

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-508969
(P2024-508969A)

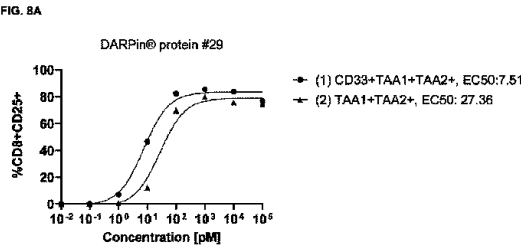
(43)公表日 令和6年2月28日(2024.2.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00		4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全60頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-554812(P2023-554812)	(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4年3月9日(2022.3.9)				
(85)翻訳文提出日	令和5年11月2日(2023.11.2)				
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/052120				
(87)国際公開番号	WO2022/190010	(74)代理人	100094569	弁理士 田中 伸一郎	
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)				
(31)優先権主張番号	63/158,539	(74)代理人	100103610		
(32)優先日	令和3年3月9日(2021.3.9)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109070	弁理士 ▲吉▼田 和彦	
(31)優先権主張番号	63/172,818				
(32)優先日	令和3年4月9日(2021.4.9)	(74)代理人	100119013		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/265,179	(74)代理人	100123777	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規のDARPinに基づくCD33エンゲージャ

(57)【要約】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、アンキリン反復ドメインがヒトCD33に対する結合特異性を有する、組換え結合タンパク質に関する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌、例えば急性骨髄性白血病（AML）などの疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、前記アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、前記アンキリン反復ドメインが、(1) 配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに(2) 配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける最大9個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質。

【請求項 2】

アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、前記アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、前記アンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質。

10

【請求項 3】

前記アンキリン反復ドメインが、PBS中のヒトCD33に、約100nM未満の解離定数(K_D)で、任意選択で約0.1nM～約100nMの間の K_D で結合する、請求項1又は2のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 4】

前記アンキリン反復ドメインが、約0.1nM～約10nMの範囲にわたる EC_{50} でヒトCD33に結合する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

20

【請求項 5】

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

【請求項 6】

前記免疫細胞がT細胞であり、免疫細胞上に発現される前記標的がCD3である、請求項5に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ヒトCD3に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、請求項5～7のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

30

【請求項 9】

免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ヒトCD3に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインであり、ヒトCD3に対する結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つと少なくとも85%アミノ酸配列同一性であるアミノ酸配列を含む、請求項5～7のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 10】

ヒトCD3に対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項9に記載の組換え結合タンパク質。

40

【請求項 11】

ヒトCD33に対する結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメイン、及び免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する前記結合部分が、ペプチドリンカーと共有結合している、請求項5～10のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 12】

前記ペプチドリンカーが、プロリントレオニンに富むペプチドリンカーである、請求項11に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項 13】

50

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

【請求項14】

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

【請求項15】

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

【請求項16】

ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号52～54のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項17】

ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する前記アンキリン反復ドメインが、配列番号52～54のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項11及び12に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項18】

前記結合タンパク質が、腫瘍細胞において発現される標的に対して結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含み、腫瘍細胞において発現される前記標的が、ヒトCD33とは異なる、請求項1～17のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質。

【請求項19】

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

【請求項20】

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

【請求項21】

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

【請求項22】

前記免疫細胞が、T細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

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

【請求項24】

前記医学的状態が、癌である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記医学的状態が、液性腫瘍を特徴とする癌である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記医学的状態が、白血病である、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記医学的状態が、急性骨髄性白血病である、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

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

【請求項29】

癌の治療に使用するための、任意選択では液性腫瘍を特徴とする癌の治療に使用するための、請求項1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、請求項19に記載の核酸、又は請求項20に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

