

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-554379

(P2023-554379A)

(43)公表日 令和5年12月27日(2023.12.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A	4 H 0 4 5
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全83頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-536343(P2023-536343)	(71)出願人	515146556	モレキュラー パートナーズ アクチェン ゲゼルシャフト スイス国 ツューハー 8 9 5 2 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 1 4	
(86)(22)出願日	令和3年12月16日(2021.12.16)				
(85)翻訳文提出日	令和5年7月27日(2023.7.27)				
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/086331				
(87)国際公開番号	WO2022/129428				
(87)国際公開日	令和4年6月23日(2022.6.23)				
(31)優先権主張番号	63/126,356	(74)代理人	110000109	弁理士法人特許事務所サイクス グリム セバスティアン スイス国 8 9 5 2 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 1 4 モレキュラー パートナーズ アクチェン ゲゼルシャフト内	
(32)優先日	令和2年12月16日(2020.12.16)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者			
(31)優先権主張番号	20216705.2			レシュケ ニーナ スイス国 8 9 5 2 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラーセ 1 4 モレキュラー パートナーズ アクチェン ゲゼルシャフト内	
(32)優先日	令和2年12月22日(2020.12.22)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(72)発明者			
(31)優先権主張番号	63/182,394			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 組換え C D 3 結合タンパク質及びそれらの使用

(57)【要約】

本発明は、C D 3 に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインを含む、組換え結合タンパク質に関する。加えて、本発明は、このような結合タンパク質をコードする核酸、このような結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びこのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、T細胞の疾患局所的活性化の方法における使用、並びにヒトを含む哺乳動物における感染症又は癌などの疾患の治療方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

【請求項 2】

前記アンキリン反復モジュールが、第 1 のアンキリン反復モジュールであり、前記アンキリン反復ドメインが、(1) 配列番号 5～9 及び (2) 配列番号 5～9 のいずれかにおける 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第 2 のアンキリン反復モジュールを更に含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 3】

前記第 1 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 5 及び (2) 配列番号 5 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記第 2 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

前記第 1 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記第 2 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 5】

前記第 1 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記第 2 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 8 及び (2) 配列番号 8 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 6】

前記第 1 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記第 2 のアンキリン反復モジュールが、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

前記第 1 のアンキリン反復モジュールが、前記アンキリン反復ドメイン内の前記第 2 のアンキリン反復モジュールの N 末端に位置する、請求項 2～6 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 8】

C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、前記アンキリン反復ドメインが、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A が、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A が、場合により N によって置換されている、組換え結合タンパク質。

【請求項 9】

前記結合タンパク質が、 10^{-7} M 未満の解離定数 (K_D) で P B S 中のヒト C D 3 に結合する、請求項 8 に記載の結合タンパク質。

50

【請求項 10】

前記結合タンパク質が、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する、請求項9又は10に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

前記結合タンパク質が、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む、請求項8～10のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

前記結合タンパク質が、半減期延長部分を更に含む、請求項8～11のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の結合タンパク質をコードする、核酸。

【請求項 14】

請求項1～12のいずれか一項に記載の結合タンパク質又は請求項13に記載の核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項 15】

医学的状態を治療する方法であって、医学的状態を治療することを必要とする患者に、治療有効量の請求項1～12のいずれか一項に記載の結合タンパク質、請求項13に記載の核酸、又は請求項14に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年12月16日に出願された米国特許出願第63／126,356号、2020年12月22日に出願された欧州特許第20216705号、及び2021年4月30日に出願された米国特許仮出願第63／182,394号に対する優先権の利益を主張するものである。これらの特許出願の開示は、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、CD3に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインを含む、組換え結合タンパク質に関する。加えて、本発明は、このような結合タンパク質をコードする核酸、このような結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びこのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、T細胞の疾患局在化活性化の方法における使用、並びにヒトを含む哺乳動物における感染症又は癌などの疾患の治療方法に関する。

【背景技術】

【0003】

T細胞は、適応免疫応答において重要な役割を果たし、感染細胞又は癌細胞中の異種タンパク質を特異的に認識する。この認識は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)によって提示される異種タンパク質抗原に結合するT細胞受容体(TCR)を介して行われる。TCRリガンドは、典型的には、比較的弱く結合するが、少数のリガンドであっても、T細胞を完全に活性化するのに十分である(Birnbaum et al, Proc Natl Acad Sci U S A; 111(49):17576-81(2014); Davis et al, Annu Rev Immunol; 16:523-44(1998))。T細胞受容体は、それ自体ではシグナル伝達しないが、TCR/CD3複合体を集合的に形成するCD3εγ及びCD3εδヘテロ二量体並びにCD3ζζホモ二量体を典型的に含むマルチサブユニットシグナル伝達器と非共有結合する。免疫適応応答におけるその重要な役割に起因して、この多重タンパク質TCR/CD3複合体は、癌免疫療法における新しい治療ツールの開発のために顕著な注目を集めている。これらのツールの中には、T細胞エンゲージャがある。

【0004】

T細胞エンゲージャ（TCE）は、例えば腫瘍細胞上の標的抗原、及びT細胞上のTCR／CD3複合体に同時に結合し、正常なTCR－MHC相互作用を迂回することによってT細胞活性化を誘発するタンパク質である（Ellerman, Methods; 154: 102－117（2019））。TCEの例は、BiTE（登録商標）分子（Amgen）である。

【0005】

現在、T細胞エンゲージャは、典型的には、TCR／CD3複合体の定常成分（例えば、CD3）及び腫瘍関連抗原（TAA）に対し指向した二重特異性抗体又は抗体フラグメントの形態を有する。しかしながら、これらのT細胞結合性治療ツールは、製造コストが高いこと、複数の病気関連抗原を標的とすることができないことなどのいくつかの欠点を提示する一方でまた、サイトカイン放出症候群（CRS）（Shimabukuro－Vornhagen et al, J Immunother Cancer; 6（1）: 56（2018）; Labrjin et al, Nat Rev Drug Discov; 18（8）: 585－608（2019））及びオンターゲット／オフ腫瘍毒性（Weiner et al, Cancer Res.; 55（20）: 4586－4593（1995）; Weiner et al, Cancer Immunol. Immunother.; 42（3）: 141－150（1996））などの特定の重篤な副作用を引き起こすリスクを抱えている例えば、EGFRを標的とするTCEが非ヒト霊長類において試験され、低レベルの抗原を発現する正常組織との結合に関する安全性の知見が得られた（Lutterbuese et al, Proc Natl Acad Sci U S A; 107（28）: 12605－10（2010））。更に、HER標的化TCEの高親和性CD3結合剤は、二次リンパ組織に優先的に分布し、全身曝露を減少させることが示された（Mandikian et al, Mol. Cancer Ther.; 17（4）: 776 LP－785（2018））。抗体ベースのT細胞エンゲージャは、天然のTTCR－MHC相互作用と比較して、CD3に対して1000倍超高い親和性を示すことが多い（（Wu et al, Pharmacol Ther; 182: 161－75（2018）; 国際公開第2014／167022号; Junntila et al, Cancer Res.; 19: 5561－71（2014）; Yang et al, J Immunol Aug.; 15（137）: 1097－100（1986））。この高い親和性は、T細胞活性化及び腫瘍細胞死滅の点でより低い効率と相関している（Bortolotto et al, Eur. J. Immunol. 32; 11: 3102－3107（2002）; Ellerman, Methods; 154: 102－117（2019）; Mandikian et al, Mol. Cancer Ther.; 17（4）: 776 LP－785（2018）; Vafa et al, Frontiers in Oncology; 10: 446（2020））。

【0006】

したがって、T細胞エンゲージャフォーマットにおいて使用されるのに好適な有益な特性を有する新規なCD3特異的結合タンパク質、並びにCD3特異的結合から利益を得る、癌及び感染症を含む疾患の治療のための治療アプローチが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、CD3に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインを含む、組換え結合タンパク質を提供する。更に提供されるのは、疾患関連抗原（DAA）、例えば感染関連抗原（IAA）、好ましくはウイルス関連抗原（VAA）、又は腫瘍関連抗原（TAA）に対して結合特異性を有する1つ以上の結合剤、好ましくはアンキリン反復ドメイン（これらは、結合タンパク質によるT細胞のDAA依存性活性化を促進する）に連結されたそのような結合タンパク質である。加えて、本発明は、そのような結合タンパク質をコードする核酸、及びそのような結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物を提供する。本発明はまた、T細胞の局在化活性化、例えば、腫瘍局在化又は感染局在化活性化のた

10

20

30

40

50

めの方法における、及びヒトを含む哺乳動物における感染症、好ましくはウイルス感染症又は癌などの疾患を治療する方法における、そのような結合タンパク質、核酸又は医薬組成物の使用を提供する。

【0008】

本出願人は、T細胞エンゲージャ医薬において使用されるのに好適であり、有益な特性を有するCD3特異的結合ドメインを設計、生成及び選択するために、ひたむきな研究を行った（下記参照）。複雑なスクリーニングプロセスとそれに続く数ラウンドの親和性成熟を合理的設計と組み合わせた結果として、4つのCD3特異的アンキリン反復タンパク質、すなわちDARPin（登録商標）タンパク質#1（配列番号1）、DARPin（登録商標）タンパク質#2（配列番号2）、DARPin（登録商標）タンパク質#3（配列番号3）及びDARPin（登録商標）タンパク質#4（配列番号4）を操作した。これらの組換え結合タンパク質は全て、CD3及び／又はT細胞に対して異なる結合親和性を示しながら、CD3に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインを含む。結合タンパク質は、標的化されたT細胞活性化を達成するのに十分に高く、同時に、有害作用（例えば、過剰なT細胞活性化によって引き起こされる）のリスクが低減されるように比較的低い、CD3及び／又はT細胞に対する結合親和性を有する。これらの組換え結合タンパク質は、多重特異性T細胞エンゲージャ（TCE）を含む機能的TCE分子を形成するために、1つ以上のDAA特異的結合剤に連結されるのに好適であることが見出された。したがって、本発明の結合タンパク質は、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含み得る。TCEフォーマットのそのような結合タンパク質は、腫瘍細胞又は感染細胞などの疾患関連細胞上のそれぞれのDAAの存在に応じて、局在化及び標的化された様式で、免疫系、より具体的にはT細胞に結合することができる。CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン（配列番号1、2、3若しくは4又はそれらの変異体）を含む、本発明の結合タンパク質は、したがって、とりわけ、TCE薬物候補の生成において、並びにT細胞の過剰刺激及び／又は有害作用を回避若しくは低減しながらT細胞の効率的な活性化を伴うヒトにおける疾患を治療する方法において使用されるCD3特異的結合タンパク質の「ツールボックス」を表す。

【0009】

一態様では、本発明は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質を提供し、当該アンキリン反復ドメインは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む。一態様では、当該アンキリン反復モジュールは、第1のアンキリン反復モジュールであり、当該アンキリン反復ドメインは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む。特定の一実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、（1）配列番号5及び（2）配列番号5における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、（1）配列6及び（2）配列番号6の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の特定の実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、（1）配列番号7及び（2）配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、（1）配列番号6及び（2）配列番号6の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。更なる特定の実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、（1）配列番号7及び（2）配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、（1）配列番号8及び（2）配列番号8の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸により置換されてい

10

20

30

40

50

る配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。更なる特定の実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1)配列番号7及び(2)配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1)配列番号9及び(2)配列番号9の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸により置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。好ましい一実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。

【0010】

一態様では、本発明は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質を提供し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。

【0011】

一実施形態では、当該結合タンパク質のいずれかは、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合する。更なる実施形態では、当該結合タンパク質のいずれかは、2～900nM、好ましくは約5～約400nMの範囲の EC_{50} でT細胞上のヒトCD3に結合する。更なる実施形態では、当該結合タンパク質に含まれるCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い、好ましくは70℃より高い融解温度(T_m)を有する。更なる実施形態では、当該結合タンパク質に含まれるCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い、好ましくは75℃より高い凝集開始温度(T_{agg})を有する。特定の一実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は2～900nM、好ましくは約5～約400nMの範囲の EC_{50} でT細胞上のヒトCD3に結合する。特定の一実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い、好ましくは80℃より高い融解温度(T_m)を有し、かつ／又は当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い、好ましくは80℃より高い凝集開始温度(T_{agg})を有し、及び／又は当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は当該結合タンパク質は、2～900nM、好ましくは約5～約400nMの範囲の EC_{50} でT細胞上のヒトCD3に結合する。別の特定の実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 5×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は2～900nM、好ましくは約250～約400nMの範囲の EC_{50} でT細胞上のヒトCD3に結合する。別の特定の実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、72℃より高い、好ましくは77℃より高い融解温度(T_m)を有し、かつ／又は当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い、好ましくは75℃より高い凝集開始温度(T_{agg})を有し、及び／又は当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 5×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は当該結合タンパク質は、2～900nM、好ましくは約250～約400nMの範囲の EC_{50} でT細胞上のヒトCD3に結合する。代替的な特定の実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 2×10^{-8}

10

20

30

40

50

M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は2～900 nM、好ましくは約50～約100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。別の特定の実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い、好ましくは70℃より高い融解温度 (T_m) を有し、かつ／又は当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い、好ましくは75℃より高い凝集開始温度 (T_{agg}) を有し、及び／又は当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 2×10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は当該結合タンパク質は、2～900 nM、好ましくは約50～約100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。別の代替実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は2～900 nM、好ましくは約5～約150 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。別の特定の実施形態では、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、73℃より高い、好ましくは78℃より高い融解温度 (T_m) を有し、かつ／又は当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い、好ましくは75℃より高い凝集開始温度 (T_{agg}) を有し、及び／又は当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の、好ましくは又は約 10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合し、かつ／又は当該結合タンパク質は、2～900 nM、好ましくは約5～約15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。

10

20

【0012】

別の態様では、本発明は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該結合タンパク質が、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む、組換え結合タンパク質を提供する。一実施形態では、当該結合剤は、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインである。更なる実施形態では、当該疾患関連抗原は、感染関連抗原 (IAA)、好ましくはウイルス関連抗原 (VAA) である。別の実施形態では、当該疾患関連抗原は、腫瘍関連抗原 (TAA) である。本発明の一態様では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤は、CD3に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインに共有結合又は融合される。特定の一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤は、ペプチドリンカー、好ましくは高プロリンートレオニンペプチドリンカーを用いて、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインに共有結合される。一実施形態では、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、1～50個のアミノ酸、好ましくは6～38個のアミノ酸の長さを有する。好ましい一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該結合タンパク質内のCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインのN末端に位置する。

30

【0013】

別の態様では、本発明は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該結合タンパク質が、半減期延長部分を更に含む、組換え結合タンパク質を提供する。一実施形態では、当該半減期延長部分は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する結合剤を含む。一実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該結合剤は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインである。特定の一実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該結合剤は、配列番号28～30のいずれか1つのアミノ酸配列、好ましくは配列番号29のアミノ酸配列を含む、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインである。一実施形態では、当該半減期延長部分は、当該結合タンパク質内のCD3に対して結合特異性を有する、当該アンキリ

40

50

ン反復ドメインのN末端に位置する。

【0014】

別の態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸、並びに、本発明の結合タンパク質又は本発明の核酸と、任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

別の態様では、本発明は、医学的状態を治療する方法において使用するための、本発明の結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を提供する。一実施形態では、当該医学的状態は、感染症、好ましくはウイルス感染症である。別の実施形態では、当該医学的状態は、癌である。

【0016】

別の態様では、本発明は、哺乳動物、好ましくはヒトにおけるT細胞の腫瘍局在化活性化の方法であって、当該哺乳動物に本発明の結合タンパク質、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。特定の一実施形態では、そのような方法は、腫瘍関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む本発明の結合タンパク質を、腫瘍を有するヒト患者を含む哺乳動物に投与して、腫瘍組織において局在化したT細胞活性化をもたらすことを含む。

【0017】

別の態様では、本発明は、哺乳動物、好ましくはヒトにおけるT細胞の感染局在化活性化の方法であって、当該哺乳動物に本発明の結合タンパク質、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。特定の一実施形態では、そのような方法は、ウイルス関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む本発明の結合タンパク質を、ウイルス感染有するヒト患者を含む哺乳動物に投与して、感染組織において局在化したT細胞活性化をもたらすことを含む。

【0018】

別の態様では、本発明は、ヒト患者における医学的状態を治療するための方法であって、本方法は、当該患者に、治療有効量の本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を投与することを含む。特定の一実施形態では、このような方法は、当該患者に、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む治療有効量の本発明の結合タンパク質、本発明のこのような結合タンパク質をコードする核酸、又は本発明のこのような結合タンパク質を含む医薬組成物を投与することを含む。一実施形態では、当該医学的状態は、癌である。別の実施形態では、当該医学的状態は、感染症、好ましくはウイルス感染症である。

【0019】

特定の一実施形態では、医学的状態は癌であり、癌又は腫瘍組織は、腫瘍関連抗原を発現又は提示する細胞を含み、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該細胞において発現又は提示される当該腫瘍関連抗原に結合する。特定の一実施形態では、当該疾患関連抗原は、当該癌又は腫瘍組織において発現又は過剰発現される細胞表面タンパク質の細胞外ドメインである。別の特定の実施形態では、腫瘍関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、ペプチド-MHC複合体に結合し、当該ペプチドは、腫瘍細胞において発現されるタンパク質（例えば、NY-ESO-1又はMAGE-A3など）に由来する。特定の一実施形態では、当該MHCはMHCクラスIである。一実施形態では、当該癌は、癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫及び混合型癌から選択される。

【0020】

別の特定の一定実施形態では、医学的状態は感染症、好ましくはウイルス感染症であり、感染組織は、感染関連抗原、好ましくはウイルス関連抗原を発現又は提示する細胞を含み、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該細胞において発現又は提示される当該感染関連抗原に結合する。特定の一実施形態では、当該疾患関連抗原は、当該感染組織において発現又は過剰発現されるウィルスタンパク質の細胞外ドメインである。

10

20

30

40

50

。別の特定の実施形態では、ウイルス関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、ペプチド-MHC複合体に結合し、当該ペプチドは、細菌感染因子又はウイルス感染因子などの感染因子、好ましくはウイルス感染因子（例えば、HBcAg又はEBNA-1など）のタンパク質に由来する。特定の一実施形態では、当該MHCはMHCクラスIである。

【0021】

本発明は、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を含む、キットを更に提供する。本発明は、本発明の組換え結合タンパク質を産生するための方法であって、(i)当該組換え結合タンパク質を好適な宿主細胞（真核細胞又は原核細胞）中で発現させるステップと、(ii)当該組換え結合タンパク質を精製するステップ（例えば、クロマトグラフィーを使用して）と、を含む、方法を更に提供する。

10

【0022】

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

E1. CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、(1)配列番号5～9及び(2)配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む、組換え結合タンパク質。

20

E2. 当該アンキリン反復モジュールが、第1のアンキリン反復モジュールであり、当該アンキリン反復ドメインが、(1)配列番号5～9及び(2)配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む、E1に記載の結合タンパク質。

E3. 当該第1のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号5及び(2)配列番号5における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号6及び(2)配列番号6の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、E2に記載の結合タンパク質。

30

E4. 当該第1のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号7及び(2)配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号6及び(2)配列番号6の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、E2に記載の結合タンパク質。

E5. 当該第1のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号7及び(2)配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号8及び(2)配列番号8の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸により置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、E2に記載の結合タンパク質

40

E6. 当該第1のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号7及び(2)配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールが、(1)配列番号9及び(2)配列番号9の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸により置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、E2に記載の結合タンパク質

E7. 当該第1のアンキリン反復モジュールが、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する、E2～E6のいずれかに記載の結合タンパク質。

E8. CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タ

50

ンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAが、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAが、場合によりNによって置換されている、組換え結合タンパク質。

E 9．結合タンパク質が、 10^{-7} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合する、E 1～E 8のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 10．当該結合タンパク質が、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する、E 1～E 9のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 11．CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、E 1～E 10のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 12．CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号2と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、E 1～E 10のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 13．当該結合タンパク質が、約 5×10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合する、E 12に記載の結合タンパク質。

E 14．当該結合タンパク質が、約250～約400 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する、E 12又はE 13に記載の結合タンパク質。

E 15．CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号3と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、E 1～E 10のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 16．当該結合タンパク質が、約 2×10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合する、E 15に記載の結合タンパク質。

E 17．当該結合タンパク質が、約50～約100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する、E 15又はE 16に記載の結合タンパク質。

E 18．CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、E 1～E 10のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 19．当該結合タンパク質が、約 10^{-8} M未満の解離定数 (K_D) でPBS中のヒトCD3に結合する、E 18に記載の結合タンパク質。

E 20．当該結合タンパク質が、約5～約15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する、E 18又はE 19に記載の結合タンパク質。

E 21．当該結合タンパク質が、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む、E 1～E 20のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 22．当該結合剤が、疾患関連抗原に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、E 21に記載の結合タンパク質。

E 23．当該疾患関連抗原が、感染関連抗原 (IAA)、好ましくはウイルス関連抗原 (VAA)、又は腫瘍関連抗原 (TAA) である、E 21又はE 22に記載の結合タンパク質。

E 24．疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤が、当該結合タンパク質内のCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインのN末端に位置する、E 21～E 23のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 25．疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤が、当該結合タンパク質内のCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインに共有結合している、E 21～E 24のいずれか1つに記載の結合タンパク質。

E 26．当該ペプチドリンカーが、高プロリントレオニンペプチドリンカーである、E 25に記載の結合タンパク質。

E 27．当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1～50個のアミノ酸、好ましくは6～38個のアミノ酸の長さを有する、E 25又はE 26に記載の結合タンパク質。

10

20

30

40

50

E 2 8 . 当該結合タンパク質が、半減期延長部分を更に含む、E 1 ~ E 2 7 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質。

E 2 9 . 当該半減期延長部分が、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する結合剤を含む、E 2 8 に記載の結合タンパク質。

E 3 0 . ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該結合剤が、配列番号 2 8 ~ 3 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、好ましくは配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含むアンキリン反復ドメインである、E 2 9 に記載の結合タンパク質。

E 3 1 . 当該半減期延長部分が、当該結合タンパク質内の C D 3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインの N 末端に位置する、E 2 8 ~ E 3 0 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質。

10

E 3 2 . E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質をコードする、核酸。

E 3 3 . E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質又は E 3 2 に記載の核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物。

E 3 4 . 医学的状态を治療する方法において使用するための、E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質、E 3 2 に記載の核酸、又は E 3 3 に記載の医薬組成物。

E 3 5 . 医学的状态が感染症、好ましくはウイルス感染症、又は癌である、E 3 4 に記載の結合タンパク質。

E 3 6 . ヒトを含む哺乳動物における T 細胞の腫瘍局所的活性化の方法であって、当該哺乳動物に、E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質、E 3 2 に記載の核酸、又は E 3 3 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

20

E 3 7 . ヒトを含む哺乳動物における T 細胞の感染局所的活性化の方法であって、当該哺乳動物に、E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質、E 3 2 に記載の核酸、又は E 3 3 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

E 3 8 . 医学的状态を治療する方法であって、医学的状态を治療することを必要とする患者に、治療有効量の E 1 ~ E 3 1 のいずれか 1 つに記載の結合タンパク質、E 3 2 に記載の核酸、又は E 3 3 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

E 3 9 . 当該医学的状态が感染症、好ましくはウイルス感染症、又は癌である、E 3 8 に記載の方法。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】ヒト C D 3、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 1、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 2、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 3、及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 4 に対して結合特異性を有する、4 つの選択されたアンキリン反復タンパク質の精製物の S D S - P A G E ゲル分析である。M は、タンパク質サイズマーカー（還元 S D S - P A G E、N u P A G E 4 ~ 1 2 %、B i s T r i s（i n v i t r o g e n）ゲル；5 μ g / レーン；M E S 緩衝液；インスタントブルー染色）。マーカータンパク質の分子量（k D a）を示す。レーン 1：タンパク質サイズマーカー；レーン 2：精製 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 1；レーン 3：精製 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 2；レーン 4：精製 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 3；レーン 5：精製 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 4。

