSSTKKT QLQL^XHLLLD LQMILNGINN YKNPKL
TRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X は、G l u 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a である。

【 0 4 2 2】

30

【化 1 4 0】

APTSSSTKKT QLQLE^XLLLD LQMILNGINN YKNPKL
TRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X は、H i s 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a である。

【 0 4 2 3】

40

【化 1 4 1】

APTSSSTKKT QLQLE^XLLLD LQMILNGINN YKNPKL
TRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X は、H i s 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X は、A l a、A s n、A s p、C y s、G l u、G l n、G l y、I l e、L y s、L e u、M e t、P h e、P r o、S e r、T h r、T y r、T r p、または V a l である。

50

【 0 4 2 4 】

【 化 1 4 2 】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKL
 TRML TFKF~~X~~MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、Xは、T y r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a である。

10

【 0 4 2 5 】

【 化 1 4 3 】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKL
 TRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFC~~X~~SIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、Xは、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、Xは、A l a である。

20

【 0 4 2 6 】

【 化 1 4 4 】

APTSSSTKKT QLQLE~~X~~LLLD LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X₁は、H i s 以外の任意のアミノ酸であり、X₂は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X₁は、A l a である。一部の事例では、X₂は、A l a である。一部の事例では、X₁は、A l a であり、かつX₂は、A l a である。

30

【 0 4 2 7 】

【 化 1 4 5 】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLL~~X~~ LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X₁は、A s p 以外の任意のアミノ酸であり、X₂は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、X₁は、A l a である。一部の事例では、X₂は、A l a である。一部の事例では、X₁は、A l a であり、かつX₂は、A l a である。

40

【 0 4 2 8 】

【 化 1 4 6 】

APTSSSTKKT QLQL~~X~~HLLLL~~X~~₂ LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₃KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

50

(ここで、 X_1 は、G l u 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、A s p 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、A l a である。一部の实例では、 X_2 は、A l a である。一部の实例では、 X_3 は、A l a である。一部の实例では、 X_1 は、A l a であり、 X_2 は、A l a であり、かつ X_3 は、A l a である。

【0429】

【化147】

APTSSSTKKT QLQLE~~X~~₁LLLL~~X~~₂ LQMILNGINN YKNPKL
TRML T~~X~~₃KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号27)

10

(ここで、 X_1 は、H i s 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、A s p 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、P h e 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、A l a である。一部の实例では、 X_2 は、A l a である。一部の实例では、 X_3 は、A l a である。一部の实例では、 X_1 は、A l a であり、 X_2 は、A l a であり、かつ X_3 は、A l a である。

【0430】

【化148】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLL~~X~~₁ LQMILNGINN YKNPKL
TRML T~~X~~₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFC~~X~~₃SIIS TLT (配列番号27)

20

(ここで、 X_1 は、A s p 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、P h e 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、G l n 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、A l a である。一部の实例では、 X_2 は、A l a である。一部の实例では、 X_3 は、A l a である。一部の实例では、 X_1 は、A l a であり、 X_2 は、A l a であり、かつ X_3 は、A l a である。

30

【0431】

【化149】

APTSSSTKKT QLQLEHLLLL~~X~~₁ LQMILNGINN YKNPKL
TRML T~~X~~₂KF~~X~~₃MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号27)

(ここで、 X_1 は、A s p 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、P h e 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、T y r 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、 X_1 は、A l a である。一部の实例では、 X_2 は、A l a である。一部の实例では、 X_3 は、A l a である。一部の实例では、 X_1 は、A l a であり、 X_2 は、A l a であり、かつ X_3 は、A l a である。

40

【0432】

【化 1 5 0】

APTSSSTKKT QLQLE~~X~~₁LLL~~X~~₂ LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₃KF~~X~~₄MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (配列番号 27)

(ここで、X₁ は、His 以外の任意のアミノ酸であり、X₂ は、Asp 以外の任意のアミノ酸であり、X₃ は、Phe 以外の任意のアミノ酸であり、X₄ は、Tyr 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、X₁ は、Ala である。一部の实例では、X₂ は、Ala である。一部の实例では、X₃ は、Ala である。一部の实例では、X₄ は、Ala である。一部の实例では、X₁ は、Ala であり、X₂ は、Ala であり、X₃ は、Ala であり、かつ X₄ は、Ala である。

10

【0 4 3 3】

【化 1 5 1】

APTSSSTKKT QLQLEHLLL~~X~~₁ LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₂KF~~X~~₃MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFC~~X~~₄SIIS TLT (配列番号 27)

20

(ここで、X₁ は、Asp 以外の任意のアミノ酸であり、X₂ は、Phe 以外の任意のアミノ酸であり、X₃ は、Tyr 以外の任意のアミノ酸であり、X₄ は、Gln 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、X₁ は、Ala である。一部の实例では、X₂ は、Ala である。一部の实例では、X₃ は、Ala である。一部の实例では、X₄ は、Ala である。一部の实例では、X₁ は、Ala であり、X₂ は、Ala であり、X₃ は、Ala であり、かつ X₄ は、Ala である。

【0 4 3 4】

【化 1 5 2】

APTSSSTKKT QLQLE~~X~~₁LLL~~X~~₂ LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₃KF~~X~~₄MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFC~~X~~₅SIIS TLT (配列番号 27)

30

(ここで、X₁ は、His 以外の任意のアミノ酸であり、X₂ は、Asp 以外の任意のアミノ酸であり、X₃ は、Phe 以外の任意のアミノ酸であり、X₄ は、Tyr 以外の任意のアミノ酸であり、X₅ は、Gln 以外の任意のアミノ酸である)。一部の实例では、X₁ は、Ala である。一部の实例では、X₂ は、Ala である。一部の实例では、X₃ は、Ala である。一部の实例では、X₄ は、Ala である。一部の实例では、X₅ は、Ala である。一部の实例では、X₁ は、Ala であり、X₂ は、Ala であり、X₃ は、Ala であり、X₄ は、Ala であり、かつ X₅ は、Ala である。

40

【0 4 3 5】

【化 1 5 3】

APTSSSTKKT QLQLE~~X~~₁LLLD LQMILNGINN YKNPKL
 TRML T~~X~~₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL N
 LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEY
 ADE TATIVEFLNR WITFC~~X~~₃SIIS TLT (配列番号 27)

50

(ここで、 X_1 は、His 以外の任意のアミノ酸であり、 X_2 は、Phe 以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 は、Gln 以外の任意のアミノ酸である)。一部の事例では、 X_1 は、Ala である。一部の事例では、 X_2 は、Ala である。一部の事例では、 X_3 は、Ala である。一部の事例では、 X_1 は、Ala であり、 X_2 は、Ala であり、かつ X_3 は、Ala である。

【0436】

本明細書に提供される野生型またはバリエーション IL-2 配列のうちのいずれかにおいて、125 位のシステインは、アラニンで置換されてもよい (C125A 置換 (substitution))。この置換によって提供されるあらゆる安定性に加えて、例えば、エピトープ含有 (containing) ペプチドまたはペイロードが T 細胞 MMP の第 1 または第 2 のポリペプチドにおける他の箇所にあるシステイン残基にコンジュゲートされる予定の場所で、それを採用して、それによって IL-2 MOD 配列の C125 による競合を回避してもよい。

10

【0437】

I. H. 追加的なポリペプチド

T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートのポリペプチド鎖は、上述のポリペプチドに加えて 1 つまたは複数のポリペプチドを含み得る。好適な追加のポリペプチドには、エピトープタグ及び親和性ドメインが含まれる。1 つまたは複数の追加的なポリペプチド (複数可) は、細胞または無細胞系によって翻訳されるポリペプチドの一部として、多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖の N 末端で、多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖の C 末端で、または多量体ポリペプチドのポリペプチド鎖内で内部に、組み込むことができる。

20

【0438】

I. I. エピトープタグ

好適なエピトープタグには、ヘマグルチニン (HA、例えば、YPYDVPDYA (配列番号 31))、FLAG (例えば、DYKDDDDK (配列番号 32))、c-myc (例えば、EQKLISEEDL (配列番号 33)) 等が含まれるが、これらに限定されない。

【0439】

I. J. 親和性ドメイン

親和性ドメインは、識別または精製に有用な、例えば、固体支持体上に固定化された結合パートナー等の結合パートナーと相互作用し得る、ペプチド配列を含む。発現タンパク質に融合させた場合の、ヒスチジン等の複数の連続する単一アミノ酸をコードする DNA 配列が、ニッケル SEPHAROSE (登録商標) 等の樹脂カラムへの高親和性の結合による組換えタンパク質の一段階精製に使用されてもよい。例となる親和性ドメインには、His5 (HHHHH) (配列番号 34)、HisX6 (HHHHHH) (配列番号 35)、C-myc (EQKLISEEDL) (配列番号 33)、Flag (DYKDDDDK) (配列番号 32)、StreptTag (WSHPQFEK) (配列番号 36)、ヘマグルチニン (例えば、HA タグ (YPYDVPDYA) (配列番号 31))、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン、セルロース結合ドメイン、R Y I R S (配列番号 37)、Phe-His-His-Thr (配列番号 38)、キチン結合ドメイン、S-ペプチド、T7 ペプチド、SH2 ドメイン、C 末端 RNA タグ、WEAAREACCREECCARA (配列番号 39)、金属結合ドメイン、例えば、亜鉛結合ドメインまたはカルシウム結合ドメイン、例えば、カルシウム結合タンパク質、例えば、カルモジュリン、トロポニン C、カルシニューリン B、ミオシン軽鎖、リカバリン、S-モジュリン、ビジニン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フリクエニン、カルトラクチン、カルパイン大サブユニット、S100 タンパク質、バルブアルブミン、カルビンディン D9K、カルビンディン D28K、及びカルレチニン由来のもの、インティン、ピオチン、ストレプトアビジン、MyoD、Id、ロイシンジッパー配列、ならびにマルトース結合タンパク質が含まれる。

30

40

50

【 0 4 4 0 】

I . K . ペイロード

多種多様なペイロードが T 細胞 MMP 及び T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに
 会合させられてもよく、この T 細胞 MMP 及び T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート
 は、第 1 または第 2 の化学コンジュゲーション部位で T 細胞 MMP に（共有結合性で）コ
 ンジュゲートされたエピトープに加えて、1 つよりも多くの種類のペイロードを組み込み
 得る。加えて、T 細胞 MMP 分子またはそれらのエピトープコンジュゲートが多量体化す
 る場合、異なるペイロードで標識された単量体を多量体に組み込むことが可能であり得る
 。したがって、治療剤、化学療法剤、診断剤、標識等からなる群から選択される 1 つまた
 は複数のペイロードを導入することが可能である。一部のペイロードは 1 つよりも多くの
 区分に該当し得ることが明らかとなろう（例えば、放射標識は、診断薬として、また治療
 薬として、具体的な組織または細胞型に選択的に照射するのに有用であり得る）。

10

【 0 4 4 1 】

上述のように、T 細胞 MMP ポリペプチド（例えば、足場または Fc ポリペプチド）は
 、ペイロード及び / またはエピトープを、T 細胞 MMP の第 1 もしくは第 2 のポリペプチ
 ドに結合させた、または T 細胞 MMP の第 1 もしくは第 2 のポリペプチドにある（例えば
 、操作されたシステインまたはリジン等の化学コンジュゲーション部位で）化学コンジュ
 ゲーション部位にコンジュゲートするための架橋試薬で修飾され得る。かかる架橋剤には
 、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレ
 ート (S M C C) 、スルホ - S M C C 、マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシン
 イミドエステル (M B S) 、スルホ - M B S 、またはスクシンイミジル - ヨードアセテ
 ートが含まれる。過剰のかかる架橋剤を用いてペイロードを導入することにより、複数のペ
 イロード分子が T 細胞 MMP に組み込まれる結果をもたらすことができる。ペイロードを
 T 細胞 MMP 及びそれらのエピトープコンジュゲートに導入するためのいくつかの二官能
 性リンカーには、切断可能リンカー及び切断不可能リンカーが含まれる。一部の事例では
 、ペイロードリンカーは、プロテアーゼで切断可能なリンカーである。好適なペイロード
 リンカーには、例えば、ペプチド（例えば、2 ~ 10 アミノ酸の長さ、例えば、2、3、
 4、5、6、7、8、9、または 10 アミノ酸の長さ）、アルキル鎖、ポリ（エチレング
 リコール）、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ
 不安定基、及びエステラーゼ不安定基が含まれる。好適なリンカーの非限定的な例は、N
 - スクシンイミジル - [(N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコー
 ル] エステル (N H S - P E G 4 - マレイミド) 、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリ
 ジルジチオ) ブタノエート (S P D B) 、スベリン酸ジスクシンイミジル (D S S) 、グ
 ルタル酸ジスクシンイミジル (D G S) 、アジブイミド酸ジメチル (D M A) 、N - スク
 シンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホブタノエート (スルホ - S P D B)
 、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P) 、N - ス
 クシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - (6 -
 アミドカプロエート) (L C - S M C C) 、 - マレイミドウンデカン酸 N - スクシ
 ンイミジルエステル (K M U A) 、 - マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (G M B S) 、
 - マレイミドカプロン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (E M C S) 、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M B S) 、
 N - (- マレイミドアセトキシ) - スクシンイミドエステル (A M A S) 、スクシンイ
 ミジル - 6 - (- マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (S M P H) 、N - ス
 クシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (S M P B) 、N - (p - マ
 レイミドフェニル) イソシアネート (P M P I) 、N - スクシンイミジル 4 (2 - ピリジ
 ルチオ) ペンタノエート (S P P) 、N - スクシンイミジル (4 - ヨード - アセチル) ア
 ミノベンゾエート (S I A B) 、6 - マレイミドカプロイル (M C) 、マレイミドプロパ
 ノイル (M P) 、p - アミノベンジルオキシカルボニル (P A B) 、N - スクシンイミジ
 ル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C) 、スクシンイ
 ミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P) 、P E G 4 - S P D P (

20

30

40

50

PEG化、長鎖SPDPクロスリンカー)、BS(PEG)₅(PEG化ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート)、BS(PEG)₉(PEG化ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート)、マレイミド-PEG₆-スクシンイミジルエステル、マレイミド-PEG₈-スクシンイミジルエステル、マレイミド-PEG₁₂-スクシンイミジルエステル、PEG₄-SPDP(PEG化、長鎖SPDPクロスリンカー)、PEG₁₂-SPDP(PEG化、長鎖SPDPクロスリンカー)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート)、SMCCの「長鎖」類似体(LC-SMCC)、3-マレイミドプロパン酸N-スクシンイミジルエステル(BMPs)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジルプロモアセテート(SBA)、及びN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオネート(SBAP)である。

10

【0442】

反応の化学量論組成の制御は、分子における全ての他の基に直交型の化学反応を伴う操作された部位が利用されない、何らかの選択的修飾をもたらし得る。上記で考察されたビス-チオリンカー等の、はるかにより高い選択性を示す試薬が、単一のリジンまたはスステイン残基と反応する試薬よりも、箇所及び化学量論組成のより精密な制御を可能にする傾向にある。

【0443】

本開示のT細胞MMPがFcポリペプチドを含む場合、Fcポリペプチドは、直接またはリンカーを通して間接的に結合させた、1つまたは複数の共有結合性で結合したペイロード分子を含み得る。例として、本開示のT細胞MMPがFcポリペプチドを含む場合、Fcポリペプチドを含むポリペプチド鎖は、式(A)-(L)-(C)のものであり得、式中、(A)は、Fcポリペプチドを含むポリペプチド鎖であり、存在する場合、(L)は、リンカーであり、(C)は、ペイロード(例えば、細胞傷害性薬剤)である。存在する場合、(L)は、(A)を(C)に連結する。一部の事例では、Fcポリペプチドを含むポリペプチド鎖は、1つよりも多くのペイロード分子(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、または5つよりも多くの細胞傷害性薬剤分子)を含み得る。

20

【0444】

ある実施形態では、ペイロードは、生物活性剤もしくは生物活性薬、診断剤または標識、ヌクレオチドまたはヌクレオシド類似体、核酸または合成核酸(例えば、アンチセンス核酸、低分子干渉RNA、2本鎖(ds)DNA、1本鎖(ss)DNA、ssRNA、dsRNA)、毒素、リポソーム(例えば、5-フルオロデオキシウリジン等の化学療法薬を組み込む)、ナノ粒子(例えば、核酸または他の分子を担持する金または他の金属、核酸または他の分子を担持する脂質、粒子)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

30

【0445】

ある実施形態では、ペイロードは、治療剤(例えば、薬物またはプロドラッグ)、化学療法剤、細胞傷害性薬剤、抗生物質、抗ウイルス薬、細胞周期同調剤、細胞表面受容体(複数可)に対するリガンド、免疫調節剤(例えば、シクロスポリン等の免疫抑制薬)、アポトーシス促進剤、血管新生阻害剤、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク質またはポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片、酵素、酵素前駆体、ホルモン、及びそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される、生物活性剤または生物活性薬から選択される。

40

【0446】

ある実施形態では、ペイロードは、光検出可能な標識(例えば、色素、蛍光標識、燐光標識、発光標識)、造影剤(例えば、ヨウ素またはバリウム含有物質)、放射標識、画像化剤、常磁性標識/画像化剤(磁気共鳴画像法におけるガドリニウム含有標識)、超音波標識、及びそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される、治療薬、診断剤または標識から独立して選択される、生物活性剤または生物活性薬から選択される。

I. L. 治療剤及び化学療法剤

50

【 0 4 4 7 】

T細胞MMPのポリペプチド鎖は、化学コンジュゲーション部位で第1または第2のポリペプチド鎖に連結された（例えば、共有結合性で結合した）小分子薬物を含むが、これらに限定されないペイロードを含み得る。ペイロードと、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートの第1または第2のポリペプチド鎖との間の連結は、直接連結であっても、または間接的連結であってもよい。直接連結は、アミノ酸側鎖への直接の連結を伴い得る。間接的連結は、リンカーを介した連結であり得る。薬物（例えば、がん化学療法剤等のペイロード）は、チオエーテル結合、アミド結合、カルバメート結合、ジスルフィド結合、またはエーテル結合を介して、本開示のT細胞MMPのポリペプチド鎖（例えば、Fcポリペプチド）に連結され得る。

10

【 0 4 4 8 】

好適な治療剤には、例えば、ラパマイシン、全トランス型レチノイン酸（ATRA）等のレチノイド、ビタミンD3、ビタミンD3類似体等が含まれる。上述のように、一部の事例では、薬物は、細胞傷害性薬剤である。細胞傷害性薬剤は、当該技術分野で既知である。好適な細胞傷害性薬剤は、細胞死をもたらすか、もしくは細胞死を誘導するか、または何らかの様態で細胞の生存能力を減少させる、任意の化合物であり得、これには、例えば、マイタンシノイド及びマイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065及びCC-1065類似体、デュオカルマイシン及びデュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン等のエンジン、ドラスタチン及びアウリスタチンを含めたドラスタチン類似体、トメイマイシン誘導体、レプトマイシン誘導体、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ならびにモルホリノドキソルビシンが含まれる。

20

【 0 4 4 9 】

例えば、一部の事例では、細胞傷害性薬剤は、真核細胞における微小管形成を阻害する化合物である。かかる薬剤には、例えば、マイタンシノイド、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トメイマイシン、及びレプトマイシン、または前述のもののうちのいずれか1つのプロドラッグが含まれる。マイタンシノイド化合物には、例えば、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキシプロピル)-マイタンシン(DM1)、N(2')-デアセチル-N(2')-(4-メルカプト-1-オキシペンチル)-マイタンシン(DM3)、及びN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキシペンチル)-マイタンシン(DM4)が含まれる。ベンゾジアゼピンには、例えば、インドリノベンゾジアゼピン及びオキサゾリジノベンゾジアゼピンが含まれる。

30

【 0 4 5 0 】

細胞傷害性薬剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン(colchicin)、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン(dihydroxyanthracin dione)、マイタンシンまたはその類似体もしくは誘導体、アウリスタチンまたはその機能性ペプチド類似体もしくは誘導体、ドラスタチン10もしくは15またはその類似体、イリノテカンまたはその類似体、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、カリケアマイシンまたはその類似体もしくは誘導体、代謝拮抗剤、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、フルダラビン(fludarabine)、5フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビン、アルキル化剤、白金誘導体、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン(CC-1065)またはその類似体もしくは誘導体、抗生物質、ピロロ[2,1-c][1,4]-ペ

40

50

ンゾジアゼピン (P D B)、ジフテリア毒素、リシン毒素、コレラ毒素、志賀様毒素、L T毒素、C 3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆Bowman - Birkプロテアーゼ阻害剤、Pseudomonas外毒素、アロリン (a l o r i n)、サボリン、モデシン、ゲラニン (g e l a n i n)、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ - サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン (m i t o g e l l i n)、レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、フェノマイシン (p h e n o m y c i n)、エノマイシン (e n o m y c i n)毒素、リボヌクレアーゼ (R N a s e)、D N a s e I、Staphylococcal腸毒素A、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ジフテリア (d i p h t h e r i n)毒素、及びPseudomonas内毒素が含まれる。

10

【 0 4 5 1 】

I . M . 診断剤及び標識

T細胞MMPの第1及び/または第2のポリペプチド鎖は、光検出可能な標識 (例えば、色素、蛍光標識、燐光標識、発光標識)、造影剤 (例えば、ヨウ素またはバリウム含有物質)、放射標識、画像化剤、スピン標識、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T)型標識、常磁性標識/画像化剤 (例えば、磁気共鳴画像法におけるガドリニウム含有標識)、超音波標識、及びそれらの組み合わせの、1つまたは複数のペイロード分子を含み得る。

20

【 0 4 5 2 】

一部の実施形態では、コンジュゲート部分は、放射性同位体であるかまたはそれを含む、標識を含む。放射性同位体または他の標識の例としては、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{131}In 、 ^{153}Sm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、及び ^{153}Pb が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 4 5 3 】

I I . T細胞MMPポリペプチドの生成方法

本開示は、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較してより低い親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含むT細胞MMP及びT細胞MMP - エピトープコンジュゲートを含めた、T細胞MMP及びT細胞MMP - エピトープコンジュゲートの獲得方法を提供し、該方法は、

30

A) T細胞MMPの第1及び第2のポリペプチドをコードする核酸を細胞または無細胞系に導入することによって、T細胞MMPを生成することであって、各メンバーが、

a) i) 第1のMHCクラスIポリペプチド (例えば、2Mポリペプチド) を含む、第1のポリペプチドと、

b) i) 第2のMHCポリペプチド (例えば、MHCクラスI重鎖ポリペプチド)、及びii) 任意選択でIgFcポリペプチドまたは非Ig足場を含む、第2のポリペプチドと、を含み、

第1のポリペプチドが、第1の化学コンジュゲーション部位を含み、及び/または第2のポリペプチドが、第2の化学コンジュゲーション部位を含み、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方が、独立して選択される1つまたは複数のMOD (例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれよりも多くの野生型及び/またはバリエーションMOD) を含む、該生成することと、