前記癌が、白血病であり、任意選択では前記癌が、急性骨髄性白血病である、請求項 29 に記載の使用のための組換え結合タンパク質又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年3月9日に出願された米国特許仮出願第63/158,539号、2021年4月9日に出願された米国特許第63/172,818号、及び2021年12月9日に出願された米国特許出願第63/265,179号に対して優先権の利益を主張するものである。これら特許出願の開示は、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、ここで、アンキリン反復ドメインは、ヒトCD33に対する結合特異性を有する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌など、例えば急性骨髄性白血病（AML）、の疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。

20

【背景技術】

【0003】

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

【0004】

30

CD33は、AML芽細胞及び白血病性幹細胞の約80～90%で発現されるので、CD33は、癌、特にAMLの治療のための魅力的な標的である（Ehningerら、「Blood Cancer Journal」、第4巻、第e218、2014年）。CD33はまた、AML治療の標的として臨床的に検証されており、ここで、抗CD33抗体は、単剤療法として使用されるか、又は細胞傷害性剤とコンジュゲートされるかのいずれかである（Winer&Stone、「Ther Adv Hematol」；2019年；第10巻）。しかしながら、これらの薬物は、有意な有害作用又は低い有効性のいずれかを示している。例えば、細胞傷害性剤カリチアマイシンにコンジュゲートしたヒト化抗CD33モノクローナル抗体である、ゲムツズマブオゾガマイシンによる治療は、有意な血液学的及び肝毒性をもたらした。

40

【0005】

CAR-T細胞療法は、リンパ系悪性腫瘍の管理に強く影響してきたアプローチである。この技術をAMLにも適用することに大きな関心が寄せられているが、実際には、これは困難であることが証明されている。モノクローナル抗体に関して、CD33は、AMLにおけるCAR-T細胞療法のための最も有望な標的であると考えられている。しかしながら、このアプローチについての前臨床モデルは、非AML細胞に対して広範な副作用（オンターゲット／オフ腫瘍毒性）を示し、サイトカイン放出症候群（CRS）は、別の認識されている副作用である。

【0006】

二重特異性抗体を用いた腫瘍細胞のT細胞指向性殺傷は、AMLを含む様々な癌型の治

50

療に利用されている別の最近の治療ツールである。これらのT細胞エンゲージャ（TCE）二重特異性抗体は、2つの異なる可変領域を含み、一方はT細胞受容体複合体サブユニットCD3に結合し、他方は腫瘍細胞表面抗原に結合する。これらの2つの標的へのTCEの結合は、細胞間の機能的接続を提供し、T細胞活性化及び腫瘍細胞に対して細胞傷害活性をもたらす、正常なTCR-MHC相互作用を回避する（Ellerman、「Methods」；第154巻：第102～117頁（2019年））。AMG330は、AML細胞に対してT細胞の細胞障害性を引き起こすことができる、CD3及びCD33に対して二重特異性抗体である。

【0007】

しかしながら、多重特異性抗体療法及び二重特異性抗体療法の両方は、製造コストが高いことなどのいくつかの欠点を提示し、かつサイトカイン放出症候群（CRS）（Shimabukuro-Vornhagenら、「J Immunother Cancer」；第6巻（第1号）：第56頁（2018年）；Labrijnら、「Nat Rev Drug Discov」；第18巻（第8号）：第585～608頁（2019年））、及び／又はオンターゲット／オフ腫瘍毒性（Weinerら、「Cancer Res.」；第55巻（第20号）：第4586～4593頁（1995年）；Weinerら、「Cancer Immunol. Immunother.」；第42巻（第3号）：第141～150頁（1996年））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。抗体ベースのT細胞エンゲージャは、天然のTCR-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ら、「Pharmacol Ther」；第182巻：第161～75頁（2018年）；国際公開第2014/167022号；Junntilaら、「Cancer Res.」；第19巻：第5561～71頁（2014年）；Yangら、「J Immunol Aug.」；第15巻（第137号）：第1097～100頁（1986年））。この高い親和性は、T細胞活性化及び腫瘍細胞殺傷の点でより低い効率と相関している（Bortolottoら、「Eur. J. Immunol.」第32巻；第11号：3102～3107頁（2002年）；Ellerman、「Methods」；第154巻：第102～117頁（2019年）；Mandikianら、「Mol. Cancer Ther.」；第17巻（第4号）：第776頁、LP-785（2018年）；Vafaら、「Frontiers in Oncology」；第10巻：第446頁（2020年））。更に、TCEによって標的化される腫瘍表面マーカーのダウンレギュレーションは、TCE治療に対して腫瘍の耐性をもたらす得る。