40

【図 2 A】U V 分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 1 ~ 4 を T B S p H 8 . 0（5 0 m M T r i s、5 0 0 m M N a C l）中で 1 : 1 に希釈し、十分に混合して、その後 N a n o d r o p による U V - V I S（紫外可視）測定を行った。- 7 0 ° C での試料に対して、5 0 ° C で 1 8 日間熱ストレスを受けた試料について評価した。3 2 0 n m で吸収は見られなかった（沈殿の指標）。参照試料とストレスを受けた試料のスペクトルに差はない。

【図 2 B】U V 分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 1 ~ 4 を T B S p H 8 . 0（5 0 m M T r i s、5 0 0 m M N a C l）中で 1 : 1 に希釈し、十分に混合して、その後 N a n o

50

dropによるUV-VIS（紫外可視）測定を行った。-70℃での試料に対して、50℃で18日間熱ストレスを受けた試料について評価した。320nmで吸収は見られなかった（沈殿の指標）。参照試料とストレスを受けた試料のスペクトルに差はない。

【図2C】UV分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）タンパク質#1～4をTBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中で1：1に希釈し、十分に混合して、その後Nano dropによるUV-VIS（紫外可視）測定を行った。-70℃での試料に対して、50℃で18日間熱ストレスを受けた試料について評価した。320nmで吸収は見られなかった（沈殿の指標）。参照試料とストレスを受けた試料のスペクトルに差はない。

【図2D】UV分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）タンパク質#1～4をTBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中で1：1に希釈し、十分に混合して、その後Nano dropによるUV-VIS（紫外可視）測定を行った。-70℃での試料に対して、50℃で18日間熱ストレスを受けた試料について評価した。320nmで吸収は見られなかった（沈殿の指標）。参照試料とストレスを受けた試料のスペクトルに差はない。

【図3】還元SDS-PAGE；10%のBis-Trisゲル；5μg／レーン；MES緩衝液；インスタントブルー染色を使用する、例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。予想MW：14.5kDa。レーン1、M：染色済みマーカー、マーカータンパク質の分子量（kDa）を示す；レーン2及び3：-70℃でのDARPin（登録商標）タンパク質#1対50℃で18日間の熱ストレスを受けた試料；レーン4及び5：-70℃でのDARPin（登録商標）タンパク質#2対50℃で18日間の熱ストレスを受けた試料；レーン6及び7：-70℃でのDARPin（登録商標）タンパク質#3対50℃で18日間の熱ストレスを受けた試料；レーン8及び9：-70℃でのDARPin（登録商標）タンパク質#4対50℃で18日間の熱ストレスを受けた試料。

【図4A】サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）#1～4タンパク質試料を2mg／mlに希釈し、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中でGE Superdex 200 150／5 Increasedカラムにかけた。トレースを280nmで分析した。黒色：-70℃で保存した参照試料；灰色：50℃で18日間インキュベートした熱ストレスを受けた試料。これらの曲線は、大部分が重なっている。

【図4B】サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）#1～4タンパク質試料を2mg／mlに希釈し、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中でGE Superdex 200 150／5 Increasedカラムにかけた。トレースを280nmで分析した。黒色：-70℃で保存した参照試料；灰色：50℃で18日間インキュベートした熱ストレスを受けた試料。これらの曲線は、大部分が重なっている。

【図4C】サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）#1～4タンパク質試料を2mg／mlに希釈し、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中でGE Superdex 200 150／5 Increasedカラムにかけた。トレースを280nmで分析した。黒色：-70℃で保存した参照試料；灰色：50℃で18日間インキュベートした熱ストレスを受けた試料。これらの曲線は、大部分が重なっている。

【図4D】サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の安定性評価である。DARPin（登録商標）#1～4タンパク質試料を2mg／mlに希釈し、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中でGE Superdex 200 150／5 Increasedカラムにか

けた。トレースを280nmで分析した。黒色：-70℃で保存した参照試料；灰色：50℃で18日間インキュベートした熱ストレスを受けた試料。これらの曲線は、大部分が重なっている。

【図5A】円偏光二色性(CD)分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の熱安定性評価である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料(それぞれA~D)を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で2μMに希釈した。タンパク質アンフォールディング(順方向)及びリフォールディング(逆方向)をモニターした。全てのタンパク質は、65℃より高いT_mで可逆的アンフォールディングを示した(グラフにおいて点線で示される)。

【図5B】円偏光二色性(CD)分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の熱安定性評価である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料(それぞれA~D)を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で2μMに希釈した。タンパク質アンフォールディング(順方向)及びリフォールディング(逆方向)をモニターした。全てのタンパク質は、65℃より高いT_mで可逆的アンフォールディングを示した(グラフにおいて点線で示される)。

【図5C】円偏光二色性(CD)分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の熱安定性評価である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料(それぞれA~D)を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で2μMに希釈した。タンパク質アンフォールディング(順方向)及びリフォールディング(逆方向)をモニターした。全てのタンパク質は、65℃より高いT_mで可逆的アンフォールディングを示した(グラフにおいて点線で示される)。

【図5D】円偏光二色性(CD)分光法を用いた例示的な設計アンキリン反復タンパク質の熱安定性評価である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料(それぞれA~D)を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で2μMに希釈した。タンパク質アンフォールディング(順方向)及びリフォールディング(逆方向)をモニターした。全てのタンパク質は、65℃より高いT_mで可逆的アンフォールディングを示した(グラフにおいて点線で示される)。

【図6A】動的光散乱(DLS)による凝集開始温度T_{agg}の決定である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で1mg/mlに希釈し、T_{agg}をDLSによって決定した(5回反復、A1、A2、A3、A4、A5)。試験した4つ全てのアンキリン反復タンパク質は、80℃を超える高いT_{agg}を示した。

【図6B】動的光散乱(DLS)による凝集開始温度T_{agg}の決定である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で1mg/mlに希釈し、T_{agg}をDLSによって決定した(5回反復、A1、A2、A3、A4、A5)。試験した4つ全てのアンキリン反復タンパク質は、80℃を超える高いT_{agg}を示した。

【図6C】動的光散乱(DLS)による凝集開始温度T_{agg}の決定である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で1mg/mlに希釈し、T_{agg}をDLSによって決定した(5回反復、A1、A2、A3、A4、A5)。試験した4つ全てのアンキリン反復タンパク質は、80℃を超える高いT_{agg}を示した。

【図6D】動的光散乱(DLS)による凝集開始温度T_{agg}の決定である。DARPin(登録商標)タンパク質#1~4の試料を、TBS pH8.0(50mM Tris、500mM NaCl)中で1mg/mlに希釈し、T_{agg}をDLSによって決定した(5回反復、A1、A2、A3、A4、A5)。試験した4つ全てのアンキリン反復タンパク質は、80℃を超える高いT_{agg}を示した。

【図7A】雌BALB/cマウスにおける例示的なCD3特異的結合タンパク質の薬物動態分析である。図は、1mg/kgの単回静脈内ボラス投与後の、雌BALB/cマウスにおけるDARPin(登録商標)タンパク質#5、DARPin(登録商標)タンパ

10

20

30

40

50

ク質 # 6、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 7 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 8 の群平均血清濃度－時間プロファイルを示す（平均±最大／分、群当たり N = 3）。

【図 7 B】D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 3 によって例示される、ヒト C D 3 に結合する結合タンパク質の表面プラズモン共鳴（S P R）分析である。様々な濃度（8、16、32、及び 64 nM）の精製されたアンキリン反復タンパク質を、オンレート及びオフレート測定のために不動化したヒト C D 3 を有する G L C チップに適用した。得られた S P R トレース分析を使用して、アンキリン反復タンパク質 C D 3 相互作用を決定した。R U、共鳴単位；s、時間（秒）。

【図 8 A】例示された結合タンパク質の T 細胞への C D 3 結合である。P a n－T 細胞上の C D 3 への結合を、M i r r o r b a l l によって評価した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1 及び T A A 3 に対して結合特異性を有する T C E 2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない（図 A）又は伴う（図 B）D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。半減期延長タンパク質（B）は、（A）に示される対応する非 H L E 分子と比較して同様の結合を示す。5 人の異なるドナーからの P a n－T 細胞を試験し、1 人の代表的なドナーをここに示す。（* 陰性対照：それぞれ半減期延長を伴う及び伴わない、T A A 2 及び T A A 3 のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

【図 8 B】例示された結合タンパク質の T 細胞への C D 3 結合である。P a n－T 細胞上の C D 3 への結合を、M i r r o r b a l l によって評価した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1 及び T A A 3 に対して結合特異性を有する T C E 2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない（図 A）又は伴う（図 B）D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。半減期延長タンパク質（B）は、（A）に示される対応する非 H L E 分子と比較して同様の結合を示す。5 人の異なるドナーからの P a n－T 細胞を試験し、1 人の代表的なドナーをここに示す。（* 陰性対照：それぞれ半減期延長を伴う及び伴わない、T A A 2 及び T A A 3 のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

【図 9 A】短期標的細胞死滅（L D H）である。P a n－T 細胞（エフェクター細胞（E）として）及び T A A 2／T A A 3 発現腫瘍細胞（標的細胞（T）として）を 5：1 の E：T 比でインキュベートし、腫瘍細胞死滅を、示された分子の段階希釈物の存在下での 48 時間の共培養後の上清中の L D H 放出によって評価した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない（図 A）又は伴う（図 B）D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。（A）半減期延長を伴わないタンパク質について、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 C によって誘導される腫瘍細胞死滅は、ベンチマーク分子に匹敵するが、D A R P i n（登録商標）タンパク質 D 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 A は、細胞傷害性においてより低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非 H L E 分子と比較して、効力において 4～70 倍の減少を示す。5 人の異なるドナーからの P a n－T 細胞を試験し、1 人の代表的なドナーをここに示す。（* 陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わない T A A 2 及び T A A 3 に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

【図 9 B】短期標的細胞死滅（L D H）である。P a n－T 細胞（エフェクター細胞（E）として）及び T A A 2／T A A 3 発現腫瘍細胞（標的細胞（T）として）を 5：1 の E

10

20

30

40

50

：T比でインキュベートし、腫瘍細胞死滅を、示された分子の段階希釈物の存在下での48時間の共培養後の上清中のLDH放出によって評価した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない（図A）又は伴う（図B）DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わないタンパク質について、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導される腫瘍細胞死滅は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質D及びDARPin（登録商標）タンパク質Aは、細胞傷害性においてより低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において4～70倍の減少を示す。5人の異なるドナーからのPan-T細胞を試験し、1人の代表的なドナーをここに示す。（*陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わないTAA2及びTAA3に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

10

【図10A】活性化マーカーCD25によって測定される短期T細胞活性化である。Pan-T細胞及びTAA2/TAA3発現腫瘍細胞を、1：1のE：T比でインキュベートし、T細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での24時間の共培養後に、FACSによって評価した。活性化したT細胞を、生存CD8+/CD25+細胞としてゲーティングした。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない（図A）又は伴う（図B）DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質D及びDARPin（登録商標）タンパク質Aは、より低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において4～100倍の減少を示す。7人の異なるドナーからのPan-T細胞を試験し、1人の代表的なドナーをここに示す。（*陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わないTAA2及びTAA3のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

20

30

【図10B】活性化マーカーCD25によって測定される短期T細胞活性化である。Pan-T細胞及びTAA2/TAA3発現腫瘍細胞を、1：1のE：T比でインキュベートし、T細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での24時間の共培養後に、FACSによって評価した。活性化したT細胞を、生存CD8+/CD25+細胞としてゲーティングした。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない（図A）又は伴う（図B）DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質D及びDARPin（登録商標）タンパク質Aは、より低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において4～100倍の減少を示す。7人の異なるドナーからのPan-T細胞を試験し、1人の代表的なドナーをここに示す。（*陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わないTAA2及びTAA3のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

40

【図11A】IFN γ 分泌によって測定される短期T細胞活性化である。Pan-T及び

50

T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞を、1 : 1 の E : T 比でインキュベートした。示された分子の連続希釈物の存在下で 24 時間共培養した後、培養上清中の I F N γ 分泌を E L I S A によって分析した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない（図 A）又は伴う（図 B）D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。（A）半減期延長を伴わない、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 C によって誘導される T 細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、D A R P i n（登録商標）タンパク質 D 及び v 1 1 8 D A R P i n（登録商標）タンパク質 A は、より低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非 H L E 分子と比較して、効力において 3 ~ 20 倍の減少を示す。4 人の異なるドナーからの P a n - T 細胞を試験し、1 人の代表的なドナーをここに示す。（* 陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わない T A A 2 及び T A A 3 のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

10

【図 1 1 B】I F N γ 分泌によって測定される短期 T 細胞活性化である。P a n - T 及び T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞を、1 : 1 の E : T 比でインキュベートした。示された分子の連続希釈物の存在下で 24 時間共培養した後、培養上清中の I F N γ 分泌を E L I S A によって分析した。ベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない（図 A）又は伴う（図 B）D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。（A）半減期延長を伴わない、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 C によって誘導される T 細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、D A R P i n（登録商標）タンパク質 D 及び v 1 1 8 D A R P i n（登録商標）タンパク質 A は、より低い効力を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非 H L E 分子と比較して、効力において 3 ~ 20 倍の減少を示す。4 人の異なるドナーからの P a n - T 細胞を試験し、1 人の代表的なドナーをここに示す。（* 陰性対照：それぞれ半減期延長を伴うか又は伴わない T A A 2 及び T A A 3 のみに対して結合特異性を有する設計アンキリン反復タンパク質）。

20

30

【図 1 2】長期腫瘍細胞死滅である。P a n - T 細胞及び T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞を、5 : 1 の E : T 比でインキュベートし、T 細胞死滅を、示された分子の段階希釈物の存在下での 6 日間にわたる共培養で、I n c u C y t e によって評価した。腫瘍細胞死滅を、アネキシン V 染色の曲線下面積と細胞増殖との間の比として計算する。2 つのベンチマーク対照分子（既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1 及び T A A 3 に対して結合特異性を有する T C E 2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（H L E）を伴わない又は伴う、D A R P i n（登録商標）タンパク質 A、D A R P i n（登録商標）タンパク質 B、D A R P i n（登録商標）タンパク質 C 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 D を示す。データは、半減期延長とは無関係に、ほとんどの試験されたタンパク質で、ベンチマーク分子に匹敵する強力かつ特異的な腫瘍細胞死滅を示す。より低い親和性の D A R P i n（登録商標）タンパク質 A のみが、死滅効力の顕著な低下を示す。濃度は、左から右に、H S A 結合ドメインを含まないベンチマーク及び試験タンパク質については 2 n M であり、続いてそれぞれ 1 / 10 に希釈し、H S A 結合ドメインを含む試験タンパク質については 20 n M であり、続いてそれぞれ 1 / 10 に希釈する。5 人の異なるドナーからの P a n - T 細胞を使用し、1 人の代表的なドナーをここに示す。

40

【図 1 3 A】長期 T 細胞活性化である。P a n - T 細胞及び T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞を、1 : 1 の E : T 比でインキュベートし、T 細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での 5 日間の共培養後に、F A C S によって評価した。活性化した T 細胞を

50

、生存CD8+／CD25+細胞としてゲーティングした。2つのベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない又は伴う、DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質A及びDARPin（登録商標）タンパク質Dは、効力において>100倍の減少を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において>10倍の減少を示す。2人の異なるドナーからのPan-T細胞を使用し、1人の代表的なドナーをここに示す。

10

【図13B】長期T細胞活性化である。Pan-T細胞及びTAA2／TAA3発現腫瘍細胞を、1：1のE：T比でインキュベートし、T細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での5日間の共培養後に、FACSによって評価した。活性化したT細胞を、生存CD8+／CD25+細胞としてゲーティングした。2つのベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない又は伴う、DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞活性化は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質A及びDARPin（登録商標）タンパク質Dは、効力において>100倍の減少を示す。（B）半減期延長タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において>10倍の減少を示す。2人の異なるドナーからのPan-T細胞を使用し、1人の代表的なドナーをここに示す。

20

【図14A】長期T細胞増殖である。Pan-T細胞及びTAA2／TAA3発現腫瘍細胞を、1：1のE：T比でインキュベートし、T細胞増殖を、示された分子の段階希釈物の存在下での5日間の共培養後に、FACSによって評価した。増殖T細胞を、少なくとも1回の細胞分裂を示すCellTrace Violet陽性細胞としてゲーティングした。2つのベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない又は伴う、DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞増殖は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質A及びDARPin（登録商標）タンパク質Dは、効力において>100倍の減少を示す。（B）半減期延長DARPin（登録商標）タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において>30倍の減少を示す。2人の異なるドナーからのPan-T細胞を使用し、1人の代表的なドナーをここに示す。

30

40

【図14B】長期T細胞増殖である。Pan-T細胞及びTAA2／TAA3発現腫瘍細胞を、1：1のE：T比でインキュベートし、T細胞増殖を、示された分子の段階希釈物の存在下での5日間の共培養後に、FACSによって評価した。増殖T細胞を、少なくとも1回の細胞分裂を示すCellTrace Violet陽性細胞としてゲーティングした。2つのベンチマーク対照分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2）及び選択されたアンキリン反復タンパク質、半減期延長（HLE）を伴わない又は伴う

50

、DARPin（登録商標）タンパク質A、DARPin（登録商標）タンパク質B、DARPin（登録商標）タンパク質C及びDARPin（登録商標）タンパク質Dを示す。（A）半減期延長を伴わない、DARPin（登録商標）タンパク質B及びDARPin（登録商標）タンパク質Cによって誘導されるT細胞増殖は、ベンチマーク分子に匹敵するが、DARPin（登録商標）タンパク質A及びDARPin（登録商標）タンパク質Dは、効力において>100倍の減少を示す。（B）半減期延長DARPin（登録商標）タンパク質は、（A）に示される対応する非HLE分子と比較して、効力において>30倍の減少を示す。2人の異なるドナーからのPan-T細胞を使用し、1人の代表的なドナーをここに示す。

【図15A】マウスの腫瘍細胞注射及び処置後の経時的な腫瘍増殖である。ビヒクル、ベンチマークTAA3 T細胞エンゲージャ、DARPin（登録商標）タンパク質#E、DARPin（登録商標）タンパク質#F、DARPin（登録商標）タンパク質#G及びDARPin（登録商標）タンパク質#Hを用いて、実施例10に示され、記載されるように処置を行った。

【図15B】マウスの腫瘍細胞注射及び処置後の経時的な腫瘍増殖である。ビヒクル、ベンチマークTAA3 T細胞エンゲージャ、DARPin（登録商標）タンパク質#E、DARPin（登録商標）タンパク質#F、DARPin（登録商標）タンパク質#G及びDARPin（登録商標）タンパク質#Hを用いて、実施例10に示され、記載されるように処置を行った。

【図15C】マウスの腫瘍細胞注射及び処置後の経時的な腫瘍増殖である。ビヒクル、ベンチマークTAA3 T細胞エンゲージャ、DARPin（登録商標）タンパク質#E、DARPin（登録商標）タンパク質#F、DARPin（登録商標）タンパク質#G及びDARPin（登録商標）タンパク質#Hを用いて、実施例10に示され、記載されるように処置を行った。

【図16A】（A）hPBMCを腹腔内注射したマウスにおける経時的な腫瘍増殖（ドナー当たりn=5マウス／使用した2匹のhPBMCドナー）であり、TAA2／TAA3／TAA4発現腫瘍細胞を皮下異種移植し、PBS 1×（黒丸）、0.5mg/kgでの多重特異性TCEフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#3（黒四角）又は0.5mg/kgでのベンチマークTAA3 T細胞エンゲージャ（黒三角）で処置した。処置を、実施例10に記載のように施した。データを平均+SEMで表示する。（B）腫瘍細胞異種移植の17日後の腫瘍体積の評価である。

【図16B】（A）hPBMCを腹腔内注射したマウスにおける経時的な腫瘍増殖（ドナー当たりn=5マウス／使用した2匹のhPBMCドナー）であり、TAA2／TAA3／TAA4発現腫瘍細胞を皮下異種移植し、PBS 1×（黒丸）、0.5mg/kgでの多重特異性TCEフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#3（黒四角）又は0.5mg/kgでのベンチマークTAA3 T細胞エンゲージャ（黒三角）で処置した。処置を、実施例10に記載のように施した。データを平均+SEMで表示する。（B）腫瘍細胞異種移植の17日後の腫瘍体積の評価である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本明細書に開示及び例証されるように、本開示は、CD3を特異的に標的化するアンキリン反復タンパク質を提供する。設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー（国際公開第2002/020565号、Binzet al., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004; Stumpp et al., Drug Discov. Today, 13, 695-701, 2008）は、高い親和性でそれらの標的に結合する標的特異的設計アンキリン反復ドメインの選択に使用することができる。次に、そのような標的特異的設計アンキリン反復ドメインを、疾患を治療するための組換え結合タンパク質の価値ある成分として使用することができる。設計アンキリンリピートタンパク質は、モノクローナル抗体の限界を克服する可能性を有する結合分子のクラスであり、したがって新規な治療的アプローチを可能にする。そのようなアンキリン反復タンパク質は

、単一の設計アンキリン反復ドメインを含んでもよく、又は同じ若しくは異なる標的特異性を有する2つ以上の設計アンキリン反復ドメインの組合せを含んでもよい（Stumpら、「Drug Discov. Today」13, 695-701, 2008；米国特許第9,458,211号）。単一の設計アンキリン反復ドメインのみを含むアンキリンリピートタンパク質は、高い親和性及び特異性で所与の標的タンパク質に結合するように選択され得る小タンパク質（14 kDa）である。これらの特性、及び2つ、3つ、4つ又はそれ以上の異なる特異性を有する結合タンパク質をもたらす、1つのタンパク質において2つ、3つ、4つ又はそれ以上の設計アンキリン反復ドメインを組み合わせ可能であることは、設計アンキリン反復タンパク質を理想的なアゴニスト、アンタゴニスト及び／又は阻害性薬物候補にし、例えば、T細胞エンゲージャ薬物分子の新規設計を含む新規薬物設計を可能にする。更に、そのようなアンキリン反復タンパク質は、様々なエフェクター機能、例えば細胞傷害性剤又は半減期延長剤を担持し、完全に新しい薬物フォーマットを可能にするように操作することができる。まとめると、設計アンキリン反復タンパク質は、既存の抗体薬物を超える可能性を有するタンパク質治療薬の次世代の例である。

10

【0025】

DARPin（登録商標）は、Molecular Partners AG, Switzerland 所有の商標である。

【0026】

一態様では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインは、CD3に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のうちいずれかにおける9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のアンキリン反復モジュールを更に含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、（1）配列番号5～9及び（2）配列番号5～9のいずれかにおける1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個のアミノ酸置換の全てが、当該アンキリン反復モジュールのフレームワーク位置に生じる。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号5～9からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

40

【0027】

一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号5のアミノ酸配列又は配列番号5の1個若しくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号6のアミノ酸配列又は配列番号6の1個若しくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号7のアミノ酸配列又は配列番号7の1個若しくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号8のアミノ酸配列又は配列番号8の1個若しくは2個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配

50

列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 9 のアミノ酸配列又は配列番号 9 の 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復モジュールは、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む。