40

B) 第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを接触させて (同じ細胞または無細胞系において共発現される場合、該ポリペプチドは、翻訳されると同時に接触し得る)、T細胞MMPを形成させることと、を含み、

T細胞MMPが1つまたは複数の新生の (例えば、活性化されていない) 化学コンジュゲーション部位を含む場合、該新生の化学コンジュゲーション部位は、任意選択で、第1及び/または第2の化学コンジュゲーション部位を有するT細胞MMPを生産するよう

50

に活性化され得る（例えば、T細胞MMPを発現する細胞がホルミルグリシン生成酵素を発現しない場合、スルファターゼモチーフをホルミルグリシン生成酵素と反応させること）。

該方法はこの時点で停止され、T細胞MMPが精製によって得られてもよい。代替として、T細胞MMPエピトープコンジュゲートが所望される場合、該方法は、以下のステップで継続されてもよい。

C) 第1及び/または第2の化学コンジュゲーション部位とのコンジュゲーションに好適なエピトープ（例えば、エピトープペプチド）（例えば、スルファターゼモチーフのホルミルグリシンとの反応用のヒドラジニルまたはヒドラジニルインドール修飾ペプチド）を用意し、該エピトープをT細胞MMPに（例えば、好適な反応条件下で）接触させて、T細胞MMPエピトープコンジュゲートを生産すること。

10

【0454】

T細胞MMPがペイロード（例えば、小分子薬物、放射標識等）を含有することが望ましい場合、上述のようなエピトープコンジュゲートの代わりにペイロードがT細胞MMPと反応させられてもよい。T細胞MMPエピトープコンジュゲートがペイロードを含有することが望ましい場合、ペイロードは、エピトープがその化学反応部位（複数可）に接触させられて、それと反応させられる前、またはその後のいずれかで、化学コンジュゲーション部位（複数可）と反応させられてもよい。異なるコンジュゲーション部位（例えば、第1及び第2の化学コンジュゲーション部位）に対するエピトープ及びペイロードの選択性は、コンジュゲーション反応における直交型の化学反応の使用及び/または化学量論組成の制御により制御されてもよい。複数の実施形態では、リンカー（例えば、ポリペプチドまたは他の二官能性化学リンカー）を用いて、エピトープ及び/またはペイロードをそれらのコンジュゲーション部位に結合させてもよい。

20

【0455】

本開示は、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較してより低い親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含む、T細胞MMPエピトープコンジュゲートの獲得方法を提供し、該方法は、

A) 複数のメンバーを含むT細胞MMPエピトープコンジュゲートのライブラリを生成することであって、各メンバーが、a) i) エピトープ、及びii) 第1のMHCポリペプチド（例えば、2Mポリペプチド）を含む、第1のポリペプチドと、b) i) 第2のMHCポリペプチド（例えば、MHCクラスI重鎖ポリペプチド）、及びii) 任意選択でIg Fcポリペプチドまたは非Ig足場を含む、第2のポリペプチドと、を含み、各メンバーが、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1及び第2のポリペプチド上の両方に、異なるバリエーションMODを含む、該生成することと、

30

B) ライブラリの各メンバーの、同種MODに対する親和性を決定することと、

C) 同種MODに対して低減された親和性を呈するライブラリメンバーを選択することと、を含む。

一部の事例では、親和性は、精製したT細胞MMPライブラリメンバー及び同種MODを用いて、BLIによって決定される。BLI法は当業者に周知である。BLIアッセイは上述される。例えば、Lad et al. (2015) J. Biomol. Screen. 20(4): 498-507、及びShah and Duncan (2014) J. Vis. Exp. 18: e51383を参照されたい。

40

【0456】

本開示は、T細胞に対して選択的結合を呈するT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの獲得方法を提供し、該方法は、

A) 複数のメンバーを含むT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリを生成することであって、各メンバーが、

a) i) 第1のMHCポリペプチドを含む、第1のポリペプチドと、

b) i) 第2のMHCポリペプチド、及びii) 任意選択で免疫グロブリン(Ig) Fcポリペプチドまたは非Ig足場を含む、第2のポリペプチドと、を含み、

50

各メンバーが、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1及び第2のポリペプチド上の両方に、異なるバリエーションMODを含み、該バリエーションMODが、アミノ酸配列において、野生型親MODから1aa~10aaだけ異なり、

T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーが、エピトープタグまたは蛍光標識をさらに含み)、

第1または第2のポリペプチドのうちの1つが、直接、またはリンカーを通して間接的のいずれかで、化学コンジュゲーション部位を通して第1及び/または第2のポリペプチドに共有結合されたエピトープを含む、該生成することと、

B) T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、その表面上に、i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) 該エピトープに結合するTCR、を発現する標的T細胞に接触させることと、

C) T細胞MMPエピトープコンジュゲートがエピトープタグを含む場合、標的T細胞に結合したT細胞MMPエピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、エピトープタグに結合する蛍光標識した結合剤に接触させ(これは、蛍光標識したT細胞MMPエピトープコンジュゲートを用いる場合は不必要である)、ライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体を生成することと、

D) フローサイトメトリーを用いて、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体の平均蛍光強度(MFI)を測定することであって、様々な濃度のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーにわたって測定されたMFIが、親和性及び見かけの結合活性の尺度を提供する、該測定することと、

E) i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) T細胞MMPライブラリメンバーに存在するエピトープ以外のエピトープに結合するTCR、を含む対照T細胞への、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーの結合と比較して、標的T細胞に選択的に結合するT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを選択することと、を含む。

一部の実例では、標的T細胞に選択的に結合するとして識別されるT細胞MMPライブラリメンバーが、ライブラリから単離される。一部の実例では、野生型親MODと同種MODとの対は、IL-2とIL-2受容体、4-1BBと4-1BB、PD-L1とPD-1、FasLとFas、TGFBとTGFB受容体、CD80とCD28、CD86とCD28、OX40LとOX40、ICOS-LとICOS、ICAMとLFA-1、JAG1とNotch、JAG1とCD46、CD70とCD27、CD80とCTLA4、及びCD86とCTLA4から選択される。

【0457】

本開示は、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含む、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの獲得方法を提供し、該方法は、複数のメンバーを含むT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリから、同種MODに対して低減された親和性を呈するメンバーを選択することを含み、該複数のメンバーの各々は、a) i) 化学コンジュゲーション部位に共有結合されたエピトープ、及びii) 第1のMHCポリペプチドを含む、第1のポリペプチドと、b) i) 第2のMHCポリペプチド、及びii) 任意選択でIgFcポリペプチドまたは非Ig足場を含む、第2のポリペプチドと、を含み、該ライブラリのメンバーは、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1及び第2のポリペプチドの両方に存在する複数のバリエーションMODを含む。一部の実例では、該選択ステップは、BLIを用いて、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーと同種MODとの間の結合の親和性を決定することを含む。一部の実例では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、上述の通りである。

【0458】

一部の実例では、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含む、

10

20

30

40

50

T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの獲得方法は、a) 選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、その表面上に、i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) 該エピトープに結合するTCR、を発現する標的T細胞に接触させて(ここで、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーは、エピトープタグを含む)、それによりT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーが標的T細胞に結合するようにすることと、b) 標的T細胞に結合した選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、エピトープタグに結合する蛍光標識した結合剤に接触させて、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体を生成することと、c) フローサイトメトリーを用いて、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体のMFIを測定することであって、様々な濃度の選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーにわたって測定されたMFIが、親和性及び見かけの結合活性の尺度を提供する、該測定することと、をさらに含む。i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーに存在するエピトープ以外のエピトープに結合するTCR、を含む対照T細胞への、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーの結合と比較して、標的T細胞に選択的に結合する選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーが、標的T細胞に選択的に結合するとして識別される。一部の事例では、結合剤は、エピトープタグに特異的な抗体である。一部の事例では、バリエーションMODは、対応する野生型親MODと比較して、1~20個のアミノ酸置換(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸置換)を含む。一部の事例では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、2つのバリエーションMODを含む。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、同じアミノ酸配列を含む。一部の事例では、第1のポリペプチドは、該2つのバリエーションMODのうちの一方を含み、第2のポリペプチドは、該2つのバリエーションMODのうちの第2のバリエーションMODを含む。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの同じポリペプチド鎖上にある。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの第1のポリペプチド上にある。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの第2のポリペプチド上にある。

【0459】

一部の事例では、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含む、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの獲得方法は、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーをライブラリから単離することをさらに含む。一部の事例では、該方法は、選択されたライブラリメンバーを調製するために使用される、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有するT細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を用意することをさらに含む。一部の事例では、該核酸は、組換え発現ベクターに存在する。一部の事例では、該ヌクレオチド配列は、真核細胞において機能性である転写制御要素に作動可能に連結されている。一部の事例では、該方法は、該核酸を真核宿主細胞に導入することと、細胞を液体培地中で培養して、細胞において少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有するコードされたT細胞MMPを合成することと、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有する合成されたT細胞MMPを細胞から、または液体培養基から単離することと、それを少なくとも1つのエピトープにコンジュゲートして、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを形成させることと、をさらに含む。一部の事例では、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有する選択されたT細胞MMPは、IgFcポリペプチドを含む。一部の事例では、該方法は、薬物をIgFcポリペプチドにコンジュゲートすることをさらに含む。一部の事例では、薬物は、マイタンシノイド、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1

065、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トメイマイシン、及びレプトマイシン、または前述のもののうちのいずれか1つのプロドラッグから選択される細胞傷害性薬剤である。一部の事例では、薬物は、レチノイドである。一部の事例では、野生型親MODと同種MODは、IL-2とIL-2受容体、4-1BBLと4-1BB、PD-L1とPD-1、FasLとFas、TGFBとTGFB受容体、CD70とCD27、CD80とCD28、CD86とCD28、OX40LとOX40、FasLとFas、ICOS-LとICOS、ICAMとLFA-1、及びJAG1とNotch、JAG1とCD46、CD80とCTLA4、及びCD86とCTLA4から選択される。

【0460】

本開示は、同種MODに対して、対応する野生型親MODの同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈する1つまたは複数のバリエーションMODを含む、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの獲得方法を提供し、該方法は、A)複数のメンバーを含むT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリを用意することであって、該複数のメンバーが、a) i) 化学コンジュゲーション部位で共有結合されたエピトープ、及びii) 第1のMHCポリペプチドを含む、第1のポリペプチドと、b) i) 第2のMHCポリペプチド、及びii) 任意選択でIgFcポリペプチドまたは非Ig足場を含む、第2のポリペプチドと、を含み、該ライブラリのメンバーが、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、または第1及び第2のポリペプチドの両方に存在する複数のバリエーションMODを含む、該用意することと、B) 該ライブラリから、同種MODに対して低減された親和性を呈するメンバーを選択することと、を含む。一部の事例では、該選択ステップは、BLIを用いて、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーと同種MODとの間の結合の親和性を決定することを含む。一部の事例では、該選択ステップは、BLIを用いて、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーと同種MODとの間の結合の親和性を決定することを含む。一部の事例では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、上述の通りである。

【0461】

一部の事例では、該方法は、a) 選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、その表面上に、i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) 該エピトープに結合するT細胞受容体、を発現する標的T細胞に接触させて(ここで、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーは、エピトープタグを含む)、それによりT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーが標的T細胞に結合するようにすることと、b) 標的T細胞に結合した選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーを、エピトープタグに結合する蛍光標識した結合剤に接触させて、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体を生成することと、c) フローサイトメトリーを用いて、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバー/標的T細胞/結合剤複合体のMFIを測定することであって、様々な濃度の選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーにわたって測定されたMFIが、親和性及び見かけの結合活性の尺度を提供する、該測定することと、をさらに含む。i) 野生型親MODに結合する同種MOD、及びii) T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーに存在するエピトープ以外のエピトープに結合するT細胞受容体、を含む対照T細胞への、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーの結合と比較して、標的T細胞に選択的に結合する選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーが、標的T細胞に選択的に結合するとして識別される。一部の事例では、結合剤は、エピトープタグに特異的な抗体である。一部の事例では、バリエーションMODは、対応する野生型親MODと比較して、1~20個のアミノ酸置換(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸置換)を含む。一部の事例では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、2つのバリエーションMOD

10

20

30

40

50

を含む。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、同じアミノ酸配列を含む。一部の事例では、第1のポリペプチドは、該2つのバリエーションMODのうちの一方を含み、第2のポリペプチドは、該2つのバリエーションMODのうちの第2のバリエーションMODを含む。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの同じポリペプチド鎖上にある。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの第1のポリペプチド上にある。一部の事例では、該2つのバリエーションMODは、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの第2のポリペプチド上にある。

【0462】

一部の事例では、該方法は、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのライブラリメンバーをライブラリから単離することをさらに含む。一部の事例では、該方法は、選択されたライブラリメンバーを調製するために使用される、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有するT細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を用意することをさらに含む。一部の事例では、該核酸は、組換え発現ベクターに存在する。一部の事例では、該ヌクレオチド配列は、真核細胞において機能性である転写制御要素に作動可能に連結されている。一部の事例では、該方法は、該核酸を真核宿主細胞に導入することと、細胞を液体培地中で培養して、細胞において少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有するコードされたT細胞MMPを合成することと、少なくとも1つの化学コンジュゲーション部位を有する合成された選択されたT細胞MMPを細胞から、または液体培養基から単離することと、それを少なくとも1つのエピトープにコンジュゲートして、選択されたT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを形成させることと、をさらに含む。一部の事例では、選択されたT細胞MMPライブラリメンバーは、Ig Fcポリペプチドを含む。一部の事例では、該方法は、薬物をIg Fcポリペプチドにコンジュゲートすることをさらに含む。一部の事例では、薬物は、マイタンシノイド、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トメイマイシン、及びレプトマイシン、または前述のもののうちのいずれか1つのプロドラッグから選択される細胞傷害性薬剤である。一部の事例では、薬物は、レチノイドである。一部の事例では、野生型親MODと同種MODは、IL-2とIL-2受容体、4-1BBと4-1BB、PD-L1とPD-1、FasLとFas、TGFとTGF受容体、CD70とCD27、CD80とCD28、CD86とCD28、OX40LとOX40、FasLとFas、ICOS-LとICOS、ICAMとLFA-1、及びJAG1とNotch、JAG1とCD46、CD80とCTLA4、及びCD86とCTLA4から選択される。

【0463】

III. 核酸

本開示は、本開示のT細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示は、T細胞MMPのポリペプチドに導入操作される化学コンジュゲーション部位を含む本開示のT細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。

【0464】

本開示は、本明細書に記載されるT細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。一部の事例では、本開示のT細胞MMPの個々のポリペプチド鎖は、別個の核酸においてコードされる。一部の事例では、本開示のT細胞MMPの全てのポリペプチド鎖が、単一核酸においてコードされる。一部の事例では、第1の核酸が、本開示のT細胞MMPの第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、第2の核酸が、本開示のT細胞MMPの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の事例では、単一核酸が、本開示のT細胞MMPの第1のポリペプチド及び本開示のT細胞MMPの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0465】

III. A. 多量体ポリペプチドの個々のポリペプチド鎖をコードする別個の核酸

本開示は、T細胞MMPをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。上述のように、一部の事例では、T細胞MMPの個々のポリペプチド鎖は、別個の核酸においてコードされる。一部の事例では、T細胞MMPの別個のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素、例えば、真核細胞において機能性であるプロモーター等のプロモーターに作動可能に連結され、このプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。

【0466】

本開示は、第1の核酸及び第2の核酸を提供し、該第1の核酸は、本開示のT細胞MMPの第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該第1のポリペプチドが、N末端からC末端の順に、a)第1のMHCポリペプチド、及びb)MOD(例えば、上述のような親和性低減バリエーションMODポリペプチド)を含み、該第2の核酸は、T細胞MMPの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該第2のポリペプチドが、N末端からC末端の順に、a)第2のMHCポリペプチド、及びb)IgFcポリペプチドを含む。好適なエピトープ、MHCポリペプチド、MOD、及びIgFcポリペプチドは上述される。第1及び第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、化学コンジュゲーション部位(または化学コンジュゲーション部位に変換され得る新生の部位)を含む。一部の事例では、第1及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素に作動可能に連結されている。一部の事例では、転写制御要素は、真核細胞において機能性であるプロモーターである。一部の事例では、該核酸は、別個の発現ベクターに存在する。

10

20

【0467】

本開示は、第1の核酸及び第2の核酸を提供し、該第1の核酸は、T細胞MMPの第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該第1のポリペプチドが第1のMHCポリペプチドを含み、該第2の核酸は、T細胞MMPの第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該第2のポリペプチドが、N末端からC末端の順に、a)MOD(例えば、上述のような親和性低減バリエーションMODポリペプチド)、b)第2のMHCポリペプチド、及びc)IgFcポリペプチドを含む。好適なMHCポリペプチド、MOD、及びIgFcポリペプチドは上述される。第1及び第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、化学コンジュゲーション部位を含む。一部の事例では、第1及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写制御要素に作動可能に連結されている。一部の事例では、転写制御要素は、真核細胞において機能性であるプロモーターである。一部の事例では、該核酸は、別個の発現ベクターに存在する。

30

【0468】

III. B. T細胞MMPに存在する2つ以上のポリペプチドをコードする核酸

本開示は、T細胞MMPの少なくとも第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。一部の事例では、本開示のT細胞MMPが第1、第2、及び第3のポリペプチドを含む場合、核酸は、第1、第2、及び第3のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の事例では、T細胞MMPの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に介在する、タンパク質分解によって切断可能なリンカーを含む。一部の事例では、T細胞MMPの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に介在する、配列内リボソーム進入部位(IRES)を含む。一部の事例では、T細胞MMPの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、第2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に介在する、リボソームスキッピングシグナル(またはシス作用性ヒドロラーゼ要素、CHYSEL)を含む。タンパク質分解によって切断可能なリンカーがT細胞MMPの第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードするそれぞれのヌクレオチド配列の間に提供される、核酸の例が

40

50

下記に記載される。これらの実施形態のうちのいずれにおいても、タンパク質分解によって切断可能なリンカーをコードするヌクレオチド配列の代わりに、IRESまたはリボソームスキッピングシグナルが使用され得る。

【0469】

本明細書で提供される一部の事例では、第1の核酸（例えば、組換え発現ベクター、mRNA、ウイルスRNA等）は、T細胞MMPの第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、第2の核酸（例えば、組換え発現ベクター、mRNA、ウイルスRNA等）は、T細胞MMPの第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の事例では、第1のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及び第2のポリペプチドをコードする第2のヌクレオチド配列は各々、転写制御要素、例えば、真核細胞において機能性であるプロモーター等のプロモーターに作動可能に連結され、このプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。

10

【0470】

本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、該組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、下記の要素、a)第1のMHCポリペプチド、b)MOD（例えば、上述のような親和性低減バリエーション）、c)タンパク質分解によって切断可能なリンカー、d)第2のMHCポリペプチド、及びe)免疫グロブリン(Ig)Fcポリペプチド、を含み、該要素のうちの少なくとも1つが、細胞プロセス中に除去されない化学コンジュゲーション部位を含む。本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、該組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、下記の要素、a)第1のリーダーペプチド、b)第1のMHCポリペプチド、c)MOD（例えば、上述のような親和性低減バリエーション）、d)タンパク質分解によって切断可能なリンカー、e)第2のリーダーペプチド、f)第2のMHCポリペプチド、及びg)IgFcポリペプチド、を含み、該要素のうちの少なくとも1つが、細胞プロセス中に除去されない化学コンジュゲーション部位を含む。本開示は、組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、該組換えポリペプチドは、N末端からC末端の順に、下記の要素、a)第1のMHCポリペプチド、b)タンパク質分解によって切断可能なリンカー、c)MOD（例えば、上述のような親和性低減バリエーション）、d)第2のMHCポリペプチド、及びe)IgFcポリペプチド、を含み、該要素のうちの少なくとも1つが、細胞プロセス中に除去されない化学コンジュゲーション部位を含む。一部の事例では、第1のリーダーペプチド及び第2のリーダーペプチドは、2Mリーダーペプチドである。一部の事例では、ヌクレオチド配列は、転写制御要素に作動可能に連結されている。一部の事例では、転写制御要素は、真核細胞において機能性であるプロモーターである。

20

30

【0471】

好適なMHCポリペプチドは上述される。一部の事例では、第1のMHCポリペプチドは、2-ミクログロブリンポリペプチドであり、第2のMHCポリペプチドは、MHCクラスI重鎖ポリペプチドである。一部の事例では、2-ミクログロブリンポリペプチドは、図4に図示される2Mアミノ酸配列に対して少なくとも約85%（例えば、少なくとも(at least)約90%、95%、98%、99%、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の事例では、MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K、またはHLA-L重鎖である。一部の事例では、MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、図3A～3Dのうちのいずれか1つに図示されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。かかる実施形態では、MHCクラスI重鎖ポリペプチドは、膜貫通アンカードメインを含まない場合がある（例えば、該重鎖ポリペプチドは、図3Dにある配列を含む）。

40

【0472】

好適なFcポリペプチドは上述される。一部の事例では、IgFcポリペプチドは、IgG1Fcポリペプチド、IgG2Fcポリペプチド、IgG3Fcポリペプチド、

50

ド、I g G 4 F c ポリペプチド、I g A F c ポリペプチド、またはI g M F c ポリペプチドである。一部の事例では、I g F c ポリペプチドは、図 2 A ~ 2 G に図示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 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。

【 0 4 7 3 】

好適な免疫調節ポリペプチド (M O D) は上述される。

【 0 4 7 4 】

タンパク質分解によって切断可能な任意の他のリンカーに加えて、一部の事例では、タンパク質分解によって切断可能なリンカーは、a) L E V L F Q G P (配列番号 4 0)、b) E N L Y T Q S (配列番号 4 1)、c) D D D D K (配列番号 4 2)、d) L V P R (配列番号 4 3)、及び e) G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 4 4) からなる群 (r o u p) から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 4 7 5 】

一部の事例では、第 1 の M H C ポリペプチドに結合した第 1 の C y s 残基を含むリンカーが提供され、第 2 の M H C ポリペプチドは、第 2 の (操作された) C y s 残基を提供するようなアミノ酸置換を含み、それにより、第 1 及び第 2 の C y s 残基が、該リンカーと第 2 の M H C ポリペプチドとの間でジスルフィド結合による連結を提供する。一部の事例では、第 1 の M H C ポリペプチドは、第 1 の操作された C y s 残基を提供するようなアミノ酸置換を含み、第 2 の M H C ポリペプチドは、第 2 の操作された C y s 残基を提供するようなアミノ酸置換を含み、それにより、第 1 の C y s 残基及び第 2 の C y s 残基が、第 1 の M H C ポリペプチドと第 2 の M H C ポリペプチドとの間でジスルフィド結合による連結を提供する。上記で考察されたように、ジスルフィド架橋が提供される場合、チオール反応性薬剤またはビス - チオールリンカーのいずれかをを用いて、ペイロードまたはエピトープを組み込むことが可能である。