【0008】

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

【0009】

したがって、有益な特性を有する新規のCD33特異的結合タンパク質が依然として必要とされている。そのような結合タンパク質は、AMLなどの癌を含む、疾患の治療及び特徴付けのための治療及び診断アプローチに有用であり得る。特に、癌細胞上のCD33を特異的に標的とするように機能することができ、かつ例えば1つ以上の結合部分などの他の官能性部分（functional moieties）と容易に組み合わせることもまたできる、新しいCD33特異的結合タンパク質が必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、ここで、アンキリン反復ドメインは、ヒトCD33に対する結合特異性を有する。くわえて、本発明は、そのような組換え結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及びそのような結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の、癌など、例

例えば急性骨髄性白血病（AML）、の疾患を治療又は診断するための方法における、ヒトを含む哺乳動物での使用に関する。

【0011】

本発明の組換え結合タンパク質は、腫瘍関連抗原（TAA）CD33に特異的に結合するか、又は腫瘍関連抗原（TAA）CD33を標的とする。本発明のそのような結合タンパク質は、新しい治療剤又は診断剤を生成するためのツール又は構成要素として役立ち得る。本明細書中には、CD33特異的アンキリン反復ドメインが1つの分子中の1つ以上他の官能性部分と組み合わせられる、組換え結合タンパク質もまた開示される。そのような他の官能性部分には、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する結合部分、半減期延長部分、別の腫瘍関連抗原に対する結合特異性を有する結合部分、及び／又は細胞傷害性剤が含まれる。したがって、CD33に対する結合特異性を有する本発明の組換え結合タンパク質は、現在の治療様式と比較して改善された毒性プロファイル及び／又は治療濃度域を提供し得る、新規治療分子の生成に有用である。

10

【0012】

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

【0013】

1. 一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインは、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、（1）配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに（2）配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける最大9個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0014】

2. 第2の実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

30

【0015】

3. 第3の実施形態では、本発明は、当該アンキリン反復ドメインが、PBS中のヒトCD33に、約100nM未満の解離定数（ K_D ）で、任意選択で約0.1nM～約100nMの間の K_D で結合する、実施形態1又は2のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0016】

4. 第4の実施形態では、本発明は、当該アンキリン反復ドメインが、約0.1nM～約10nMの範囲にわたるEC₅₀でヒトCD33に結合する、実施形態1～3のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

40

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

7. 第7の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、アンキリン反復ドメインである、実施形態5～6のいずれか一

50

項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0020】

8. 第8の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ヒトCD3に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、実施形態5～7のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0021】

9. 第9の実施形態では、本発明は、免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ヒトCD3に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインであり、ヒトCD3に対する結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つと少なくとも85%アミノ酸配列同一性であるアミノ酸配列を含む、実施形態5～7のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

10

【0022】

10. 第10の実施形態では、本発明は、ヒト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55～59のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態9に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0023】

11. 第11の実施形態では、本発明は、ヒトCD33に対する結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメイン、及び免疫細胞上に発現される標的に対する結合特異性を有する当該結合部分が、ペプチドリンカーと共有結合している、実施形態5～10のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

20

【0024】

12. 第12の実施形態では、本発明は、当該ペプチドリンカーが、プロリントレオニンに富むペプチドリンカーである、実施形態11に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0025】

13. 第13の実施形態では、本発明は、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1～50個のアミノ酸の長さを有する、実施形態11又は12に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0026】