【0028】

一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、第 1 のアンキリン反復モジュール及び第 2 のアンキリン反復モジュールを含む。好ましい一実施形態では、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第 2 のアンキリン反復モジュールの N 末端に位置する。一実施形態では、当該第 1 及び第 2 のアンキリン反復モジュールは、それぞれ、(1) 配列番号 5～9 及び (2) 配列番号 5～9 のいずれかにおける 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第 2 のアンキリン反復モジュールを更に含む。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、(1) 配列番号 5～9 及び (2) 配列番号 5～9 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第 1 のアンキリン反復モジュールを含み、(1) 配列番号 5～9 及び (2) 配列番号 5～9 のいずれかにおける 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第 2 のアンキリン反復モジュールを更に含む。

【0029】

特定の一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 5 及び (2) 配列番号 5 における 9 個までの、又は 8 個までの、又は 7 個までの、又は 6 個までの、又は 5 個までの、又は 4 個までの、又は 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 の 9 個までの、又は 8 個までの、又は 7 個までの、又は 6 個までの、又は 5 個までの、又は 4 個までの、又は 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0030】

したがって、一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 5 及び (2) 配列番号 5 における 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 における 2 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 5 及び (2) 配列番号 5 における 6 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 における 2 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 5 及び (2) 配列番号 5 における 5 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 6 及び (2) 配列番号 6 の 9 個までの、又は 8 個までの、又は 7 個までの、又は 6 個までの、又は 5 個までの、又は 4 個までの、又は

3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号5及び(2) 配列番号5における4個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号5及び(2) 配列番号5における3個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号5及び(2) 配列番号5における2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号5及び(2) 配列番号5の1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、配列番号5のアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0031】

好ましい実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号5及び(2) 配列番号5における3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。更に、より好ましい実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、配列番号5のアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、配列番号6のアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。

【0032】

別の特定の実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配

10

20

30

40

50

好ましい一実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号6及び(2) 配列番号6の3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末

端に位置する。更に、より好ましい実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、配列番号7のアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、配列番号6のアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。

【0035】

別の特定の実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の9個までの、又は8個までの、又は7個までの、又は6個までの、又は5個までの、又は4個までの、又は3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。

10

【0036】

したがって、一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の9個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における6個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の6個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における5個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の5個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における4個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の4個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における3個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の3個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号8及び(2) 配列番号8の1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアン

20

30

40

50

ンキリン反復モジュールは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む。

【0037】

好ましい一実施形態では、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 における 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 8 及び (2) 配列番号 8 の 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第 2 のアンキリン反復モジュールの N 末端に位置する。更に、より好ましい実施形態では、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、配列番号 7 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第 2 のアンキリン反復モジュールの N 末端に位置する。

10

【0038】

別の特定の実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 9 個までの、又は 8 個までの、又は 7 個までの、又は 6 個までの、又は 5 個までの、又は 4 個までの、又は 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 9 個までの、又は 8 個までの、又は 7 個までの、又は 6 個までの、又は 5 個までの、又は 4 個までの、又は 3 個までの、又は 2 個までの、又は 1 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0039】

したがって、一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 9 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 6 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 6 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 5 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 5 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 4 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 4 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第 1 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 7 及び (2) 配列番号 7 の 3 個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第 2 のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号 9 及び (2) 配列番号 9 の 3 個までのアミノ酸

30

40

50

が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7の2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号9及び(2) 配列番号9の2個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7における1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号9及び(2) 配列番号9の1個のアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、そのようなアンキリン反復ドメインにおいて、当該第1のアンキリン反復モジュールは、配列番号7のアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0040】

好ましい実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号7及び(2) 配列番号7の3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、(1) 配列番号9及び(2) 配列番号9の3個までの、又は2個までの、又は1個までのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。更に、より好ましい実施形態では、当該第1のアンキリン反復モジュールは、配列番号7のアミノ酸配列を含み、当該第2のアンキリン反復モジュールは、配列番号9のアミノ酸配列を含み、当該第1のアンキリン反復モジュールは、当該アンキリン反復ドメイン内の当該第2のアンキリン反復モジュールのN末端に位置する。

【0041】

好ましい一実施形態では、本明細書に説明及び言及されるような当該アンキリン反復モジュールの当該のアミノ酸置換の全ては、当該アンキリン反復モジュールのフレームワーク位置において起こり、典型的には、モジュールの全体構造は、置換によって影響を受けない。フレームワーク位置におけるそのような置換の実施形態は、そのような置換が明示的に記載されているかどうかに関係なく、全ての実施形態に適用されるものとする。

【0042】

1つの好ましい実施形態では、本明細書に説明及び言及されるような当該アンキリン反復モジュールの当該のアミノ酸置換の全ては、配列番号5～9の当該アンキリン反復モジュールのフレームワーク位置でかつ3、4、6、14及び15位以外の位置で、好ましくは2、3、4、5、6、14及び15位以外の位置で起こり、典型的には、モジュールの全体的な構造は、置換の影響を受けない。

【0043】

別の態様では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインは、CD3に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAが、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている、組換え結合タンパク質に関する。

【0044】

したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施

形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 93 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 から選択されるアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A が、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されている。

10

【0045】

一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1 の最後から 2 番目の位置の A が、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1 の最後の位置の A は、N によって場合により置換されている。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 93 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0046】

一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 2 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 2 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されている。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 93 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

40

【0047】

50

一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号3の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3の最後の位置のAは、Nによって場合により置換されている。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

10

【0048】

一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、Nによって場合により置換されている。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、E1～E10のいずれか1つに記載の結合タンパク質。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0049】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインの潜在的な相互作用残基は、配列番号1～4のアンキリン反復ドメインのいずれか1つにおける対応する位置と同一である。

40

【0050】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、900、700、500、400、300、200、150、100、70、60、50、40、30、20、15、又は10 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、900 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、700 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、500 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、400 nM未満のE

50

C₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、300 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、200 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、100 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、70 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、60 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、50 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、40 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、30 nM未満のEC₅₀でT細胞に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、20 nM未満のEC₅₀でT細胞に結合し；別の態様では、当該結合タンパク質は、15 nM未満のEC₅₀でT細胞に結合し；更なる態様では、当該結合タンパク質は、0 nM未満のEC₅₀でT細胞に結合する。

10

【0051】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約5～約400 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。更なる実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約250～約400 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；別の実施形態では、当該結合タンパク質は、約50～約100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し；更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、約5～約15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合する。

20

【0052】

Mirrorballレーザー走査イメージングサイトメトリーを使用することによる、CD3に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質のT細胞上でのCD3結合（EC₅₀）の典型的かつ好ましい決定は、実施例5に記載されている（初代ヒトT細胞を用いて）。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質の当該CD結合（EC₅₀）は、実施例5に記載されるように、Mirrorballレーザー走査イメージングサイトメトリーによって初代ヒトT細胞上で決定される。

30

【0053】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該結合タンパク質は、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAが、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAは、場合によりN置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900

40

50

nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、2～900nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、2～900nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。

10

【0054】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約250～約400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該結合タンパク質は、配列番号2のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号2の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号2の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約250～400nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2のアミノ酸配列を含み、配列番号2の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号2の最後の位置のAが、場合によりNによって置換されている。

20

30

40

【0055】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約50～約100nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該結合タンパク質は、配列番号3と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号3の最後か

50

ら2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、50～100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約50～約100 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含み、配列番号3の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3の最後の位置のAが、場合によりNによって置換されている。

10

20

30

40

50

【0056】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約5～約15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該結合タンパク質は、配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、5～15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約5～約15 nMの範囲のEC₅₀でT細胞上のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含み、配列

番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAが、場合によりNによって置換されている。

【0057】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、 10^{-6} M未満、又は 10^{-7} M未満、又は 5×10^{-8} M未満、又は 2×10^{-8} M未満、又は 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)で、PBS中のヒトCD3に結合する。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-6} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合する。別の実施形態では、当該ポリペプチドは、約 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、 5×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、更なる一実施形態では、当該結合は、 2×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合する。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合する。

10

【0058】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、 10^{-6} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1~4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1~4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。別の実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1~4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1~4の最後の位置のAは、場合によりN置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-7} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1~4のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、約 10^{-7} M又はそれ未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、

20

30

40

50

当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A が、場合により N によって置換されている。

【0059】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、約 5×10^{-8} M 又はそれ未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 又はそれ未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 93 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 98 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 5×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、約 5×10^{-8} M 又はそれ未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A が、場合により N によって置換されている。

【0060】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、約 2×10^{-8} M 又はそれ未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 3 又は 4 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 3 又は 4 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M 又はそれ未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 3 又は 4 と少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M 未満の解離定数 (K_D) で PBS 中のヒト CD3 に結合し、当該アンキリン反復ドメインは

、配列番号3又は4と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3又は4のいずれか1つと少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3又は4と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3又は4と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3又は4のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約 2×10^{-8} M又はそれ未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3又は4のアミノ酸配列を含み、配列番号3又は4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3又は4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。

10

【0061】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、約 10^{-8} M又はそれ未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。したがって、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M又はそれ未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも93%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一実施形態では、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該結合タンパク質は、約 10^{-8} M又はそれ未満の解離定数(K_D)でPBS中のヒトCD3に結合し、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されている。

20

30

40

【0062】

CD3に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質の解離定数(K_D)

50

の、表面プラズモン共鳴（SPR）分析による典型的かつ好ましい決定は、実施例 4 に説明されている。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質の CD 3 に対する当該結合特異性は、表面プラズモン共鳴（SPR）によって PBS 中で決定される。一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質の CD 3 に対する当該結合特異性は、実施例 4 に記載のように、表面プラズモン共鳴（SPR）によって PBS 中で決定される。

【0063】

一実施形態では、本発明は、CD 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、当該アンキリン反復ドメインが、65℃より高い、68℃より高い、70℃より高い、72℃より高い、75℃より高い、78℃より高い、80℃より高い、約75℃の、約80℃の、約82℃の、約85℃の、65℃～95℃の、70℃～90℃の、又は72℃～88℃の融解温度（ T_m ）を有する。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、65℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、65℃～95℃の融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、72℃～88℃の融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1～4 のいずれか 1 つと少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1～4 の最後から 2 番目の位置の A は、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1～4 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、68℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、72℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、78℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。更なる実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 1 と少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 1 の最後から 2 番目の位置の A が、場合により L によって置換されており、及び／又は配列番号 1 の最後の位置の A は、場合により N によって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、78℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃よりも高い融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃～95℃の融解温度（ T_m ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、約 85℃の融解温度（ T_m ）を有する。

【0064】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 と少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89

%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号2の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号2の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、72℃より高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、77℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃～92℃の融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、約82℃の融解温度 (T_m) を有する。

【0065】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号3の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、68℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、65℃～85℃の融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、約75℃の融解温度 (T_m) を有する。

【0066】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、73℃より高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、78℃よりも高い融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、73℃～93℃の融解温度 (T_m) を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、約83℃の融解温度 (T_m) を有する。

【0067】

円偏光二色性 (CD) 分光法による、CD3に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの融解温度 (T_m) の典型的かつ好ましい決定は、実施例2に記載されている。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの当該融解温度 (T_m) は、TBS pH 8.0 (50mM Tris、500mM NaCl) 中で円偏光二色性 (CD) 分光法によって決定される。一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの当該融解温度 (T_m) は、実施例2に記載されるように、TBS pH 8.0 (50mM Tris、500mM NaCl) 中で円偏光二色性 (CD) 分光法によって決定される。

【0068】

一実施形態では、本発明は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い、68℃より高い、70℃より高い、72℃より高い、75℃より高い、78℃より高い、80℃より高い、82℃より高い、85℃より高い、75℃～100℃の、70℃～9

10

20

30

40

50

5℃の、又は75℃～95℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。したがって、一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、65℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では当該アンキリン反復ドメインは、75℃～100℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では当該アンキリン反復ドメインは、70℃～95℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

【0069】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1～4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1～4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、68℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、72℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、78℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。別の実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃よりも高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

【0070】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号1と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号1の最後から2番目の位置のAが、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号1の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、85℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃～100℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

【0071】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号2と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号2の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号2の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、

当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃～95℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

【0072】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号3と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号3の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号3の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃～95℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

10

【0073】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、当該アンキリン反復ドメインは、配列番号4と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4の最後から2番目の位置のAは、場合によりLによって置換されており、及び／又は配列番号4の最後の位置のAは、場合によりNによって置換されており、当該アンキリン反復ドメインは、65℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、75℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、80℃より高い凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。一実施形態では、当該アンキリン反復ドメインは、70℃～95℃の凝集開始温度（ T_{agg} ）を有する。

20

30

【0074】

動的光散乱（DLS）分析による、CD3に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの凝集開始温度（ T_{agg} ）の典型的かつ好ましい決定は、実施例2に記載されている。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの当該凝集温度（ T_m ）は、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中で動的光散乱（DLS）分析によって決定される。一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質又はアンキリン反復ドメインの当該凝集開始温度（ T_{agg} ）は、実施例2に記載されるように、TBS pH8.0（50mM Tris、500mM NaCl）中で動的光散乱（DLS）分析によって決定される。

40

【0075】

本明細書中に開示される組換え結合タンパク質の反復ドメイン、好ましくはアンキリン反復ドメインは、好ましくは、N末端及び／又はC末端キャッピングモジュール（以降、キャッピング反復又はキャッピング単位とも称される）を含む。キャッピングモジュールはアンキリン反復ドメインのN末端及び／又はC末端に位置し、典型的には、アンキリン反復モジュールとの間に密な三次相互作用（すなわち、三次構造相互作用）を形成し、それによって、アンキリン反復ドメインの疎水性コアを溶媒への曝露から側方で遮蔽するキャップを提供する。N末端及び／又はC末端キャッピングモジュールは、キャッピング単

50

位、又は反復単位に隣接する天然に存在する反復タンパク質中に見出される他の構造単位に由来してもよい。キャッピング配列の例は、国際公開第2002/020565号及び同第2012/069655号、米国特許出願公開第20130296221、並びに *Interlandi et al.*, *J Mol Biol.* 2008 Jan 18; 375 (3): 837-54 に記載されている。N末端キャッピングモジュール（すなわち、N末端キャッピング反復）の例は、配列番号11～16であり、11～16であり、C末端キャッピングモジュール（すなわち、C末端キャッピング反復）の例は、配列番号17～26である。

【0076】

例示的な実施形態では、N末端キャッピングモジュールは、配列番号10～15のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号10～15のいずれか1つの最大9、最大8、最大7、最大6、最大5個、最大4、最大3、最大2、又は最大1個のアミノ酸は、場合により、任意のアミノ酸によって交換される。

10

【0077】

例示的な実施形態では、C末端キャッピングモジュールは、配列番号17～25のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号17～25のいずれか1つの最大9、最大8、最大7、最大6、最大5個、最大4、最大3、最大2、又は最大1個のアミノ酸は、場合により、任意のアミノ酸によって交換される。

【0078】

有利には、いくつかの実施形態では、本明細書の設計されたアンキリン反復ドメインのN末端キャッピングモジュール及び／又はC末端キャッピングモジュール中のある特定のアミノ酸残基を変化させることにより、設計されたアンキリン反復ドメインの、及び設計されたアンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質の終末相半減期の長期化を含む、薬物動態特性の改善が得られることが発見された。変化したアミノ酸残基は、ほとんど表面に露出した残基である。好ましくは、変更されたアミノ酸残基は、N末端キャッピングモジュールの8位及び15位におけるアミノ酸残基であり、8位におけるアミノ酸はQであり、15位におけるアミノ酸はLであり、位置番号は、配列番号10の位置、並びにC末端キャッピングモジュールの14位及び18位におけるアミノ酸残基に対応し、14位のアミノ酸はRであり、18位のアミノ酸はQであり、位置番号は配列番号17の位置に対応する。

20

30

【0079】

例えば、変化されたアミノ酸残基を有するN末端キャッピングモジュールは、以下の配列：DLGXLLQAAXXGQLDXVRXLXXXGADVNA（配列番号16）を含むことができ、式中、「x」は、任意のアミノ酸を示す。

【0080】

例えば、変化されたアミノ酸残基を有するC末端キャッピングモジュールは、以下の配列：x D x x G x T P A D x A A R x G H Q x I A x V L Q x A A（配列番号26）を含むことができ、式中、「x」は、任意のアミノ酸を示す。

【0081】

したがって、一実施形態では、本発明のCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を有するN末端キャッピングモジュールを含み、式中、「x」は、任意のアミノ酸を示す。代替的又は追加的に、本発明のCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を有するC末端キャッピングモジュールを含んでもよく、式中、「x」は、任意のアミノ酸を示す。

40

【0082】

特定の実施形態では、本発明のCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号、1～4のいずれか1つの8位におけるアミノ酸Eは、Qで置換されており、配列番号1～3のいずれか1つの15位におけるアミノ酸D

50

は、Lで置換されている。代替的又は追加的に、本発明のCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、配列番号1～4のいずれか1つの110位におけるアミノ酸Kは、Rで置換されており、配列番号1及び2の114位におけるアミノ酸E、又は配列番号4のアミノ酸Rは、Qで置換されている。

【0083】

更に、本発明のCD3結合ドメインは、場合により、そのN末端に「G」、「S」、又は「GS」配列を更に含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるCD3結合ドメインは、(i)配列番号1～4のいずれか1つと少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み、そして(ii)そのN末端でG、S、又はGSを更に含む。例示的な実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、そのN末端でG、S、又はGSを更に含む。例示的な実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、そのN末端でG、S、又はGSを更に含む。例示的な実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号1～4のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、そのN末端でG、S、又はGSを更に含む。

【0084】

一実施形態では、本発明の結合タンパク質は、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む。

【0085】

したがって、特定の一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様及び実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるようなCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む。好ましい一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該結合タンパク質内のCD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインのN末端に位置する。

【0086】

一実施形態では、当該疾患関連抗原は、腫瘍関連抗原(TAA)である。腫瘍関連抗原の例示的な例としては、腫瘍細胞の細胞表面上に発現されるタンパク質、例えば、HER2(本明細書ではTAA1としても称される)、CD123(本明細書ではTAA2としても称される)、CD33(本明細書ではTAA3としても称される)、及びCD70(本明細書ではTAA4としても称される)、又はペプチド-MHC複合体が挙げられるが、これらに限定されず、当該ペプチドは腫瘍細胞において発現されるタンパク質(例えば、NY-ESO-1又はMAGE-A3など)に由来し、該MHCはMHCクラスIである。別の実施形態では、当該疾患関連抗原は、感染関連抗原、好ましくはウイルス関連抗原(VAA)である。ウイルス関連抗原の例示的な例としては、ペプチド-MHC複合体が挙げられるが、これに限定されず、当該ペプチドは、はウイルス感染因子(例えば、HBcAg又はEBNA-1など)に由来し、当該MHCはMHCクラスIである。一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインに連結、コンジュゲート、融合、又は他の方法で物理的に付着している。一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインに共有結合している。一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、ペプチドリンカーを用いて、CD3に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインに共有結合している。一実施形態では、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、1～50個のアミノ酸、好ましくは6～38個のアミノ酸の長さを有する。一実施形態で

は、当該ペプチドリンカーは、高プロリントレオニンペプチドリンカーである。一実施形態では、当該ペプチドリンカーは、配列番号 31 及び 42～46 のいずれか 1 つの高プロリントレオニンペプチドリンカーである。一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、31 及び 42～46 のいずれか 1 つの高プロリントレオニンペプチドリンカーを用いて、CD3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインに共有結合している。好ましい一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインである。

【0087】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様又は実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるような CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、本明細書の態様又は実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるような疾患関連抗原に対して結合特異性を有する 2 つのアンキリン反復ドメインを更に含む。好ましい実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、当該結合タンパク質内の CD3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインの N 末端に位置する。

【0088】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質は、半減期延長部分を更に含む。

【0089】

したがって、特定の実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様及び実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるような CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、半減期延長部分を更に含む。一実施形態では、当該半減期延長部分は、当該結合タンパク質内の CD3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインの N 末端に位置する。

【0090】

一実施形態では、当該半減期延長部分は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する結合剤を含む。

【0091】

一実施形態では、当該半減期延長部分は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する設計アンキリン結合ドメインである。一実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該設計アンキリン結合ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様又は実施形態のいずれかでより具体的に記載されるような CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン結合ドメインを更に含む。一実施形態ヒトでは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと少なくとも 93% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態ヒトでは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つと少なくとも 98% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 28～30 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。し

10

20

30

40

50

たがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを更に含み、C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号 1 ～ 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 8 ～ 3 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、当該結合タンパク質内の C D 3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインの N 末端に位置する。

【0092】

好ましい実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該設計アンキリン結合ドメインは、配列番号 2 9 と少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 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。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様又は実施形態のいずれかでより具体的に記載されるような C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、配列番号 2 9 と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン結合ドメインを更に含む。一実施形態ヒトでは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 と少なくとも 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 と少なくとも 9 3 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 と少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態ヒトでは、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 と少なくとも 9 8 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、更なる実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む。したがって、一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを更に含み、C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインは、配列番号 1 ～ 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは、C D 3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインの N 末端に位置する。

【0093】

一実施形態では、C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを更に含む、本発明の組換え結合タンパク質は、C D 3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインを含むが、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは含まない対応する組換え結合タンパク質と比較して、増加した終末相半減期、好ましくは少なくとも 5 %、好ましくは 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、又は 2 5 0 % の増加した終末相半減期を示す。

【0094】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、本明細書の態様又は実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるような C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、本明細書の態様又は実施形態のいずれかにおいてより具体的に記載されるようなヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する 2 つのアンキリン反復

ドメインを更に含む。

【0095】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、ポリペプチドタグを更に含む。ポリペプチドタグは、ポリペプチド／タンパク質に結合されたアミノ酸配列であり、ここで、当該アミノ酸配列は、当該ポリペプチド／タンパク質の精製、検出、若しくは標的化に有用であり、又は、当該アミノ酸配列は、ポリペプチド／タンパク質の物理化学的挙動を改善し、又は、当該アミノ酸配列はエフェクター機能を有する。結合タンパク質の個々のポリペプチドタグは、結合タンパク質の他の部位に、直接又はペプチドリinkerを介して接続してもよい。ポリペプチドタグは技術分野で周知であり、当業者には十分に利用可能である。ポリペプチドタグの例は、小ポリペプチド配列、例えば、Hisタグ、HAタグ、mycタグ、FLAGタグ、若しくはStreptタグ、又は酵素（例えばアルカリホスファターゼ）等のポリペプチドであり、これらにより、当該ポリペプチド／タンパク質、又は標的化に使用できるポリペプチド（免疫グロブリン又はそれらのフラグメント等）及び／若しくはエフェクター分子として使用できるポリペプチドの検出が可能となる。

10

【0096】

一実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質は、ペプチドリinkerを更に含む。ペプチドリinkerは、例えば、2つのタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグとタンパク質ドメイン、タンパク質ドメインと非タンパク質化合物若しくはポリエチレングリコールなどのポリマー、又はタンパク質ドメインと生物学的活性分子、タンパク質ドメインとローカライザ、又は2つの配列タグを、結合させることができるアミノ酸配列である。ペプチドリinkerは、当業者に既知である。例の一覧は、特許出願公開第WO2002/020565号の明細書に提供されている。そのようなリンカーの具体例は、グリシン-セリン-リンカー及び可変長のプロリントレオニン-リンカーである。グリシン-セリン-リンカーの例は、アミノ酸配列GS及び配列番号41のアミノ酸配列であり、プロリントレオニン-リンカーの例は、配列番号31及び42～46のアミノ酸配列である。

20

【0097】

別の態様では、本発明は、本発明のアンキリン反復ドメイン又は組換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号1～4からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号3のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。更に、本発明は、本発明のいずれかの核酸を含むベクターに関する。核酸は、当業者に周知である。実施例において、核酸は、本発明の設計アンキリン反復ドメイン又は組換え結合タンパク質を、大腸菌で生産するために使用した。本発明の核酸の例は、配列番号37～40によって提供され、これは、それぞれ、配列番号1～4のアミノ酸配列をコードする。

30

【0098】

一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質及び／若しくは設計されたアンキリン反復ドメイン、及び／又は本発明の組換え結合タンパク質及び／若しくは設計されたアンキリン反復ドメインをコードする核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