【 0 4 7 6 】

I I I . C . 組換え発現ベクター

本開示は、本開示の核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。一部の事例では、組換え発現ベクターは、非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、組換え発現ベクターは、ウイルス構築物、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス構築物 (例えば、米国特許第 7 , 0 7 8 , 3 8 7 号を参照されたい)、組換えアデノウイルス構築物、組換えレンチウイルス構築物、組換えレトロウイルス構築物、非組み込みウイルスベクター等である。

【 0 4 7 7 】

好適な発現ベクターには、ウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス (例えば、Li et al. , Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 2 5 4 3 2 5 4 9 , 1 9 9 4、Borras et al. , Gene Ther 6 : 5 1 5 5 2 4 , 1 9 9 9、Li and Davidson , PNAS 92 : 7 7 0 0 7 7 0 4 , 1 9 9 5、Sakamoto et al. , H Gene Ther 5 : 1 0 8 8 1 0 9 7 , 1 9 9 9、WO 9 4 / 1 2 6 4 9、WO 9 3 / 0 3 7 6 9、WO 9 3 / 1 9 1 9 1、WO 9 4 / 2 8 9 3 8、WO 9 5 / 1 1 9 8 4、及び WO 9 5 / 0 0 6 5 5 を参照されたい)、アデノ随伴ウイルス (例えば、Ali et al. , Hum Gene Ther 9 : 8 1 8 6 , 1 9 9 8、Flannery et al. , PNAS 94 : 6 9 1 6 6 9 2 1 , 1 9 9 7、Bennett et al. , Invest Ophthalmol Vis Sci 38 : 2 8 5 7 2 8 6 3 , 1 9 9 7、Jomary et al. , Gene Ther 4 : 6 8 3 6 9 0 , 1 9 9 7、Rolling et al. , Hum Gene Ther 10 : 6 4 1 6 4 8 , 1 9 9 9、Ali et al. , Hum Mol Genet 5 : 5 9 1 5 9 4 , 1 9 9 6、WO 9 3 / 0 9 2 3 9 における Srivastava、Samulski et al. , J. Vir. (1 9 8 9) 6 3 : 3 8 2 2 - 3 8 2 8、Mendelson et al. , Virol. (1 9 8 8) 1 6 6 : 1 5 4 - 1 6 5、及び Flotte et al. , PNAS (1 9 9 3) 9 0 : 1 0

613-10617を参照されたい)、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(例えば、Miyoshi et al., PNAS 94:10319-23, 1997、Takahashi et al., J Virol 73:7812-7816, 1999を参照されたい)、レトロウイルスベクター(例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳腺腫瘍ウイルス等のレトロウイルスに由来するベクターに基づく、ウイルスベクター)等が含まれるが、これらに限定されない。

【0478】

多数の好適な発現ベクターが当業者に既知であり、多くが市販されている。以下のベクターは、真核宿主細胞に対する例として提供される。pXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLSV40(Pharmacia)。しかしながら、宿主細胞と適合性である限り、任意の他のベクターが使用され得る。

10

【0479】

利用される宿主/ベクター系に応じて、構成的プロモーター及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等を含めた、いくつかの好適な転写制御要素及び翻訳制御要素のうちのいずれも、発現ベクターにおいて使用され得る(例えば、Bitter et al. (1987), Methods in Enzymology, 153:516-544を参照されたい)。

20

【0480】

一部の実施形態では、DNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、制御要素、例えば、プロモーター等の転写制御要素に作動可能に連結されている。転写制御要素は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞、または原核細胞(例えば、細菌または古細菌細胞)のいずれかにおいて機能性であり得る。一部の実施形態では、DNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、原核細胞及び真核細胞の両方においてDNA標的化RNA及び/または部位特異的修飾ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の制御要素に作動可能に連結されている。

【0481】

好適な真核生物プロモーター(真核細胞において機能的なプロモーター)の非限定的な例としては、サイトメガロウイルス(CMV)最初期、単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ、初期及び後期SV40、レトロウイルス由来の長い末端反復配列(LTR)、ならびにマウスメタロチオネイン-I由来のものが挙げられる。適切なベクター及びプロモーターの選択は、当該技術分野における通常の技術の水準内に十分にある。発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写ターミネーターを含有してもよい。発現ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでもよい。

30

【0482】

Iv. 宿主細胞

本開示は、遺伝子修飾された宿主細胞を提供し、該宿主細胞は、本開示の核酸により遺伝子修飾されている。

40

【0483】

好適な宿主細胞には、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞等の真核細胞が含まれる。一部の事例では、宿主細胞は、哺乳類細胞株の細胞である。好適な哺乳類細胞株には、ヒト細胞株、非ヒト霊長類細胞株、齧歯類(例えば、マウス、ラット)細胞株等が含まれる。好適な哺乳類細胞株には、HeLa細胞(例えば、American Type Culture Collection(ATCC)番号CCL-2(商標))、CHO細胞(例えば、ATCC番号CRL-9618(商標)、CCL-61(商標)、CRL9096)、293細胞(例えば、ATCC番号CRL-1573(商標))、Vero細胞、NIH 3T3細胞(例えば、ATCC番号CRL-1658)、Huh-7細胞、B

50

H K細胞（例えば、ATCC番号CCL-10（商標））、PC12細胞（ATCC番号CRL-1721（商標））、COS細胞、COS-7細胞（ATCC番号CRL1651）、RAT1細胞、マウスL細胞（ATCC番号CCLI.3）、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞（ATCC番号CRL1573）、HLHeP2細胞等が含まれるが、これらに限定されない。

【0484】

一部の事例では、宿主細胞は、内在性MHC 2Mを合成しないように、及び/または内在性MHCクラスI重鎖（MHC-H）を合成しないように遺伝子修飾された、哺乳類細胞である。前述のものに加えて、ホルミルグリシン生成酵素（FGE）活性を発現する宿主細胞が、スルファターゼモチーフを含むT細胞MMPとの使用に関して上記で考察され、かかる細胞は有利には、内在性MHC 2M及びMHC-Hタンパク質の、両方ではなくとも少なくとも一方を発現しないように修飾され得る。

10

【0485】

V. 組成物

本開示は、1つまたは複数のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを含む、薬学的組成物を含めた組成物を提供する。本開示は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む、薬学的組成物を含めた組成物を提供する。

【0486】

V. A. T細胞MMPを含む組成物

本開示の組成物は、本開示のT細胞MMPに加えて、下記のうちの1つまたは複数を含み得る。塩、例えば、NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等；緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、N-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-N'-（2-エタンスルホン酸）（HEPES）、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸ナトリウム塩（MES）、3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPS）等；可溶化剤；界面活性剤、例えば、Tween-20等といった非イオン性界面活性剤；プロテアーゼ阻害剤；グリセロール等。

20

【0487】

該組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含んでもよく、様々なそのような賦形剤が当該技術分野で既知であり、本明細書で詳細に考察される必要はない。薬学的に許容される賦形剤は、様々な刊行物に十分に記載されており、これには例えば、“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 19th Ed. (1995)、または最新版、Mack Publishing Co、A. Gennaro (2000) “Remington: The Science and Practice of Pharmacy,” 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins、及びHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assocが含まれる。

30

40

【0488】

薬学的組成物は、本開示のT細胞MMPと、薬学的に許容される賦形剤とを含み得る。一部の事例では、対象となる薬学的組成物は、対象への投与に好適であり、例えば、滅菌されていよう。例えば、一部の実施形態では、対象となる薬学的組成物は、ヒト対象への投与に好適であり、例えば、該組成物は、滅菌されており、かつ検出可能な発熱物質及び/または他の毒素を含まない。

【0489】

該タンパク質組成物は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステ

50

アリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、スクロース、マグネシウム、カーボネート等といった他の構成要素を含んでもよい。該組成物は、pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤等といった、生理条件に近似させるために必要とされるような薬学的に許容される補助的物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、塩酸塩、硫酸塩、溶媒和物（例えば、混合イオン性塩、水、有機物）、水和物（例えば、水）等を含んでもよい。

【0490】

例えば、組成物は、水性液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、坐剤、カプセル剤、懸濁剤、スプレー剤等を含み（例えば、その形態であり）得る。該組成物は、下記に記載される種々の投与経路に従って製剤化されてもよい。

10

【0491】

本開示のT細胞MMPが、注射剤（例えば、皮下、腹腔内、筋肉内、及び/または静脈内）として組織内に直接投与される場合、製剤は、即時使用可能な（ready-to-use）剤形、非水性形態（例えば、再構成可能な貯蔵安定性粉末）、または薬学的に許容される担体及び賦形剤から構成される液体等の水性形態として提供され得る。該タンパク質含有製剤はまた、投与後に対象となるタンパク質の血清半減期を向上させるように提供され得る。例えば、該タンパク質は、リボソーム製剤中で、コロイドとして調製されて、または血清半減期を延長するための他の従来技法により、提供され得る。例えば、Szoka et al., 1980 Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、及び同第4,837,028号に記載されるような、様々な方法が、リボソームを調製するために利用可能である。調製物はまた、制御放出または緩徐放出形態で提供されてもよい。

20

【0492】

非経口投与に好適な製剤の他の例としては、等張滅菌注射液、酸化防止剤、静菌剤、及び製剤を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質、懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び防腐剤が挙げられる。例えば、対象となる薬学的組成物は、容器、例えば、シリンジ等の滅菌容器中に存在し得る。製剤は、アンプル及びバイアル等の単位用量または複数用量の密封容器中で提示され得、注射のために、使用直前に滅菌液体賦形剤、例えば、水の添加のみを必要とする、凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））状態で貯蔵され得る。即座の注射液及び懸濁液が、滅菌散剤、顆粒剤、及び錠剤から調製され得る。

30

【0493】

製剤中のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの濃度は、広く異なり得（例えば、重量に基づき、約0.1%未満、通常は約2%または少なくとも約2%から最大20%~50%以上まで）、通常は、主として流体の体積、粘度、ならびに選択される特定の投与様式及び患者の必要性に従った患者に基づく要因に基づいて、選択されよう。

【0494】

本開示は、本開示の組成物、例えば、液体組成物を含む容器を提供する。容器は、例えば、シリンジ、アンプル等であり得る。一部の事例では、容器は滅菌されている。一部の事例では、容器及び組成物の両方が滅菌されている。

40

【0495】

本開示は、T細胞MMPまたはそのエピトープコンジュゲートを含む、薬学的組成物を含めた組成物を提供する。組成物は、a) T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートと、b) T細胞MMP及びそれらのエピトープコンジュゲートに関して上述したような賦形剤と、を含み得る。一部の事例では、賦形剤は、薬学的に許容される賦形剤である。

【0496】

一部の事例では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、液体組成物中に存在する。故に、本開示は、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞

50

胞 MMP - エピトープコンジュゲートを含む組成物（例えば、薬学的組成物を含めた、液体組成物）を提供する。一部の事例では、本開示の組成物は、a）本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと、b）食塩水（例えば、0.9 % または約 0.9 % NaCl）と、を含む。一部の事例では、該組成物は、滅菌されている。一部の事例では、該組成物は、ヒト対象への投与に好適であり、例えば、該組成物は、滅菌されており、かつ検出可能な発熱物質及び / または他の毒素を含まない。故に、本開示は、a）T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと、b）食塩水（例えば、0.9 % または約 0.9 % NaCl）と、を含む組成物を提供し、該組成物は、滅菌されており、かつ検出可能な発熱物質及び / または他の毒素を含まない。

【0497】

VI. 核酸または組換え発現ベクターを含む組成物

本開示は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む、組成物、例えば、薬学的組成物を提供する。多種多様な薬学的に許容される賦形剤が当該技術分野で既知であり、本明細書で詳細に考察される必要はない。薬学的に許容される賦形剤は、様々な刊行物に十分に記載されており、これには例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins、及び Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc が含まれる。

【0498】

本開示の組成物は、a）T 細胞 MMP をコードするヌクレオチド配列を含む 1 つもしくは複数の核酸または 1 つもしくは複数の組換え発現ベクターと、b）緩衝液、界面活性剤、酸化防止剤、親水性ポリマー、デキストリン、キレート剤、懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、静菌剤、湿潤剤、及び防腐剤のうちの 1 つまたは複数と、を含むことができる。好適な緩衝液には、（例えば）N, N - ビス（2 - ヒドロキシエチル） - 2 - アミノエタンスルホン酸（BES）、ビス（2 - ヒドロキシエチル）アミノ - トリス（ヒドロキシメチル）メタン（ビス - トリス）、N - （2 - ヒドロキシエチル）ピペラジン - N' 3 - プロパンスルホン酸（EPPS または HEPPS）、グリシルグリシン、N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸（HEPES）、3 - （N - モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン - N, N' - ビス（2 - エタンスルホン酸）（PIPES）、重炭酸ナトリウム、3 - （N - トリス（ヒドロキシメチル） - メチル - アミノ） - 2 - ヒドロキシ - プロパンスルホン酸）TAPSO、（N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸（TES）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - グリシン（トリシン）、トリス（ヒドロキシメチル） - アミノメタン（トリス）等）が含まれるが、これらに限定されない。好適な塩には、例えば、NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄ 等が含まれる。

【0499】

本開示の薬学的製剤は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを約 0.001 % ~ 約 90 %（w/w）の量で含むことができる。下記の製剤の説明において、「対象となる核酸または組換え発現ベクター」とは、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含むことが理解されよう。例えば、一部の実施形態では、対象となる製剤は、本開示の核酸または組換え発現ベクターを含む。

【0500】

対象となる核酸または組換え発現ベクターは、他の化合物または化合物の混合物と混和、カプセル封入、コンジュゲートされ得るか、または別様に会合され得、かかる化合物は、例えば、リボソームまたは受容体標的分子を含むことができる。対象となる核酸または

10

20

30

40

50

組換え発現ベクターは、製剤中で、取り込み、分布、及び／または吸収を補助する１つまたは複数の構成要素と組み合わせることができる。

【 0 5 0 1 】

対象となる核酸または組換え発現ベクター組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、ソフトゲル剤、坐剤、及び浣腸剤等の、多くの可能な剤形のうちのいずれかへと製剤化され得る。対象となる核酸または組換え発現ベクター組成物はまた、水性、非水性、または混合媒体中の懸濁剤としても製剤化され得る。水性懸濁剤は、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、及び／またはデキストランを含めた、懸濁剤の粘度を増加させる物質をさらに含有してもよい。懸濁剤はまた、安定剤を含有してもよい。

10

【 0 5 0 2 】

対象となる核酸または組換え発現ベクターを含む製剤は、リボソーム製剤であり得る。本明細書で使用されるとき、「リボソーム」という用語は、１つまたは複数の球状の二重層に配列された両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リボソームは、親油性材料と、送達対象の組成物を含有する水性の内部とから形成される膜を有する、単層膜または多層膜小胞である。カチオン性リボソームは、負電荷をもつDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成し得る、正電荷をもつリボソームである。pH感受性であるまたは負電荷をもつリボソームは、DNAと複合体を形成するのではなく、DNAを封入すると考えられる。カチオン性リボソーム及び非カチオン性リボソームの両方が、対象となる核酸または組換え発現ベクターを送達するために使用され得る。

20

【 0 5 0 3 】

リボソームにはまた、「立体的に安定化された」リボソームも含まれ、この用語は、本明細書で使用されるとき、１つまたは複数の特殊化された脂質を含むリボソームを指し、この特殊化された脂質は、リボソームに組み込まれるとき、かかる特殊化された脂質を欠いたリボソームと比べて向上した循環寿命をもたらす。立体的に安定化されたリボソームの例としては、リボソームの小胞を形成する脂質部分の一部が１つまたは複数の糖脂質を含むか、またはポリエチレングリコール（PEG）部分等の１つもしくは複数の親水性ポリマーで誘導体化されている、リボソームがある。リボソーム及びそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、同特許は参照によりその全体が本明細書に援用される。

30

【 0 5 0 4 】

本開示の製剤及び組成物はまた、界面活性剤を含んでもよい。医薬品、製剤、及びエマルジョン中の界面活性剤の使用は、当該技術分野で周知である。界面活性剤及びそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載される。

【 0 5 0 5 】

一実施形態では、核酸の効率的な送達をもたらすために、種々の透過促進剤が含まれる。細胞膜を通した非親油性薬物の拡散を補助することに加えて、透過促進剤はまた、親油性薬物の透過性も向上させる。透過促進剤は、５つの大区分、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、及び非キレート性非界面活性剤のうちの１つに属するものとして分類され得る。透過促進剤及びそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、同特許は参照によりその全体が本明細書に援用される。

40

【 0 5 0 6 】

経口投与用の組成物及び製剤には、散剤もしくは顆粒剤、微粒子、ナノ粒子、水中もしくは非水性媒体中の懸濁剤もしくは液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、小袋、錠剤、または小さな錠剤（minitablets）が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、または結合剤が望ましい場合がある。好適な経口製剤には、対象となるアンチセンス核酸が１つまたは複数の透過促進剤、界面活性剤、及びキレート剤と併せて投与されるものが含まれる。好適な界面活性剤には、脂肪酸及び／またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸及び／またはその塩が含まれるが、これらに限定されない。好適な胆汁酸／塩及び脂肪酸ならびにそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記

50

載される。また、透過促進剤の組み合わせ、例えば、胆汁酸 / 塩と組み合わせた脂肪酸 / 塩も好適である。例となる好適な組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、及び U D C A のナトリウム塩である。さらなる透過促進剤には、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、及びポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルが含まれるが、これらに限定されない。好適な透過促進剤にはまた、プロピレングリコール、ジメチルスルホキシド、トリエタノールアミン (triethanolamine)、N, N - ジメチルアセトアミド、N, N - ジメチルホルムアミド、2 - ピロリドン及びその誘導体、テトラヒドロフルフリルアルコール、ならびに A Z O N E (商標) も含まれる。

【0507】

V I I T細胞活性の調節方法

T細胞MMP上のMOD、ならびに一部の事例では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP - エピトープコンジュゲートが担持している場合があるペイロード。エピトープを欠いたT細胞MMPを用いて、ペイロードを、MODによって定義されるT細胞のクラスに、及び/またはT細胞のこれらのクラスを刺激するかもしくは阻害する手段として、送達してもよい。他の事例では、T細胞MMPがエピトープにコンジュゲートされた場合(すなわち、それはT細胞MMP - エピトープコンジュゲートである)、このコンジュゲートをT細胞に接触させることにより、エピトープ特異的T細胞の調節がもたらされる。一部の事例では、接触は、インビボで(例えば、ヒト、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、または霊長類等の哺乳動物において)起こる。一部の事例では、接触は、インビトロで起こる。一部の事例では、接触は、エクスビボで起こる。

【0508】

本開示は、エピトープ特異的T細胞の活性の選択的調節方法を提供し、該方法は、T細胞を本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることを含み、ここで、T細胞を本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、エピトープ特異的T細胞の活性が選択的に調節される。一部の事例では、接触は、インビトロで起こる。一部の事例では、接触は、インビボで起こる。一部の事例では、接触は、エクスビボで起こる。

【0509】

一部の事例では、例えば、標的T細胞がCD8⁺ T細胞である場合、T細胞MMP - エピトープコンジュゲートは、MHCクラスIポリペプチド(例えば、2 - ミクログロブリン及びMHCクラスI重鎖)を含む。

【0510】

本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートが、活性化型ポリペプチドであるMODを含む場合、T細胞をT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、エピトープ特異的T細胞が活性化される。一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、がん細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、がん細胞に対するT細胞の細胞傷害活性が増加する。一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、がん細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、エピトープ特異的T細胞の数が増加する。

【0511】

一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、ウイルス感染細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、ウイルス感染細胞に対するT細胞の細胞傷害活性が増加する。一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、ウイルス感染細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、エピトープ特異的T細胞の数が増加する。

【0512】

10

20

30

40

50

本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが、阻害型ポリペプチドである MOD を含む場合、T 細胞を該多量体に接触させることにより、エピトープ特異的 T 細胞が阻害される。一部の事例では、エピトープ特異的 T 細胞は、自己抗原に存在するエピトープに特異的である自己反応性 T 細胞であり、この接触により、自己反応性 T 細胞の数が低減される。

【0513】

V I I I 共刺激ポリペプチド (MOD) の選択的送達方法

本開示は、MOD または天然型 MOD の親和性低減バリエーション (本明細書に開示されるバリエーション等) の、例えば、所与のエピトープに特異的な TCR が標的化されるような状態で、選択された T 細胞または選択された T 細胞集団への送達方法を提供する。本開示は、MOD または本明細書に開示される天然型 MOD の親和性低減バリエーションの、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的な TCR をもつ標的 T 細胞への選択的な送達方法を提供する。該方法は、T 細胞の集団を本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることを含む。T 細胞の集団は、i) 標的 T 細胞と、ii) 該エピトープに特異的でない非標的 T 細胞 (例えば、エピトープ特異的 T 細胞が結合するエピトープ以外のエピトープ (複数可) に特異的である T 細胞) と、を含む混合集団であり得る。エピトープ特異的 T 細胞は、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在するエピトープ提示ペプチドに特異的であり、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートによって提供されるペプチド HLA 複合体またはペプチド MHC 複合体に結合する。したがって、T 細胞の集団を T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに接触させることにより、共刺激ポリペプチド (例えば、野生型 MOD または本明細書に記載されるような野生型 MOD の親和性低減バリエーション) が、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的である T 細胞 (複数可) に選択的に送達される。

【0514】

故に、本開示は、MOD (IL - 2 等)、もしくは本明細書に開示される天然型 MOD の親和性低減バリエーション (IL - 2 バリエーション等)、または両方の組み合わせの、標的 T 細胞への選択的な送達方法を提供し、該方法は、T 細胞の混合集団を本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることを含む。T 細胞の混合集団は、標的 T 細胞及び非標的 T 細胞を含む。標的 T 細胞は、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート内に存在するエピトープに特異的である。T 細胞の混合集団を本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることにより、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート内に存在する MOD (複数可) が標的 T 細胞に送達される。

【0515】

例えば、本開示の T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートは、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的である標的 T 細胞 (複数可) と、ii) 非標的 T 細胞 (複数可)、例えば、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープではない第 2 のエピトープ (複数可) に特異的である T 細胞 (複数可) と、を含む T 細胞の集団に接触させられる。該集団の接触により、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD (複数可) (例えば、天然型 MOD (例えば、天然型 IL - 2) または天然型 MOD の親和性低減バリエーション (例えば、本明細書に開示される IL - 2 バリエーション) の、標的 T 細胞への選択的送達をもたらされる。故に、例えば、非標的 T 細胞の 50 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、または 4 %、3 %、2 %、もしくは 1 % 未満が、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに結合し、結果として、共刺激ポリペプチド (例えば、IL - 2 または IL - 2 バリエーション) は、非標的 T 細胞には送達されない。別の例として、該集団の接触により、T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在する共刺激ポリペプチド (複数可) (例えば、天然型共刺激ポリペプチド (例えば、天然型 4 - 1 BBL) または天然型共刺激ポリペプチドの親和性低減バリエーション (例えば、本明細書に開示される 4 - 1 BBL バリエーション) の、標的 T 細胞への選択的送達をもたらされる。故に、例えば、非標的 T 細胞の 50 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、25 % 未満、20 % 未満、1