14. 第14の実施形態では、本発明は、当該結合タンパク質が、半減期延長部分を含む、実施形態1～13のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

30

【0027】

15. 第15の実施形態では、本発明は、当該半減期延長部分が、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有するアンキリン反復ドメインである、実施形態14に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0028】

16. 第16の実施形態では、本発明は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号52～54のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む、実施形態15に記載の組換え結合タンパク質に関する。

40

【0029】

17. 第17の実施形態では、本発明は、ヒト血清アルブミンに対して結合特異性を有する当該アンキリン反復ドメインが、配列番号52～54のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態15及び16に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0030】

18. 第18の実施形態では、本発明は、当該結合タンパク質が、腫瘍細胞において発現される標的に対して結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含み、腫瘍細胞において発現される当該標的が、ヒトCD33とは異なる、実施形態1～17のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質に関する。

【0031】

50

19. 第19の実施形態では、本発明は、実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質をコードする核酸に関する。

【0032】

20. 第20の実施形態では、本発明は、実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質又は実施形態19に記載の核酸、並びに薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤を含む、医薬組成物に関する。

【0033】

21. 第21の実施形態では、本発明は、ヒト患者の腫瘍組織における免疫細胞活性化の方法であって、実施形態1～18のいずれか一項に記載の組換え結合タンパク質、実施形態19に記載の核酸、又は実施形態20に記載の医薬組成物を、当該患者へ投与する工程を含む、方法に関する。

【0034】

22. 第22の実施形態では、本発明は、当該免疫細胞が、T細胞である、実施形態21に記載の方法に関する。

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1A】ヒトCD33に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴（SPR）分析。図1A. D A R P i n（登録商標）タンパク質#29のSPR分析；図1B. D A R P i n（登録商標）タンパク質#30のSPR分析。様々な濃度の精製されたアンキリン反復タンパク質を、オン速度及びオフ速度測定のために不動化したヒトCD3

10

20

30

40

50

3を有するGLCチップに適用した。得られたSPRトレース分析を使用して、アンキリン反復タンパク質のCD33に対する結合を分析し、決定した。RU、共鳴単位；s、時間（秒）。

【図1B】ヒトCD33に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴（SPR）分析。図1A．DARPin（登録商標）タンパク質#29のSPR分析；図1B．DARPin（登録商標）タンパク質#30のSPR分析。様々な濃度の精製されたアンキリン反復タンパク質を、オン速度及びオフ速度測定のために不動化したヒトCD33を有するGLCチップに適用した。得られたSPRトレース分析を使用して、アンキリン反復タンパク質のCD33に対する結合を分析し、決定した。RU、共鳴単位；s、時間（秒）。

10

【図2】CD33発現腫瘍細胞への本発明の例示的な結合タンパク質の結合。DARPin（登録商標）タンパク質#2、DARPin（登録商標）タンパク質#29、及びDARPin（登録商標）タンパク質#30（全て単一ドメインフォーマット）の濃度依存性結合曲線を示す。

【図3】活性化マーカーCD25によって決定される短期T細胞活性化である。汎Tエフェクター細胞及びMolm-13標的細胞を、5：1のE：T比でインキュベートし、T細胞活性化を、示された分子の段階希釈物の存在下での24時間の共培養後に、FACSによって評価した。活性化したT細胞を、生存CD8+／CD25+細胞としてゲーティングした。選択されたアンキリン反復タンパク質DARPin（登録商標）タンパク質#33、DARPin（登録商標）タンパク質#31、及びDARPin（登録商標）タンパク質#32によって誘導される、T細胞活性化を示す。

20

【図4】LDH放出を測定する細胞傷害性アッセイによって評価した腫瘍細胞殺傷。汎Tエフェクター細胞及びMolm-13標的細胞を、5：1のE：T比でインキュベートし、腫瘍細胞殺傷を、示された分子の段階希釈物の存在下での24時間の共培養後に、FACSによって評価した。DARPin（登録商標）タンパク質#33、DARPin（登録商標）タンパク質#31、及びDARPin（登録商標）タンパク質#32によって引き起こされるT細胞による、腫瘍細胞殺傷を示す。