40

【0099】

一実施形態では、本発明は、組換え結合タンパク質、又は本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸、並びに任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／若しくは希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【0100】

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

50

【0101】

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

【0102】

当業者に既知の、好適な担体、賦形剤又は安定剤としては、例えば、生理食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液、ハंकス液、固定油、オレイン酸エチル、5%デキストロス生理食塩水、等張性及び化学的安定性を高める物質、緩衝液並びに保存剤が挙げられる。他の好適な担体としては、それ自体が、組成物を投与される個体にとって有害な抗体の産生を誘発しない任意の担体、例えば、タンパク質、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸及びアミノ酸コポリマーが挙げられる。医薬組成物はまた、抗癌剤若しくは抗血管新生剤、又は更なる生物活性化合物等の、追加の有効成分を含む、合剤であってもよい。

【0103】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなくてはならない、又は、滅菌されていなくてはならない。これは、滅菌濾過膜で濾過することにより、容易に実施される。

【0104】

本発明の一実施形態は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、医薬組成物を製造するための血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを更に含む、本発明の組換え結合タンパク質の使用に関し、当該組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインを含むが、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインは含まない対応する組換え結合タンパク質と比較して、増加した終末相半減期、好ましくは少なくとも5%、好ましくは10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、又は250%の増加した終末相半減期を示す。本発明の一実施形態では、組換え結合タンパク質は、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、血清アルブミンに対して結合特異性を有する2つのアンキリン反復ドメインを更に含む。

【0105】

一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載のような少なくとも1つの組換え結合タンパク質、並びに非イオン性洗剤などの洗剤、リン酸塩緩衝液などの緩衝液、及びスクロースなどの糖を含む。一実施形態では、このような組成物は、上記のような組換え結合タンパク質及びPBSを含む。

【0106】

別の態様では、本発明は、哺乳動物における腫瘍細胞又は組織中のCD3 媒介T細胞活性化の方法であって、当該哺乳動物に、CD3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含み、ローカライザ分子を更に含む、本発明の組換え結合タンパク質を投与するステップを含む、方法を提供する。一実施形態では、当該ローカライザ分子は、CD3 とは異なる標的、好ましくはTAA 又はVAA に対して結合特異性を有する結合タンパク質である。一実施形態では、当該哺乳動物はヒトであり、当該TAA 発現細胞又は組織は、原発性腫瘍、転移及び／又は腫瘍間質を含む腫瘍内に位置する。

【0107】

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

【0108】

別の態様では、本発明は、ヒトを含む哺乳動物におけるT細胞の感染局所的活性化の方法であって、当該哺乳動物に、本発明の結合タンパク質、本発明の核酸又は本発明の医薬

組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0109】

別の態様では、本発明は、医学的状態を治療するための方法であって、医学的状態を治療することを必要とする患者に、治療有効量の、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む本発明の組換え結合タンパク質、当該結合タンパク質をコードする核酸、又は当該結合タンパク質を含む医薬組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。別の態様では、本発明は、医学的状態を治療する方法であって、医学的状態の治療を必要とする患者に、治療有効量の、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する結合剤を更に含む本発明の組換え結合タンパク質を投与するステップを含み、当該結合剤は、当該結合タンパク質を標的腫瘍組織又は感染組織に局在化させるのに有効であり、当該結合タンパク質の当該局在化は、標的腫瘍又は感染組織中のT細胞活性化をもたらす、方法を提供する。一実施形態では、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は結合タンパク質であり、好ましくは、TAA又はVAAに対して結合特異性を有するアンキリン反復結合タンパク質である。

10

【0110】

一実施形態では、本発明は、疾患の治療において使用するための、本発明による医薬組成物、組換え結合タンパク質、又は核酸に関する。その目的のため、本発明による医薬組成物、核酸又は組換え結合タンパク質は、これらを必要とする患者に、治療有効量で投与される。投与としては、局所投与、経口投与、及び非経口投与を挙げることができる。典型的な投与経路は非経口投与である。親的 (parental) 投与において、本発明の医薬組成物は、上で定義したような薬学的に許容される賦形剤と共に、溶液、懸濁液、又はエマルジョンなどの単位用量の注射可能な形態で処方される。用量及び投与方法は、治療される個体及び特定の疾患によって異なる。

20

【0111】

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

【0112】

一実施形態では、当該組換え結合タンパク質又は本明細書に記載のこのような他の医薬組成物は、静脈内投与される。非経口用途のため、組換え結合タンパク質又は当該医薬組成物は、ボラス注入として又は緩徐な点滴注入により、治療有効量で注入することができる。

30

【0113】

一実施形態では、本発明は、医学的状態の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に、治療有効量の本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物を投与するステップを含む、方法に関する。一実施形態では、本発明は、疾患の治療のための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一実施形態では、本発明は疾患の治療において使用するための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物に関する。一実施形態では、本発明は、医学的状態の治療において使用するための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物に関する。一実施形態では、本発明は、疾患の治療のための医薬品としての、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一実施形態では、本発明は、医薬品の製造のための、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸、又は本発明の医薬組成物の、使用に関する。一実施形態では、本発明は、疾患の治療のための医薬品の製造するためのプロセスであって、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸分子、又は本発明の医薬組成物が、医薬品の有効成分である、プロセスに関する。一実施形態において、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質、本発明の核酸又は本発明の医薬組成物を使用する、疾患の治療方法に関する。

40

50

【0114】

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

【0115】

一実施形態では、当該医学的状態は、癌である。別の実施形態では、当該医学的状態は、感染症、好ましくはウイルス感染症である。

10

【0116】

特定の一実施形態では、医学的状態は癌であり、癌又は腫瘍組織は、腫瘍関連抗原を発現又は提示する細胞を含み、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該細胞において発現又は提示される当該腫瘍関連抗原に結合する。特定の一実施形態では、当該疾患関連抗原は、当該癌又は腫瘍組織において発現又は過剰発現される細胞表面タンパク質の細胞外ドメインである。別の特定の実施形態では、腫瘍関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、ペプチド-MHC複合体に結合し、当該ペプチドは、腫瘍細胞において発現されるタンパク質（例えば、NY-ESO-1又はMAGE-A3など）に由来する。特定の一実施形態では、当該MHCはMHCクラスIである。一実施形態では、当該癌は、腺癌及び扁平上皮癌から選択される。一実施形態では、当該癌は、骨肉腫又は骨原性肉腫（骨）、軟骨肉腫（軟骨）、平滑筋肉腫（平滑筋）、横紋筋肉腫（骨格筋）、中皮肉腫又は中皮腫（体腔の内膜）、線維肉腫（線維組織）、血管肉腫又は血管内皮腫（血管）、脂肪肉腫（脂肪組織）、神経膠腫又は星状細胞腫（脳に見られる神経原性結合組織）、粘液肉腫（原始胎児性結合組織）、及び間葉性又は混合中胚葉腫瘍（混合結合組織型）から選択される。一実施形態では、当該癌は、骨髄性又は顆粒球性白血病（骨髄性及び顆粒球性白血球系列の悪性腫瘍）、リンパ性、リンパ球性、又はリンパ芽球性白血病（リンパ性及びリンパ球性血液細胞系列の悪性腫瘍）、及び真性赤血球増加症又は赤血症（様々な血液細胞産物の悪性腫瘍であるが、赤血球が優勢である）から選択される。一実施形態では、当該癌は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫から選択される。一実施形態では、当該癌は、腺扁平上皮癌、混合型中胚葉腫瘍、癌肉腫及び奇形癌から選択される。一実施形態では、当該癌は、結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肺癌、浸潤性膀胱癌、膵癌、脳頭頸部扁平上皮細胞癌の転移性癌、食道扁平上皮細胞癌、肺扁平上皮細胞癌、皮膚扁平上皮細胞癌、メラノーマ、乳腺癌、肺腺癌、子宮頸部扁平上皮細胞癌、膵臓扁平上皮細胞癌、結腸扁平上皮細胞癌、若しくは胃扁平上皮細胞癌、前立腺癌、骨肉腫、又は軟部組織肉腫及び良性腫瘍から選択される。一実施形態では、そのような癌は、肺癌、結腸直腸癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、及び乳癌、並びに骨及び軟部組織肉腫を含む、上皮悪性腫瘍（原発性及び転移性）から選択される。

20

30

【0117】

別の特定の一実施形態では、医学的状態は感染症、好ましくはウイルス感染症であり、感染組織は、感染関連抗原、好ましくはウイルス関連抗原を発現又は提示する細胞を含み、疾患関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、当該細胞において発現又は提示される当該感染関連抗原に結合する。特定の一実施形態では、当該疾患関連抗原は、当該感染組織において発現又は過剰発現されるウィルスタンパク質の細胞外ドメインである。別の特定の実施形態では、ウイルス関連抗原に対して結合特異性を有する当該結合剤は、ペプチド-MHC複合体に結合し、当該ペプチドは、細菌感染因子又はウイルス感染因子などの感染因子、好ましくはウイルス感染因子（例えば、HBcAg又はEBNA-1など）のタンパク質に由来する。特定の一実施形態では、当該MHCはMHCクラスIである。一実施形態では、当該感染症は、B型肝炎ウイルス（HBV）によって引き起こされるウイルス感染、エプスタイン・バーウイルス（EBV）によって引き起こされるウイ

40

50

ルス感染、H I V 感染、西ナイルウイルス感染症、A 型、B 型、C 型肝炎、天然痘、結核、水疱性口内炎ウイルス（V S V）感染症、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）感染症、ヒトパピローマウイルス（H P V）感染症、S A R S、インフルエンザ、エボラ出血熱、ウイルス性髄膜炎、ヘルペス、炭疽菌、ライム病、及び大腸菌感染症から選択される。一実施形態では、本発明は、上述のアンキリン反復ドメインのいずれかを含む組換え結合タンパク質に関する。

【0118】

一実施形態では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質を含む、キットに関する。一実施形態では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸を含む、キットに関する。一実施形態では、本発明は、本発明の医薬組成物を含む、キットに関する。一実施形態では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質、及び／又は本発明の核酸、及び／又は本発明の医薬組成物を含む、キットに関する。一実施形態では、本発明は、本発明の C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号 1～4 を含む組換え結合タンパク質、及び／又は C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号 1～4 を含む組換え結合タンパク質をコードする核酸、及び／又は C D 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメイン、例えば、配列番号 1～4 を含む組換え結合タンパク質を含む医薬組成物を含む、キットに関する。

【0119】

一実施形態では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質を産生するための方法に関する。一実施形態では、本発明は、組換え結合タンパク質、例えば、配列番号 1～4 のアミノ酸配列を含む組換え結合タンパク質を産生するための方法であって、（i）当該組換え結合タンパク質を好適な宿主細胞（例えば、細菌中）で発現させるステップと、（ii）当該組換え結合タンパク質を精製する（例えば、クロマトグラフィーを使用して）ステップと、を含む、方法に関する。当該方法は追加のステップを含んでもよい。本発明の組換え結合タンパク質のこのような産生方法は、実施例 1 に記載される。

【0120】

本発明は、実施例に記載の特定の実施形態に制限されない。

【0121】

本明細書は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、添付の配列表に開示されている多くのアミノ酸配列、核酸配列、及び配列番号を参照する。

【0122】

定義

本明細書で別段定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。

【0123】

本発明の文脈において、用語「タンパク質」とは、ポリペプチドを含む分子を指し、ポリペプチドの少なくとも一部は、単一のポリペプチド鎖内及び／又は複数のポリペプチド鎖間において二次、三次、又は四次構造を形成することによって、定義された三次元配列を有する、又は獲得することができる。タンパク質が 2 つ以上のポリペプチド鎖を含む場合、個々のポリペプチド鎖は、非共有結合又は共有結合により、例えば、2 つのポリペプチド間のジスルフィド結合により、結合され得る。二次及び／又は三次構造を形成することによって定義された三次元配列を個別に有する、又は獲得することができるタンパク質の一部は、「タンパク質ドメイン」と呼ばれる。そのようなタンパク質ドメインは、当業者に周知である。

【0124】

組換えタンパク質及び組換えポリペプチドなどで使用される用語「組換え」とは、当該タンパク質又はポリペプチドが、当業者に周知の組換え D N A 技術の使用によって産生されることを意味する。例えば、ポリペプチドをコードする組換え D N A 分子（例えば遺伝子合成によって生産される）を細菌発現プラスミド（例えば p Q E 3 0、Q I A g e n）、酵母発現プラスミド、哺乳動物発現プラスミド、若しくは植物発現プラスミド、又は i

*in vitro*発現を可能にするDNAにクローニングすることができる。例えば、そのような組換え細菌発現プラスミドを適切な細菌（例えば、大腸菌）に挿入すると、これらの細菌は、この組換えDNAによってコードされたポリペプチドを生産することができる。それに応じて生産されたポリペプチド又はタンパク質は、組換えポリペプチド又は組換えタンパク質と呼ばれる。

【0125】

本発明の文脈において、用語「結合タンパク質」は、結合ドメインを含むタンパク質を指す。結合タンパク質はまた、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上の結合ドメインを含んでもよい。好ましくは、この結合タンパク質は、組換え結合タンパク質である。本発明の結合タンパク質は、CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む。

10

【0126】

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

【0127】

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

20

【0128】

用語「標的」は、核酸分子、ポリペプチド若しくはタンパク質、炭水化物、又は任意の他の天然に存在する分子などの個々の分子を指し、そのような個々の分子の任意の一部を含むか、又はそのような分子の2つ以上の複合体、又は細胞全体若しくは組織試料、又は任意の非天然化合物を指す。好ましくは、標的は天然に存在する、若しくは、非天然のポリペプチド若しくはタンパク質、又は、例えば、天然に存在する若しくは非天然のリン酸化、アセチル化、若しくはメチル化によって修飾された、化学修飾を含むポリペプチド若しくはタンパク質である。本発明の文脈において、T細胞は、CD30特異的結合タンパク質及びローカライザ標的タンパク質の標的であり、細胞及び組織は、ローカライザの標的である。

30

【0129】

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

【0130】

特許出願第2002/020565号及びForrerら、2003（Forrer, P., Stumpp, M. T., Binz, H. K., Pluckthun, A., 2003. FEBS Letters 539, 2~6）には、反復タンパク質の特徴及び反復ドメインの特徴、技術、及び用途の一般的な説明が含まれる。用語「反復タンパク質」とは、1つ以上の反復ドメインドメインを含むタンパク質を指す。好ましくは、反復タンパク質は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つの反復ドメインを含む。更に、当該反復タンパク質は、追加の非反復タンパク質ドメイン、ポリペプチドタグ、及び／又はペプチドリンカーを含んでもよい。反復ドメインは、結合ドメインであり得る。

40

【0131】

用語「反復ドメイン」は、構造単位として2つ以上の連続する反復モジュールを含むタンパク質ドメインを指し、この反復モジュールは、構造相同性及び配列相同性を有する。好ましくは、反復ドメインは、N末端及び／又はC末端キャッピングモジュールを更に含

50

む。明確にするために、キャッピングモジュールは、反復モジュールであり得る。そのような反復ドメイン、反復モジュール、及びキャッピングモジュール、配列モチーフ、並びに構造的相同性及び配列相同性は、アンキリン反復ドメイン（国際公開第2002/020565号）、ロイシンリッチ反復ドメイン（国際公開第2002/020565号）、テトラトリコペプチド反復ドメイン（Main, E. R., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L., Regan, L., Structure 11 (5), 497~508, 2003）、及びアルマジロ反復ドメイン（国際公開第2009/040338号）の実施例から、当業者に周知である。そのような反復ドメインが反復されるアミノ酸配列を含むタンパク質とは異なることは、当業者には更に周知であり、反復されるアミノ酸配列は全て、個々のドメイン（例えば、フィブロネクチンのFN3ドメイン）を形成することができる。

10

【0132】

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

【0133】

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

【0134】

用語「フレームワーク残基」は、反復モジュールのアミノ酸残基を指し、これは、折り畳みトポロジーに寄与する、すなわち、反復モジュールの折り畳みに寄与するか、又は隣接モジュールとの相互作用に寄与する。そのような寄与は、反復モジュール内の他の残基との相互作用、又は α -ヘリックス若しくは β -シートに見られるポリペプチド骨格立体構造への影響、又は直鎖ポリペプチド若しくはループを形成するアミノ酸ストレッチへの関与であってもよい。

20

【0135】

そのようなフレームワーク及び標的相互作用残基は、X線結晶解析、NMR及び／若しくはCD分光法などの物理化学法によって得られる構造データの分析によって、又は構造生物学及び／若しくはバイオインフォマティクスにおいて当業者に周知の既知の関連する構造情報と比較することによって同定され得る。

30

【0136】

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

【0137】

したがって、用語「アンキリン反復モジュール」は、元々天然に存在するアンキリンリピートタンパク質の反復単位に由来する反復モジュールを指す。アンキリンリピートタンパク質は、当業者に周知である。

40

【0138】

反復モジュールは、標的特異的反復ドメインを選択する目的で、ライブラリ内でランダム化されていないアミノ酸残基を有する位置（「非ランダム化位置」）及び標的特異的反復ドメインを選択する目的で、ライブラリ内でランダム化されたアミノ酸残基を有する位置（「ランダム化位置」）を含み得る。非ランダム化された位置は、フレームワーク残基を含む。ランダム化された位置は、標的相互作用残基を含む。「ランダム化された」とは、例えば、反復モジュールのアミノ酸位置で2つ以上のアミノ酸が許可され、通常の20

50

個の天然に存在するアミノ酸のいずれかが許可された、若しくはシステイン以外のアミノ酸、又はグリシン、システイン、及びプロリン以外のアミノ酸などの、20個の天然に存在するアミノ酸のほとんどが許可されたことを意味する。これらの位置は、概して、本明細書に開示される配列番号5～9のモジュール配列の変異体において置換されない。

【0139】

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

10

【0140】

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

【0141】

用語「標的に対して結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」、「高い特異性で標的に結合する」、「標的に対して特異的な」又は「標的特異性」などは、結合タンパク質又は結合ドメインが、大腸菌マルトース結合タンパク質(MBP)などの非関連タンパク質に結合するよりも、PBS中で、標的に、より低い解離定数で結合する(すなわち、より高い親和性で結合する)ことを意味する。好ましくは、標的に対するPBS中での解離定数(K_D)は、MBPに対する対応する解離定数よりも、少なくとも 10^2 倍、より好ましくは少なくとも 10^3 倍、より好ましくは少なくとも 10^4 倍、又はより好ましくは少なくとも 10^5 倍低い。タンパク質-タンパク質間の相互作用の解離定数を測定するための方法、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)に基づく技術(例えば、SPR平衡解析)又は等温滴定熱量測定(ITC)は、当業者に周知である。特定のタンパク質-タンパク質相互作用の K_D の測定値は、異なる条件下(例えば、塩濃度、pH)で測定された場合、変動し得る。したがって、 K_D 値の測定は、好ましくは、タンパク質の標準化溶液及びPBS等の標準化緩衝液を使用して実施される。CD3に対して結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質の解離定数(K_D)の、表面プラズモン共鳴(SPR)分析による典型的かつ好ましい決定は、実施例4に説明されている。

20

30

【0142】

「結合剤」という用語は、標的分子に特異的に結合することができる任意の分子を指す。用語「結合剤」は、例えば、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、ペプチド(例えば、Williams et al., J Biol Chem 266:5182-5190 (1991))、抗体模擬体、反復タンパク質、例えば、設計アニクリン反復タンパク質、受容体タンパク質、及び標的分子のいずれかの他の天然に存在する相互作用パートナーを含み、天然タンパク質と、例えば、非天然残基を含むように、及び／又は天然残基を欠いているように修飾され若しくは遺伝子操作されたタンパク質とを含むことができる。

40

【0143】

用語「約」は、言及した値の $\pm 20\%$ を意味し、例えば、「約50」は、40～60を意味するものとする。

【0144】

用語「PBS」は、137mM NaCl、10mMリン酸塩及び2.7mM KClを含み、pHが7.4であるリン酸緩衝水溶液を意味する。

50

【0145】

用語「マウス血清アルブミン」は、UniProt受託番号P07724を指し、用語「カニクイザル血清アルブミン」（すなわちカニクイザル（*macaca fascicularis*））は、UniProt受託番号A2V9Z4を指し、用語「ヒト血清アルブミン」はUniProt受託番号P02768を指す。

【0146】

好ましくは、クリアランス、及び／又は曝露、及び／又は終末相半減期は、哺乳動物、より好ましくはマウス及び／又はカニクイザル、より好ましくはカニクイザルで評価する。クリアランス、及び／又は曝露、及び／又は終末相半減期は、実施例3に記載されるように評価され得る。好ましくは、クリアランス、及び／又は曝露、及び／又は終末相半減期をマウスで測定する場合、評価は、注入後最大48時間までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、マウスにおける終末相半減期の評価は、24時間～48時間で計算される。好ましくは、クリアランス、及び／又は曝露、及び／又は終末相半減期をカニクイザルで測定する場合、評価は、注射後最大7日目までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、カニクイザルにおける終末相半減期の評価は、1日目～5日目で計算する。当業者は、標的媒介クリアランスなどの効果を更に特定し、終末相半減期を計算する場合、それらを考慮することができる。本発明の組換え結合タンパク質などの薬物の用語「終末相半減期」とは、偽平衡に達した後、哺乳動物に適用した薬物の血漿中濃度の半分に達するのに必要な時間を指す（例えば、マウスでは24時間～48時間で計算し、又はカニクイザルでは1日目～5日目で計算する）。終末相半減期は、哺乳動物に投与された薬物の用量の半分の排泄するのに必要な時間とは定義されない。終末相半減期という用語は、当業者に周知である。好ましくは、薬物動態の比較は、任意の用量、より好ましくは同等の用量（すなわち、同一のmg/kg用量）又は等モル用量（すなわち、同一のmol/kg用量）、より好ましくは等モル投与量（すなわち、同一のmol/kg用量）、で行う。動物での同等及び／又は等モルの投与は、少なくとも20%、より好ましくは30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%の実験的な投与量のばらつきを伴うことが、当業者には理解される。好ましくは、薬物動態の測定に用いられる投与量は、0.001～1000mg/kg、より好ましくは0.01～100mg/kg、より好ましくは0.1～50mg/kg、より好ましくは0.5～10mg/kgから選択される。

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

用語「T細胞の腫瘍限局性活性化」は、非腫瘍組織と比較して、T細胞が腫瘍組織にお

いて優先的に活性化されることを意味する。

【0150】

用語「T細胞の感染症限局性活性化」は、非感染組織と比較して、T細胞が感染組織において優先的に活性化されることを意味する。

【0151】

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

【0152】

「医学的状态」（又は障害又は疾患）という用語には、自己免疫障害、炎症性障害、網膜症（特に増殖性網膜症）、神経変性障害、感染症、代謝性疾患、及び腫瘍性疾患が含まれる。本明細書に記載の組換え結合タンパク質のいずれかを、そのような障害、特に、自己免疫障害、炎症性障害、網膜症、及び腫瘍性疾患を含む群から選択される障害の治療のための医薬の調製に使用することができる。「医学的状态」は、不適切な細胞増殖を特徴とするものである場合がある。医学的状态は、過剰増殖状態である場合がある。本発明は、特に、医学的状态の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に、本発明の組換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む、治療方法に関する。好ましい実施形態では、当該医学的状态は、腫瘍性疾患である。用語「腫瘍性疾患」は、本明細書で使用する場合、急速に増殖する細胞増殖又は腫瘍を特徴とする、細胞又は組織の異常な状態（state or condition）を指す。一実施形態では、当該医学的状态は、悪性腫瘍性疾患である。一実施形態では、当該医学的状态は、癌である。用語「治療有効量」は、患者において所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。