5 %未満、10 %未満、5 %未満、または4 %、3 %、2 %、もしくは1 %未満が、T細胞MMPエピトープコンジュゲートに結合し、結果として、共刺激ポリペプチド（例えば、4 - 1 B B Lまたは4 - 1 B B Lバリエーション）は、非標的T細胞には送達されない。

【0516】

一部の事例では、T細胞の集団は、インビトロにある。一部の事例では、T細胞の集団は、インビトロにあり、標的T細胞集団の、本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに対する生物学的応答（例えば、T細胞の活性化及び／または増大及び／または表現型分化）が、インビトロ培養物の関連において誘発される。例えば、T細胞の混合集団を個体から得ることができ、T細胞MMP - エピトープコンジュゲートにインビトロで接触させることができる。かかる接触は、T細胞の集団の、規定の用量（複数可）及び／または曝露スケジュール（複数可）への単回または複数回の曝露を含み得る。一部の事例では、該接触は、T細胞の集団内での標的T細胞の選択的結合／活性化及び／または増大をもたらす。例として、T細胞の混合集団は、末梢血単核細胞（PBMC）であり得る。例えば、患者由来のPBMCを標準的な採血及びPBMC濃縮技法から得、その後、標準的なリンパ球培養条件下で0.1 ~ 1000 nMの本開示の多量体ポリペプチドに曝露することができる。規定の用量及びスケジュールでの混合T細胞集団の曝露の前、その最中、及びその後の時点で、インビトロ培養物中の標的T細胞の存在量を、特異的ペプチド - MHC多量体及び／または表現型マーカー及び／または機能活性（例えば、サイトカインELISPOTアッセイ）によって監視することができる。一部の事例では、インビトロで抗原特異的細胞の最適な存在量及び／または表現型が達成されると、活性化した及び／または増大した標的T細胞の集団の全てまたは一部分が、個体（T細胞の混合集団が得られた個体）に投与される。

【0517】

一部の事例では、T細胞の集団は、インビトロにある。例えば、T細胞の混合集団を個体から得、本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートにインビトロで接触させる。インビトロ細胞培養の関連における、T細胞の、規定の用量（複数可）及び／または曝露スケジュール（複数可）への単回または複数回の曝露を含み得る、かかる接触を用いて、T細胞の混合集団が、T細胞MMP - エピトープコンジュゲートによって提示されるエピトープに特異的であるT細胞を含むかどうかを決定することができる。T細胞MMP - エピトープコンジュゲートのエピトープに特異的であるT細胞の存在は、T細胞の混合集団を含む試料をアッセイすることによって決定することができ、そのようなT細胞の集団は、該エピトープに特異的でないT細胞（非標的T細胞）を含み、また該エピトープに特異的であるT細胞（標的T細胞）を含んでもよい。既知のアッセイを用いて、標的T細胞の活性化及び／または増殖を検出し、それによって、特定のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートが、当該個体に存在するT細胞に結合するエピトープを保有するかどうか、故に、該T細胞MMP - エピトープコンジュゲートが、その個体にとって治療組成物として有用な可能性を有するかどうかを決定することが可能な、エクスピボアッセイを提供することができる。標的T細胞の活性化及び／または増殖を検出するのに好適な既知のアッセイには、例えば、フローサイトメトリーによるT細胞の表現型及び／または抗原特異性及び／または増殖の特性評価が含まれる。エピトープ特異的T細胞の存在を検出するためのかかるアッセイ、例えば、コンパニオン診断は、T細胞MMP - エピトープコンジュゲートが標的T細胞に選択的に結合する／それを活性化させる及び／または増大させるかどうかを決定するための、追加的なアッセイ（例えば、エフェクターサイトカインELISPOTアッセイ）及び／または適切な対照（例えば、抗原特異的及び抗原非特異的多量体ペプチド - HLAを染色する試薬）をさらに含み得る。故に、例えば、本開示は、個体から得られたT細胞の混合集団における、目的とするエピトープに結合する標的T細胞の存在の検出方法を提供し、該方法は、a) インビトロT細胞の混合集団を本開示のT細胞MMP - エピトープコンジュゲートに接触させることと（ここで、T細胞MMP - エピトープコンジュゲートは、目的とするエピトープを含む）、b) 該接触に応答したT細胞の活

10

20

30

40

50

活性化及び／または増殖を検出することと（ここで、活性化した及び／または増殖したＴ細胞は、標的Ｔ細胞の存在を示す）、を含む。代替として、及び／または加えて、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートを用いて、所望のＴ細胞集団の活性化及び／または増大（増殖）が得られる場合、活性化した／増大したＴ細胞を含むＴ細胞の集団の全てまたは一部分が、治療薬として当該個体に戻して投与され得る。

【０５１８】

一部の事例では、Ｔ細胞の集団は、個体内のインビボにある。かかる事例では、ＭＯＤ（例えば、ＩＬ－２もしくは親和性低減ＩＬ－２、４－１ＢＢＬもしくは親和性低減４－１ＢＢＬ、ＰＤ－Ｌ１もしくは親和性低減ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ８０もしくは親和性低減ＣＤ８０、またはＣＤ８６もしくは親和性低減ＣＤ８６）の、エピトープ特異的Ｔ細胞への、本開示の選択的送達方法は、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートを個体に投与することを含む。

10

【０５１９】

ＭＯＤ（例えば、ＩＬ－２もしくは親和性低減ＩＬ－２、４－１ＢＢＬもしくは親和性低減４－１ＢＢＬ、ＰＤ－Ｌ１もしくは親和性低減ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ８０もしくは親和性低減ＣＤ８０、またはＣＤ８６もしくは親和性低減ＣＤ８６）が選択的に送達されようとしているエピトープ特異的Ｔ細胞は、本明細書で「標的Ｔ細胞」とも称される。一部の事例では、標的Ｔ細胞は、制御性Ｔ細胞（Ｔレグ）である。一部の事例では、Ｔレグは、自己反応性Ｔ細胞の活性を阻害または抑制する。

20

【０５２０】

一部の事例では、標的Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞である。例えば、標的Ｔ細胞は、がんエピトープ（例えば、がん細胞によって提示されるエピトープ）に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞であり得る。

【０５２１】

ＸＩ．処置方法

本開示は、個体におけるエピトープ特異的Ｔ細胞の活性の選択的調節方法（例えば、個体を処置する）を提供し、該方法は、エピトープへのコンジュゲーション後に個体においてエピトープ特異的Ｔ細胞の活性を選択的に調節するのに有効である、ある量の本開示のＴ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲート、またはＴ細胞ＭＭＰをコードする１つもしくは複数の核酸を個体に投与することを含む。また、ヒトまたは動物の身体の処置方法において使用するための、本開示のＴ細胞ＭＭＰエピトープコンジュゲートも提供される。一部の事例では、本開示の処置方法は、それを必要とする個体に、本開示のＴ細胞ＭＭＰをコードするヌクレオチド配列を含む１つまたは複数の組換え発現ベクターを投与することを含む。一部の事例では、本開示の処置方法は、それを必要とする個体に、本開示のＴ細胞ＭＭＰをコードするヌクレオチド配列を含む１つまたは複数のｍＲＮＡ分子を投与することを含む。一部の事例では、本開示の処置方法は、それを必要とする個体に、本開示のＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートを投与することを含む。処置され得る病態には、感染症、がん、及び自己免疫障害が含まれ、これらのうちのいくつかの例が下記に記載される。

30

【０５２２】

一部の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、それを必要とする個体に投与されたとき、エピトープ特異的Ｔ細胞の応答及びエピトープ非特異的Ｔ細胞の応答の両方を誘導する。換言すれば、一部の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、それを必要とする個体に投与されたとき、*i*) Ｔ細胞ＭＭＰに存在するエピトープに特異的なＴＣＲ、及び*i i*) Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートに存在するＭＯＤに結合する同種ＭＯＤ、の両方を発現する第１のＴ細胞の活性を調節することによって、エピトープ特異的Ｔ細胞の応答を誘導し、かつ、*i*) Ｔ細胞ＭＭＰに存在するエピトープ以外のエピトープに特異的なＴＣＲ、及び*i i*) Ｔ細胞ＭＭＰに存在するＭＯＤに結合する同種ＭＯＤ、を発現する第２のＴ細胞の活性を調節することによって、エピトープ非特異的Ｔ細胞の応答を誘導する。エピトープ特異的Ｔ細胞の応答対エ

40

50

ピトープ非特異的 T 細胞の応答の比は、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、または少なくとも 100 : 1 である。エピトープ特異的 T 細胞の応答対エピトープ非特異的 T 細胞の応答の比は、約 2 : 1 ~ 約 5 : 1、約 5 : 1 ~ 約 10 : 1、約 10 : 1 ~ 約 15 : 1、約 15 : 1 ~ 約 20 : 1、約 20 : 1 ~ 約 25 : 1、約 25 : 1 ~ 約 50 : 1、約 50 : 1 ~ 約 100 : 1、または 100 : 1 超である。T 細胞の「活性を調節すること」には、i) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞を活性化すること、ii) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞の細胞傷害活性を誘導すること、iii) 細胞傷害性 (例えば、CD8⁺) T 細胞による細胞毒素 (例えば、パーフォリン、グランザイム、グラニュライシン) の産生及び放出を誘導すること、iv) 自己反応性 T 細胞の活性を阻害すること等のうちの 1 つまたは複数が含まれ得る。

10

【0523】

複数の実施形態では、例えば、患者が全般的に免疫抑制状態にある場合、独立して選択される MOD (例えば、野生型) またはそれらの同種 MOD に対して低減された親和性を有するバリエーション MOD をもつ 1 つまたは複数の T 細胞 MMP が、患者の全体的な免疫状態 / 応答性 (例えば、ワクチン抗原または感染症に反応する患者の能力によって測定したときの) を刺激するために患者に投与されてもよい。他の実施形態では、例えば、患者が全般的に免疫抑制状態にある場合、独立して選択される MOD (例えば、野生型) またはそれらの同種 MOD に対して低減された親和性を有するバリエーション MOD をもつ、1 つまたは複数の T 細胞 MMP が、患者の免疫応答を刺激するために、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと組み合わせて患者に投与されてもよい。

20

【0524】

複数の実施形態では、独立して選択される MOD (例えば、野生型) またはそれらの同種 MOD に対して低減された親和性を有するバリエーション MOD をもつ 1 つまたは複数の T 細胞 MMP が、病原体に対する免疫の発達を刺激する / 向上させるために、病原体に対するワクチン (例えば、タンパク質または核酸ワクチン) と併せて患者に投与されてもよい。別の実施形態では、病原体に対するエピトープをもつ 1 つまたは複数の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが、病原体に対する免疫の発達を刺激するために、病原体に対するワクチン (例えば、タンパク質または核酸ワクチン) と併せて患者に投与される。かかる事例では、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、独立して選択される MOD (例えば、野生型)、またはそれらの同種 MOD に対して低減された親和性を有するバリエーション MOD を含んでもよい。T 細胞 MMP がワクチン (例えば、タンパク質または核酸) と併せて投与される場合、それはワクチンと組み合わせて、またはワクチン投与と同時にもしくはそれとは異なる時間に投与される別個の製剤中で、共投与されてもよい。

30

【0525】

MOD のその同種 MOD に対して低減された親和性と、エピトープの TCR に対する親和性との組み合わせは、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの向上された選択性を実現する。故に、例えば、本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、それが i) T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在するエピトープ以外のエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD、を発現する第 2 の T 細胞に結合する結合活性と比較して、より高い結合活性をもって、i) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在するエピトープに特異的な TCR、及び ii) T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートに存在する MOD に結合する同種 MOD、の両方を発現する第 1 の T 細胞に結合する。

40

【0526】

本開示は、個体におけるエピトープ特異的 T 細胞の活性の選択的調節方法を提供し、該方法は、個体に、有効量の本開示の T 細胞 MMP または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを投与することを含み、ここで、T 細胞 MMP またはそのエピトープコンジュゲートは、個体においてエピトープ特異的 T 細胞の活性を選択的に調節する。エピトープ特異的 T 細胞の活性の選択的調節により、個体において疾患または障害を処置することがで

50

きる。故に、本開示は、処置を必要とする個体に、有効量のＴ細胞ＭＭＰまたはそのエピトープコンジュゲートを投与することを含む、処置方法を提供する。

【０５２７】

一部の事例では、ＭＯＤは、活性化型ポリペプチドであり、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、エピトープ特異的Ｔ細胞を活性化させる。一部の事例では、該エピトープは、がん関連エピトープであり、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、がん関連エピトープに特異的なＴ細胞の活性を増加させる。

【０５２８】

本開示は、個体におけるがんの処置方法を提供し、該方法は、個体に、有効量の本開示のＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲート投与することを含み、ここで、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、がんエピトープであるＴ細胞エピトープを含み、かつＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートは、刺激性ＭＯＤを含む。一部の事例では、Ｔ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるがん細胞の数を低減する量である。例えば、一部の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるがん細胞の数を、Ｔ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの投与前、またはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートによる投与の不在下での個体におけるがん細胞の数と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または検出不能なレベルまで低減する量である。別の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体における少なくとも１つの固形腫瘍の体積を、Ｔ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの第１回目の用量の投与時点でのその腫瘍の体積と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または検出不能なレベルまで低減する量である。

【０５２９】

一部の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体（腫瘍を有する個体）に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるがん細胞の数、または少なくとも１つの腫瘍の体積のいずれかを検出不能なレベルまで低減する量である。一部の事例では、本開示のＴ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体における腫瘍量を、Ｔ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの投与前、またはＴ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの投与の不在下での個体における総腫瘍量と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または検出不能なレベルまで低減する量である。別の実施形態では、本開示のＴ細胞ＭＭＰまたはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体（腫瘍を有する個体）に１回または複数回の用量で投与されたときに、個体における少なくとも１つの腫瘍の腫瘍体積を低減する量である。例えば、一部の事例では、本開示の多量体ポリペプチドの「有効量」とは、それを必要とする個体（腫瘍を有する個体）に１回または複数回の用量で投与されたときに、腫瘍体積を、Ｔ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの投与前、またはＴ細胞ＭＭＰもしくはＴ細胞ＭＭＰ－エピトープコンジュゲートの投与の不在下での個体における腫瘍体積と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、

少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または検出不能なレベル(体積)まで低減する量である。かかる実施形態では、腫瘍量は、腫瘍の密度及び体積に基づいて算出され得る。

【0530】

一部の事例では、本開示のT細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、個体の生存時間を増加させる量である。例えば、一部の事例では、本開示のT細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、個体の生存時間を、T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートによる投与の不在下での個体の予想される生存時間と比較して、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、3ヶ月~6ヶ月、6ヶ月~1年、1年~2年、2年~5年、5年~10年、または10年超増加させる量である。

10

【0531】

一部の事例では、本開示のT細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体の集団内の個体に1回または複数回の用量で投与されたときにその集団の平均生存時間を増加させる量である。例えば、一部の事例では、本開示のT細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体の集団内の個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを受けているその個体の集団の生存時間を、T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを受けていない個体の生存時間と比較して、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、3ヶ月~6ヶ月、6ヶ月~1年、1年~2年、2年~5年、5年~10年、または10年超増加させる量であり、ここで、集団は、年齢、性別、体重、及び疾患状態(疾患及び進行度合い)を一致させた集団である。一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、ウイルス感染細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP-エピトープコンジュゲートに接触させることにより、ウイルス感染細胞に対するT細胞の細胞傷害活性が増加する。一部の事例では、エピトープ特異的T細胞は、ウイルス感染細胞上に存在するエピトープに特異的であるT細胞であり、このエピトープ特異的T細胞をT細胞MMP-エピトープコンジュゲートに接触させることにより、エピトープ特異的T細胞の数が増加する。したがって、本開示は、個体におけるウイルス感染症の処置方法を提供し、該方法は、個体に、有効量の本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを投与することを含み、ここで、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、ウイルスエピトープであるT細胞エピトープを含み、かつT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、刺激性MODを含む。一部の事例では、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるウイルス感染細胞の数を低減する量である。例えば、一部の事例では、本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるウイルス感染細胞の数を、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートの投与前、またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートによる投与の不在下での個体におけるウイルス感染細胞の数と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%低減する量である。一部の事例では、本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に1回または複数回の用量で投与されたときに、個体におけるウイルス感染細胞の数を検出不能なレベルまで低減する量である。

20

30

40

【0532】

50

本開示はまた、個体における感染症の処置方法も提供し、該方法は、個体に、有効量の T 細胞 MMP 及び / または本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを投与することを含み、ここで、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、病原体関連エピトープである T 細胞エピトープを含み、かつ T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、刺激性 MOD を含む。一部の事例では、T 細胞 MMP の「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、個体における病原体の数を低減する量である。例えば、一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、個体における病原体の数を、T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートによる投与の不在下での個体における病原体の数と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % 低減する量である。一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、個体における病原体の数を検出不能なレベルまで低減する量である。病原体には、ウイルス、細菌、原虫等が含まれる。

10

【0533】

一部の事例では、MOD は、阻害性ポリペプチドであり、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、エピトープ特異的 T 細胞の活性を阻害する。一部の事例では、該エピトープは、自己エピトープであり、T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、自己エピトープに特異的な T 細胞の活性を選択的に阻害する。

20

【0534】

本開示は、個体における自己免疫障害の処置方法を提供し、該方法は、個体に、有効量の、自己エピトープを含む T 細胞 MMP (または T 細胞 MMP をコードするヌクレオチド配列を含む 1 つまたは複数の核酸) 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを投与することを含み、ここで、T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、阻害性 MOD を含む。そのような事例では、T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、自己反応性 T 細胞の数を、T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの投与前、または T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの投与の不在下での個体における自己反応性 T 細胞の数と比較して、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % 低減する量である。一部の事例では、かかる T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、個体における Th2 サイトカインの産生を低減する (例えば、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %) 量である。一部の事例では、かかる T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの「有効量」とは、それを必要とする個体に 1 回または複数回の用量で投与されたときに、個体における自己免疫疾患に関連する 1 つまたは複数の症状を寛解させる量である。

30

40

【0535】

上述のように、一部の事例では、対象となる処置方法を実施するにあたって、本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが、ポリペプチドそれ自体としてそれを必要とする個体に投与される。他の事例では、対象となる処置方法を

50

実施するにあたって、本開示の T 細胞 MMP をコードするヌクレオチド配列を含む 1 つまたは複数の核酸が、それを必要とする個体に投与される。故に、他の事例では、本開示の 1 つまたは複数の核酸、例えば、本開示の 1 つまたは複数の組換え発現ベクターが、それを必要とする個体に投与される。

【0536】

X . 製剤

好適な製剤は上述され、ここで、好適な製剤は、薬学的に許容される賦形剤を含む。一部の事例では、好適な製剤は、a) 本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと、b) 薬学的に許容される賦形剤と、を含む。一部の事例では、好適な製剤は、a) 本開示の T 細胞 MMP をコードするヌクレオチド配列を含む核酸と、b) 薬学的に許容される賦形剤と、を含み、一部の事例では、核酸は、mRNA である。一部の事例では、好適な製剤は、a) 本開示の T 細胞 MMP の第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸と、b) 本開示の T 細胞 MMP の第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸と、c) 薬学的に許容される賦形剤と、を含む。一部の事例では、好適な製剤は、a) 本開示の T 細胞 MMP をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターと、b) 薬学的に許容される賦形剤と、を含む。一部の事例では、好適な製剤は、a) 本開示の T 細胞 MMP の第 1 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の組換え発現ベクターと、b) 本開示の T 細胞 MMP の第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の組換え発現ベクターと、c) 薬学的に許容される賦形剤と、を含む。

10

20

【0537】

好適な薬学的に許容される賦形剤は上述される。

【0538】

X . A . 投薬量

好適な投薬量は、種々の臨床要因に基づいて、主治医、または他の資格を有する医療関係者が決定することができる。医療分野において周知であるが、任意の一患者に対する投薬量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与対象となる特定のポリペプチドまたは核酸、患者の性別、投与時間、投与経路、全般的な健康状態、及び同時に投与されようとしている他の薬物を含めた、多くの要因に左右される。本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、用量当たり $1 \text{ ng} / \text{kg}$ 体重 $\sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の間、例えば、 $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、例えば、 $0.5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の間の量で投与されてもよいが、とりわけ前述の要因を考慮して、この例となる範囲を下回るかまたは上回る用量が想定される。レジメンが持続注入である場合、それはまた、体重 1 キログラム 当たり、 1 分間につき $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg}$ の範囲にあり得る。本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートは、約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 $\sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、例えば、約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $15 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $15 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $25 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $25 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $35 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、約 $35 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $40 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、または約 $40 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重 \sim 約 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の量で投与され得る。

30

40

【0539】

一部の事例では、本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの好適な用量は、体重 1 kg 当たり $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{ g}$ 、体重 1 kg 当たり $0.1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ g}$ 、体重 1 kg 当たり $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{ g}$ 、体重 1 kg 当たり $10 \mu\text{g} \sim 100 \text{ mg}$ 、体重 1 kg 当たり $100 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg}$ 、または体重 1 kg 当たり $100 \mu\text{g} \sim 1 \text{ mg}$ である。当業者は、投与された薬剤の体液または体組織中での測定された滞留時間及び濃度に基づいて、投薬の反復速度を容易に推定することができる。処置の成功に続いて、疾患状態の再発を予防するために患者に維持療法を受けさせることが望ましい場合があり、ここで、本開示の T 細胞 MMP 及び / または T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲ

50

ートは、体重 1 k g 当たり 0 . 0 1 μ g ~ 1 0 0 g、体重 1 k g 当たり 0 . 1 μ g ~ 1 0 g、体重 1 k g 当たり 1 μ g ~ 1 g、体重 1 k g 当たり 1 0 μ g ~ 1 0 0 m g、体重 1 k g 当たり 1 0 0 μ g ~ 1 0 m g、または体重 1 k g 当たり 1 0 0 μ g ~ 1 m g の範囲の維持用量で投与される。

【 0 5 4 0 】

当業者であれば、用量レベルが、具体的な T 細胞 M M P、対象の症状の重症度及び副作用の起こりやすさの関数として異なり得ることを容易に理解しよう。所与の化合物についての好ましい投薬量は、様々な手段により当業者が容易に決定可能である。

【 0 5 4 1 】

一部の実施形態では、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターの複数回用量が投与される。本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターの投与頻度は、様々な要因のうちのいずれか、例えば、症状の重症度等に応じて異なり得る。例えば、一部の実施形態では、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、1 ヶ月に 1 回、1 ヶ月に 2 回、1 ヶ月に 3 回、隔週 (q o w)、1 週間に 1 回 (q w)、1 週間に 2 回 (b i w)、1 週間に 3 回 (t i w)、1 週間に 4 回、1 週間に 5 回、1 週間に 6 回、隔日 (q o d)、毎日 (q d)、1 日 2 回 (q i d)、または 1 日 3 回 (t i d) 投与される。