【図5】HTRFによって決定された全長及び切断型CD33標的へのCD33特異的アンキリン反復タンパク質の結合。試験した3つ全てのアンキリン反復タンパク質、DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、又はDARPin（登録商標）タンパク質#14は、全長CD33に結合するが、DARPin（登録商標）タンパク質#9のみが切断型CD33に結合する。シグナルを百分率で示す（バックグラウンド補正し、各タンパク質について観察された最大HTRFシグナルに対して正規化した）。A．U．におけるHTRFシグナルを番号として示す。

30

【図6】結合競合ELISA。ビオチン化ヒトCD33標的を、競合物質（DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、又はDARPin（登録商標）タンパク質#14）の有無にかかわらずプレインキュベートした。その後、結合標的を不動化AMG330に対して試験した。DARPin（登録商標）タンパク質#1については、AMG330との部分的競合が観察された。DARPin（登録商標）タンパク質#14はAMG330との完全な競合を示すが、一方で、DARPin（登録商標）タンパク質#9はAMG330との競合を示さない。

40

【図7A】図7A．hPBMCを腹腔内注射し、hPBMC注射の2日後にMOLM-13腫瘍細胞を皮下異種移植し、かつ、PBS 1×（黒丸）又は0.5mg/kgのマルチドメインフォーマットでのDARPin（登録商標）タンパク質#29（黒四角）で処理した、マウス（ドナー当たりn=5マウス／使用した2匹のhPBMCドナー）における経時的な腫瘍増殖。腫瘍細胞異種移植の4日後に処置を開始した。データを平均±SEMで表示する。図7B．図7Aに記載されるマウスにおける腫瘍細胞異種移植の17日後の腫瘍体積の評価。

【図7B】図7A．hPBMCを腹腔内注射し、hPBMC注射の2日後にMOLM-13腫瘍細胞を皮下異種移植し、かつ、PBS 1×（黒丸）又は0.5mg/kgのマル

50

チドメインフォーマットでのDARPin（登録商標）タンパク質#29（黒四角）で処理した、マウス（ドナー当たりn=5マウス／使用した2匹のhPBMCDナー）における経時的な腫瘍増殖。腫瘍細胞異種移植の4日後に処置を開始した。データを平均+SEMで表示する。図7B．図7Aに記載されるマウスにおける腫瘍細胞異種移植の17日後の腫瘍体積の評価。

【図8A】図8A．野生型又はCD33ノックアウトMolm-13腫瘍細胞を用いたマルチドメインフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#29の効力滴定曲線（T細胞活性化）。EC50値をpMで示す。図8B．野生型又はCD33ノックアウトMolm-13腫瘍細胞を用いたマルチドメインフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#30の効力滴定曲線（T細胞活性化）。EC50値をpMで示す。

【図8B】図8A．野生型又はCD33ノックアウトMolm-13腫瘍細胞を用いたマルチドメインフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#29の効力滴定曲線（T細胞活性化）。EC50値をpMで示す。図8B．野生型又はCD33ノックアウトMolm-13腫瘍細胞を用いたマルチドメインフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#30の効力滴定曲線（T細胞活性化）。EC50値をpMで示す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

本明細書では、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質が開示され、ここで、当該アンキリン反復ドメインは、ヒトCD33に対する結合特異性を有する。組換え結合タンパク質をコードする核酸、結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物、及び結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物を用いる方法もまた開示される。

【0045】

アンキリン反復ドメイン

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

【0046】

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

【0047】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー（国際公開第2002／020565号、Binz et 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。設計アンキリン反復タンパク質は、モノクローナル抗体の限界を克服する可能性を有する結合分子のクラスであり、したがって新規な治療的アプローチを可能にする。そのようなアンキリン反復タンパク質は、単一の設計アンキリン反復ドメインを含んでもよく、又は同じ若しくは異なる標的特異性を有する2つ以上の設計アンキリン反復ドメインの組合せを含んでもよい（Stumpp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反復タンパク質は、高い親和性