【0153】

用語「抗体」は、インタクトな抗体分子だけでなく、免疫原結合能力を保持する抗体分子の任意のフラグメント及び変異体も意味する。そのようなフラグメント及び変異体もまた、当技術分野において周知であり、*in vitro*及び*in vivo*の両方で常時使用されている。したがって、用語「抗体」は、インタクトな免疫グロブリン分子、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、及び単鎖V領域フラグメント（scFv）、二重特異性抗体、キメラ抗体、抗体融合ポリペプチド、及び非従来型抗体を包含する。

【0154】

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

【0155】

用語「感染症」及び「感染」は、特に病理学的症状を引き起こす、体組織における微生物の浸潤及び増殖を指すか又は説明するために、本明細書で使用される。感染症の例とし

10

20

30

40

50

てはとりわけ、例えば、H I V 感染症、ウェストナイル熱ウイルス感染症、A 型、B 型、及び C 型肝炎、痘瘡、結核、水疱性口内炎ウイルス (V S V) 感染症、呼吸器合胞体ウイルス (R S V) 感染症、ヒトパピローマウイルス (H P V) 感染症、S A R S、インフルエンザ、エボラウイルス病、ウイルス性髄膜炎、疱疹、炭疽、ライム病、及び大腸菌 (E . C o l l i) 感染症などのウイルス性疾患及び細菌性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0156】

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

【0157】

材料

化学物質は S i g m a - A l d r i c h (U S A) より購入した。オリゴヌクレオチドは M i c r o s y n t h (S w i t z e r l a n d) より購入した。特に明記しない限り、DNA ポリメラーゼ、制限酵素、及び緩衝液は、N e w E n g l a n d B i o l a b s (U S A) 又は F e r m e n t a s / T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c (U S A) より購入した。誘導性大腸菌発現株は、例えば、大腸菌の X L 1 - b l u e (S t r a t a g e n e, U S A) 又は B L 2 1 (N o v a g e n, U S A) などのクローニング及びタンパク質生産に使用した。

【0158】

分子生物学

特に明記しない限り、方法は、既知のプロトコルに従って実施される（例えば、S a m b r o o k J ., F r i t s c h E . F ., 及び M a n i a t i s T ., 「M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l」, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y (1989年)、New York 参照）。

【0159】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー

設計されたアンキリンリピートタンパク質ライブラリーを生成する方法は、例えば、米国特許第 7, 417, 130 号; B i n z e t a l . 2003 年、上記引用; B i n z ら、(2004 年)、上記引用に記載されている。このような方法により、ランダム化アンキリン反復モジュール及び／又はランダム化キャッピングモジュールを有する、設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーを構築することができる。例えば、そのようなライブラリーはしたがって、固定化 N 末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号 5、6、若しくは 7 の N 末端キャッピングモジュール）、10、11、12、13、14 若しくは 15) の N 末端キャッピングモジュール) 又は配列番号 16 によるランダム化 N 末端キャッピングモジュール、及び固定化 C 末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号 17、18、19、20、21、22、23、24 若しくは 25 の C 末端キャッピングモジュール) 又は配列番号 26 によるランダム化 C 末端キャッピングモジュールに基づいて組み立てられ得る。好ましくは、そのようなライブラリーは、反復又はキャッピングモジュールのランダム化された位置にアミノ酸 C、G、M、N (G 残基の前) 及び P のいずれも有さないように組み立てられる。

【0160】

更に、そのようなライブラリー内のそのようなランダム化されたモジュールは、ランダム化されたアミノ酸位置を有する追加のポリペプチド挿入を含んでもよい。そのようなポリペプチド挿入の例は、抗体又はデノボ生成ペプチドライブラリーの補体決定領域 (C D R) ループライブラリーである。例えば、そのようなループ挿入は、ガイドンスとして、ヒトリボヌクレアーゼ L の N 末端アンキリン反復ドメインの構造を用いて設計することができた (T a n a k a, N ., N a k a n i s h i, M, K u s a k a b e, Y, G o t o, Y ., K i t a d e, Y, N a k a m u r a, K . T ., E M B O J

10

20

30

40

50

．． 23 (30), 3929-3938, 2004)。2つのアンキリン反復の境界近くに存在するβターンに10個のアミノ酸が挿入される、このアンキリン反復ドメインと同様に、アンキリン反復タンパク質ライブラリーは、アンキリン反復ドメインの1つ以上のβターンに挿入された可変長（例えば、1～20個のアミノ酸）のランダム化ループ（固定化及びランダム化位置を有する）を含有してもよい。

【0161】

アンキリン反復タンパク質ライブラリーのいずれかのそのようなN末端キャッピングモジュールは、好ましくは、RI L L A Aモチーフ、RI L L K Aモチーフ、又はRE L L K Aモチーフを有し（例えば、配列番号29の位置21～26に存在）、アンキリン反復タンパク質ライブラリーのいずれかのそのようなC末端キャッピングモジュールは、好ましくは、K L Nモチーフ、K L Aモチーフ、又はK A Aモチーフを有する（例えば、配列番号1における最後の3個のアミノ酸に存在）。配列番号10、11、12、13、14、又は15は、RI L L A A、RI L L K A又はRE L L K Aモチーフを含むN末端キャッピングモジュールの例を提供し、配列番号17、18、19、20、21、22、23、24、若しくは25は、K L N、K L A又はK A Aモチーフを含むC末端キャッピングモジュールの例を提供する。

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

反復単位及びモジュール内の位置を定義するために使用される命名法は、Binzら（2004年）の上記引用に基づき、アンキリン反復モジュールとアンキリン反復単位との境界が、1アミノ酸位置シフトするという修飾を伴う。例えば、Binzら（2004年）の上記引用のアンキリン反復モジュールの位置1は、本開示のアンキリン反復モジュールの位置2に対応し、結果として、Binzら（2004年）の上記引用のアンキリン反復モジュールの位置33は、本開示の以下のアンキリン反復モジュールの位置1に相当する。

【0165】

全てのDNA配列は配列決定によって確認され、選択されたタンパク質の計算された分子量は質量分析によって確認された。

【0166】

実施例1：CD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む結合タンパク質の選択

リボソームディスプレイ（Hanes, J. 及び Pluckthun, A., 「PNAS」第94巻第4937～42頁（1997年））を用いて、ヒトscCD3に対して結合特異性を有する多くのアンキリン反復タンパク質を、Binzら（2004年）の上記引用による記載と同様のDARPin（登録商標）ライブラリーから選択した。選択されたクローンの組換えヒトCD3標的への結合は、粗抽出物のホモジニアス時間分解蛍光測定（Homogeneous Time Resolved Fluorescence: HTRF）によって評価され、数百のヒトscCD3特異的結合タンパク質がうまく選択されたことを示した。例えば

10

20

30

40

50

、配列番号1のアンキリン反復ドメインは、s c C D 3に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む、選択された結合タンパク質のアミノ酸配列を構成する。s c C D 3に対して結合特異性を有するそのようなアンキリン反復ドメインからの個々のアンキリン反復モジュール、例えば、配列番号5～9におけるものが提供される。

【0167】

ヒト組換えC D 3 標的調製物

選択された標的フォーマットは、26アミノ酸リンカー（s c C D 3 ε γ）及び部位指向的ビオチン化のためのC末端A v i タグによって連結されたヒトC D 3 ε 及びC D 3 γヘテロ二量体からなる単鎖フォーマットに基づく。標的タンパク質は、C D 3細胞外ドメインのみを含み、C末端システイン「ノブ」並びに膜貫通領域及び細胞質領域全体を欠く。

10

【0168】

ヒトs c C D 3 ε γの細胞外ドメイン（配列番号32__s c C D 3 ε γ__A v i -B i o）を、大腸菌において以前に記載された（K j e r -N i e l s e n e t a l . , P N A S , 2004, 101(20):7675-7680）のと同様の一本鎖フォーマットで発現させ、続いて封入体からリフォールディングさせ、分取サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）によって精製した。材料を10mMのT r i s -H C l、50mMのN a C l、p H 8.0中で3.4mg/mlに濃縮し、組換えB i r Aを使用してインビトロでビオチン化した。機能的標的材料を単離するために、O K T 3充填カラム（G E H i T r a p N H S 活性化H P カラム）を用いて材料を再精製した。最終材料はサイズ排除で単量体であり、10mMのT r i s、100mMのN a C l、p H 8.0、10%のグリセロール中0.39mg/mlの最終濃度で保存した。

20

【0169】

組換えヒトs c C D 3 標的調製プロセスの概要は、D u n s t o n e e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a 2004に記載されている。

【0170】

リボソームディスプレイによるC D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の選択

C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の選択は、ヒトC D 3の細胞外ドメインの一部（配列番号32）を、標的タンパク質として、上記のアンキリン反復タンパク質のライブラリー、及び確立されたプロトコルとして用いる、リボソームディスプレイ（H a n e s 及びP l u c k t h u n（上記引用））によって実施した（例えば、Z a h n d , C . , A m s t u t z , P . , 及びP l u c k t h u n , A . , N a t . M e t h o d s 4, 69-79, 2007参照）。各選択ラウンド後の逆転写（R T）-P C Rサイクルの数は、結合剤の富化のために、収率に合わせて調整する45から28に一定に減少させた。最初の4ラウンドの選択は、標準的なリボソームディスプレイ選択を採用し、標的濃度を減少させ（それぞれ、400nM、133nM、45nM及び15nM）、洗浄ストリンジェンシーを増加させて、ラウンド1からラウンド4まで選択圧力を増加させる（B i n z e t a l . 2004、上記引用）。ラウンド2～4において、m R N Aを、過剰のC D 3結合抗体O K T 3を使用する競合溶出によって回収した（各ラウンドにおいて、競合物過剰は、35倍から300倍まで一定に増加した）。

30

40

【0171】

選択されたクローンは、二価フォーマットでT細胞を活性化する。

C D 3 標的に結合する個々のアンキリン反復タンパク質クローンを、リボソームディスプレイによって選択し、発現ベクターのp Q E 30（Q i a g e n）の誘導体にクローン化し、大腸菌X L 1 -B l u e（S t r a t a g e n e）に形質転換し、L B寒天（1%のグルコース及び50μg/mlのアンピシリンを含む）上にプレーティングし、次いで、37℃で一晩インキュベートした。発現ベクター、H i s タグとM y c タグの両方とC D 3 特異的なアンキリン反復ドメインを備えたJ u nロイシンジッパー構築物を、二価フォーマット（C D 3 特異的結合ドメインに関して）でのスクリーニングに使用し、T細胞の架橋による機能性の試験を可能にした。単一のコロニーを、160μLの増殖培地（1

50

%グルコース及びアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有するTB)を含有する96ウェルプレート(単一ウェル内の各クローン)中に拾い上げ、 37°C で一晩インキュベートし、 800rpm で振盪した。アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する $150\mu\text{L}$ の新鮮なTB培地に、新しい96ウェルプレート中 $8.5\mu\text{L}$ の一晩培養物を播種した。 37°C 及び 850rpm で120分間インキュベートした後、発現をIPTG(最終濃度 0.5mM)で誘導し、4時間続けた。細胞を収集し、ペレットを -20°C で一晩凍結した後、 $8.5\mu\text{L}$ のB-PER II(Thermo Scientific)中に再懸濁し、振盪(600rpm)しながら室温で1時間インキュベートした。次いで、 $160\mu\text{L}$ のPBSを添加し、細胞片を遠心分離によって除去し(3220g で15分間)、更なる使用のために -20°C で保存した。

10

【0172】

第1のステップでは、BK112 CD8+モノクローナルT細胞を用いてT細胞活性化スクリーニングを行った。各溶解クローンの抽出物を、PBSSB(12%(w/v)FBSを補充したPBS pH7.4)中の1:20希釈物(最終濃度)として、抗ペンタHis抗体(Qiagen)コーティング96ウェルプレートに適用し、 4°C で一晩インキュベートした。プレートをPBSで5回洗浄した後、ウェル当たり $100\mu\text{L}$ の100'000 BK112 T細胞を添加し、T細胞アッセイ培地RPMI-1640+10%のFBS+1%のL-グルタミン+1%のPen Strep+200IU IL2中で培養した。 $0.1\mu\text{g}$ の $100\mu\text{L}$ のGolgi Stopを添加し、プレートを室温で3分間、 20g で遠心分離した後、 CO_2 -インキュベーター内で、 37°C で4~5時間インキュベートした。細胞を 4°C で5分間、 350g で遠心分離し、デカントした。細胞を表面CD8発現について染色した後、BD Cytomixを用いて細胞を保存し、 4°C で一晩インキュベートした。細胞を $1\times\text{PBS}+2\%$ のFBSで洗浄し、Cell perm(BD)中の $50\mu\text{L}$ のIFN γ -APC抗体を添加し、 4°C で30分間インキュベートすることによって、細胞内IFN γ について染色した。細胞を再びPBSで洗浄し、BDからのCytometer FACS Canto IIを用いて分析した。

20

【0173】

選択されたクローンは、CD3への結合(HTRF及びOKT3競合によって示される)及び二重特異性フォーマットにおける機能性を示す。

T細胞エンゲージャ(TCE)構築物を作製するために、同定された機能的な設計アンキリン反復ドメインヒットを、N末端Hisタグ、腫瘍関連抗原1(TAA1)特異的アンキリン反復ドメイン及びCD3特異的アンキリン反復ドメインを含有するpQE30(Qiagen)発現ベクターの誘導体にサブクローニングした。構築物を大腸菌細胞中で発現させ、標準的なプロトコルに従ってそれらのHisタグを用いて精製した。 25mL の静置一晩培養物(TB、1%のグルコース、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリン; 37°C)を使用して、 500mL の培養物(TB、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリン、 37°C)に接種した。 600nm で $1.0\sim 1.5$ の吸光度において、培養物を 0.5mM IPTGで誘導し、振盪しながら 37°C で4~5時間インキュベートした。培養物を遠心分離し、得られたペレットを、 25mL のTBSS₅₀₀(50mM のTris-HCl、 500mM のNaCl、pH8)中に再懸濁し、溶解した(超音波処理)。溶解後、試料を50KU DNase/mLと混合し、 62.5°C で30分間の熱処理ステップの前に15分間インキュベートし、遠心分離し、上清を回収し、濾過した。Triton X100(1%(v/v)の最終濃度)及びイミダゾール(20mMの最終濃度)をホモジネートに添加した。タンパク質を、Ni-ニトリロ三酢(Ni-NTA)酸カラム、続いて、AKTAexpress(商標)システム上のサイズ排除クロマトグラフィで、当業者に既知の標準的なプロトコル及び樹脂に従って精製した。

30

40

【0174】

第1のステップにおいて、組換えタンパク質への結合を、HTRFアッセイを使用して試験した。PBSS-TC(0.1%(w/v)のカゼイン及び0.1%のTween20を補充したPBS、pH7.4)中のアンキリン反復タンパク質($5\sim 640\text{nM}$)の力

50

価測定を、384ウェルプレートのウェル中で、48 nM（最終濃度）のヒトビオチン化 s c C D 3 ϵ γ 、1:100（最終濃度）の抗 6 H i s - D 2 H T R F 抗体 - F R E T アクセプタコンジュゲート (C i s b i o) 及び 1:100（最終濃度）の抗 s t r e p - T b 抗体 F R E T ドナーコンジュゲート (C i s b i o) に対して行い、室温で 120 分間インキュベートした。340 nm の励起波長及び 665 $\pm$ 10 nm の発光フィルタを使用して、T e c a n M 1000 で H T R F を読み取った。いくつかの候補は用量依存的結合を示し、更なる評価のために使用した。全てのこれらの構築物について、結合シグナルは、C D 3 ϵ の立体構造エピトープに結合する 20 倍過剰の C D 3 結合抗体（ヒト F c 領域を含有する O K T 3、最終濃度 2.4 mM）と競合した場合にバックグラウンドレベルであった (K j e r - N i e l s e n e t a l., P N A S, 2004, 101 (20): 7675-7680)。用量依存的なインビトロでの T 細胞活性化を、T A A 1 発現腫瘍細胞の存在下で、B K 112 T 細胞活性化アッセイ (C D 3 / C D 28 D y n a b e a d s で予め活性化された B K 112 C D 8 モノクローナル T 細胞) を使用して確認した。細胞内 I F N γ レベルを、1~100,000 pM の二重特異性 T C E 構築物の存在下での B K 112 及び S K O V 3 細胞 (E:T=1:10) の 5 時間のインキュベーション後に、C D 8+ 又は C D 4+ T 細胞上で測定した。最も強力な構築物は、C D 4+ 細胞及び C D 8+ 細胞についてそれぞれ 0.5 nM 及び 0.4 nM の E C 50 値を示した。

10

【0175】

選択された C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の親和性成熟及び合理的設計

20

合理的設計と組み合わせた数ラウンドの親和性成熟を、親の低親和性結合 C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質（前駆体 A と称する）に適用し、4 つのより高い親和性の C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質（前駆体 B、C 及び D と称する）を得た。次いで、これらの前駆体分子を、最終的に、C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 1、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 2、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 3 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 4 に操作した。

【0176】

親和性成熟は、Z a h n d e t a l., N a t M e t h o d s, 2007, 4: 269-279 に記載されているエラープローン PCR 及び DNA イシャッフリングを使用して多様性を導入することによって、C D 3 標的への十分な結合能力と、インビトロでの T 細胞を効率的に活性化する能力の両方を考慮して選択した、親 C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質（前駆体 A）の 1 つに対して実行した。簡単に説明する。3 ラウンドのリボソームディスプレイを、増加させた選択圧力（洗浄ステップはラウンド 1 (3 $\times$ 15 分) から、3 $\times$ 30 分 (ラウンド 2) まで、3 $\times$ 45 分 (ラウンド 3) まで増加) を用いて、C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質 / ラウンド当たり約 1~2 個の変異を導入するために、異なる濃度の d N T P 類似体 (J e n a B i o s c i e n c e s 製の変異誘発キット) を使用して実施したが、標的濃度は 5 nM で一定に保った。第 2 のステップでは、DNA プールを DNA シャッフルし、90 秒の DNA s e インキュベーション時間及び DNA ポリメラーゼ H o t S t a r T a q DNA ポリメラーゼ (Q i a g e n) を使用し、以前に記載されているように (C a d w e l l & J o y c e, P C R M e t h o d s A p p l, 1992, 2: 28-33; S t e m m e r, N a t u r e, 1994 370: 389-391; Z a c c o l o e t a l., J M o l B i o l 1996, 255: 589-603) 使用して、1 ラウンド又は 2 ラウンドのリボソームディスプレイで親クローンを使用して戻し交雑した。親和性成熟した C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質プールを、最終的に N 末端 H i s - F l a g タグ、半減期延長のための H S A 結合アンキリン反復ドメイン、T A A 1 結合アンキリン反復ドメイン及び C D 3 特異的アンキリン反復ドメインを含む p Q E 30 (Q i a g e n) 発現ベクターの誘導体にサブクローニングし、発現させ、前述のように H T R F によって組換え s c C D 3 ϵ γ への結合についてスクリーニングした。リードクローンを選択した（前駆体 B、全てのステップにおいて 10 μ M の d N T P 類似体を使用する 3 ラウンドのエラープローン P

30

40

50

C R 並びに 2 ラウンドの D N A シャッフリング及び戻し交雑を含む 5 ラウンドの親和性成熟後に作製した)。

【0177】

同じプロセスにおいて、5 位及び 20 位における N キャップ変異、2 位及び 4 位における第 1 の内部反復変異、2 位、5 位及び 20 位における第 2 の内部反復変異、並びに 1 位及び 18 位における C キャップ変異を含む、増加した T 細胞活性化についてのいくつかの潜在的に有益な変異を、B K 1 1 2 アッセイにおける I F N γ + T 細胞の % によって同定した。熱安定性を維持するために N 及び C キャップフレームワーク変異を最小限に維持しながら、これらの変異の組み合わせは、設計された変異体のセットをもたらし、これを、改善された T 細胞活性化について同じフォーマットで再び試験した。それによって、親及び最初に成熟したものと比較してより高い T 細胞活性化効力を有する、新しい更に成熟した変異体 (前駆体 C) を生成した。

10

【0178】

C D 3 親和性及び T 細胞活性化効力を更に増加させるために、上記に記載されたものと同様に、前駆体 C クローンに対して第 2 の親和性成熟を行った。簡単に説明する。4 ラウンドのリボソームディスプレイを行った。最初の 3 ラウンドでは、7.5 μ M の d N T P 類似体を用いたエラープローン P C R によって変異を導入した。ラウンド 1 及び 3 では、更に成熟したクローン自体又は競合のための非ビオチン化 C D 3 標的タンパク質のいずれかを使用して、オフレート選択を適用した。1 nM の標的をラウンド 1 及び 2 で使用し、一方、5 nM をあまりストリンジентでないラウンド 3 及び 4 で適用した。H S A 結合ドメイン及び T A A 1 結合アンキリン反復ドメインを含む三重特異性フォーマットにおいて、競合物として更に成熟したクロンの 250 倍アクセスを用いるオフレート H T R F アッセイを使用して、C D 3 変異体をスクリーニングした。競合後に最も高い残存 H T R F シグナルを有する合計 3 $\times$ 96 個のクロンを配列決定した。改善された結合 (N キャップ 16 位、第 1 の内部反復 1、12、18、19、26、30 及び 33 位、第 2 の内部反復 2、3、7、20、21、26、及び 32 位、並びに C キャップ 9、11 及び 18 位を含む) について、又は減少されたドメイン相互作用 (N キャップ 11、18、19、26 位、及び C キャップ 3、19、及び 22 位を含む) についての同定された有益な変異を、まず、B K 1 1 2 T 細胞活性化について、精製タンパク質変異体の個別又は対になる変異として試験した。次いで、最も有益な変異体を第 2 のステップにおいて組換え、変異体を最も高い T 細胞活性化についてスクリーニングし、これにより、前駆体 D の同定をもたらした。

20

30

【0179】

最後のステップでは、血清中半減期及び生物物理学的特性を改善するために、変異体 D A R P i n (登録商標) プロテイン # 1、D A R P i n (登録商標) プロテイン # 2、D A R P i n (登録商標) プロテイン # 3 及び D A R P i n (登録商標) プロテイン # 4 を、それぞれ C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質前駆体 A、B、C 及び D に基づいて作製した。それにより、23 位及び/又は 26 位の N キャップ変異を導入し、フレームワーク変異のいくつかを除去した (19 位、18 位)。

【0180】

ヒト C D 3 に対して結合特異性を有する親和性成熟アンキリン反復ドメインを p Q E (Q I A g e n, G e r m a n y) ベースの発現ベクターにクローン化し、N 末端 H i s タグ (配列番号 27) を提供して、以下に記載するように簡単なタンパク質精製を容易にした。例えば、以下のアンキリンリピートタンパク質をコードする発現ベクターを構築した。

40

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 (配列番号 1、その N 末端に融合させた H i s タグ (配列番号 27) を有する)、

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 (配列番号 2、その N 末端に融合させた H i s タグ (配列番号 27) を有する)、

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 (配列番号 3、その N 末端に融合させた H i

50

s タグ（配列番号 27）を有する）、

D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 4（配列番号 4、その N 末端に融合させた H i s タグ（配列番号 27）を有する）、

【0181】

C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の高レベル及び可溶性発現

詳細な分析のために、一価として、又は T A A 及び／若しくは H S A 結合アンキリン反復ドメインと組み合わせてのいずれかで、特異的な C D 3 結合を示す選択されたクローンを大腸菌細胞で発現させ、H i s タグを使用して精製し、続いて当業者に公知の標準的なプロトコール及び樹脂に従って A K T A x p r e s s（商標）システムでサイズ排除クロマトグラフィを行った。一価構築物及び多価構築物について、それぞれ、T B S p H 8 . 0（50 mM の T r i s、500 mM の N a C l）又は P B S p H 7 . 4 中で 10 m g / m l に濃縮したとき、タンパク質は単量体であり、可溶性であった。そのような S D S - P A G E 分析の代表的な例を、図 1 に示す。