10

【 0 5 4 2 】

本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターの投与の継続期間、例えば、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターが投与される期間は、様々な要因のうちのいずれか、例えば、患者の応答等に応じて異なり得る。例えば、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、約 1 日 ~ 約 1 週間、約 2 週間 ~ 約 4 週間、約 1 ヶ月 ~ 約 2 ヶ月、約 2 ヶ月 ~ 約 4 ヶ月、約 4 ヶ月 ~ 約 6 ヶ月、約 6 ヶ月 ~ 約 8 ヶ月、約 8 ヶ月 ~ 約 1 年、約 1 年 ~ 約 2 年、もしくは約 2 年 ~ 約 4 年の範囲の、またはそれよりも長い期間にわたって投与され得る。

20

【 0 5 4 3 】

X . B . 投与経路

活性薬剤 (本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクター) は、インピボ法及びエクスピボ法、ならびに全身投与経路及び局所投与経路を含めた、薬物送達に好適な任意の利用可能な方法及び経路を用いて、個体に投与される。

30

【 0 5 4 4 】

従来のかつ薬学的に許容される投与経路には、腫瘍内、腫瘍周囲、筋肉内、リンパ内、気管内、脳内、皮下、皮内、局所、静脈内、動脈内、直腸、鼻腔、経口、ならびに他の経腸及び非経口経路の投与が含まれる。投与経路は、所望であれば組み合わせられるか、あるいは、T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート及び / または所望の効果に応じて調整されてもよい。本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、または本開示の核酸もしくは組換え発現ベクターは、単回用量または複数回用量で投与され得る。

40

【 0 5 4 5 】

一部の実施形態では、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、静脈内に投与される。一部の実施形態では、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、筋肉内に投与される。一部の実施形態では、本開示の T 細胞 M M P 及び / または T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、リンパ内に投

50

与される。一部の実施形態では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、局所投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、腫瘍内に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、腫瘍周囲に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、脳内に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、皮下に投与される。

10

【0546】

一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、静脈内に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、筋肉内に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、局所投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、腫瘍内に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、腫瘍周囲に投与される。一部の実施形態では、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、脳内に投与される。一部の実施形態では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、皮下に投与される。一部の実施形態では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、リンパ内に投与される。一部の実施形態では、T細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートは、リンパ内に投与される。

20

【0547】

本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターは、全身経路または局所経路を含めた、従来の薬物の送達に好適な任意の利用可能な従来方法及び経路を用いて、宿主に投与され得る。一般に、本開示の方法において用いるために企図される投与経路には、経腸、非経口、及び吸入経路が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

30

【0548】

吸入投与以外の非経口投与経路には、局所、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、嚢内、脊椎内、胸骨内(intrasternal)、腫瘍内、リンパ内、腫瘍周囲、及び静脈内経路が含まれるが、必ずしもこれらに限定されず、すなわち、消化管を通した投与経路以外の任意の投与経路である。非経口投与は、本開示のT細胞MMP及び/またはT細胞MMP-エピトープコンジュゲート、本開示の核酸、または本開示の組換え発現ベクターの全身または局所送達をもたらすために実行され得る。全身送達が所望される場合、投与は典型的には、薬学的調製物の侵襲性投与または全身に吸収される局所もしくは粘膜投与を伴う。

40

【0549】

X.C.処置に好適な対象

本開示の方法による処置に好適な対象には、がんを有すると診断された個体、がんに対して処置されたが、処置に応答しなかった個体、及びがんに対して処置され、最初は処置に応答したが、その後不応性となった個体を含めた、がんを有する個体が含まれる。本開示の方法による処置に好適な対象には、感染症を有すると診断された個体、及び感染症に対して処置されたが、処置に応答しなかった個体を含めた、感染症(例えば、細菌、ウイルス、原虫等といった病原体による感染症)を有する個体が含まれる。本開示の方法による処置に好適な対象には、細菌感染症を有すると診断された個体、及び細菌感染症に対して処置されたが、処置に応答しなかった個体を含めた、細菌感染症を有する個体が含まれ

50

る。本開示の方法による処置に好適な対象には、ウイルス感染症を有すると診断された個体、及びウイルス感染症に対して処置されたが、処置に応答しなかった個体を含めた、ウイルス感染症を有する個体が含まれる。本開示の方法による処置に好適な対象には、自己免疫疾患を有すると診断された個体、及び自己免疫疾患に対して処置されたが、処置に応答しなかった個体を含めた、自己免疫疾患を有する個体が含まれる。

【 0 5 5 0 】

ある特定の事例では、例えば、本開示の T 細胞調節多量体ポリペプチドが H B V エピトープを含む場合、処置に好適な個体は、H B V に感染した個体である。一部の事例では、個体は、急性 H B V 感染症を有する。一部の事例では、個体は、急性 H B V 感染症を有し、肝臓癌は有しない。一部の事例では、個体は、H B V の非活動性キャリアである。一部の事例では、個体は、H B V の非活動性キャリアであり、肝臓癌は有しない。一部の事例では、個体は、慢性活動性 H B V を有する。一部の事例では、個体は、慢性活動性 H B V を有し、肝臓癌は有しない。一部の事例では、個体は、H B V 感染症に起因する肝臓癌を有する。

10

【 0 5 5 1 】

ある特定の事例では、例えば、本開示の T 細胞調節多量体ポリペプチドが H B V エピトープを含む場合、処置に好適な個体は、H B V に感染した個体であり、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、急性 H B V 感染症を有する。一部の事例では、個体は、急性 H B V 感染症を有し、肝臓癌は有せず、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、H B V の非活動性キャリアであり、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、H B V の非活動性キャリアであり、肝臓癌は有せず、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、慢性活動性 H B V を有し、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、慢性活動性 H B V を有し、肝臓癌は有せず、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。一部の事例では、個体は、H B V 感染症に起因する肝臓癌を有し、ここで、個体はアジア人であり、例えば、個体は、H L A - A 1 1、H L A - A 2 4、または H L A - A 3 3 対立遺伝子を有する。

20

30

【 0 5 5 2 】

X I . ある特定の実施形態

本発明は、その具体的な実施形態を参照して説明されたが、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく種々の変更がなされてもよく、均等物が代わりに用いられてもよいことが当業者には理解されるべきである。加えて、特定の状況、材料、組成物 (c o m p o s i t i o n o f m a t t e r)、プロセス、及び/またはプロセスのステップ (単数または複数) を本発明の目的、趣旨、及び範囲に適合させるために、多くの改変がなされてもよい。全てのかかる修飾が、本明細書に添付される特許請求の範囲内にあることを意図する。

40

1 . T 細胞 M M P (T 細胞 M M P) であって、

a)

i) N 末端及び C 末端を有する第 1 の主要組織適合複合体 (M H C) ポリペプチド

、

を含む、第 1 のポリペプチドと、

b) N 末端から C 末端の順に、

i) 第 2 の M H C ポリペプチド、及び

i i) 任意選択で免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチドまたは非 I g ポリペプ

50

チド足場、

を含む、第 2 のポリペプチドと、

c) 前記第 1 のポリペプチドに結合した (例えば、前記 N 末端または C 末端で) もしくはその内部にある第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位、及び / または前記第 2 のポリペプチドに結合した (例えば、前記 N 末端または C 末端で) もしくはその内部にある第 2 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位と、

d) 1 つまたは複数の免疫調節ポリペプチド (MOD) と、を含み、前記 1 つまたは複数の MOD のうちの少なくとも 1 つが、

A) 前記第 1 のポリペプチドの前記 C 末端に、

B) 前記第 2 のポリペプチドの前記 N 末端に、

C) 前記第 2 のポリペプチドの前記 C 末端に、または

D) 前記第 1 のポリペプチドの前記 C 末端及び前記第 2 のポリペプチドの前記 N 末端にあり、

前記 1 つまたは複数の MOD の各々が、独立して選択される野生型またはバリエーション MOD である、前記 T 細胞 MMP (T 細胞 MMP)。

2. 前記第 1 のポリペプチドが、

その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない第 1 の MHC ポリペプチド、

その N 末端上にリンカーをもつ第 1 の MHC ポリペプチド、

その C 末端上にリンカーをもつ第 1 の MHC ポリペプチド、または

その N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ第 1 の MHC ポリペプチド、

を含む、実施形態 1 に記載の T 細胞 MMP。

3. 前記第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、

a) 前記第 1 の MHC ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記第 1 の MHC ポリペプチドが、その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない、

b) 前記第 1 の MHC ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記第 1 の MHC ポリペプチドが、その N 末端及び C 末端上にリンカーを含む、

c) 前記第 1 の MHC ポリペプチドの前記 N 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、及び / または

d) 前記第 1 の MHC ポリペプチドの前記 C 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

実施形態 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

4. 前記第 1 及び第 2 の MHC ポリペプチドが、MHC クラス I ポリペプチドであり、前記第 1 の MHC ポリペプチドが、

その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない、N 末端及び C 末端を有するベータ - 2 - ミクログロブリン (「 $\beta 2M$ 」) ポリペプチド、

その N 末端上にリンカーをもつ $\beta 2M$ ポリペプチド、

その C 末端上にリンカーをもつ $\beta 2M$ ポリペプチド、または

その N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ $\beta 2M$ ポリペプチド、

を含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

5. 前記第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、

a) その N 末端または C 末端上にリンカーを有しない前記 $\beta 2M$ ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

b) 前記 $\beta 2M$ ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記 $\beta 2M$ ポリペプチドが、その N 末端及び C 末

10

20

30

40

50

端上にリンカーを含む、

c) 前記 2 M ポリペプチドの前記 N 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、及び / または

d) 前記 2 M ポリペプチドの前記 C 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

実施形態 4 に記載の T 細胞 MMP。

6. 前記第 2 のポリペプチドが、

その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない第 2 の MHC ポリペプチド (例えば、MHC クラス I 重鎖 (「MHC - H」) ポリペプチドを含む)、

その N 末端上にリンカーをもつ第 2 の MHC ポリペプチド、

その C 末端上にリンカーをもつ第 2 の MHC ポリペプチド、または

その N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ第 2 の MHC ポリペプチド、

を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

7. 前記第 2 のポリペプチドが、免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチドまたは非 Ig ポリペプチド足場をさらに含む、実施形態 6 に記載の T 細胞 MMP。

8. 前記第 2 のポリペプチドが、N 末端から C 末端の順に、

その C 末端上にリンカーをもつ第 2 の MHC ポリペプチド、続いて免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチドもしくは非 Ig ポリペプチド足場、または

その N 末端及び / または C 末端上にリンカーをもつ第 2 の MHC ポリペプチド、続いて免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチドもしくは非 Ig ポリペプチド足場、

を含む、実施形態 7 に記載の T 細胞 MMP。

9. 前記第 2 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、

a) 前記第 2 の MHC ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記第 2 の MHC ポリペプチドが、その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない、

b) 前記第 2 の MHC ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記第 2 の MHC ポリペプチドが、その N 末端及び / または C 末端上にリンカーを含む、

c) 前記第 2 の MHC ポリペプチドの前記 N 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

d) 前記第 2 の MHC ポリペプチドの前記 C 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、及び / または

e) 免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチドもしくは非 Ig ポリペプチド足場の配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、このとき、前記第 2 の MHC ポリペプチドに免疫グロブリン (Ig) Fc ポリペプチドもしくは非 Ig ポリペプチド足場が続く、

実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

10. 前記第 2 の MHC ポリペプチドが、その N 末端及び C 末端上にリンカーを有しない、N 末端及び C 末端を有する MHC クラス I 重鎖 (「MHC - H」) ポリペプチド、その N 末端上にリンカーをもつ MHC - H ポリペプチド、その C 末端上にリンカーをもつ MHC - H ポリペプチド、またはその N 末端及び C 末端上にリンカーをもつ MHC - H ポリペプチドを含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

11. 前記第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、

a) その N 末端または C 末端上にリンカーを有しない前記 2 M ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

b) 前記 2 M ポリペプチドの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にあり、前記 2 M ポリペプチドが、その N 末端及び C 末

10

20

30

40

50

端上にリンカーを含む、

c) 前記 2 M ポリペプチドの前記 N 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、及び/または

d) 前記 2 M ポリペプチドの前記 C 末端上の前記リンカーの配列に結合しているか (例えば、前記 N 末端または C 末端で)、もしくはその配列内にある、

実施形態 4 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

12. 前記第 1 のポリペプチドの 1 つもしくは複数の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、そのシグナル配列を欠いた成熟 2 M ポリペプチド配列 (例えば、図 4 に示される 2 M ポリペプチド配列) の、アミノ末端の 15 個のアミノ酸のうちのいずれかを置き換える、及び/またはそれらの間に挿入される、実施形態 4 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

13. 前記第 2 のポリペプチドが、Ig Fc ポリペプチドを含む、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

14. 前記 Ig Fc ポリペプチドが、Ig G1 Fc ポリペプチド、Ig G2 Fc ポリペプチド、Ig G3 Fc ポリペプチド、Ig G4 Fc ポリペプチド、Ig A Fc ポリペプチド、または Ig M Fc ポリペプチドである、実施形態 13 に記載の T 細胞 MMP。

15. 前記 Ig Fc ポリペプチドが、図 2 A ~ 2 D のうちの 1 つに図示されるアミノ酸配列、または図 2 A ~ 2 D のうちの 1 つにある配列のうち前記 Ig Fc ポリペプチドに対応する一部分 (少なくとも約 50、75、100、125、または 150 アミノ酸の長さ) に対して少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性 (例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 % の同一性、またはさらには 100 % の同一性) を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 14 に記載の T 細胞 MMP。

16. 前記 Ig Fc ポリペプチドが、Ig G1 Fc ポリペプチドである、実施形態 15 に記載の T 細胞 MMP。

17. 前記 Ig G1 Fc ポリペプチドが、N297A、L234A、L235A、L234F、L235E、及び P331S から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む、実施形態 16 に記載の T 細胞 MMP。

18. 前記 Ig G1 Fc ポリペプチドが、L234A 及び L235A 置換を含む、実施形態 17 に記載の T 細胞 MMP。

19. T 細胞 MMP が、独立して選択される 1 つまたは複数の野生型及び/またはバリエーション MOD ポリペプチドを含み、前記 1 つまたは複数のバリエーション MOD ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つが、同種 MOD (その同種 MOD) に対して、対応する野生型 MOD の前記同種 MOD に対する親和性と比較して低減された親和性を呈する (例えば、BLI (上述の通り) によって測定したときの、対照 T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの (ここで、前記対照は、野生型 MOD を含む) の同種 MOD に対する結合親和性対、ii) 前記野生型 MOD のバリエーションを含む本開示の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの前記同種 MOD に対する結合親和性の比が、少なくとも 1.5 : 1、少なくとも 2 : 1、少なくとも 5 : 1、少なくとも 10 : 1、少なくとも 15 : 1、少なくとも 20 : 1、少なくとも 25 : 1、少なくとも 50 : 1、少なくとも 100 : 1、少なくとも 500 : 1、少なくとも 10^2 : 1、少なくとも 5×10^2 : 1、少なくとも 10^3 : 1、少なくとも 5×10^3 : 1、少なくとも 10^4 : 1、少なくとも 10^5 : 1、または少なくとも 10^6 : 1 である)、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP。

20. 前記バリエーション MOD ポリペプチドが、対応する野生型免疫調節ポリペプチドと比べて 1 ~ 10 個のアミノ酸置換、挿入、もしくは欠失を含むか、または前記対応する野生型 MOD のアミノ酸配列、もしくは野生型 MOD の前記配列の一部分 (例えば、前記野生型 MOD の少なくとも約 50、75、100、125、または 150 個の連続アミノ酸の長さ) に対して少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性 (例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 % の同一性、またはさらには 100 % の同一性) を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 19 に記載の T 細胞 MMP。

10

20

30

40

50

21. 前記野生型免疫調節ポリペプチドが、IL-2、4-1BBL、PD-L1、CD70、CD80、CD86、ICOS-L、OX-40L、FasL、JAG1、TGF、ICAM、及びPD-L2からなる群から独立して選択される、実施形態1~20のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

22. 前記第1のMHCポリペプチドが、2ミクログロブリン2Mポリペプチドであり、前記第2のMHCポリペプチドが、MHCクラスI重鎖ポリペプチドである、実施形態1~21のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

23. 前記2Mポリペプチドが、図4に記載されるアミノ酸配列のうちの1つ、または図4にある成熟配列2Mポリペプチドの一部分（例えば、少なくとも約60、70、80、または90アミノ酸の長さ）に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含む、実施形態4~22のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

10

24. 前記2Mポリペプチドが、図4に記載されるアミノ酸配列のうちの1つの少なくとも一部分との同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または99個の連続アミノ酸の配列（例えば、図4に記載されるそのシグナル配列を欠いた成熟2Mポリペプチドの配列に対して同一性を有する、20~99、20~40、30~50、40~60、40~90、50~70、60~80、60~99、70~90、または79~99個の連続アミノ酸を有する配列）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態4~23のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

20

25. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C重鎖（例えば、HLA-A11、HLA-A24、及びHLA-A33を含めた、図3からのHLA-A、HLA-B、またはHLA-C）である、実施形態10~24のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

26. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチド配列が、図3A~3Dのうちの1つに記載されるアミノ酸配列、または図3A~3Dのうちの1つにある配列のうち前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドに対応する一部分に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有するアミノ酸配列（例えば、図3A~3Dのうちの1つに記載される配列に対して同一性を有する、20~100、20~40、30~50、40~60、40~90、50~70、60~80、60~90、70~90、80~100、100~150、150~200、200~250個、または250個超の連続アミノ酸を有する配列）を含み、任意選択で、前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが機能的な膜貫通アンカードメインを含まないという条件下にある、実施形態25に記載のT細胞MMP。

30

27. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、図3A~3Dのうちの少なくとも1つに記載されるアミノ酸配列の一部分との同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、80、100、150、200、または250個の連続アミノ酸の配列を含むが、但し、前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが機能的な膜貫通ドメインを含まないことを条件とする、実施形態26に記載のT細胞MMP。

40

28. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチド配列が、1ヘリックスのカルボキシル末端部分におけるシステインと、2-1ヘリックスのアミノ末端部分におけるシステインとの間にジスルフィド結合を含み、及び/またはアミノ酸残基2、7、84、5、59、116、139、167、168、170、もしくは171のうちのいずれか1つもしくは複数（2つ、3つ、4つ等）においてシステインもしくはシステイン置換を含む、実施形態10~27のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

29. 前記1ヘリックスの前記カルボキシル末端部分が、前記MHCクラスI重鎖のおよそアミノ酸79位からおよそアミノ酸89位までであり、前記2-1ヘリックスの前記アミノ末端部分が、およそアミノ酸134位からアミノ酸144位までであり、前記

50

アミノ酸位置が、それらのリーダー配列を含めずに前記重鎖の配列に基づいて決定される（例えば、図3Dを参照されたい）、実施形態28に記載のT細胞MMP。

30．前記ジスルフィド結合が、83位、84位、または85位に位置するシステインと、138位、139位、または140位に位置するシステインとの間（例えば、83位～138位、139位、もしくは140位、84位～138位、139位、もしくは140位、または85位～138位、139位、もしくは140位）にある、実施形態28～29のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

31．前記ジスルフィド結合が、84位に位置するシステインと、139位（position）に位置するシステインとの間にある、実施形態28～30のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

32．前記MHCクラスI重鎖配列が、前記1ヘリックスの前記カルボキシル末端部分と、前記2-1ヘリックスの前記アミノ末端部分との間で前記ジスルフィド結合を形成する前記システインの前または後に、1～5個のアミノ酸の挿入、欠失、及び/または置換を有し得る、実施形態28に記載のT細胞MMP。

33．置換及び/または挿入が存在する場合、前記アミノ酸が、任意の天然型アミノ酸、またはグリシン及びプロリンを除く任意の天然型アミノ酸から選択され得る、実施形態32に記載のT細胞MMP。

34．前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドの1～79位にあるアミノ酸配列が、図3Dに記載される少なくとも1つの配列の前記対応する一部分に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有する（例えば、前記配列が、図3Dにある配列と比べて1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有する）、実施形態25～33のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

35．前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドの89～134位（これらの位置を含む）のアミノ酸配列が、図3Dに記載される少なくとも1つの配列の前記対応する一部分に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有する（例えば、前記配列が、図3Dにある配列と比べて1、2、3、4、5、または6個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有する）、実施形態25～34のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

36．前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドの144～230位（これらの位置を含む）のアミノ酸配列が、図3Dに記載される少なくとも1つの配列の前記対応する一部分に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有する（例えば、前記配列が、図3Dにある配列と比べて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有する）、実施形態25～35のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

37．前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドの242～274位（これらの位置を含む）のアミノ酸配列が、図3Dに記載される少なくとも1つの配列の前記対応する一部分に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%の同一性）を有する（例えば、前記配列が、図3Dにある配列と比べて1、2、3、または4個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有する）、実施形態25～36のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

38．前記第1のポリペプチド及び前記第2のポリペプチドが、非共有結合性で会合している、実施形態1～37のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

39．前記第1のポリペプチド及び前記第2のポリペプチドが、互いに共有結合性で連結している、実施形態1～37のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

40．前記共有結合性の連結が、ジスルフィド結合を介するものである、実施形態39に記載のT細胞MMP。

41．独立して選択される2つ以上、3つ以上、または4つ以上のMODを含む、実施

10

20

30

40

50

形態 1 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。

42. 前記 2 つ以上 (例えば、2 つ、3 つ、または 4 つ) の野生型またはバリエーション M O D のうちのいずれか 2 つ以上、3 つ以上、または 4 つ以上の間にペプチドリinker を含む、実施形態 41 に記載の T 細胞 M M P。

43. 前記第 1 のポリペプチドが、前記第 1 の M H C ポリペプチドと、少なくとも 1 つの野生型またはバリエーション M O D との間にペプチドリinker を含む、実施形態 1 ~ 42 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。

44. 前記第 2 のポリペプチドが、前記第 2 の M H C ポリペプチドと、少なくとも 1 つの野生型またはバリエーション M O D との間にペプチドリinker を含む、実施形態 1 ~ 42 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。

45. 前記リンカーが、5 アミノ酸 ~ 30 アミノ酸 (例えば、5 ~ 10、10 ~ 20、または 20 ~ 30 アミノ酸) の長さを有する、実施形態 2 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。

46. 前記リンカーが、式 (A A A G G) n または (G G G G S) n のペプチドであり、式中、n が 1 ~ 8 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8、または 1 ~ 4、3 ~ 6、もしくは 4 ~ 8 から選択される範囲内) である、実施形態 45 に記載の T 細胞 M M P。

47. 前記第 1 及び第 2 の化学コンジュゲーション部位が、

a) 酵素的修飾配列として作用するペプチド配列 (例えば、スルファターゼモチーフ)、

b) 非天然アミノ酸及び / またはセレノシステイン、

c) 操作されたアミノ酸の化学コンジュゲーション部位、

d) 炭水化物もしくはオリゴ糖部分、及び / または

e) I g G ヌクレオチド結合部位、

から独立して選択される、実施形態 1 ~ 46 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。:

48. 前記 1 つまたは複数の第 1 及び第 2 の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、酵素的修飾配列を含む、実施形態 1 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P。

49. 前記 1 つまたは複数の第 1 または第 2 の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも 1 つが、スルファターゼモチーフである、実施形態 48 に記載の T 細胞 M M P。

50. 前記スルファターゼモチーフが、配列 X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3、X 1 (C / S) X 2 (P / A) X 3 Z 3、X 1 C X 2 P X 3 Z 3、または C X 2 P X 3 R を含み、ここで、

Z 1 が、システインまたはセリンであり、

Z 2 が、プロリン残基またはアラニン残基のいずれかであり、

Z 3 が、塩基性アミノ酸 (アルギニン、リジン、またはヒスチジン、通常はリジン)、または脂肪族アミノ酸 (アラニン、グリシン、ロイシン、バリン、イソロイシン、またはプロリン、通常は A、G、L、V、または I) であり、

X 1 が、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、硫黄含有アミノ酸、または極性非荷電アミノ酸 (すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外)、通常は L、M、V、S、または T、より通常は L、M、S、または V であり、但し、前記スルファターゼモチーフが前記標的ポリペプチドの前記 N 末端にある場合、X 1 が存在することを条件とし、

X 2 及び X 3 が独立して、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、極性非荷電アミノ酸、または硫黄含有アミノ酸 (すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外)、通常は S、T、A、V、G、または C、より通常は S、T、A、V、または G である、

実施形態 49 に記載の T 細胞 M M P。

51. 第 1 のポリペプチドまたは前記第 2 のポリペプチドのアミノ酸配列において 1 つまたは複数の f G l y アミノ酸残基を含む、実施形態 50 に記載の T 細胞 M M P。

10

20

30

40

50

52. 前記1つまたは複数の第1または第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、前記第1及び/または第2のポリペプチドの前記C末端に位置付けられたアミノ酸配列LP(X5)TG、LP(X5)TG、LP(X5)TA、LP(X5)TGG、LP(X5)TAA、LPETGG、またはLPETAAを含むソルターゼA酵素部位であり、ここで、X5が、任意のアミノ酸である、実施形態1~51のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

53. 前記1つまたは複数の第1または第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、前記第1及び/または第2のポリペプチドの前記アミノ末端に少なくとも1つのオリゴグリシン(例えば、(G)₂、₃、₄、または₅)を含む、及び/または前記第1及び/または第2のポリペプチドの前記アミノ末端に少なくとも1つのオリゴアラニン(例えば、(A)₂、₃、₄、または₅)を含む、ソルターゼA酵素部位である、実施形態1~52のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

54. 前記1つまたは複数の第1または第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、トランスグルタミナーゼ部位である、実施形態1~53のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

55. 前記1つまたは複数のトランスグルタミナーゼ部位のうちの少なくとも1つが、LQG、LLQGG、LLQG、LSLSQG、GGGLLQGG、GLLQG、LLQ、GSPLAQSHGG、GLLQGGG、GLLQGG、GLLQ、LLQLLQGA、LLQGA、LLQYQGA、LLQGS G、LLQYQG、LLQLLQG、SLLQG、LLQLQ、LLQLLQ、LLQGR、LLQGPP、LLQGPA、GGLLQGGP、GGLLQGA、LLQGP GK、LLQGP G、LLQGP、LLQP、LLQPGK、LLQAP GK、LLQGAPG、LLQGAP、及びLLQLQGからなる群から選択される、実施形態54に記載のT細胞MMP。

56. 前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、セレノシステイン、または独立して選択される1つもしくは複数の非天然アミノ酸を含有するアミノ酸配列を含む、実施形態1~55のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

57. 前記1つまたは複数の非天然アミノ酸のうちの少なくとも1つが、パラ-アセチルフェニルアラニン、パラ-アジドフェニルアラニン、及びプロピニル-チロシンからなる群から選択される、実施形態56に記載のT細胞MMP。

58. 前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、操作されたアミノ酸部位を含む、実施形態1~57のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

59. 前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、1つまたは複数のスルフヒドリル基またはアミン基(例えば、アミノ酸残基2、7、84、5、59、116、139、167、168、170、または171のうちのいずれか1つまたは複数(2つ、3つ、4つ等)におけるシステイン置換)を含む、実施形態1~57のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

60. 前記1つまたは複数のスルフヒドリル基またはアミン基のうちの少なくとも1つが、前記第1及び/または第2のポリペプチドにおけるリジンまたはシステインの存在からもたらされる、実施形態59に記載のT細胞MMP。

61. 前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、独立して選択される炭水化物、単糖、二糖、及び/またはオリゴ糖を含む、実施形態1~60のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

62. 前記1つまたは複数の第1及び第2の化学コンジュゲーション部位のうちの少なくとも1つが、1つまたは複数のIgGヌクレオチド抗体結合部位を含む、実施形態1~61のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

63. エピトープ(例えば、エピトープポリペプチド)をさらに含み、前記エピトープが、第1のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位で、または第2のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位で、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチド

10

20

30

40

50

に直接、またはスパーサーもしくはリンカーを介して間接的にコンジュゲートされて（共有結合性で結合して）、T細胞MMP-エピトープコンジュゲートを形成する、実施形態1～62のいずれか1つに記載のT細胞MMP。

64．前記1つまたは複数のMODのうちの少なくとも1つが、バリエーションMODである、実施形態63に記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

65．前記エピトープが、リンカーまたはスパーサーによって前記第1または第2のペプチドの化学コンジュゲーション部位に間接的に共有結合されている、実施形態63～64のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

66．前記エピトープが、ペプチドまたは非ペプチドポリマーから選択されるリンカーを通してコンジュゲートされている、実施形態63～65のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

67．前記リンカーが、グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）_n、（GSGGS）_n、（GGGS）_n、GSGG）、（GSGGG）、（GSGGGG）、（GSGGGG）_n、（GGGS）_n、（GSSSSG）_n、及び（GGGGGS）_nを含む）、（AAAAGG）_n等のグリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及びGCGGS（G4S）_n GCGASGGGGSGGGGS、GCGGSGGGGSGGGGS、またはGCGGSGGGGSGGGGS等のシステイン含有リンカーを含むが、これらに限定されない、10アミノ酸～30アミノ酸（例えば、10～20または20～30アミノ酸）の長さを有するペプチドであり、式中、nが、少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）の整数である、実施形態66に記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

68．前記リンカーが、式（AAAAGG）_nまたは（GGGGGS）_nのペプチドであり、式中、nが、1～8（例えば、1、2、3、4、5、6、7、もしくは8、または1～4、3～6、もしくは4～8から選択される範囲内）である、67に記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート

69．

（a）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートが、前記T細胞MMPが第2のT細胞に結合する親和性よりも少なくとも25%高い（1.25倍高い）親和性で、第1のT細胞に結合し、

前記第1のT細胞が、その表面上に同種MOD、及び少なくとも 10^{-7} M（例えば、 10^{-8} または 10^{-9} M）の親和性で前記エピトープに結合するTCRを発現し、

前記第2のT細胞が、その表面上に前記同種MODを発現するが、その表面上に、少なくとも 10^{-7} Mの親和性（例えば、 10^{-6} または 10^{-5} M等の、 10^{-7} M未満の親和性）で前記エピトープに結合するTCRは発現しないか、または

（b）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートが、それが前記第2のT細胞に結合する親和性よりも少なくとも10%（例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%）、または少なくとも2倍（例えば、少なくとも2.5倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、または100倍超）高い親和性で、第1のT細胞に結合し、

前記第1のT細胞が、i）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに存在する前記エピトープに特異的なTCR、及びii）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに存在する前記MODに結合する同種MOD、の両方を発現し、

前記第2のT細胞が、i）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに存在する前記エピトープ以外のエピトープに特異的なTCR、及びii）前記T細胞MMP-エピトープコンジュゲートに存在する前記MODに結合する同種MOD、を発現する、実施形態63～68のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

70．1つまたは複数のバリエーションMODを含み、前記1つまたは複数のMODが、バイオレイヤー干渉法によって測定したとき、その同種MODに対して、対応する野生型M

10

20

30

40

50

ODの前記同種MODに対する親和性と比較して低減された親和性を呈する(例えば、BLI(上述の通り)によって測定したときの、対照T細胞MMP-エピトープコンジュゲート(前記対照は、野生型MODを含む)の同種MODに対する結合親和性対、ii)前記野生型MODのパリアントを含む本開示のT細胞MMP-エピトープコンジュゲートの前記同種MODに対する結合親和性の比が、少なくとも1.5:1、少なくとも2:1、少なくとも5:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも50:1、少なくとも100:1、少なくとも500:1、少なくとも 10^2 :1、少なくとも 5×10^2 :1、少なくとも 10^3 :1、少なくとも 5×10^3 :1、少なくとも 10^4 :1、少なくとも 10^5 :1、または少なくとも 10^6 :1である)、実施形態63~68のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

10

71. 前記エピトープが、がんエピトープ、ウイルスエピトープ、または自己エピトープである、実施形態63~70のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

72. 前記エピトープが、HPV CMVまたはHBVエピトープから選択されるウイルスエピトープである、実施形態63~70のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

73. 前記エピトープが、4アミノ酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、または20aaの長さのペプチド断片である、実施形態63~72のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

20

74. 前記エピトープが、ソルターゼ部位、スルファターゼ部位、またはトランスグルタミナーゼ部位でコンジュゲートされている、実施形態63~72のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

75. 前記エピトープが、非天然アミノ酸またはセレノシステインを通してコンジュゲートされている、実施形態63~72のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

76. 前記エピトープが、操作されたアミノ酸を通してコンジュゲートされている、実施形態63~72のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

77. 1つまたは複数の第1及び/または第2の化学コンジュゲーション部位に直接、またはスペーサーもしくはリンカーを通して間接的のいずれかで共有結合されている、独立して選択される1つまたは複数のペイロードをさらに含み、前記スペーサーまたはリンカーが、任意選択で切断可能である(例えば、哺乳類細胞のエンドソーム内で)、実施形態63~76のいずれか1つに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

30

78. 前記ペイロードが、独立して選択される1つまたは複数の生物活性剤もしくは生物活性薬、診断剤もしくは標識、ヌクレオチドもしくはヌクレオシド類似体、核酸もしくは合成核酸、または毒素、リポソーム(例えば、5-フルオロデオキシウリジン等の等の(such as such as))薬物を組み込む)、ナノ粒子、またはそれらの組み合わせである、実施形態77に記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

79. 治療剤(例えば、薬物またはプロドラッグ)、化学療法剤、細胞傷害性薬剤、抗生物質、抗ウイルス薬、細胞周期同調剤、細胞表面受容体(複数可)に対するリガンド、免疫調節剤(例えば、シクロスポリン等の免疫抑制薬)、アポトーシス促進剤、血管新生阻害剤、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク質もしくはポリペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、酵素、酵素前駆体、ホルモン、またはそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される、1つまたは複数の生物活性剤または生物活性薬から選択されるペイロードを含む、実施形態77に記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

40

80. 光検出可能な標識(例えば、色素、蛍光標識、燐光標識、発光標識)及び放射標識、画像化剤、造影剤、常磁性標識、超音波標識、ならびにそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される、1つまたは診断剤または標識から選択されるペイロードを含

50

む、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

81. 1 本鎖または 2 本鎖 DNA、1 本鎖または 2 本鎖 RNA、DNA / RNA ハイブリッド、リボザイム、siRNA、アンチセンス RNA、cDNA、球状核酸 (spherical nucleic acids)、及びプラスミドからなる群から選択される、1 つまたは複数のヌクレオチドもしくはヌクレオシド、ヌクレオシド類似体、核酸、または合成核酸から選択されるペイロードを含む、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

82. ミセル、金属ナノ粒子 (例えば、金ナノ粒子)、及び非金属ナノ粒子 (これらのうちのいずれかまたは全てが、核酸及びまたはタンパク質にコンジュゲートされ得る) からなる群から独立して選択される、1 つまたは複数のリボソーム及び / またはナノ粒子から選択されるペイロードを含む、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

83. 前記ペイロードが、独立して選択される 1 ~ 20 個 (例えば、1 ~ 2、2 ~ 4、5 ~ 10、または 10 ~ 20 個) のアルファ、ベータ、デルタ、ガンマアミノ酸、もしくはそれらの組み合わせを有するリンカーを介してコンジュゲートされるか、または前記リンカーが、式、ポリ - グリシンポリ - アラニン、ランダム (random) ポリグリシン / アラニンコポリマー、もしくはポリ (GGGGS)_n のペプチドであり、式中、n が、1、2、3、4、5、6、7、または 8 である、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

84. 前記ペイロードが、スパーサーによって化学コンジュゲーション部位に結合しており、前記スパーサーが、単結合もしくは二重結合、ジスルフィド結合、炭素 - 酸素結合、炭素窒素結合、またはそれらの組み合わせによって繋がれた 2 個以上の炭素原子を含む、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

85. 前記ペイロードが、スパーサーによって化学コンジュゲーション部位に結合しており、前記スパーサーが、ホモ官能性 (例えば、ホモ二官能性) クロスリンカーまたはヘテロ官能性 (例えば、ヘテロ二官能性) クロスリンカーの作用からもたらされる、実施形態 77 に記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

86. 前記ペイロードが、リンカーによって結合されており、ヒト T 細胞エンドソーム内での前記リンカーもしくはスパーサーの切断によって、または過剰のチオール還元剤 (例えば、ジチオスレイトール、DTT) での還元によって前記 T 細胞 MMP から除去され得る、実施形態 77 ~ 85 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート。

87. 実施形態 63 ~ 85 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを含む組成物。

88.

a) 実施形態 63 ~ 87 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートと、

b) 薬学的に許容される賦形剤と、
を含む、組成物。

89. 個体における免疫応答の調節方法であって、前記個体に、有効量の実施形態 63 ~ 87 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを投与することを含む、前記方法。

90. インビトロでのまたは個体へのインビボでの、エピトープ選択的またはエピトープ選択的 / 特異的様態での免疫調節ポリペプチド (MOD) の標的 T 細胞 (例えば、制御性 T 細胞または細胞傷害性 T 細胞) への送達方法であって、

実施形態 63 ~ 86 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを前記 T 細胞にインビトロで接触させること、または

実施形態 63 ~ 86 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲート、もしくは実施形態 87 ~ 88 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートを含む組成物を、前記個体に投与すること、を含み、

10

20

30

40

50

前記標的 T 細胞が、前記 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートに存在する前記エピトープに特異的である、前記方法。

9 1 . 前記 M O D が、I L - 2、4 - 1 B B L、P D - L 1、C D 7 0、C D 8 0、C D 8 6、I C O S - L、O X - 4 0 L、F a s L、I C A M、または P D - L 2 ポリペプチドから選択される野生型またはバリエーション M O D である、実施形態 9 0 に記載の方法。

9 2 . 前記個体がヒトである、実施形態 8 9 ~ 9 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 3 . 前記調節が、がん細胞に対する細胞傷害性 T 細胞の応答を増加させることを含む、実施形態 8 9 ~ 9 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 4 . 前記調節が、自己抗原に対する T 細胞の応答を低減することを含む、実施形態 8 9 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

9 5 . 前記投与が、直腸、鼻腔、経口、ならびに他の経腸及び / または非経口経路の投与である、実施形態 8 9 ~ 9 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 6 . 前記投与が、腫瘍内、腫瘍周囲、筋肉内、気管内、脳内、皮下、リンパ内、皮内、局所、静脈内、及び / または動脈内である、実施形態 8 9 ~ 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

9 7 . 実施形態 1 ~ 6 2 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P の前記第 1 及び前記第 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、1 つまたは複数の核酸。

9 8 . 前記第 1 のポリペプチドが、第 1 のヌクレオチド配列によってコードされ、前記第 2 のポリペプチドが、第 2 のヌクレオチド配列によってコードされ、前記第 1 及び前記第 2 のヌクレオチド配列が、単一核酸 (例えば、プラスミド) に存在する、実施形態 9 7 に記載の 1 つまたは複数の核酸。

20

9 9 . 前記第 1 のヌクレオチド配列及び前記第 2 のヌクレオチド配列が、転写制御要素に作動可能に連結されている、実施形態 9 7 ~ 9 8 のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数の核酸。

1 0 0 . 前記第 1 のポリペプチドが、第 1 の核酸 (例えば、第 1 のプラスミド) に存在する第 1 のヌクレオチド配列によってコードされ、前記第 2 のポリペプチドが、第 2 の核酸 (例えば、第 2 のプラスミド) に存在する第 2 のヌクレオチド配列によってコードされる、実施形態 9 7 に記載の 1 つまたは複数の核酸。

1 0 1 . 前記第 1 のヌクレオチド配列が、第 1 の転写制御要素に作動可能に連結され、前記第 2 のヌクレオチド配列が、第 2 の転写制御要素に作動可能に連結されている、実施形態 9 8 または 1 0 0 のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数の核酸。

30

1 0 2 . 実施形態 9 7 ~ 1 0 1 のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数の核酸を含む組成物。

1 0 3 . 実施形態 1 ~ 6 2 のいずれか 1 つに記載の T 細胞 M M P の作製方法であって、前記方法が、

a) 前記第 1 の M H C ポリペプチドをコードする核酸、前記第 2 の M H C ポリペプチドをコードする核酸、及び独立して選択される 1 つまたは複数の M O D をコードする核酸 (複数可)、ならびに任意選択で、免疫グロブリン (I g) F c ポリペプチド、非 I g ポリペプチド足場、及び / または独立して選択される 1 つまたは複数のリンカーのうちのいずれか 1 つまたは複数を含む核酸を用意すること、

40

b) ステップ i 及び i i を任意の順に実施することであって、これらのステップが、

i) 1 つまたは複数の化学コンジュゲーション部位を、前記独立して選択される 1 つまたは複数の M O D をコードする前記核酸 (複数可) 以外の前記用意された核酸のうちの 1 つの中を含める (コード配列の中に導入操作する) ように、前記用意された核酸のうちの少なくとも 1 つを修飾することと、

i i) 前記用意された核酸を、前記第 1 のポリペプチドをコードする第 1 の核酸及び前記第 2 のポリペプチドをコードする第 2 の核酸に組み込むことと、を含む、前記実施すること、

c) 前記第 1 及び第 2 の核酸によってコードされる前記ポリペプチドを発現させて、前記第 1 のポリペプチド及び前記第 2 のポリペプチドを得るための T 細胞 M M P を得ること

50

、
を含む、前記方法。

104. 前記1つまたは複数の化学コンジュゲーション部位が、酵素的修飾配列として作用するペプチド配列、非天然アミノ酸及び/またはセレノシステイン、操作されたアミノ酸の化学コンジュゲーション部位、IgGヌクレオチド結合部位から独立して選択される、実施形態103に記載の方法。

105. 前記用意された核酸のうちの少なくとも1つを修飾することが、野生型の第1のMHCポリペプチド、前記第2のMHCポリペプチド、前記MODのペプチド配列、またはいずれの任意選択的な免疫グロブリン(Ig)Fcポリペプチド、非Igポリペプチド足場、もしくはリンカーにおいて、天然型アミノ酸をそれが存在しない箇所で含むポリペプチド配列としてコードするように、MOD(複数可)をコードする前記核酸(複数可)以外の用意された核酸のうちの1つまたは複数を修飾することを含む、実施形態104に記載の方法。

106.

a) 反応性基をもつエピトープペプチド、または反応性基をもつ任意選択的なリンカーにコンジュゲートされたエピトープペプチドを用意すること、

b) 前記エピトープペプチド、または任意選択的なリンカーにコンジュゲートされたエピトープペプチドを、実施形態103~105のいずれか1つに記載のT細胞MMPに、前記反応性基と化学コンジュゲーション部位との間で共有結合が形成される条件下で接触させて、

それによってT細胞MMP-エピトープコンジュゲートを生産すること、
をさらに含む、実施形態103~105のいずれかに記載の方法。

107. 共有結合が、前記反応性基と、前記第1のMHCポリペプチドまたは前記第1のMHCポリペプチドに結合したリンカーにおける化学コンジュゲーション部位との間で選択的に形成される、実施形態106に記載の方法。

108. 前記第1のMHCポリペプチドが、そのN末端に任意選択的なペプチドリンカーが結合したベータ-2-ミクログロブリン(2M)ポリペプチドを含む、実施形態107に記載の方法。

109. 前記2Mポリペプチドが、前記第1のポリペプチドの前記N末端にある、108に記載の方法。

110. 反応性基をもつペイロードをT細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートに接触させて、前記T細胞MMPまたはT細胞MMP-エピトープコンジュゲートのペイロードコンジュゲートを形成させることをさらに含む、実施形態103~109のいずれか1つに記載の方法。

111. 前記T細胞MMP-エピトープを作り出すために前記エピトープが共有結合された前記化学コンジュゲーション部位が、

図2A~2GにあるFcポリペプチド配列、

図3A~3DにあるMHCクラスI重鎖ポリペプチド配列、または

図4にある2ミクログロブリンポリペプチド配列、

に対して100%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列内には位置しない、実施形態63~86のいずれかに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

112. 前記T細胞MMP-エピトープを作り出すために前記エピトープが共有結合された前記化学コンジュゲーション部位が、

図2A~2GにあるFcポリペプチド配列、

図3A~3DにあるMHCクラスI重鎖ポリペプチド配列、または

図4にある2ミクログロブリンポリペプチド配列、

のうちのいずれか1つの任意の部分に対して100%のアミノ酸同一性を有する10、20、30、40、または50アミノ酸長の配列内には位置しない、実施形態63~86のいずれかに記載のT細胞MMP-エピトープコンジュゲート。

113. 前記T細胞MMP-エピトープを作り出すために前記エピトープが共有結合さ

10

20

30

40

50

れた前記化学コンジュゲーション部位が、

図 2 A ~ 2 G にある F c ポリペプチド、

図 3 A ~ 3 D にある M H C クラス I 重鎖ポリペプチド、または

図 4 にある - 2 ミクログロブリンポリペプチド配列、

のうちのいずれか 1 つの任意の部分に対して 100 % のアミノ酸同一性を有する 5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、または 70 アミノ酸長の配列に現れるアミノ酸ではない、実施形態 63 ~ 86 のいずれかに記載の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート。

114 . 前記 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートを作り出すために前記エピトープが共有結合された前記化学コンジュゲーション部位が、

10

図 2 A ~ 2 G にある F c ポリペプチド配列、

図 3 A ~ 3 D にある M H C クラス I 重鎖ポリペプチド配列、または

図 4 にある - 2 ミクログロブリンポリペプチド配列、

のうちのいずれか 1 つの任意の部分に対して 100 % のアミノ酸同一性を有する 10、20、30、40、50、60、または 70 アミノ酸長の配列内に位置するリジン、システイン、セリン、トレオニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、またはグルタミンではない、実施形態 63 ~ 86 のいずれかに記載の T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲート。

115 .