及び特異性で所与の標的タンパク質に結合するように選択され得る小タンパク質（14 kDa）である。これらの特徴、及び1つのタンパク質中の2つ以上の設計アンキリン反復ドメインを組み合わせる可能性は、設計アンキリン反復タンパク質を、理想的なアゴニスト、拮抗薬及び／又は阻害薬候補にする。更に、そのようなアンキリン反復タンパク質は、様々なエフェクター機能、例えば細胞傷害性剤又は半減期延長剤を担持し、完全に新しい薬物フォーマットを可能にするように操作することができる。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

上記のように、CD33は、特定の癌の治療、特にAMLの治療のための魅力的な治療標的である。本明細書中に記載される組換え結合タンパク質は、ヒトCD33に特異的に結合するアンキリン反復ドメイン及びアンキリン反復モジュールを含む。

【0051】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、（1）配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに（2）配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける最大9個までのアミノ酸が別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0052】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、（1）配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに（2）配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、アンキリン反復モジュールを含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0053】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号29～51及び配列番号79～81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。

【0054】

別の実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0055】

更なる実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0056】

10

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0057】

20

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号2と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0058】

30

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号3と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0059】

40

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号4と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0060】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号5と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約8

50

9 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0061】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号6と、少なくとも約85 %のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86 %、少なくとも約87 %、少なくとも約88 %、少なくとも約89 %、少なくとも約90 %、少なくとも約91 %、少なくとも約92 %、少なくとも約93 %、少なくとも約94 %、少なくとも約95 %、少なくとも約96 %、少なくとも約97 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %、又は100 %などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【0062】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号7と、少なくとも約85 %のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86 %、少なくとも約87 %、少なくとも約88 %、少なくとも約89 %、少なくとも約90 %、少なくとも約91 %、少なくとも約92 %、少なくとも約93 %、少なくとも約94 %、少なくとも約95 %、少なくとも約96 %、少なくとも約97 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %、又は100 %などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0063】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号8と、少なくとも約85 %のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86 %、少なくとも約87 %、少なくとも約88 %、少なくとも約89 %、少なくとも約90 %、少なくとも約91 %、少なくとも約92 %、少なくとも約93 %、少なくとも約94 %、少なくとも約95 %、少なくとも約96 %、少なくとも約97 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %、又は100 %などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

30

【0064】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号9と、少なくとも約85 %のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86 %、少なくとも約87 %、少なくとも約88 %、少なくとも約89 %、少なくとも約90 %、少なくとも約91 %、少なくとも約92 %、少なくとも約93 %、少なくとも約94 %、少なくとも約95 %、少なくとも約96 %、少なくとも約97 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %、又は100 %などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

40

【0065】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号10と、少なくとも約85 %のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86 %、少なくとも約87 %、少なくとも約88 %、少なくとも約89 %、少なくとも約90 %、少なくとも約91 %、少なくとも約92 %、少なくとも約93 %、少なくとも約94 %、少なくとも約95 %、少なくとも約96 %、少なくとも約97 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %、又は100 %などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0066】

50

10

20

30

40

50

50

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号16と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約

93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0072】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号77と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【0073】

一実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号78と、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0074】

更なる実施形態では、本発明は、アンキリン反復ドメインを含む組換え結合タンパク質であって、当該アンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該アンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0075】