10

【0182】

実施例 2：例示的な C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の安定性評価

U V 分光法、S D S - P A G E 及びサイズ排除クロマトグラフィ（S E C）を用いた例示的な C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の評価

4 つの選択された C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質を詳細に分析して、それらの生物物理学的特性を評価した。簡単に説明すると、T B S p H 8 . 0（50 mM の T r i s、500 mM の N a C l）中の精製された C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質 D A R P i n（登録商標）# 1（配列番号 1）、D A R P i n（登録商標）# 2（配列番号 2）、D A R P i n（登録商標）# 3（配列番号 3）及び D A R P i n（登録商標）# 4（配列番号 4）を、滅菌ガラスバイアル S c h m i d l i n : L P P 11 09 06 20 に小分けし、50 °C で 18 日間インキュベートすることによりストレスをかけた。適用されたストレス条件は、4 °C で 2 年間保存した後の生物物理学的特性の予測を可能にする。各 C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質について、アリコートを参照として -70 °C で保存した。参照試料及び熱ストレスを受けた試料を、分析前に同じ数の凍結解凍サイクルに曝露した。試料を、U V 分光法によって凝集及び濁度（サイズ範囲 > 100 µm）について、並びに S D S - P A G E 及び分析的 S E C によって多量体化、凝集及び断片化について評価した。次いで、ストレスをかけた試料をそれぞれの参照試料と比較した（図 2、図 3 及び図 4）。

20

30

【0183】

円偏光二色性（C D）分光法を用いた例示的な C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の熱安定性評価

同じ C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質をまた、J a s c o J - 815 分光光度計を使用して、それらの熱安定性及びアンフォールディング／リフォールディング傾向について評価した（ストレスをかけていないタンパク質のみ）。選択されたタンパク質の T m（融解温度）は、熱安定性のパラメータとして C D によって決定される。簡単に説明すると、楕円率を 222 n M で記録し、20 °C ~ 95 °C の温度範囲を適用した後、逆スキャンを行ってリフォールディング挙動を記録した。選択された C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質の T m は、タンパク質アンフォールディングの midpoint である。

40

【0184】

試料を、T B S p H 8 . 0（50 mM の T r i s、500 mM の N a C l）中 2 µ M の濃度で調製した（図 5）。試験した 4 つ全てのタンパク質について、65 °C より高い T m が得られた。

【0185】

【表 1】

表 1 4つの例示的なCD3特異的アンキリン反復タンパク質のT_m（融解温度）

DARPin(登録商標)タンパク質 #	配列番号	T _m °C
# 1	1	85
# 2	2	82
# 3	3	75
# 4	4	83

【0186】

動的光散乱（DLS）による凝集開始温度T_{agg}の決定

同じCD3特異的アンキリン反復タンパク質を、それらの温度依存性凝集傾向（T_{agg}）について評価した。25°C～85°Cの温度範囲を適用し、タンパク質の流体力学半径に対してプロットした。評価のために、Wyatt DynaPro Plate Reader II（シリアル番号140-WPR2）デバイスを使用し、測定値はDynamic 7.8.1.30ソフトウェアで処理した。アンキリン反復試料（表2）を、TBS pH8.0（50mMのTris、500mMのNaCl）中1mg/mlの濃度で調製し、5つの複製物（A1、A2、A3、A4及びA5）において測定した（図6）。

【0187】

図6に示すように、試験した4つ全てのアンキリンのアンキリン反復タンパク質は、65°Cよりもはるかに高い温度で凝集する傾向がある。

【0188】

【表 2】

表 2 4つの例示的なCD3特異的アンキリン反復タンパク質のT_{agg}（温度依存性凝集傾向）

DARPin(登録商標)タンパク質 #	配列番号	T _{agg} °C
# 1	1	85
# 2	2	80
# 3	3	80
# 4	4	80

【0189】

実施例3：雌BALB/cマウスにおけるCD3特異的アンキリン反復タンパク質の薬物動態分析

本発明のCD3特異的アンキリン反復ドメインが、治療薬の開発に有用であるためにin vivoで適切な血清半減期を有するかどうかを決定するために、DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPin（登録商標）タンパク質#3及びDARPin（登録商標）タンパク質#4の薬物動態プロファイルを、マウスで分析した。そのために、DARPin構築物をサブクロニングし、N末端Hisタグ、半減期延長のためのHSA結合アンキリン反復ドメイン、続いてCD3特異的結合ドメインの1つを含有するpQE30（Qiagen）発現ベクターの誘導体に上記に記載されるように発現させた。2つのアンキリン反復ドメインを、配列番号31のリンカーなどのペプチドリンカーによって互いに連結させた。

【0190】

例えば、以下のアンキリンリピートタンパク質をコードする発現ベクターを構築した。

DARPin（登録商標）タンパク質#5（配列番号33、そのN末端に融合させたHisタグ（配列番号27）を有する）、

DARPin（登録商標）タンパク質#6（配列番号34、そのN末端に融合させたHisタグ（配列番号27）を有する）、

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 7 (配列番号 3 5、その N 末端に融合させた H i s タグ (配列番号 2 7) を有する)、

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 8 (配列番号 3 6、その N 末端に融合させた H i s タグ (配列番号 2 7) を有する)、

【0191】

インビボ投与及び試料採取

ヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメイン (配列番号 2 9) でフォーマットした D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 5、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 6、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 7 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 8 を、各アンキリン反復融合タンパク質について、6 匹のマウスの尾静脈に単回静脈内ボ

10

ーラス注射として投与した。目標用量レベルは、5 mL / kg の適用容量で 1 mg / kg であった。アンキリン反復融合タンパク質を、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 溶液中に配合した。

【0192】

マウスを、等しい数の動物を有する 2 つの群に分割した。各マウスから 4 つの血清試料を収集した。薬学的動態調査のための血液試料を、化合物投与後 5 分、4 時間、2 4 時間、4 8 時間、7 6 時間、9 6 時間、及び 1 6 8 時間に採取した。血液を室温に維持して凝固させ、続いて遠心分離し、血清を採取した。

【0193】

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

20

P B S 中の 1 0 n M のポリクローナルヤギ抗ウサギ I g G 抗体 (A b 1 8) のウェル当たり 1 0 0 μ l を、N U N C M a x i s o r b E L I S A プレートに 4 ° C で一晩コーティングした。ウェル当たり 3 0 0 μ l の P B S T (0 . 1 % の T w e e n 2 0 を添加した P B S) で 5 回洗浄した後、H e i d o l p h T i t r a m a x 1 0 0 0 振盪器 (4 5 0 r p m) で、0 . 2 5 % のカゼイン (P B S T - C) を補充した 3 0 0 μ l の P B S T で、室温 (R T) で 1 時間ウェルをブロックした。プレートを上記のように洗浄した。P B S T - C 中の 1 0 0 μ l の 5 n m o l / L のウサギ抗 D A R P i n (登録商標) 1 - 1 - 1 抗体を添加し、プレートを軌道振盪 (4 5 0 r p m) しながら室温 (2 2 ° C) で 1 時間インキュベートした。上記のようにプレートを洗浄した。

【0194】

30

希釈した血清試料 (1 : 5 の希釈ステップで 1 : 2 0 ~ 1 : 3 1 2 5 0 0) 又はアンキリン反復タンパク質標準曲線試料 (1 : 3 の希釈ステップで 0 及び 5 0 ~ 0 . 0 0 0 8 n m o l / L) の 1 0 0 μ l を、4 5 0 r p m で振盪しながら、室温で 2 時間適用した。プレートを上記のように洗浄した。

【0195】

次いで、ウェルを 1 0 0 μ l のマウス抗 R G S - H i s - H R P I g G (A b 0 6、P B S T - C 中 1 : 2 0 0 0) と共にインキュベートし、室温、4 5 0 r p m で 1 時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄した。1 0 0 μ l / ウェルの T M B 基質溶液を 5 分間使用して、1 m o l / L の H ₂ S O ₄ を 1 0 0 μ l 添加することによって停止させて E L I S A を展開した。4 5 0 n m での吸光度及び 6 2 0 n m での吸光度の差を計算した。試料は、2 つの異なるプレートで二連で測定した。図 7 A は、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 5、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 6、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 7 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 8 の血清濃度を、マウスへの単回静脈内投与後の時間の関数として示している。トレースは、化合物のおおよその単一指数関数的除去を示す。

40

【0196】

薬物動態解析

薬物動態データ解析を、P h o e n i x 6 4、P h a r s i g h t、N o r t h C a r o l i n a の一部として W i n N o n l i n プログラムのバージョン 7 . 0 を使用して、M o l e c u l a r P a r t n e r s で行った。静脈内ボラス注射を介して投与

50

された動物の平均濃度－時間データに基づく薬物動態パラメータの計算を、ノンコンパートメント解析（NCAモデル200－202、IVボラス、線形台形線形補間）を用いて行った。以下の薬物動態パラメータを計算した。

AUC_{inf}、AUC_{last}、AUC_{%extrapol}、C_{max}、T_{max}、C_{l_{pred}}、V_{ss_{pred}}、t_{1/2}。

【0197】

最大血清濃度（C_{max}）及びそれらの発生時間（T_{max}）は、血清濃度－時間プロファイルから直接得られた。血清濃度－時間曲線の下面積（AUC_{inf}）は、最後のサンプリング点（T_{last}）までの線形台形公式及び終末相の単一指数関数的減少を仮定した無限大への外挿によって決定した。無限大までの外挿は、C_{last}/λ_zを使用して実行され、ここで、λ_zは、対数線形回帰によって推定された最終速度定数を示し、C_{last}は、最終対数線形回帰によってT_{last}で推定された濃度を示す。総血清クリアランス（C_{l_{pred}}）及び見かけの終末相半減期を以下のように計算した。C_{l_{pred}}＝静脈内用量/AUC_{inf}及びt_{1/2}＝ln2/λ_z。定常状態分布体積V_{ss}は、以下によって決定した。V_{ss}＝i.v.投与量・AUMC_{inf}/(AUC_{inf})²。AUMC_{inf}は、AUC_{inf}の計算について記載したのと同じ外挿手順を使用して、無限大に外挿された薬物濃度－時間曲線の第1の瞬間の総面積を示す。nmol/Lで与えられた濃度に基づいてPKパラメータを計算するために、mg/kgとして与えられた投与量値をアンキリン反復タンパク質の分子量を使用してnmol/kgに変換した。表3は、1mg/kgの単回静脈内投与後の、試験した4つのアンキリン反復タンパク質、DARPin（登録商標）タンパク質#5、DARPin（登録商標）タンパク質#6、DARPin（登録商標）タンパク質#7及びDARPin（登録商標）タンパク質#8の薬物動態特性の概要を示す。

【0198】

【表3】

表3 4つの例示的なHSA/CD3特異的アンキリン反復タンパク質についての薬物動態パラメータ

パラメータ	単位	DARPin(登録商標) タンパク質#5	DARPin(登録商標) タンパク質#6	DARPin(登録商標) タンパク質#7	DARPin(登録商標) タンパク質#8
AUCINF _{pred}	h*(nmol/L)	26470	26814	18688	14155
AUCINF _{D_{pred}}	(h*(nmol*kg)/(L*mg)	26470	26814	18688	14155
AUC _{last}	h*(nmol/L)	25857	26060	18420	14115
C _{max}	nmol/L	949	1042	761	820
T _{max}	h	0.083	0.083	0.083	0.083
Cl _{pred}	L/(h*kg)	0.00127	0.00126	0.00179	0.00237
HL _{Lambda_z} (半減期)	h	32.3	34.3	29.0	21.0
V _{ss_{pred}}	L/kg	0.0515	0.0515	0.0618	0.0547
AUC _{%Extrap_{pred}}	(%)	2	3	1	0
AUC _{%Back_{Ext_{pred}}}	(%)	0	0	0	0

【0199】

実施例4：表面プラズモン共鳴（SPR）分析によるヒトCD3に対して結合特異性を有するアンキリン反復タンパク質の解離定数（K_D）の決定

組替えヒトCD3標的上の4つの精製されたアンキリン反復タンパク質の結合親和性を、Protein装置（BioRad）を用いて分析し、当業者に既知の標準的な手順に従って測定を行った。そのために、本発明のDARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#2、及びDARPin（登録商標）タンパク質#3並びにDARPin（登録商標）タンパク質#4をサブクロニングし、N末端Hisタグ、アンキリン反復ドメインに結合する2つの異なるTAA（それぞれTAA2及びTAA3）、続いて、4つのCD3特異的アンキリン反復タンパク質構築物の1つを含有する、pQE30（Qiagen）発現ベクターの誘導体に、上記に記載されるように発現させた。

【0200】

簡単に説明すると、ビオチン化ヒトscCD3εγを、PBST（PBS、pH7.4、0.005%Tween20（登録商標）含有）中に希釈し、NLCチップ（BioRad）上に、約700～1400共鳴単位（RU）のレベルまでコーティングした。次の

で、アンキリン反復タンパク質とヒトCD3との相互作用を、マルチトレースSPR測定については64 nM～4 nMの濃度範囲を網羅する連続希釈のアンキリン反復タンパク質を含有する300 μLの泳動用緩衝液（0.005% Tween 20（登録商標）を含有するPBS、pH 7.4）を注入すること、続いて60 μL／分の一定流量で少なくとも10分間、泳動用緩衝液流を注入すること（オフレート測定）によって測定した。再生は、30 μLの10 mMグリシンpH 2を用いて行った。スポット間のシグナル（すなわち、共鳴単位（RU）値）及び参照注入（すなわち、ランニング緩衝液のみの注入）を、アンキリン反復タンパク質の注入後に得られたRUトレースから減算した（二重参照）。親和性成熟構築物について、CD3に対する結合パラメータ（ K_D 、オンレート、オフレート）を決定した。結合平衡には、最も高い試料濃度であっても適切に到達せず、オンレートに対して最適ではない適合をもたらしたので、オンレート（ k_{on} ）及び解離定数（ K_D ）は、近似としてのみ与えられる。

10

【0201】

代表例として、図7Bは、TAA2結合設計アンキリン反復ドメイン及びTAA3結合設計アンキリン反復ドメインでフォーマットされたDARPin（登録商標）分子#3について得られたSPRトレースを示す。解離定数（ K_D ）を、当業者に既知の標準的な手順を用いて、推定されたオンレート及びオフレートから算出した。ヒトCD3による選択されたアンキリン反復タンパク質の結合相互作用の K_D 値を、6～35 nMの範囲にあると決定した（表4を参照）。

20

【0202】

【表4】

表4. アンキリン反復タンパク質－ヒトCD3相互作用の K_D 値

DARPin(登録商標)タンパク質#	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	測定数
TAA2/TAA3ドメインを有するDARPin(登録商標)タンパク質#2	約35±15 nM	約4.9E+04	1.5E-03	n=2
TAA2/TAA3ドメインを有するDARPin(登録商標)タンパク質#3	約15±2 nM	約8.9E+04	1.3E-03	n=4
TAA2/TAA3ドメインを有するDARPin(登録商標)タンパク質#4	約6±2 nM	約8.2E+04	4.1E-04	6

30

【0203】

実施例5：CD3 T細胞結合の決定

CD3結合の決定は、Mirrorballレーザー走査撮像サイトメトリーを使用して、初代ヒトT細胞で行った。したがって、pan-T細胞精製キット（Miltenyi Biotec）を使用して、ヒト末梢血単核球（PBMC）から初代T細胞を単離した。三重特異性フォーマット（TAA2及びTAA3結合アンキリン反復ドメインを含む）にフォーマットされた、DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPin（登録商標）タンパク質#3及びDARPin（登録商標）タンパク質#4、本明細書では、それぞれ、DARPin（登録商標）プロテイン#A、DARPin（登録商標）タンパク質#B、DARPin（登録商標）タンパク質#C、及びDARPin（登録商標）タンパク質#Dと称するもの、又は四重特異性フォーマット（ヒト血清アルブミンに特異的に結合する追加のアンキリン反復ドメインを含む）の力価測定を、600 μMのヒト血清アルブミン（生理的血清濃度を模倣するため）の存在下、ウェル当たり50,000個のpan-T細胞と共に4℃で30分間インキュベートした。三重特異性TCEタンパク質を生成するために、DARPin（登録商標）プロテイン#1、DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPin（登録商標）タンパク質#3、及びDARPin（登録商標）タンパク質#4を、それぞれ、サブクローニングし、N末端Hisタグ、続いて、2つの異なるTAA特異的アンキリン反復ドメイン（それぞれ、TAA2特異性及びTAA3特異性の順序で）、次いで、続いて、本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインの1つをコードするpQE30（Qiagen

40

50

n) 発現ベクターの誘導体に、上記に記載されるように発現させた。四重特異性 T C E タンパク質については、ヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメインを、H i s タグと T A A 2 特異的ドメインとの間に更に含めた。アンキリン反復ドメインを、配列番号 31 のリンカーなどのペプチドリンカーによって互いに連結させた。T A A 2 又は T A A 3 のいずれかを標的とする、2つのベンチマーク T 細胞エンゲージャを対照として適用した。洗浄後、C D 3 結合を、1 : 100 希釈した抗ペンター H i s A l e x a F l u o r 488 抗体 (Q i a g e n) によって検出した。4℃で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、C y t o f i x 固定緩衝液 (B D B i o s c i e n c e s) に再懸濁し、5 μ M の D R A Q 5 (A b c a m) によって室温で15分間対比染色した。遠赤色対比染色細胞上の A l e x a F l u o r 488 結合の平均蛍光強度の中央値を、C e l l l i s t a ソフトウェア (S P T L a b t e c h) を使用して M i r r o r b a l l によって測定し、データを、G r a p h P a d P r i s m 8 を使用してプロットした。

10

【0204】

図 8 A ~ B に示されるように、D A R P i n (登録商標) タンパク質は、# A に対する検出可能な結合なしから、# D に対するベンチマーク分子 (既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャ、T A A 2 に対して結合特異性を有する T C E 1 及び T A A 3 に対して結合特異性を有する T C E 2) と同程度に良好な結合までの幅広い親和性を示す。T 細胞への C D 3 結合は、S P R によって測定される C D 3 親和性と合致する。追加の H S A 結合ドメインの存在 (図 8 B を参照されたい) は、T 細胞への結合にわずかな影響しか及ぼさなかった。表 5 は、4つの例示的なアンキリン反復タンパク質の、それらの E C₅₀ 値によって表される C D 3 結合親和性を示す。

20

【0205】

【表 5】

表 5. T A A 2 - T A A 3 - C D 3 特異的 D A R P i n (登録商標) タンパク質の E C₅₀ 値

DARPin(登録商標)タンパク質 #	EC50[nM]
#1(A)	低すぎる—計算されず
#2(B)	250—400nM
#3(C)	50—100nM
#4(D)	5—15nM

30

【0206】

実施例 6 : C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質によって誘導される標的特異的短期腫瘍細胞死滅の L D H 細胞傷害性アッセイによる評価

細胞結合について記載されたフォーマットにおける 4つの C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質 (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 1 ~ # 4) の特異性及び効力を、L D H 放出によるインビトロの短期細胞傷害性アッセイによって評価した。

【0207】

エフェクター細胞及び標的細胞を、600 μ M のヒト血清アルブミン (生理学的濃度を模倣するため) の存在下で、5 : 1 の E : T 比で 96 ウェルプレート中、2 連で共インキュベートした。p a n - T 細胞単離キット (M i l t e n y i) を使用することによって、ヒト P B M C から付着していない (u n t o u c h e d) T 細胞を単離した。1 ウェル当たり 100,000 個の精製 p a n - T 細胞 (エフェクター細胞) と 20,000 個の T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞 (標的細胞) を、選択した C D 3 特異的アンキリン反復タンパク質、対照ベンチマーク分子又は 1% の T r i t o n X - 100 を含む対照の連続希釈物と 37℃で48時間インキュベートした。48時間のインキュベーション後、細胞をスピンドウンし、1 ウェル当たり 100 μ l の上清及び 1 ウェル当たり 100 μ l の L D H 反応混合物 (L D H 検出キット; R o c h e A p p l i e d S c i e n c e) を 30 分間インキュベートした。吸光度を、T E C A N i n f i n i t e M 1000 P r o リー

40

50

ダーによって492nm～620nmで測定した。バックグラウンド補正後、Graph Pad Prism 8を使用してOD値をプロットした。

【0208】

図9Aに示されるように、半減期延長のないDARPinタンパク質、DARPin（登録商標）タンパク質#2及びDARPin（登録商標）タンパク質#3は、ベンチマーク分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャー、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1）に匹敵する腫瘍細胞死滅を誘導したが、DARPin（登録商標）タンパク質#1及びDARPin（登録商標）タンパク質#4は、10～100倍低い効力を示す。図9Bにおいて、半減期が延長されたDARPin（登録商標）タンパク質は、対応する半減期が延長されていない分子と比較して、効力の約4～70倍の低下を示す。

10

【0209】

実施例7：標的特異的短期T細胞活性化及びIFN γ 分泌の評価。

上述のCD3特異的アンキリン反復タンパク質（実施例5及び6）の特異性及び効力を、CD8+T細胞上のCD25活性化マーカーを測定するFACS及びIFN γ 分泌を測定するELISAによって、インビトロの短期T細胞活性化アッセイで評価した。

【0210】

したがって、ウェル当たり100,000個の精製pan-T細胞（エフェクター細胞）と100,000個のTAA2/TAA3発現腫瘍細胞（標的細胞）を、600 μ Mのヒト血清アルブミンの存在下で、選択した結合タンパク質又は対照ベンチマーク分子の段階希釈物と2連で37℃で24時間共インキュベートした（E:T比1:1）。24時間後、製造業者のプロトコルに従って、ヒトIFN γ 標準ABTS ELISA Developmentキット（Peprotech）によるIFN γ 分泌の測定のために、1ウェル当たり100 μ lの上清を移した。細胞を洗浄し、1:1,000のLive/Dead Aqua（Thermo Fisher）、1:250のマウス抗ヒトCD8 Pacific Blue（BD）、及び1:100のマウス抗ヒトCD25 PerCP-Cy5.5（eBiosciences）抗体を用いて4℃で30分間染色した。洗浄及び固定後、細胞をFACS Canto II（BD）機で分析した。T細胞活性化を、Live/Dead陰性のCD8+ゲートT細胞上、CD25+細胞を測定することによって評価した。FlowJoソフトウェアを用いてFACSデータを分析し、Graph Pad Prism 8を用いてデータをプロットした。

20

30

【0211】

図10Aに示すように、DARPin（登録商標）タンパク質#2及びDARPin（登録商標）タンパク質#3は、半減期延長なしで、ベンチマーク分子（既知のベンチマークT細胞エンゲージャー、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1）に匹敵する特異的な短期T細胞活性化を誘導したが、DARPin（登録商標）タンパク質#1及びDARPin（登録商標）タンパク質#4は10～100倍低い効力を示した。図10Bにおいて、半減期が延長されたDARPin（登録商標）タンパク質は、対応する半減期が延長されていない分子と比較して、効力の約3～100倍の低下を示した。

【0212】

実施例8：Incucyteによる標的特異的長期腫瘍細胞死滅の評価

40

CD3特異的アンキリン反復タンパク質（実施例5、6及び7に記載される）の特異性及び効力を、Incucyte S3プラットフォームを使用する、インビトロの長期死滅アッセイによって評価した。

【0213】

TAA2/TAA3発現腫瘍細胞を最初にNucLight Red（NLR）レンチウイルス粒子（Sartorius）で形質導入し、赤色蛍光細胞を0.7 μ g/mlのピューロマイシン及び／又はFACSソーティングによって選択した。次いで、Incucyte S3システム（Sartorius）を用いて長期腫瘍細胞死滅を評価した。エフェクター細胞及び標的細胞を、1:200のAnnexin V green（Sartorius）及び600 μ Mのヒト血清アルブミン（生理学的濃度を模倣するため）