N 末端及び C 末端を有する成熟 2 M ポリペプチド配列 (そのシグナル配列を欠いた) と、

20

任意選択的なリンカーと、

前記成熟 2 M ポリペプチドの前記配列内にある、または任意選択的なリンカーを介して前記成熟 2 M ポリペプチドに結合した、1 つまたは複数の化学コンジュゲーション部位と、
を含む、ポリペプチド。

116 . 前記成熟 2 M ポリペプチドが、図 4 に提供される成熟 2 M の配列に対して少なくとも 85 % (例えば、少なくとも 90 %、95 %、98 %、もしくは 99 % の同一性、またはさらには 100 %) のアミノ酸配列同一性を有する配列を有し、前記 2 M ポリペプチドと図 4 にある対応する配列との間の同一性が、前記付加されたスルファターゼモチーフ及び存在するいずれの任意選択的なリンカー配列をも考慮することなく決定される、実施形態 115 に記載のポリペプチド。

30

117 . 前記 2 M ポリペプチド配列が、図 4 に記載されるアミノ酸配列のうちの 1 つの少なくとも一部分との同一性を有する、少なくとも 20、30、40、50、60、70、80、90、または 99 個の連続アミノ酸の配列 (例えば、図 4 に記載されるそのシグナル配列を欠いた成熟 2 M の配列に対して同一性を有する、20 ~ 99、20 ~ 40、30 ~ 50、40 ~ 60、40 ~ 90、50 ~ 70、60 ~ 80、60 ~ 99、70 ~ 90、または 79 ~ 99 個の連続アミノ酸を有する配列) を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 115 ~ 116 のいずれかに記載のポリペプチド。

118 . 前記 2 M ポリペプチド配列が、前記成熟 2 M ポリペプチド配列のアミノ酸 10 位、11 位、12 位、13 位、または 14 位のうちの 1 つ、2 つ、またはそれよりも多くにおいてシステインを含む、実施形態 115 ~ 117 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

40

119 . 前記 2 M ポリペプチド配列の最初の 12 個のアミノ酸が、I Q R T P K I Q V Y S C である、実施形態 118 に記載のポリペプチド。

120 . 前記スルファターゼモチーフが、配列 X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3、X 1 (C / S) X 2 (P / A) X 3 Z 3、X 1 C X 2 P X 3 Z 3、または C X 2 P X 3 R を含み、ここで、

Z 1 が、システインまたはセリンであり、

Z 2 が、プロリン残基またはアラニン残基のいずれかであり、

50

Z 3 が、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、またはヒスチジン、通常はリジン）、または脂肪族アミノ酸（アラニン、グリシン、ロイシン、バリン、イソロイシン、またはプロリン、通常は A、G、L、V、または I）であり、

X 1 が、存在するかまたは不在であり、存在する場合、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、硫黄含有アミノ酸、または極性非荷電アミノ酸（すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外）、通常は L、M、V、S、または T、より通常は L、M、S、または V であり、但し、前記スルファターゼモチーフが前記標的ポリペプチドの前記 N 末端にある場合、X 1 が存在することを条件とし、

X 2 及び X 3 が独立して、任意のアミノ酸であり得るが、通常は脂肪族アミノ酸、極性非荷電アミノ酸、または硫黄含有アミノ酸（すなわち、芳香族アミノ酸または荷電アミノ酸以外）、通常は S、T、A、V、G、または C、より通常は S、T、A、V、または G である、

実施形態 1 1 5 ~ 1 1 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

1 2 1 . 前記スルファターゼモチーフが、直接、またはリンカーを介して間接的に、前記 2 M ポリペプチドの前記 N 末端配列に連結されている、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

1 2 2 . シグナル配列、またはシグナル配列及びリンカーをさらに含み、前記シグナル配列が、前記ポリペプチドのアミノ最末端の要素である、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

1 2 3 . 前記任意の 1 つまたは複数のリンカーが、独立して選択されるポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 2 のいずれか 1 つに記載のポリペプチド。

1 2 4 . 前記リンカーのうちのいずれか 1 つまたは複数が、式 (A A A G G) n または (G G G G S) n のペプチドから独立して選択され、式中、n が 1 ~ 8（例えば、1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8、または 1 ~ 4、3 ~ 6、もしくは 4 ~ 8 から選択される範囲内）である、実施形態 1 2 3 に記載のポリペプチド。

1 2 5 . 前記ポリペプチドが、下記の配列、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A L C T P S R G G G G S I Q R T P K I Q V
Y S C H P A E N G K S N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L K N G E R I E K V
E H S D L S F S K D W S F Y L L Y Y T E F T P T E K D E Y A C R V N H V T L S Q
P K I V K W D R D M

または下記の配列、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A G G G G S L C T P S R G G G G S I Q R T
P K I Q V Y S C H P A E N G K S N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L K N G E
R I E K V E H S D L S F S K D W S F Y L L Y Y T E F T P T E K D E Y A C R V N H
V T L S Q P K I V K W D R D M、

を有する、実施形態 1 2 3 に記載のポリペプチド。

1 2 6 . 前記スルファターゼモチーフのセリンまたはシステインが、f G l y（ホルミルグリシン）残基に変換された、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

1 2 7 . 前記 f G l y 残基との化学反応（例えば、チオセミカルバジド、アミノオキシ、ヒドラジド、またはヒドラジノ修飾エピトープポリペプチドと、前記 f G l y のアルデヒドとの反応）を通して前記ポリペプチドに共有結合されたエピトープをさらに含む、実施形態 1 2 6 に記載のポリペプチド。

1 2 8 . 前記エピトープが、前記 f G l y 残基の前記アルデヒドとの反応用のヒドラジニルインドール基を含む、実施形態 1 2 7 に記載のポリペプチド。

1 2 9 . 前記エピトープが、ポリペプチドエピトープである、実施形態 1 2 7 または 1 2 8 に記載のポリペプチド。

1 3 0 . 実施形態 1 1 5 ~ 1 2 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含む組成物。

1 3 1 . 実施形態 1 2 7 ~ 1 2 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドと、薬学的に許

10

20

30

40

50

容される担体とを含む組成物。

132. N末端からC末端の順に、

成熟MHCクラスI重鎖ポリペプチド配列（そのシグナル配列を欠いた）と、
任意選択的なリンカーと、

免疫グロブリン（Ig）Fcポリペプチドまたは非Igポリペプチド足場と、
を含む、ポリペプチド。

133. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、図3Dに提供される配列に対して少なくとも85%（例えば、少なくとも90%、95%、98%、もしくは99%の同一性、またはさらには100%）のアミノ酸配列同一性を有する配列を有し、前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドと図3Dにある対応する配列との間の同一性が、前記（Ig）Fc
10
ポリペプチド及び存在するいずれの任意選択的なリンカーをも考慮することなく決定される、実施形態132に記載のポリペプチド。

134. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、図3Dに記載されるアミノ酸配列のうちの1つの少なくとも一部分との同一性を有する、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100個の連続アミノ酸の配列（例えば、図3Dに記載されるMHCクラスI重鎖ポリペプチドの配列に対して同一性を有する、20～100、20～40、30～50、40～60、40～90、50～70、60～80、60～90、70～90、または80～100個の連続アミノ酸を有する配列）を含むか、それ
20
から本質的になるか、またはそれからなる、実施形態132～133のいずれかに記載のポリペプチド。

135. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、

i) 図3Dに記載されるMHCクラスI重鎖配列のおよそアミノ酸79位からおよそアミノ酸89位までの配列、

ii) およそアミノ酸134位からおよそアミノ酸144位までの配列、及び

iii) およそアミノ酸231位からおよそアミノ酸241位までの配列、

からなる群から選択される1つ、2つ、または3つの配列を含む、実施形態134に記載のポリペプチド。

136. 前記MHCクラスI重鎖ポリペプチドが、

i) およそアミノ酸79位からおよそアミノ酸89位までの前記配列と、

ii) およそアミノ酸134位からおよそアミノ酸144位までの前記配列と、
30

を含み、83位、84位、または85位のうちの1つがシステインで置換されており、前記システインが138位、139位、または140位のうちの1つにおいて置換されたシステインと鎖内ジスルフィド結合を形成する、実施形態135に記載のポリペプチド。

137. 前記ポリペプチドが、図3Dに記載されるMHCクラスI重鎖配列のおよそアミノ酸231位からおよそアミノ酸241位までのMHCクラスI重鎖ポリペプチド配列を含み、235位、236位、または237位のうちの1つが、システインによって置換されている、実施形態135～136のいずれかに記載のポリペプチド。

138. 前記リンカーのうちのいずれか1つまたは複数が、式（A A A G G）_nまたは（G G G G S）_nのペプチドから独立して選択され、式中、nが、1～8（例えば、1、2、3、4、5、6、7、もしくは8、または1～4、3～6、もしくは4～8から選択
40
される範囲内）である、実施形態132～137のいずれか1つに記載のポリペプチド。

139. 前記ポリペプチドが、下記の配列、

【化 1 5 4】

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKF
 YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA
 DETATIVEFLNRWITFCQSHSTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLD
 LQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
 DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSHSTLTGGGGSGGGGSGGGGSG
 GGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGIVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDG
 ETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALK
 EDLRSWTAADMCAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHH
 AVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYT
 CHVQHEGLPKPLTLRWEAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

を有する、実施形態 1 3 7 に記載のポリペプチド。

1 4 0 . 実施形態 1 3 2 ~ 1 3 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含む組成物。

20

1 4 1 . 実施形態 1 3 2 ~ 1 3 9 のいずれか 1 つに記載のポリペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

1 4 2 . T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートの調製方法であって、

a) 化学コンジュゲーション部位をコードするヌクレオチド配列を、T 細胞 M M P の第 1 のポリペプチド及び / または第 2 のポリペプチドをコードする核酸配列に組み込んで、第 1 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位及び / または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位を導入することと、

b) 前記核酸を、前記 T 細胞 M M P を発現させるための細胞に導入し、第 1 及び / または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位を有する T 細胞 M M P を得、任意選択で前記 T 細胞 M M P を (部分的にまたは完全に) 精製することと、

30

c) 前記化学コンジュゲーション部位 (複数可) が酵素的活性化または化学変換を必要とする場合、前記化学コンジュゲーション部位 (複数可) を (例えば、酵素により) 活性化または変換することと、

d) 第 1 及び / または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位を有する前記 T 細胞 M M P を、前記第 1 または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位と反応を経ることが可能なエピトープ (または結合したリンカーを有するエピトープ) に、前記第 1 または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位と前記エピトープ (または前記エピトープに結合した前記リンカー) との間で共有結合の形成を引き起こすのに好適な反応条件下で (例えば、酵素または触媒の存在下で) 接触させて、前記 T 細胞 M M P - エピトープコンジュゲートを生産することと、

40

を含む、前記方法。

1 4 3 . 前記化学コンジュゲーション部位が、スルファターゼモチーフ (例えば、X 1 C X 2 P X 3 Z 3、C X 1 P X 2 Z 3 等の、式 (I) または (I I) のスルファターゼモチーフ) である、実施形態 1 4 2 に記載の方法。

1 4 4 . 前記細胞が、

i) F G E を発現して、前記スルファターゼモチーフのセリンもしくはシステインを F G l y に変換するか、または

i i) 前記スルファターゼモチーフのセリンもしくはシステインを F G l y に変換する F G E を発現せず、前記方法が、第 1 及び / または第 2 のポリペプチドの化学コンジュゲーション部位を有する前記 T 細胞 M M P を、前記スルファターゼモチーフの前記セリン

50

またはシステインをF G l yに変換するF G Eに接触させることと、

i i i) 前記F G l y含有ポリペプチドを、前記F G l yのアルデヒドと前記エピトープとの間で共有結合を形成する基で官能化されたエピトープに接触させることと、をさらに含み、

それによってT細胞M M P - エピトープコンジュゲートを形成する、実施形態143に記載の方法。

【実施例】

【0553】

実施例1．ホルミルグリシン(f G l y)化学コンジュゲーション部位を有するT細胞M M Pの調製

10

このデータの裏づけのない実施例(prop h e t i c e x a m p l e)は、f G l y化学コンジュゲーション部位を含有する第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを有するT細胞M M Pの調製を可能にする。これらの第1及び第2のポリペプチドは一緒になって、エピトープがコンジュゲートされ得るT細胞M M Pを形成する。

【0554】

これらのポリペプチドは、ポリアデニル化及び終止コドンと共に第1及び第2のポリペプチドをコードするm R N A分子の発現を駆動するための構成的または誘導性プロモーター要素を含む発現カセットにおいて、第1及び第2のポリペプチドのコード配列を組み立てることによって調製する。発現カセットは、好適な細胞株(例えば、C H O、H E K、V e r o、C O S、酵母等)からの一過性発現のために、別個のベクター(プラスミド、ウイルス等)、または単一のベクターへと組み立てる。代替として、組み立てたカセットを、第1及び第2のポリペプチドの構成的発現または誘導性発現のために、かかる細胞に安定に組み込む。

20

【0555】

下記に記載されるT細胞M M Pの第1及び第2のポリペプチドポリペプチドにおいて示されるリンカーは、任意選択的なものである。存在する場合、リンカーは、アミノ酸配列(例えば、A A A G G(配列番号75)または(G G G G S)_n(ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である)(配列番号76)等の1~50個のアミノ酸)である。1つよりも多くのリンカー配列が示される場合、各箇所について選択されるリンカー配列は、リンカーが現れる他の任意の他の部位について選択されるリンカー配列と同じであっても、または異なってもよい。

30

【0556】

1 A．第1のポリペプチド

この実施例の第1のポリペプチドは、N末端からC末端へと、a)リーダー配列、b)f G l y化学カップリング部位を導入するためのスルファターゼモチーフ、c)任意選択的なリンカー、及びd)2 Mポリペプチドを含む。F G Eの作用に次いで、第1のペプチドは、このモチーフにおけるシステインをホルミルグリシン(f G l y)残基に変換させる。したがって、m R N Aは、下記の全体的配列(リーダー配列の除去及びf G l y残基を作り出すF G E作用の前として示される)を有する第1のポリペプチドをコードする。

40

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 I Q R T P (例えば、図4による、2 Mの残りの部分)、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 Z 3 - リンカー - I Q R T P (例えば、図4による、2 Mの残りの部分)、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 Z 1 X 2 Z 2 X 3 R T P (例えば、図4による、2 Mの残りの部分)、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 C X 2 P X 3 I Q R T P (例えば、図4による、2 Mの残りの部分)、

M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A - リンカー - X 1 C X 2 P X 3 Z 3 - リンカー - I Q R T P (例えば、図4による、2 Mの残りの部分)、または

50

MSRSVALAVLALLSLSGLEA - リンカー - X₁CX₂PX₃RT P (K/Q)IQVYS . . . (例えば、図4による、2Mの残りの部分)。

【0557】

上述の第1のペプチド内で、配列MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号167)は、シグナル配列としての役目を果たし、ポリペプチドの成熟中の細胞プロセスの間に除去される。スルファターゼモチーフの残基(X₁、Z₁、X₂、Z₂、X₃、及びZ₃)は、上述の第I.A節に記載される。かかる第1のポリペプチドのマッピングが図9、パートAに示され、図中、スルファターゼモチーフ(LCTPSR)は、リンカーがこのモチーフの前及び/または後に配置され得ることを強調するために、G₄S (GGGG S) (配列番号76)リンカー内に示される。このマッピングはまた、アルギニンをシステムに変化させる(R12C)、2Mポリペプチドの12位における可能性のあるアミノ酸置換の箇所も示す。マッピングの下には、リーダー配列を含む第1のポリペプチドについての例となるペプチド配列が現れる。2Mポリペプチドは、斜体と共に太字で示され、スルファターゼ配列(LCTPSR)は、太字で示される。

10

【0558】

1B. 第2のポリペプチド

この実施例の第2のポリペプチドは、N末端からC末端へと、a)リーダー配列、b)MODポリペプチド(複数可)、c)任意選択的なリンカー、d)MHCクラス1重鎖ポリペプチド、e)任意選択的なリンカー、及びf)免疫グロブリンFc領域を含む。

【0559】

mRNAは、次の全体的構造を有する第2のポリペプチドポリペプチド(polypeptide polypeptides)をコードする。シグナル配列 - リンカー - IL2ポリペプチド - リンカー - IL2ポリペプチド - MHCクラス1重鎖ポリペプチド - リンカー - 免疫グロブリン重鎖Fcポリペプチド(ここで、シグナル配列は、ヒトIL2シグナル配列である)。かかる第2のポリペプチドのマッピングが図9、パートBに示され、図中、ポリペプチドは、シグナル配列MYRMQLLSCLA LVTNS (配列番号168)、4つのG₄S (GGGG S)リピート(配列番号76)を有するリンカーによって分離されたヒトIL2 MOD (太字で示される)のリピートを含有する。このポリペプチドはまた、ヒト(huma)HLA-Aポリペプチド(太字かつ斜体で示される)及びヒトIgG1 Fcポリペプチドも含有する。このマッピングの下には、Y84C、A139C、及びA236Cシステイン置換の箇所を含めた、可能性のあるアミノ酸置換の箇所が示される。Y84C及びA139C置換は、安定化するジスルフィド結合が、HLA A 1ヘリックスのカルボキシル末端付近の領域とHLA 2-1ヘリックスのアミノ末端周辺の領域との間で形成することを可能にする。A236C置換からもたらされるシステインは、第1のポリペプチドにおける2Mポリペプチドの、例えば12位のシステインと、鎖内ジスルフィド結合を形成することができる。マッピングの下には、リーダー配列を含む第2のポリペプチドについての例となるペプチド配列が現れる。

20

30

【0560】

1C. 第1の第2のポリペプチドの発現及び成熟

上記に示されたように、第1及び第2のポリペプチドを、好適な細胞株(例えば、真核細胞株または哺乳類細胞株)における一過性発現または安定な発現によって調製する。細胞におけるプロセッシングにより、シグナル配列が除去され、また、ポリペプチド発現用に採用した細胞がまたスルファターゼモチーフのシステインまたはセリンをホルミルグリシン(fGly)残基に変換可能であるFGEも発現する場合には、fGly残基が形成する。

40

【0561】

T細胞MMPは、細胞によって、第1及び第2のポリペプチドならびに結合された(非共有結合性で会合している)エピトープまたはヌルポリペプチドを含む複合体としてプロセスされ得る。HLA重鎖ポリペプチドにおける、1ヘリックスのカルボキシル末端の領域と2-1ヘリックスのアミノ末端の領域との間でのジスルフィド結合の導入は、第

50

1 及び第 2 のポリペプチドに会合しているエピトープポリペプチドの不在下での発現を可能にする。加えて、T 細胞 MMP 複合体は膜アンカー領域を含有しないため、この複合体は、発現細胞から可溶型で放出される。

【0562】

発現された T 細胞 MMP の好適なレベルが達成された後に、発現された T 細胞 MMP を含有する細胞培養基を採集する。発現に用いた細胞が FGE 活性を有しなかった場合、T 細胞 MMP を、スルファターゼモチーフにおいて fgly 残基を形成可能な FGE で処理する。例えばクロマトグラフ法を用いて、培地からの T 細胞 MMP の単離及び濃縮を実施して、この複合体の第 1 のポリペプチドのアミノ末端またはその付近に fgly 化学コンジュゲーション部位を有する精製 T 細胞 MMP を生産する。結果として生じる T 細胞 MMP は、図 5、パート B に示される一般構造を有し、図中、第 1 のポリペプチドにおける MHC - 1 は、2 M ポリペプチドであり、第 2 のポリペプチド「MOD」は、一对の IL2 ポリペプチドであり、MHC - 2 は、HLA - A ポリペプチドであり、Fc は、IgG 1 重鎖定常領域である。第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチドとの間のジスルフィド結合は、2 M ポリペプチドの R12C 置換及び HLA - A の A236C 置換から生じるシステインからもたらされる。

【0563】

実施例 2 . T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートの調製

エピトープポリペプチドを、T 細胞 MMP における fgly アルデヒドと反応可能な基をエピトープペプチド上で形成することによって、実施例 1 で調製される fgly ポリペプチドにコンジュゲートする。チオセミカルバジド、アミノオキシ、ヒドラジド、またはヒドラジノアルデヒド反応性基を利用することができるが、この実施例は、インドールに結合させたヒドラジニル基を用いて例示され、ここで、エピトープペプチド（図 8 における R）は、インドール環の窒素に直接または間接的に共有結合されている。図 8 に示されるように、ヒドラジニルインドールの具体的な構造に応じて、エピトープペプチド（R）を T 細胞 MMP の fgly 含有ポリペプチド（囲まれたポリペプチド）に接触させることにより、T 細胞 MMP 及びエピトープが、三環基の形成を通して共有結合性で連結されるようになり、それによって T 細胞 MMP - エピトープコンジュゲートが形成する。このコンジュゲートは、図 6 にある実施形態 B の一般構造を有し、図中、エピトープ及び 2 M ポリペプチドを共有結合性で連結している三環基は示されない。

【0564】

実施例 3 . HBV エピトープにコンジュゲートされた T 細胞 MMP

T 細胞 MMP 複合体を生産するために作製され得る T 細胞 MMP 構築物の非限定的な例としては、図 10A ~ 10D 及び図 11A ~ 11E に図示されるものが挙げられた。具体的な複合体により例として示されているが、図 10 のペプチド及び図 11 のペプチドの任意の組み合わせを用いて、エピトープペプチドにコンジュゲートされて T 細胞 MMP 複合体を形成し得る、T 細胞 MMP を形成させることができる。図 (IG) 10 に示されるペプチドの各々は、ヒト IL - 2 配列、HLA - A 重鎖配列、及び IgG 足場を構成するアミノ酸を含有する。HLA - A 配列は、安定化する鎖内ジスルフィド結合を形成させるための上述のようなアミノ酸 89 及び 139 におけるシステイン、ならびに次に説明する

2 M 含有ポリペプチドと鎖内ジスルフィドを形成し得る、アミノ酸 236 におけるシステインの組み込みによって、安定化される。事例の各々において、図 11 に示されるポリペプチドは、鎖内ジスルフィド形成用に 12 位にシステイン置換を有する 2 M 配列、及び任意選択的なリンカーが両側に位置するスルファターゼモチーフ（配列番号 45）：（リンカー）₀₋₄ - X1Z1X2Z2X3Z3 - （リンカー）₀₋₄ を含有する。スルファターゼモチーフのアミノ酸は、LCTPSR 等のスルファターゼのアミノ酸配列を含むように、上述のように（例えば、実施例 1 及び 2 にあるように）選択してもよい。スルファターゼモチーフのアミノ側及びカルボキシル側上のリンカーは、独立して選択され、存在する場合、GGGGS（配列番号 76）の 1 ~ 4 つのリピート等の任意の所望のアミノ酸配列であってもよい。例えば、哺乳類細胞における発現により、HLA - A 重鎖、なら