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

30

【0076】

抗体は、抗体又は免疫グロブリン分子に由来する抗原結合ドメインを含む任意のポリペプチド又はタンパク質を含む。抗原結合ドメインは、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及び単一ドメイン抗体、例えば、重鎖可変ドメイン（VH）、軽鎖可変ドメイン（VL）、及び例えば、ヒト又はラクダ科動物起源の可変ドメイン（VHH）に由来し得る。いくつかの例では、抗原結合ドメインが、結合部分が最終的に使用されるのと同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトにおける使用のために、本明細書に記載の結合部分の抗原結合ドメインが、ヒト又はヒト化抗原結合ドメインを含むことは有益であり得る。抗体は、当該技術分野で周知の技術を用いて得ることができる。

40

【0077】

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

【0078】

一実施形態では、免疫細胞上に発現する標的に対する結合特異性を有する結合部分は、ラクダ科ナノボディーである。ラクダ科ナノボディー（ラクダ科単一ドメイン抗体又はVHHとしても知られる）は、ラマ、ラクダ、及びアルパカなどの哺乳動物のラクダ科に由

50

来する。他の抗体とは異なり、ラクダ科抗体は軽鎖を欠き、2つの同一の重鎖から構成される。ラクダ科抗体は、典型的には、約15 kDaの領域の比較的低い分子量を有する。

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

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

【0082】

アドネクチンは、元々はヒトフィブロネクチンIII型タンパク質（10Fn3）の10番目の細胞外ドメインに由来する。フィブロネクチンIII型ドメインは、7又は8個のβ鎖を有し、これらは2つのβシートの中に分布しており、βシート自体が互いにパッキングしてタンパク質のコアを形成し、更にループ（CDRに類似）を含み、ループはベータ鎖を互いに接続し、溶媒が露出している。βシートサンドイッチの各縁部には少なくとも3つのそのようなループが存在し、縁部は、β鎖の方向に垂直なタンパク質の境界である（米国特許第6818418号を参照されたい）。この構造のために、この非抗体足場は、抗体の抗原結合特性の性質及び親和性に類似した抗原結合特性を模倣する。これらの足場は、インビボでの抗体の親和性成熟のプロセスに類似するインビトロでのループ無作為化及びシャッフリング手法において使用することができる。

【0083】

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

【0084】

アフィリンは、構造的にヒトユビキチンに由来する（歴史的にはγ-Bクリスタリンにも由来する）合成抗体模倣物である。アフィリンは、主にβシート構造及び約20 kDa

10

20

30

40

50

の総分子量を有する2つの同一のドメインからなる。アフィリンは、修飾に好適ないくつかの表面露出したアミノ酸を含有する。アフィリンは、抗原に対する親和性及び特異性において抗体に似ているが、構造においては似ていない。

【0085】

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

【0086】

アフィチンは、特異的結合親和性を得るように操作されたDNA結合タンパク質 Sac 7dのバリエーションである。Sac 7dは、元々は超好熱菌古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* に由来し、DNAと結合してその熱変性を防止する。アフィチンは、商業的には Nanofitin として知られている。

【0087】

アルファボディーは、様々な抗原に結合するように操作された小さな(約10kDa)タンパク質であり、したがって抗体模倣物である。アルファボディー足場は、コイルドコイル構造に基づいてコンピュータで設計される。標準的なアルファボディー足場は、高グリシン/セリンリンカーを介して連結された、各々4つのヘプタッド反復(7残基のストレッチ)から構成される3つの α ヘリックスを含有する。標準的なヘプタッド配列は、「IAAIQKQ」である。細胞外及び細胞内タンパク質を標的とするアルファボディーの能力は、それらの高い結合親和性と組み合わせて、抗体では到達することができない標的にそれらが結合することを可能にし得る。

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

アビマーは、HER3などの天然のAドメイン含有タンパク質に由来し、アミノ酸リンカーを介して連結された多数の異なる「Aドメイン」モノマー(2~10)からなる。例えば、米国特許出願公開第2004/0175756号、同第2005/0053973号、同第2005/0048512号、及び同第2006/0008844号に記載される方法論を使用して、標的抗原に結合することができるアビマーを作製することができる。