50

の存在下で、5：1のE：T比で0.01%のポリ-L-オルニチンをコーティングした96ウェルプレート上で2連で同時インキュベートした。1ウェル当たり50,000個の精製(Miltenyi)pan-T細胞(健康ドナーPBMCから単離)+10,000個のTAA2/TAA3発現腫瘍細胞(NLR形質導入)を、選択されたアンキリン反復タンパク質又は対照ベンチマーク分子の連続希釈物と一緒に37℃で最大6日間インキュベートした。細胞増殖(NLRからの赤色蛍光)(NLRからの赤色蛍光)及び細胞死(アネキシンVからの緑色蛍光)について評価した。GraphPad Prism8を使用して6日間の共培養後の曲線下面積を計算することによって、総細胞増殖及び腫瘍細胞死滅を分析した。

【0214】

図12に示すように、試験したDARPin(登録商標)タンパク質#2、#3及び#4は、半減期延長とは無関係に、ベンチマーク分子(既知のベンチマークT細胞エンゲージャ、TAA2に対して結合特異性を有するTCE1及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2)に匹敵する強力かつ特異的な腫瘍細胞死滅を示す。より低い親和性のDARPin(登録商標)#1のみが、死滅効力の低下を示す。

【0215】

実施例9：FACSによる標的特異的長期T細胞活性化及び増殖の評価

CD3特異的アンキリン反復タンパク質(実施例5、6、7及び8に記載される)の特異性及び効力を、FACSベースのインビトロ長期T細胞活性化アッセイによって評価した。

【0216】

薬物及び標的特異性T細胞活性化及び増殖を評価するために、エフェクター細胞及び標的細胞を、選択した分子の連続希釈物の存在下で1：1のE：T比にて2連で同時インキュベートした。精製された(Miltenyi)pan-T細胞(健康なドナーPBMCから単離)を最初に5µMのCellTrace Violet(CTV)(ThermoFischer)で、37℃で20分間標識した。ウェル当たり50,000個のCTV標識pan-T細胞+50,000個のTAA2/TAA3発現腫瘍細胞を、次いで、600µMのヒト血清アルブミンの存在下(生理的濃度を模倣するため)、選択したCD3特異的アンキリン反復タンパク質又は対照ベンチマーク分子TCE1及びTCE2の連続希釈物と共に37℃でインキュベートした。5日後、細胞をPBSで洗浄し、1：5,000のLive/Dead Green(ThermoFischer)、1：100のマウス抗ヒトCD8 PE(BD)、及び1：100のマウス抗ヒトCD25 PerCP-Cy5.5(eBiosciences)抗体で、4℃で30分間染色した。PBSで2回洗浄した後、細胞を、CellFIX(BD)を使用して4℃で20分間固定し、最後に緩衝液をPBSで置き換えた。染色された細胞をFACS Canto II(BD)機で分析した。T細胞活性化を、Live/Dead陰性及びCD8+ゲートT細胞上のCD25+細胞を測定することによって評価した。T細胞増殖を、Live/Dead陰性及びCTV陽性細胞をゲーティングすることによって評価した。FlowJoソフトウェアを用いてFACSデータを分析し、GraphPad Prism8を用いてデータをプロットした。

【0217】

図13及び14に示すように、DARPin(登録商標)タンパク質#2及びDARPin(登録商標)タンパク質#3は、半減期の延長なしで、ベンチマーク分子(TAA2に対して結合特異性を有する既知のベンチマークT細胞エンゲージャTCE1、及びTAA3に対して結合特異性を有するTCE2)に匹敵する長期T細胞活性化及び増殖を誘導したが、DARPin(登録商標)タンパク質#1及びDARPin(登録商標)タンパク質#4は10~100倍低い効力を示した。半減期が延長されたCD3特異的アンキリン反復タンパク質は、対応する半減期が延長されていない分子と比較して、効力の約5~30倍の低下を示す。

【0218】

10

20

30

40

50

実施例 10：PBM C ヒト化マウス及び T A A 発現腫瘍モデルにおける例示的な多重特異性 T C E 結合タンパク質のインビボ有効性評価

実験 A. D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 4 を、四重特異性 T C E 分子にフォーマットし、この四重特異性 T C E 分子は、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3、又は D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 4 に加えて、T A A 2、T A A 3、及びヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含む。そのために、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 4 をサブクロニングし、上記に記載したように、N 末端 H i s タグ、続いてヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメイン、続いて 2 つの異なる T A A 特異性 (それぞれ T A A 2 特異性及び T A A 3 特異性) アンキリン反復ドメイン、続いて本発明の C D 3 特異的アンキリン反復ドメインの 1 つをコードする p Q E 3 0 (Q i a g e n) 発現ベクターの誘導体で発現させた。アンキリン反復ドメインを、配列番号 3 1 のリンカーなどのペプチドリinker によって互いに連結させた。対応する T C E タンパク質を、本明細書において、それぞれ、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # F (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 を含む)、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # G (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 を含む) 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # H (D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 4 を含む) と命名される。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 を、同様に三重特異性 T C E 分子にフォーマットし、三重特異性 T C E 分子は、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2 に加えて、T A A 2 及び T A A 3 に対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含むが、H S A 特異的アンキリン反復ドメインを欠く。この T C E タンパク質を本明細書では D A R P i n (登録商標) タンパク質 # E と命名する。D A R P i n (登録商標) タンパク質 # E、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # F、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # G、及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # H を、固形皮下腫瘍として T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞株を担持する末梢血単核球 (P B M C) ヒト化マウスモデルで試験し、現在臨床試験で試験されている既知の T A A 3 標的化 T 細胞エンゲージャ分子と比較した。

【0219】

材料及び方法

動物：60 匹の雌 N O G マウス、試験開始時の動物の年齢 65 日 (提供者 T a c o n i c B i o s c i e n c e s)

【0220】

試験分子及び対照分子：D A R P i n (登録商標) タンパク質 # E、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # F、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # G、及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # H を、5 m g / m l の濃度で以前に記載されたように産生し；対照は、ベンチマーク T A A 3 標的化 T C E 0.59 m g / m l であり、E v i t r i a A G によって提供された。

【0221】

処置群：60 匹のマウスを研究に登録した。全ての動物を 8 つの異なる研究群に無作為に割り当てた。腫瘍細胞接種の日付を 0 日目として示す。

【0222】

方法：実験開始の 2 日前に体重を記録し、各群において等しい平均体重及び同様の標準偏差を有するようにマウスを無作為化した。平均重量は 19.6 g であった。

【0223】

− 2 日目に、マウスに 5×10^6 個の P B M C を腹腔内注射した。

【0224】

0 日目に、マウスの右脇腹に 10^6 個の T A A 2 / T A A 3 発現腫瘍細胞を皮下注射した。

【0225】

5 日目に、表 8 に従って腹腔内注射による処置を開始した。最後の処置は 1 6 日目であった。

【0 2 2 6】

腫瘍測定及び秤量を、7、1 0、1 2、1 4、1 7、1 9 日目に実施した。腫瘍体積を以下の式に従って計算した：[長さ×(幅) $2 \times \pi$]/6。

【0 2 2 7】

腫瘍体積データを、A n o v a によって増殖曲線を比較し、続いて多重比較 (D u n n 検定) のために補正したノンパラメトリッククラスカル・ウォリス (Kruskal-Wallis) 検定によって分析した。

【0 2 2 8】

処置群の腫瘍体積を、対照群の体積と比較した。2 匹の異なる P B M C ドナーからのデータを一緒に及び別々に分析した。

【0 2 2 9】

【表 6】

表 7 治療群の割り当て及び治療スキーム

群	サブグループドナー	マウス番号	処置	投与	頻度
1	A	5	ビヒクルPBS 0. 05%Tween	—	3x週 MON/WED/FRI
	B	5			
2	A	5	ベンチマークTAA3 標的化TCE	200 μ g/kg	毎日
	B	5			
3	A	5	DARPin(登録商標) タンパク質#E	200 μ g/kg	毎日
	B	5			
4	A	5	DARPin(登録商標) タンパク質#F	200 μ g/kg	3x週 MON/WED/FRI
	B	5			
5	A	5	DARPin(登録商標) タンパク質#G	200 μ g/kg	3x週 MON/WED/FRI
	B	5			
6	A	5	DARPin(登録商標) タンパク質#H	200 μ g/kg	3x週 MON/WED/FRI
	B	5			

【0 2 3 0】

結果

腫瘍増殖阻害

試験した多特異性結合タンパク質及び既知のベンチマーク T 細胞エンゲージャへの曝露時の腫瘍増殖曲線を、両方のドナーと一緒に及び別々に含めて、図 1 5 A ~ C に要約する。

【0 2 3 1】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 8（両方のドナー）、表 9（ドナー A）及び表 10（ドナー B）：腫瘍増殖の統計。

両方のドナーを合わせて											
処置の開始後の 日数	ビヒクル	TAA3 T細胞		DARPin(登録商標) タンパク質 #E		DARPin(登録商標) タンパク質 #F		DARPin(登録商標) タンパク質 #G		DARPin(登録商標) タンパク質 #H	
	平均	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P
2	52.1	55.0	ns	46.1	ns	27.4	ns	36.7	ns	34.4	ns
5	443.4	93.0	++	197.7	ns	109.0	+	154.1	ns	150.9	ns
7	546.3	124.8	++	287.2	ns	142.3	+	122.1	++	118.3	++
9	706.8	135.6	++++	376.8	ns	240.5	+	121.1	++++	150.6	++
12	923.4	263.0	ns	450.3	ns	250.2	++	69.9	+++++	204.6	++

ドナー A											
治療の開始後の 日数	ビヒクル	TAA3 T細胞 エンゲージャ		DARPin(登録商標) タンパク質 #E		DARPin(登録商標) タンパク質 #F		DARPin(登録商標) タンパク質 #H		DARPin(登録商標) タンパク質 #G	
	平均	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P
2	86.1	53.0	ns	26.8	ns	41.0	ns	43.1	ns	43.2	ns
5	704.6	149.5	++++	172.0	++	100.3	++++	169.1	++	88.6	++++
7	634.0	183.0	++	300.5	+	153.2	++	124.0	++++	69.2	++++
9	815.7	197.8	++	296.7	+	156.4	++	119.5	++++	93.7	++++
12	895.1	389.3	ns	418.1	ns	67.6	++	57.4	++	91.8	+

ドナー B											
治療の開始後の 日数	ビヒクル	TAA3 T細胞		DARPin(登録商標) タンパク質 #E		DARPin(登録商標) タンパク質 #F		DARPin(登録商標) タンパク質 #G		DARPin(登録商標) タンパク質 #H	
	平均	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P	平均	P
2	18.1	57.1	ns	65.5	ns	13.8	ns	30.4	ns	25.7	ns
5	182.1	36.6	ns	223.5	ns	117.8	ns	139.1	ns	213.1	ns
7	458.7	66.6	+	273.9	ns	131.4	ns	120.2	+	167.5	ns
9	597.9	73.5	+	456.8	ns	324.6	ns	122.7	+	207.6	ns
12	951.8	136.7	ns	482.5	ns	432.8	ns	82.3	++	317.3	ns

10

+ = $p < 0.1$; * = $p < 0.05$; +++ = $p < 0.01$; ++++ = $p < 0.0$

0.1; ns = 有意でない

20

【0232】

ドナー B 由来の P B M C は、マウス血液中の C D 8 陽性リンパ球の量を低下させた。概して、抗腫瘍効果は、試験した全ての分子において観察された。D A R P i n（登録商標）タンパク質 # F 及び既知の T A A 3 T 細胞エンゲージャは、治療の開始後 5 日目から始まる効果を示したが、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # G 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # H の効果は、治療の開始後 7 日目から始まって有意かつ関連性があった。サブグループ A のみを比較した場合、統計的に有意な効果が、治療の開始後 5 日目から始まって全ての試験分子について観察された。D A R P i n（登録商標）タンパク質 # F、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # G、及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # H の効果は、ベンチマーク T A A 3 T 細胞エンゲージャ及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # E の効果よりも強かった。サブグループ B を比較した場合、有意な抗腫瘍効果が、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # G 及びベンチマーク T A A 3 T 細胞エンゲージャについて観察された。

30

【0233】

ベンチマーク T C E で得られた結果は、使用されたモデルを確認するものであった。同時に、ドナー B 由来の P B M C でヒト化されたマウスにおいて観察されたベンチマークのあまり顕著でない効果は、このサブグループに属するマウスの感受性がより低いことを示す。これはまた、ドナー B 由来の P B M C でヒト化されたマウスにおける実験の終わりに見出されたヒト C D 8 陽性リンパ球の有意に低い量によって反映される。

【0234】

40

したがって、ドナー A 由来の P B M C を用いてヒト化されたマウスから得られたデータは、より大きな関連性があるものとなる。

【0235】

腫瘍サイズにおける高い変動性は、腫瘍が全てのマウスにおいて認識可能になる前に処置が開始されたため、マウスにおいて無作為化及び範囲選択が行われなかったという事実起因する。この高い変動性にもかかわらず、最初の腫瘍体積に対する正規化を必要とせずに統計分析を行うことができた。

【0236】

本発明者らは、試験した全ての多重特異性結合タンパク質が抗腫瘍活性を示し、半減期延長分子である D A R P i n（登録商標）タンパク質 # F、D A R P i n（登録商標）タ

50

ンパク質 # G 及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # H が、使用した用量及び適用レジメンで、半減期延長していない D A R P i n (登録商標) タンパク質 # E よりも強い抗腫瘍活性を有することを確認した。理論に束縛されるものではないが、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # E の曝露は、この分子のより短い半減期に起因して、より低くなり得ると考えられる。

【0237】

全体として、試験した4つ全ての多重特異性結合タンパク質は、ベンチマークT細胞エンゲージャの抗腫瘍活性に匹敵するか又はそれよりも強いインビボ抗腫瘍活性を示した。これらの結果は、本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインをTAA特異的結合ドメイン(及び半減期延長部分)と組み合わせ、インビボでの抗腫瘍活性を有するT細胞エンゲージャ分子を形成することができることを実証した。したがって、そのようなTCE分子においてフォーマットされるとき、本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインは、インビボでCD3に結合し、T細胞を活性化するそれらの能力を維持する。

【0238】

実験B. 同様の実験設定において、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 を、それぞれTAA2、TAA3及びTAA4に対して結合特異性を有する3つの設計アンキリン反復ドメインと、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する2つの設計アンキリン反復ドメインとを更に含むヘキサ特異性TCE分子にフォーマットした。そのために、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 をサブクロニングし、N末端Hisタグ、続いて2つのヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメイン、次いで続いて3つの異なるTAA特異性アンキリン反復ドメイン(それぞれTAA3特異性、TAA2特異性及びTAA4特異性の順序で)、次いで続いて本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインの1つ(D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3) をコードするpQE30(Qiagen)発現ベクターの誘導体に上記のように発現させた。アンキリン反復ドメインを、配列番号31のリンカーなどのペプチドリンカーによって互いに連結させた。この六重特異性TCE分子は、2021年12月9日に出願された米国特許仮出願第63/265,184号により詳細に記載されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。そのような多重特異性TCEフォーマットでのD A R P i n (登録商標) プロテイン # 3 を、固形皮下腫瘍としてTAA2/TAA3/TAA4発現腫瘍細胞株(Molm-13)を有する末梢血単核細胞(PBMC)ヒト化マウスモデルにおいて試験し、臨床試験で本試験された既知のTAA3標的化T細胞エンゲージャと比較した。

【0239】

簡単に説明すると、インビボ実験を、6~9週齢の雌免疫不全NXGマウス(anvier Labsによって提供された)において実施した。マウスを、標準的な齧歯類マイクロアイソレーターケージ(20±1℃の室温、50±10%の相対湿度及び12時間の明暗サイクル)内の標準化環境条件下で維持した。マウスに、放射線照射食品及び床敷並びに0.22um濾過飲料水を与えた。全ての実験は、スイス動物保護法に従って州及び連邦の獣医学当局からの認可を受けて行った。

【0240】

NXGマウスにhPBMCを腹腔内注射した後、癌細胞の異種移植を行った。TAA2/TAA3/TAA4発現腫瘍細胞を、NXGマウスの右側腹部の皮下に(s.c.)異種移植した。2匹のhPBMCドナーを使用した。処置は、癌細胞移植の4日後に静脈内(i.v.)注射した。大部分の腫瘍はこの時点ではまだ確立されていなかった。処置は以下のように施した:

D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 (多重特異性TCEフォーマット) を、0.5mg/kgで、2週間、週に3回静脈注射で投与した。

ベンチマークTAA3標的化T細胞エンゲージャを、0.5mg/kgで2週間、毎日i.v.投与した。

【0241】

腫瘍サイズをキャリパー測定によって評価した。腫瘍体積は、以下の式を用いて計算し

10

20

30

40

50

た：腫瘍体積 (mm³) = 0.5 × 長さ × 幅²。

【0242】

図16 (A～B) に見られるように、多重特異性TCEフォーマットでのDARPin (登録商標) タンパク質#3は、実験の全期間にわたって (図16A)、及び最初の注射の17日後に (図16B)、腫瘍増殖及び腫瘍体積の阻害に関して良好な有効性を示した。この結果は、本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインをTAA特異的結合ドメイン及び半減期延長部分と組み合わせて、インビボでの抗腫瘍活性を有するT細胞エンゲージャ分子を形成することができることを更に実証した。したがって、そのようなTCE分子においてフォーマットされるとき、本発明のCD3特異性アンキリン反復ドメインは、インビボでCD3に結合し、T細胞を活性化するそれらの能力を維持する。