10

20

30

40

50

びにスルファターゼ配列及び 2 M 配列を含むペプチドを含む、T 細胞 MMP 複合体の形成がもたらされる。L I M P A R F Y P K (配列番号 91)、A I M P A R F Y P K (配列番号 92)、Y V N V N M G L K (配列番号 93)、F L P S D F F P S V (配列番号 84)、S T L P E T T V V (配列番号 90) から選択される H B V エピトープペプチド、または H B V エピトープの表に列挙される他の H B V エピトープ等のエピトープペプチドは、スルファターゼモチーフにおけるホルミルグリシンの形成、続いてそのホルミル基を適切に修飾したペプチド (例えば、そのカルボキシル末端またはその付近にヒドラジニルインドール等のチオセミカルバジド基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、またはヒドラジノ基をもつペプチド) にコンジュゲートすることによって、第 1 及び第 2 のペプチドの複合体にコンジュゲートすることができる。

10

【0565】

T 細胞 MMP の 1 つの非限定的な例では、この複合体は、図 10 A において 1775' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11 A において 1783' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の实例では、シグナルペプチド (M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の实例では、リーダーペプチド (M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の实例では、エピトープペプチドは、図 11 A に図示される L I M P A R F Y P K (配列番号 91) ペプチド以外である。

20

【0566】

T 細胞 MMP の第 2 の非限定的な例では、この複合体は、図 10 B において 1777' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11 A において 1783' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の实例では、シグナルペプチド (M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の实例では、リーダーペプチド (M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の实例では、エピトープペプチドは、図 11 A に図示される L I M P A R F Y P K (配列番号 91) ペプチド以外である。

30

【0567】

T 細胞 MMP の第 3 の非限定的な例では、この複合体は、図 10 C において 1779' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11 A において 1783' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の实例では、シグナルペプチド (M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の实例では、リーダーペプチド (M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の实例では、エピトープペプチドは、図 11 A に図示される L I M P A R F Y P K (配列番号 91) ペプチド以外である。

40

【0568】

T 細胞 MMP の第 4 の非限定的な例では、この複合体は、図 10 D において 1781' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11 A において 1783' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の实例では、シグナルペプチド (M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の实例では、リーダーペプチド (M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の实例では、エピトープペプチドは、図 11 A に図示される L I M P A R F Y P K (配列番号 91) ペプチド以外である。

50

【0569】

T 細胞 MMP の第 5 の非限定的な例では、この複合体は、図 10 A において 1775' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11 B において 1784' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の实例

例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11B に図示される AIMPARYPK (配列番号 92) ペプチド以外である。

【0570】

T 細胞 MMP の第 6 の非限定的な例では、この複合体は、図 10B において 1777' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11B において 1784' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11B に図示される AIMPARYPK (配列番号 92) ペプチド以外である。

10

【0571】

T 細胞 MMP の第 7 の非限定的な例では、この複合体は、図 10C において 1779' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11B において 1784' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11B に図示される AIMPARYPK (配列番号 92) ペプチド以外である。

20

【0572】

T 細胞 MMP の第 8 の非限定的な例では、この複合体は、図 10D において 1781' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11B において 1784' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11B に図示される AIMPARYPK (配列番号 92) ペプチド以外である。

30

【0573】

T 細胞 MMP の第 9 の非限定的な例では、この複合体は、図 10A において 1775' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11C において 1785' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11C に図示される YVNVNMG LK (配列番号 93) ペプチド以外である。

40

【0574】

T 細胞 MMP の第 10 の非限定的な例では、この複合体は、図 10B において 1777' と表記されるアミノ酸配列を含有する MHC 重鎖を含み、第 2 のポリペプチドは、図 11C において 1785' と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド (MYRMQLLSICIALSLALVTNS (配列番号 168)) を含まず、2 M 配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド (MSRSVALAVLALLSLSGLEA (配列番号 167)) を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図 11C に図示される YVNVNMG LK (配列番号 93) ペプチド以外である。

50

【0575】

T細胞MMPの第11の非限定的な例では、この複合体は、図10Cにおいて1779'と表記されるアミノ酸配列を含有するMHC重鎖を含み、第2のポリペプチドは、図11Cにおいて1785'と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド(MYRMQLLSICIALSLALVTNS(配列番号168))を含まず、2M配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド(MSRSVALLAVLALLSLSGLEA(配列番号167))を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図11Cに図示されるYVNVNMG LK(配列番号93)ペプチド以外である。

【0576】

T細胞MMPの第12の非限定的な例では、この複合体は、図10Dにおいて1781'と表記されるアミノ酸配列を含有するMHC重鎖を含み、第2のポリペプチドは、図11Cにおいて1785'と表記されるポリペプチドである。そのポリペプチドは、一部の事例では、シグナルペプチド(MYRMQLLSICIALSLALVTNS(配列番号168))を含まず、2M配列を含有するポリペプチドは、一部の事例では、リーダーペプチド(MSRSVALLAVLALLSLSGLEA(配列番号167))を含まないであろう。一部の事例では、エピトープペプチドは、図11Cに図示されるYVNVNMG LK(配列番号93)ペプチド以外である。

【0577】

実施例4. CMVエピトープにコンジュゲートされたT細胞MMP

順に、シグナルペプチド(MSRSVALLAVLALLSLSGLEA(配列番号167))、任意選択的なリンカーが両側に位置するスルファターゼモチーフ(配列番号45)、及び2M配列(配列番号151及び図4を参照されたい)を含む、下記の第1のポリペプチド、

【化155】

MSRSVALAVLALLSLSGLEA(リンカー)₀₋₄X1Z1X2Z2X3Z3(リンカー)₀₋₄IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM

は、シグナル配列(MYRMQLLSICIALSLALVTNS(配列番号168))、続いてヒトIL-2 MOD、Y84C、A139C、及びA236Cアミノ酸置換を有するHLA-A11(HLA A*1101)配列を含有する、下記の第2のポリペプチド、

10

20

30

【化 1 5 6】

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT
 AKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT
 FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQ
 LQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL
 NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSD
 AASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNKAQSQTDRLGTLRG^CYNQSEDGSHTIQ
 IMYGCDVGPDGRFLRGYRQDAYDGKDIALNEDLRSWTCADM^CAQITKRKWEAAH
 AAEQQRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGF
 YPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPC^CGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE
 GLPKPLTLRWEAAAGGDKTHTCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1

10

20

6 9)

、と共に発現させてもよい。

【0 5 7 8】

図 10 にあるような他の MHC クラス 1 重鎖構築物を、上記に示された HLA-A 含有構築物の代替物として共発現させてもよい。リンカー及びスルファターゼモチーフは、例えば、実施例 1 及び 2 に上述した通りである。

【0 5 7 9】

共発現により、ポリペプチドにコンジュゲートされ得るスルファターゼモチーフを有する、T 細胞 M M P 複合体の生産がもたらされる。スルファターゼモチーフが、例えば、L C T P S R (アルデヒドへの変換後は L (f G l y) T P S R) であり、コンジュゲーション用のエピトープが C M V (例えば、N L V P M V A T V (配列番号 1 7 0)) に由来する場合、F G l y 残基を含有するように変換し、エピトープペプチドの c 末端にコンジュゲートした後の第 1 のポリペプチドは、

30

【化 1 5 7】

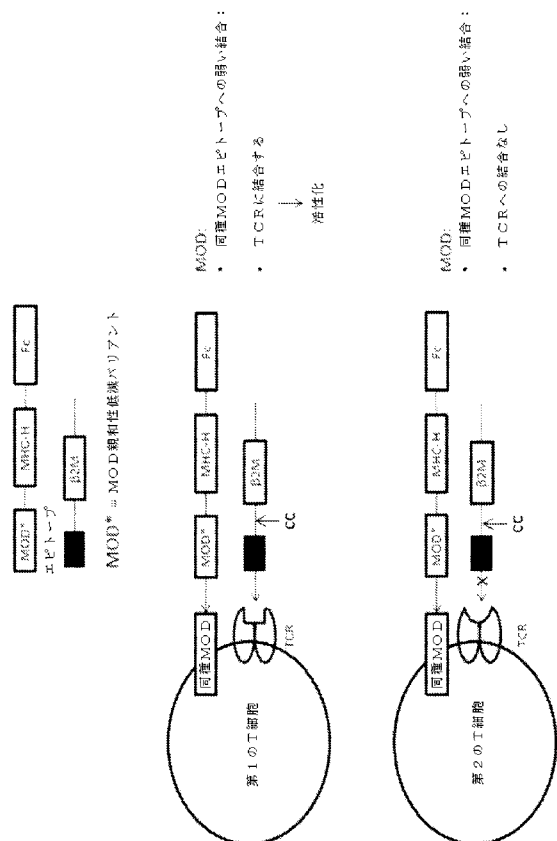
N L V P M V A T V (リンカー) ₀₋₄ L (f G l y) T P S R (リンカー) ₀₋₄ I Q R T P K I Q V Y S C H P A E N G K S
 N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L K N G E R I E K V E H S D L S F S K D
 W S F Y L L Y Y T E F T P T E K D E Y A C R V N H V T L S Q P K I V K W D R D
 M (β 2 M 配列、配列番号 1 5 1 及び図 4 を参照されたい)
 として現れ得る。

40

【0 5 8 0】

シグナルペプチドは、細胞プロセスにより除去されており、システイン 1 2 と HLA-A * 1 1 0 1 含有構築物との間の連結は示されない。

【 ㄣ 1 】



【 図 2 C 】

GenBank F01876
Homo sapiens IgA Fc (アミノ酸120~353) (配列番号6)
234 aa

1	asptspkvip	stststqpdg	nvviadlvqp	ffpgeplsvt	wsesggqvta	inf
61	gultitssul	ltptagclag	scvthvhyh	gtdsgvclp	cpvstsltp	spg
121	scchrlplrl	ptaledcllg	seanltll	lirsdangel	lwtgagkpa	zsa
181	gyeyvsvslp	gncpckthgk	tttstaaype	sktpitatis	kgvgtfipov	hll
241	anelvltitc	larqtpkady	lvwzqgde	lpekyiltva	srqpsqggt	tea
301	aaedskztd	scvsvhpal	plafctgde	raaqqctpxn	vsyvuavde	tsa

GenBank: F6A_E
Homo sapiens IgE Fc (アミノ酸6~222) (配列番号7)
212 aa

1 adpccsnrg vsaylerpnp fdlfarcept itclvvdlap skatunlwo rasekpnbs
61 rkkockgng tlivsttlpv gtdhwdgq ygcwihphl gcalmsttk tsgpraapev
121 yafatpwxp wrdkrtlacl tgnfpedis vgwlnhvgp pdrhsttqr rtkkqgqffv
181 frflevtrae weckdrfj avheaaqpsq tvrvaavnp qk

GenBank P01861
Homo sapiens IgG4Fc (アミノ酸100~327) (配列番号8)
228 aa

1	harkkapavip	lapanratso	staalgelva	dyfpopviva	wuqalagv	hufpavilna
6	qiyelsavut	vpaolagrt	ytuvndkps	ntvdrkrvs	hyypopasp	apafilggv
12	ifpppkkpt	lmartgpt	cuvvndgq	pevdrkrvs	gzevhnakt	preefilgv
18	rsvovitvin	gdwlnkayk	ckvvnkqlp	slektisak	gggpepvvt	lppsggeent
24	qvvelvltv	gypsiacave	wesngpenn	yktippvds	dgafilgarl	tvdkerwgg
30	nvfcsrcho	ailhctkts	lolslek			

【 図 2 D 】

氨基酸序列 (配列番号 9)

【 図 2 E 】

K11g1 R-定数注:1234R/1235R/P331S (三定数注「TM」) (配列番号10)

【 図 2 F 】

K T I G C I F c 変異株: 32297A (配列番号 1)
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMSIRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL
 LQDWSLNGKEVKYCKCSNKAIPAEKTISKAKGQPREPPQYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGGSFYFLYKLTDKSRPWQGVNFGSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 2 G 】

U116G1 F<京儀佳:1224A/1235A (11A1A1)> (配列番号12)
DKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVNSKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLSPREEMTKNQYSLTCKVLKGFYPSDIAVEWESGQENNYKTT
PVLDSGDSFEIYKLVNKSRLWOGQNVESVMEHFIHNYHTKQSIKSIKSPGK

残基はE.U.インデックス（E.u.b.a.も番号付け）に従って番号付けされる

【 図 2 A 】

GenBank 3S7G_A
Homo sapiens IgG1 Fc (配列番号 1)
227 aa

```

1 dkhtetppcp apelligpav fupppqkdt indertpevt cqvvdvshda pavkicwyvd
61 qvqvlnactk preegynsty rrvvvtlvk qvqvlkqeyk kvknkaapa piktakakz
121 cggppegayt lpparcelrk nevtelvlk gtyppadiav seongqppan ykttppvlds
181 dgs:tllykl tppdrwqag nvtocsmha a.hnkytaks lclspqk

```

GenBank AAN76044
Homo sapiens IgG2Fc (73ノ酸99~325) (配列番号2)
227 aa

1	akqapwafpl	apcarkstees	taalgilvex	yfpepyvsw	neqallegvn	tipavlgseq
6	lydlaavvtr	paanfarqy	snvchvskv	knhdvkrk	owcepappa	pyqapwafpl
12	fyppkldvtr	larpvtrv	vudvshede	vyfnyvfyg	ehvaktkpr	eeqnftriv
18	vsulrvhnd	wingkeykck	vsnkplpapi	ektriskkg	pragpyvlp	pxvewrkng
24	veltklvaf	ypodilawe	engpeneay	tiapeldsdg	afflyxvtr	dkrwagqgv
30	lsvvsnvhl	bahyqsls	lspak			

GenBank AAW65947
Homo sapiens IgG31c (アミノ酸 19~246) (配列番号3)
238 aa

1: hkpentavdk zwkltpgd tthtpppa pollgppwv lfpkpkdl nstcptvc
6: vvdvshag eekfwydg vvhrcdtp seegnatyr vsvvlvng dalgkyke
12: kvnkalpvp lhtlskag gpgpyvl ppsdeltkn qvalclvk fyppdiaw
18: enegppeny ktpplvld gafflyklt vdkarwggv vfcvvhva lhhvtykal
24: slsnc

【 ㄨ 2 B 】

GenBank AAA52770
Homo sapiens IgD Fc (アミノ酸 162 ~ 383) (配列番号 4)
222 aa

1	prkapeptpi	isgrtchpzn	spvvlacit	gyhetevet	wyngregepi	rtlpeigred
6	synttesepi	tpaqepip	yk-vvqvts	zk8kzeilw	espkagapw	plapagew
12	lakatetpi	trintgrege	kkhekeke	ecretitpec	phltupigvy	ltlpaqvld
18	lrdkrtfief	wygdldkdt	tkewagpge	tyggocgelc	rhmgngagp	trltlpslwl
24	nag-vetepi	ahpsldtci	ralicpape	poklcnllie	sddpgeakw	lcevgatpi
30	phmlmded	spvntsifc	spvtpagp	tlfwkswlr	vyw-papape	tyt-vvashed
36	mltlnaers	leqvntvlt	trk			

GenBank: J368221A
Homo sapiens IgM Fc (配列番号 5)
276 aa

1 vst:likaks dwlgesnfte rvdhglitq qnassmcpd gdtairvaf gsfasiflt
61 kothkietekt dlttybawf swreongw kthnniech gnatfaayge anidzedbwz
121 gerthvtrw tdlpaplqst lsrpkgnah rghydlppa rzalnzasa ttrlvrgst
181 padufvewmq rgeplapqy vtsapmpqg agpyrfahsi ltuveewnt agtytvarh
241 ealprvter twdkrgtpt lnyvaludw tagtgy

【 図 3 A 】

Homotopient III A-A
ア3、イ2、エ3、オ3、カ3

3A.1 HLA-A*01:01:01:01 NCBJ/National Center for Biotechnology Information) 変異 NP_001229687.1 (配列番号: 34)

[illegible][illegible][illegible][illegible]

【 ㄨ 3 B 】

Homo sapiens HLA-B
HLA-B CienBank 受託 NP_005505.2
アミノ酸 25～362 (配列番号 138)

1	<u>mlvmaprtvl</u>	<u>lllisaalat</u>	<u>etwa</u>	gashar	ytyovavargp	sggeprfivag	yvddtgvtvt
2	dadaapree	prapaleen	payvrtatj	ykazagatg	drnrlrgty	qgeaphstl	
121	sgyovgepvl	rlrlrlgdy	aygdhgltd	nedrlxatx	dtatqatqz	weanraocagp	
18	raylocepve	wrlryleng	dkleragpp	thrlhplcd	healrlcal	qfypactlvt	
24	wygedatq	dkllylncg	gdttjgwa	vwpvsgp	ylthvghgl	ghplltwep	
30	sgtqvtpvg	lvagavlav	vvgagvaav	wrrkhsnqk	qpyygaacs	dsagysdhl	
36	ra						

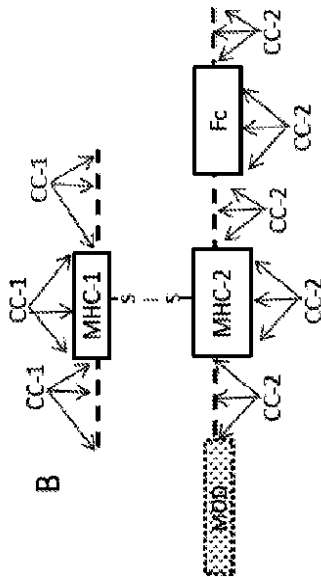
【 図 3 C 】

Homo sapiens HLA-C
HLA-C GenBank 愛託 NP_001229971.1.

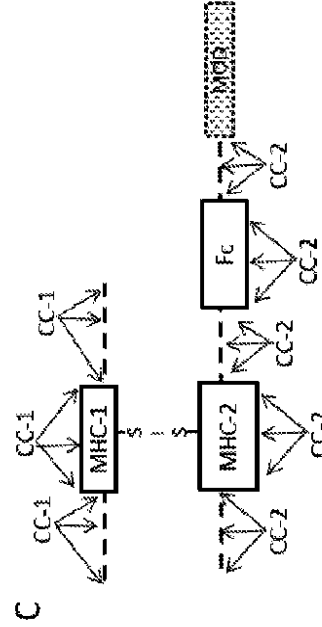
アミノ酸25～366 (配列番号139)

1	<u>mrvm</u> prall	llisggialt	etwa	esher	yfdavsrp	qsewflav	yvdqsfv
6	ddadapgr	prwqevge	gwydwet	gkr	ggadav	gmrlygyn	gqodgthl
12	ryggcdgl	gyllygdy	aydgkdyk	yl	nedrissat	daaghtgr	leaaragel
18	layegteve	gylwlerk	etlgraepp	th	hklpld	heatlrcal	gfpaititl
24	xerdgcdgt	dwellevr	gdgtfgrwa	vwpvsgp	ylymhgld	gylpaweg	gylpaweg
30	sumptipm	ivaglavlv	lavlgavta	smcrkssg	kygungau	snaggsdce	
36	lttk						

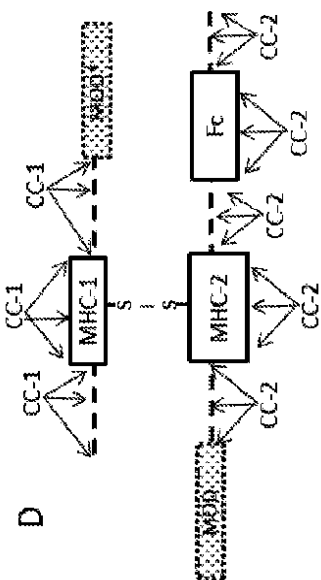
【図 5 B】



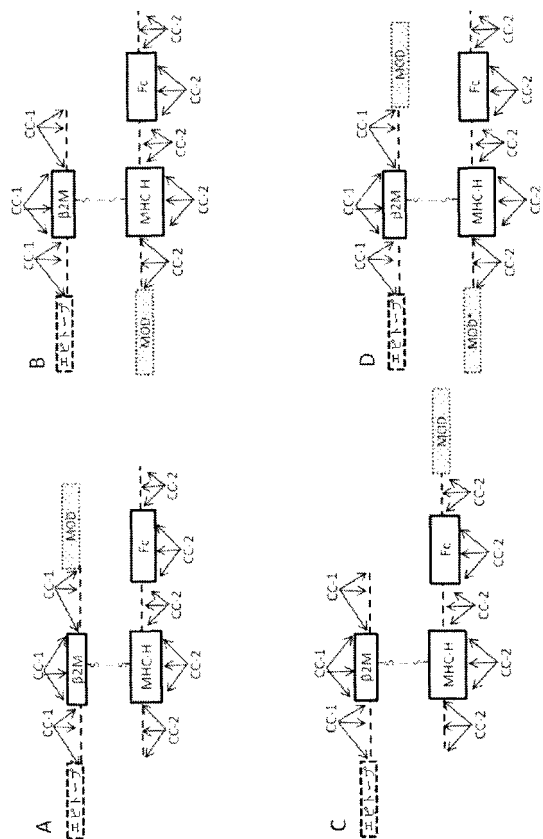
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6 - 0 1】



【手続補正書】

【提出日】令和2年7月1日(2020.7.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020534352000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/49803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/74, A61K 48/00 (2018.01) CPC - C07K 14/70539, A61K 48/00, C07K 2319/00, C07K 2319/30, C07K 2319/40		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2017/0058015 A1 (Albert Einstein College of Medicine, Inc.) 02 March 2017 (02.03.2017) para [0015], [0023], [0025], [0041], [0043], [0063], [0106], [0295], [0325], [0350], [0358], Fig. 1, 18,	1-5 --- 6-19
Y	US 2016/0229911 A1 (Redwood Bioscience, Inc.) 11 August 2016 (11.08.2016) para [0077], [0078], [0080]-(0086)	8-19
Y	US 2011/0159023 A1 (Langermann) 30 June 2011 (30.06.2011) abstract, para [0227]	6-7, (8-19)/(6-7)
Y	US 2016/0347847 A1 (Agenus Inc. et al.) 01 December 2016 (01.12.2016) para [0454]	6-7, (8-19)/(6-7)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 doubts 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 26 October 2018		Date of mailing of the international search report 26 NOV 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 0 7 K 14/025 (2006.01)	C 0 7 K 14/025	
C 0 7 K 14/02 (2006.01)	C 0 7 K 14/02	
C 0 7 K 14/045 (2006.01)	C 0 7 K 14/045	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/26 (2006.01)	C 1 2 N 15/26	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

(31)優先権主張番号 62/615,402

(32)優先日 平成30年1月9日(2018.1.9)

(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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ロドルフォ ジェイ・チャパルロ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ エリー ストリート 2 1
シーノオー キュー バイオフィーマ, インコーポレーテッド

(72)発明者 ジョン エフ・ロス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ エリー ストリート 2 1
シーノオー キュー バイオフィーマ, インコーポレーテッド

(72)発明者 チー メング ロー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ エリー ストリート 2 1
シーノオー キュー バイオフィーマ, インコーポレーテッド

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC07 CC27 CC35 CC41 EE41 EE59 FF32 FF34

4C084 AA01 AA07 BA41 BA42 DA39 MA01 NA13 NA14 ZB07 ZB09
ZB26 ZB33

4C085 AA21 AA33 BB42 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 CA02 CA03 CA40 CA41

DA01 DA04 DA50 DA51 DA75 DA86 EA20 EA28 FA74