10

【0243】

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

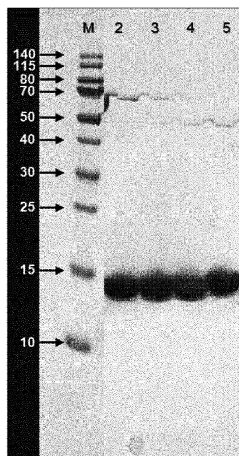
【0244】

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

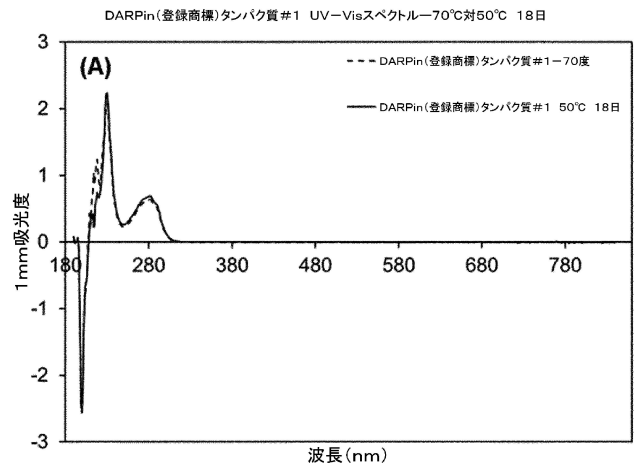
20

【図面】

【図1】



【図2A】

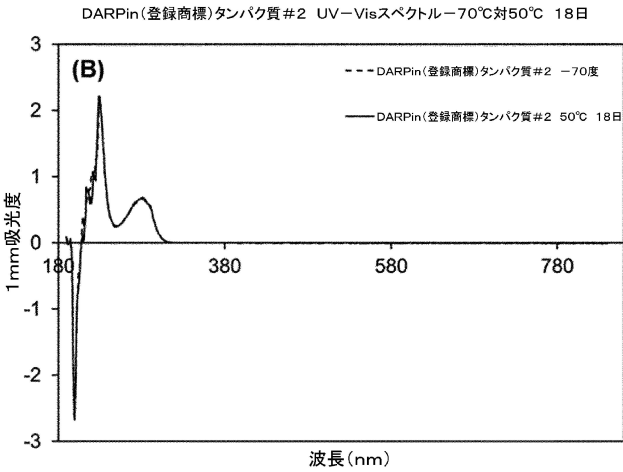


30

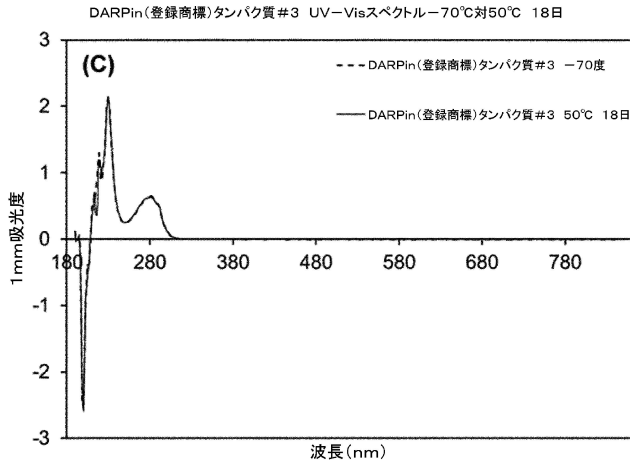
40

50

【図 2 B】

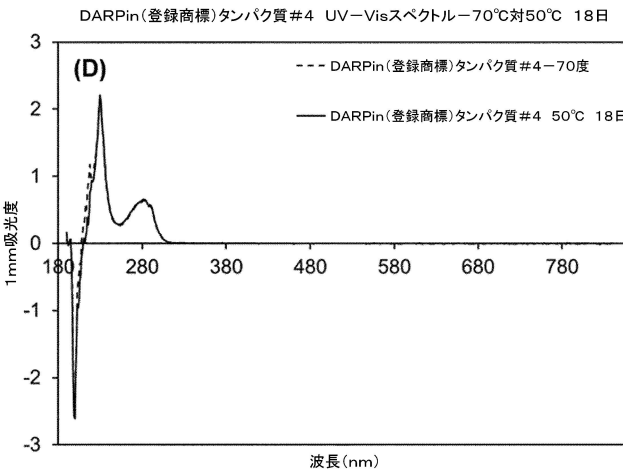


【図 2 C】

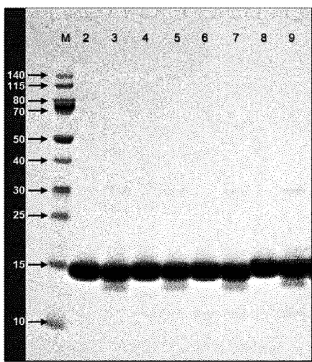


10

【図 2 D】



【図 3】



20

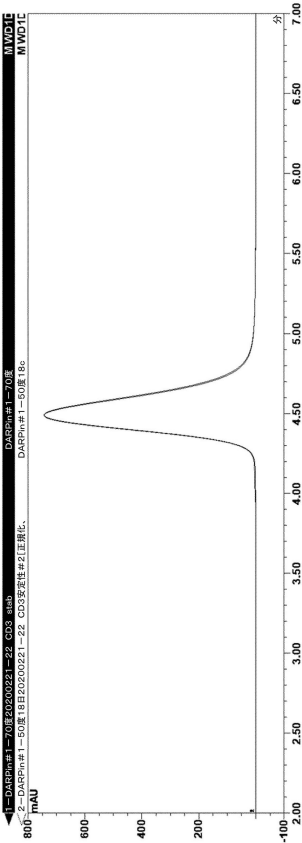
30

40

50

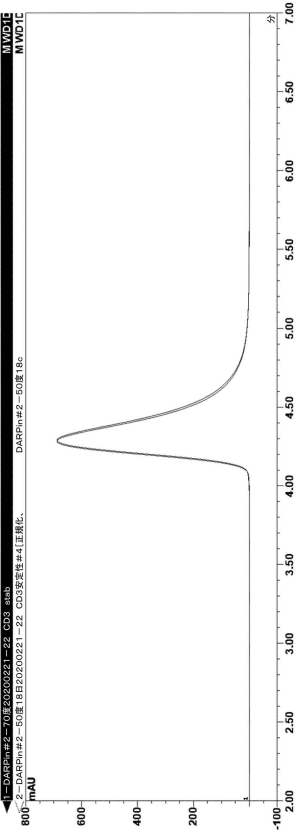
【図 4 A】

(A) DARPin(登録商標)タンパク質 #1



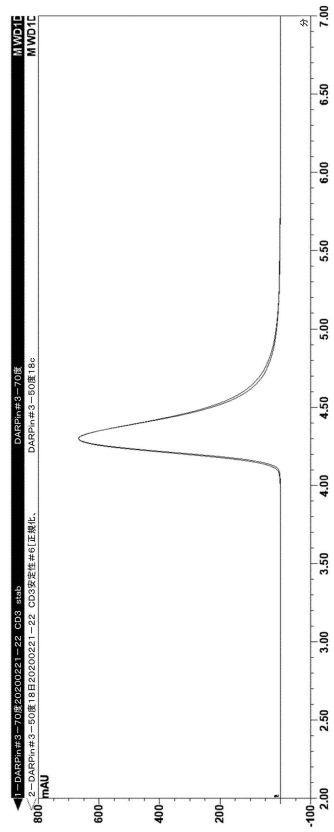
【図 4 B】

(B) DARPin(登録商標)タンパク質 #2



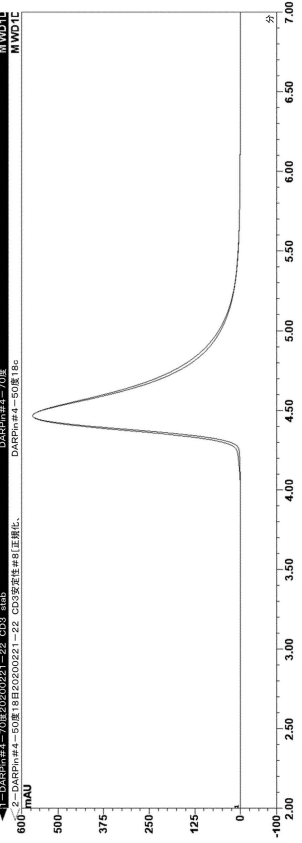
【図 4 C】

(C) DARPin(登録商標)タンパク質 #3



【図 4 D】

(D) DARPin(登録商標)タンパク質 #4



10

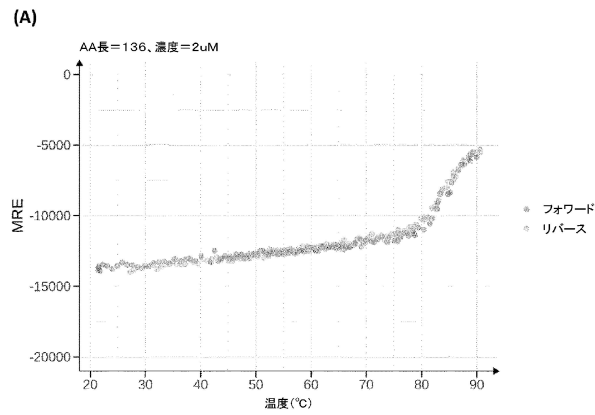
20

30

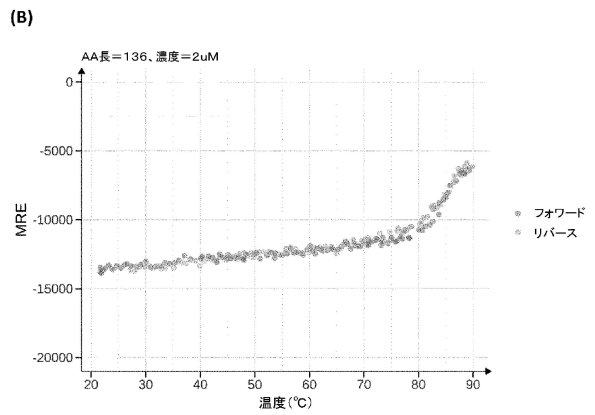
40

50

【図 5 A】

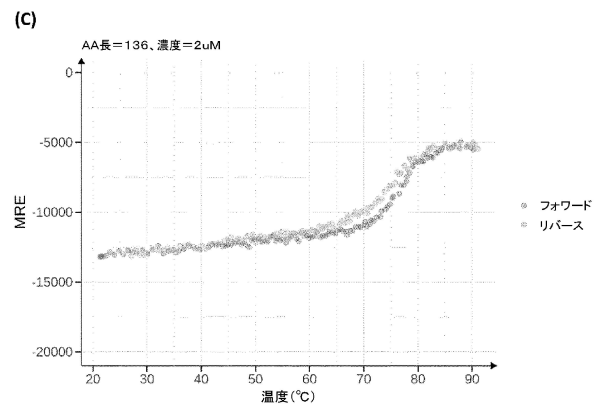


【図 5 B】

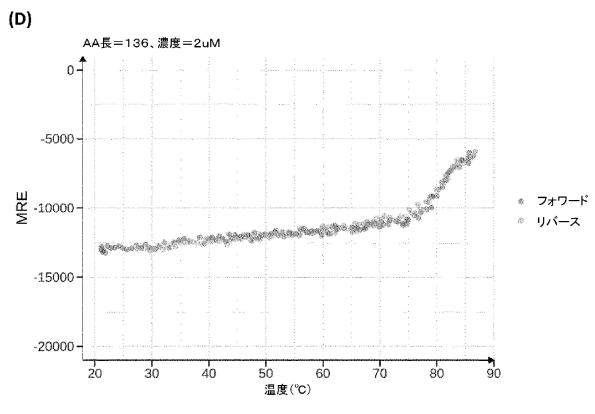


10

【図 5 C】

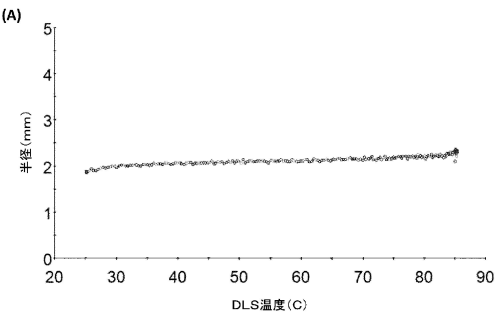


【図 5 D】

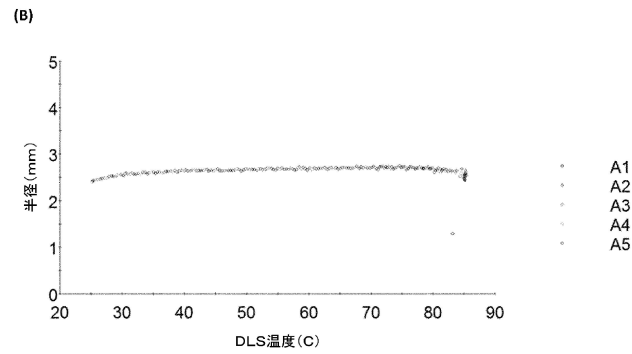


20

【図 6 A】



【図 6 B】

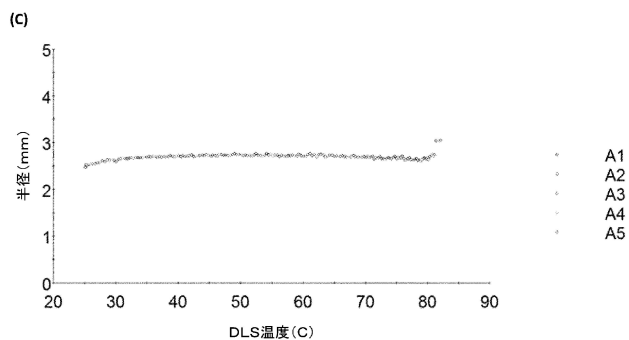


30

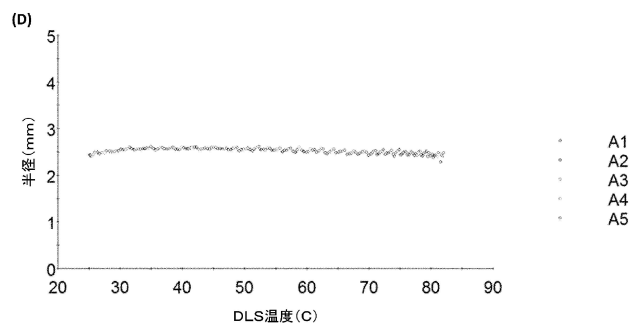
40

50

【図 6 C】

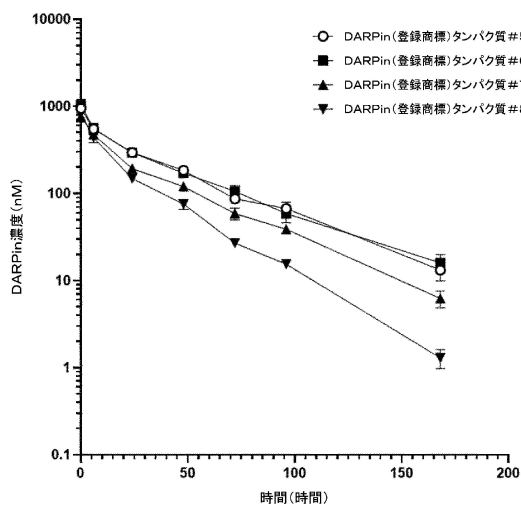


【図 6 D】

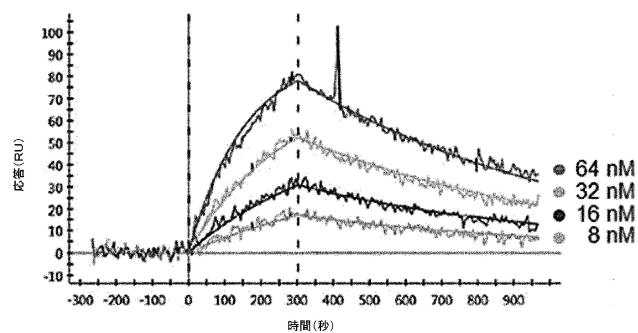


10

【図 7 A】

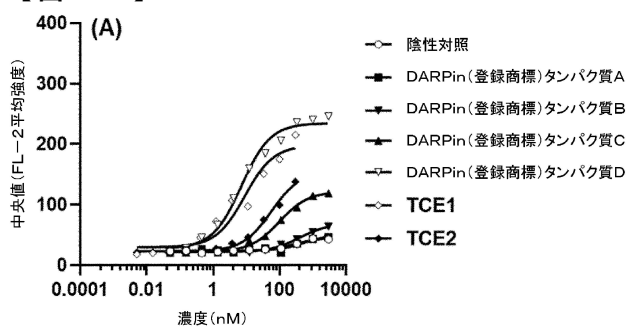


【図 7 B】

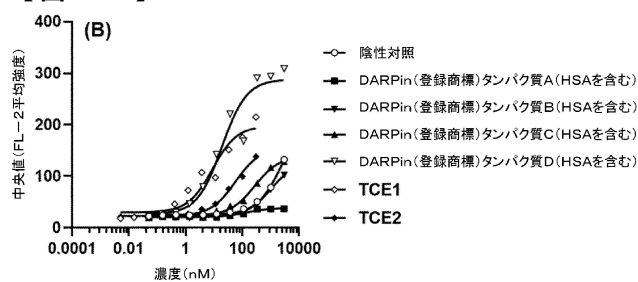


20

【図 8 A】



【図 8 B】

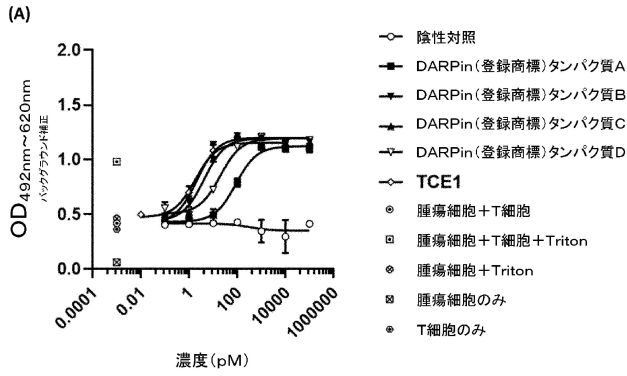


30

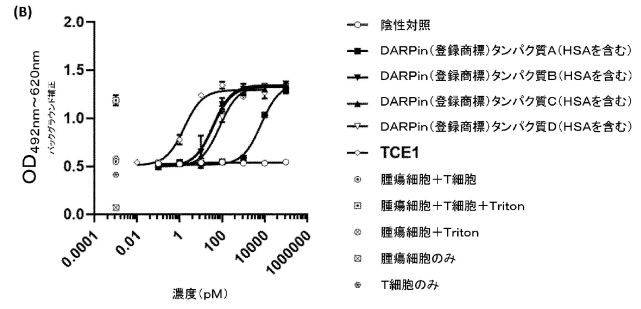
40

50

【図 9 A】

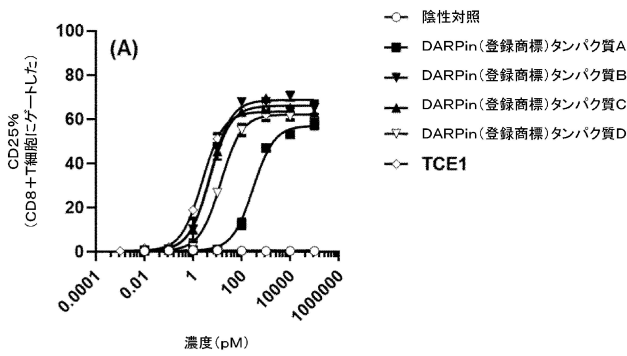


【図 9 B】

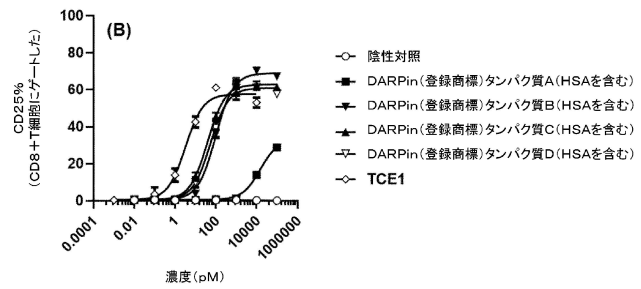


10

【図 10 A】

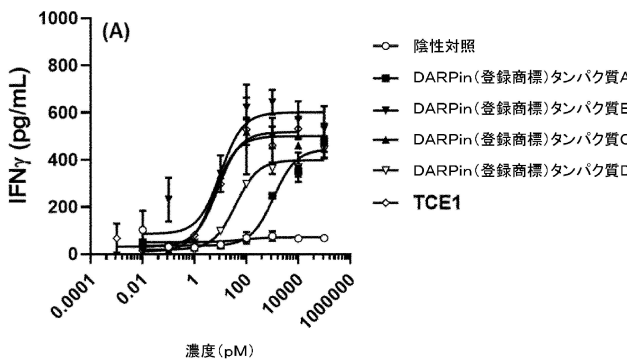


【図 10 B】

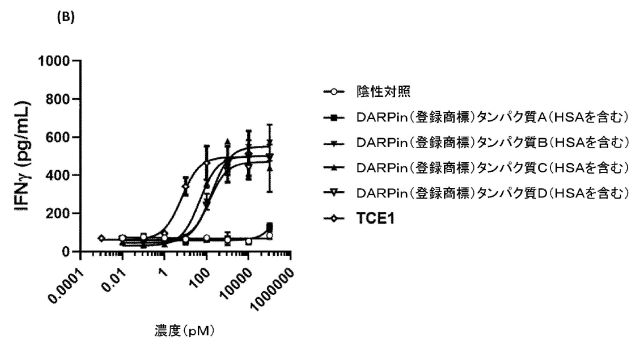


20

【図 11 A】



【図 11 B】



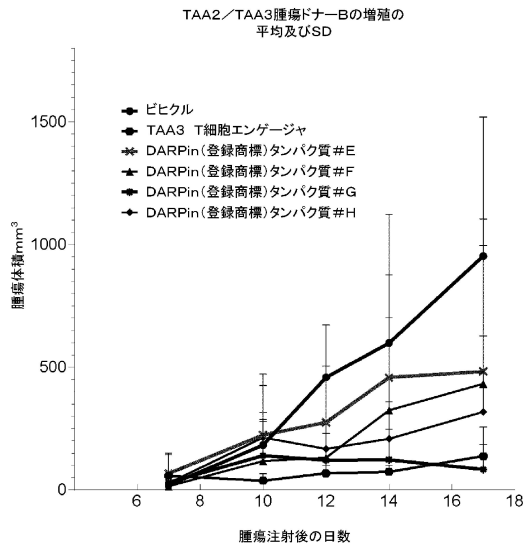
30

40

50

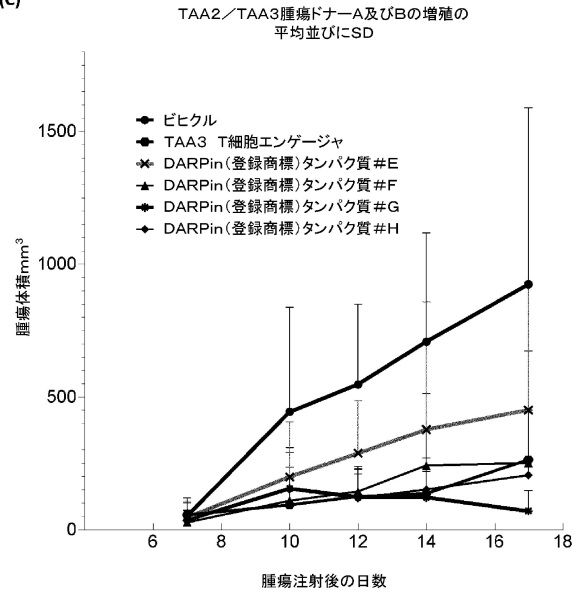
【図 15 B】

(B)



【図 15 C】

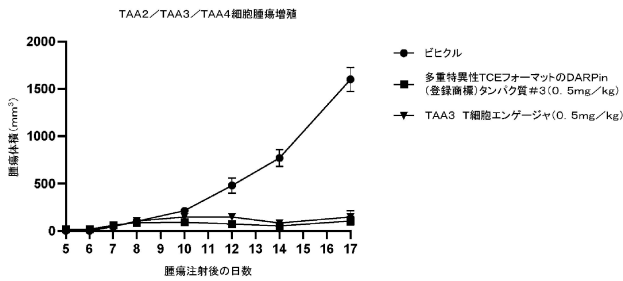
(C)



10

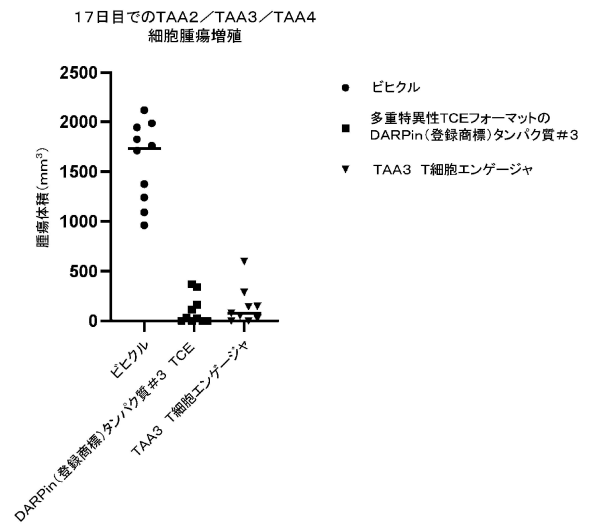
【図 16 A】

(A)



【図 16 B】

(B)



20

30

40

50

【配列表】

2023554379000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/42 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/30 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Molecular Partners: Pioneering a new class of drugs with a broad portfolio and global partnerships", , 1 November 2020 (2020-11-01), pages 1-36, XP055903556, Retrieved from the Internet: URL:https://investors.molecularpartners.co m/static-files/2bbb524d-477e-451a-afd4-1a9 12bbcf55 [retrieved on 2022-03-21] the whole document ----- -/--	1-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw 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 21 March 2022		Date of mailing of the international search report 29/03/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI HONG ET AL: "Highlights of 2019 Protein Engineering Summit (PEGS) in Boston, USA: Advancing Antibody-Based Cancer Therapies to the Clinic", ANTIBODY THERAPEUTICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB , vol. 2, no. 4 30 September 2019 (2019-09-30), pages 79-87, XP009525570, ISSN: 2516-4236, DOI: 10.1093/ABT/TBZ010 Retrieved from the Internet: URL:http://academic.oup.com/abt/article-pdf/2/4/79/35906262/tbz010.pdf [retrieved on 2019-12-03] page 5 of 9, bottom right -----	1-15
X,P	ELSHIATY MARIAM ET AL: "Principles and Current Clinical Landscape of Multispecific Antibodies against Cancer", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 22, no. 11, 26 May 2021 (2021-05-26), page 5632, XP055888110, Basel, CH ISSN: 1661-6596, DOI: 10.3390/ijms22115632 the whole document -----	1-15
A	CHRISTOPHER W. HELSEN ET AL: "The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 3 August 2018 (2018-08-03), XP055583660, DOI: 10.1038/s41467-018-05395-y figure 2a -----	1-15
A	US 2016/289285 A1 (BAKKER TALITHEA [CH] ET AL) 6 October 2016 (2016-10-06) sequences 18, 39, 26, 84 tables 4, 1 example 14 -----	1-15
A	BINZ H KASPAR ET AL: "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 22, no. 5, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 575-582, XP002343919, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT962 table 1 the whole document -----	1-15

1

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

page 2 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/086331

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/086331

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016289285 A1	06-10-2016	AU 2016240220 A1	19-10-2017
		AU 2020201264 A1	12-03-2020
		AU 2021286418 A1	20-01-2022
		BR 112017020986 A2	14-08-2018
		CA 2979602 A1	06-10-2016
		CL 2017002454 A1	25-05-2018
		CN 107454904 A	08-12-2017
		CO 2017009954 A2	20-02-2018
		EP 3277711 A1	07-02-2018
		HK 1244009 A1	27-07-2018
		IL 254788 A	30-09-2020
		JP 6552636 B2	31-07-2019
		JP 2018511327 A	26-04-2018
		KR 20170131515 A	29-11-2017
		MY 179505 A	09-11-2020
		NZ 735803 A	24-12-2021
		PH 12017501792 A1	21-01-2019
		RU 2017134456 A	03-04-2019
		SG 11201707606R A	30-10-2017
		US 9458211 B1	04-10-2016
		US 2016362453 A1	15-12-2016
		US 2019263869 A1	29-08-2019
		WO 2016156596 A1	06-10-2016

フロントページの続き

(51)国際特許分類 **F I** テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01) **A 6 1 P 35/00**

(32)優先日 令和3年4月30日(2021.4.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

リーレン ヴァーギシュトラッセ 14 モレキュラー パートナーズ アクチェンゲゼルシャフト内
 (72)発明者 ライヒェン クリスティアン
 スイス国 8952 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラッセ 14 モレキュラー パートナーズ アクチェンゲゼルシャフト内
 (72)発明者 シュレーレス ベルント
 スイス国 8952 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラッセ 14 モレキュラー パートナーズ アクチェンゲゼルシャフト内
 (72)発明者 レヴィツキー ヴィクトル
 スイス国 8952 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラッセ 14 モレキュラー パートナーズ アクチェンゲゼルシャフト内
 (72)発明者 ジャンバール ラウラ
 スイス国 8952 チューリッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラッセ 14 モレキュラー パートナーズ アクチェンゲゼルシャフト内

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA21 BA23 CA53 NA14 ZB26
 ZB32
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 CA40 EA20 FA74 GA21 GA26 GA45