【0092】

フィノマーは、ヒトFynチロシンキナーゼのSrc相同ドメイン3(SH3)のアミノ酸83~145から進化した小さな球状タンパク質(約7kDa)である。フィノマーは、その高い熱安定性、システインを含まない足場、及びヒト起源により、潜在的な免疫

10

20

30

40

50

原性を低減する、魅力的な結合分子である。

【0093】

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

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

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

【0097】

当該免疫細胞上に発現される標的の性質には、特に制限はない。一実施形態では、標的は、T細胞である免疫細胞上に発現され、当該免疫細胞上に発現される標的は、CD3である。

【0098】

したがって、好ましい実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1)配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに(2)配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換されている配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、CD3、より好ましくはヒトCD3に対する結合特異性を有する、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0099】

別の実施形態では、本発明は、(i)第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1)配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに(2)配列番号29～51及び配列番号79～81のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換される配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii)第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0100】

更なる実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号29～51及び配列番号79～81からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対して結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【0101】

別の実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、(1) 配列番号29～51及び配列番号79～81、並びに(2) 配列番号29～51のいずれかにおける、最大9個まで、最大8個まで、最大7個まで、最大6個まで、最大5個まで、最大4個まで、最大3個まで、最大2個まで、又は最大1個までのアミノ酸が、別のアミノ酸によって置換される配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0102】

別の実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号29～51及び配列番号79～81からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD3に対する結合特異性を有し、当該第2のアンキリン反復ドメインが、配列番号55～59のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

30

【0103】

好ましい実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、CD3、より好ましくはヒトCD3に対する結合特異性を有する、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

40

【0104】

別の実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該第1のアンキリン反復ドメインが、配列番号1～16及び配列番号77～78のいずれか1つと、

50

少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第 1 のアンキリン反復ドメインと、(i i) 第 2 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対して結合特異性を有し、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 55 ~ 59 のいずれか 1 つと、少なくとも約 85 % の配列同一性、例えば、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第 2 のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【0105】

一実施形態では、本発明は、(i) 第 1 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対して結合特異性を有し、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 1 ~ 16 及び配列番号 77 ~ 78 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、第 1 のアンキリン反復ドメインと、(i i) 第 2 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対して結合特異性を有し、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 55 ~ 59 のいずれか 1 つと、少なくとも約 85 % の配列同一性、例えば、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第 2 のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0106】

一実施形態では、本発明は、(i) 第 1 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対して結合特異性を有し、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 1 ~ 16 及び配列番号 77 ~ 78 のいずれか 1 つと、少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第 1 のアンキリン反復ドメインと、(i i) 第 2 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対する結合特異性を有し、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 55 ~ 59 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、第 2 のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

30

40

【0107】

更なる実施形態では、本発明は、(i) 第 1 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対して結合特異性を有し、当該第 1 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 1 ~ 16 及び配列番号 77 ~ 78 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、第 1 のアンキリン反復ドメインと、(i i) 第 2 のアンキリン反復ドメインであって、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、ヒト CD3 に対する結合特異性を有し、当該第 2 のアンキリン反復ドメインが、配列番号 55 ~ 59 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、第 2 のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

【0108】

50

本発明は、更に、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有する、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対して結合特異性を有し、当該組換え結合タンパク質が、配列番号17～28及び配列番号82～84のいずれか1つと、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、例えば、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%などのアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

10

【0109】

一実施形態では、本発明は、(i) 第1のアンキリン反復ドメインであって、当該第1のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対する結合特異性を有する、第1のアンキリン反復ドメインと、(ii) 第2のアンキリン反復ドメインであって、当該第2のアンキリン反復ドメインが、ヒトCD33に対する結合特異性を有し、当該組換え結合タンパク質が、配列番号17～28及び配列82～84のいずれか1つと少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、第2のアンキリン反復ドメインと、を含む、組換え結合タンパク質に関する。

20

【0110】

半減期延長部分

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

【0111】

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

30

【0112】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、結合部分のアンキリン反復ドメインが、配列番号52～54のいずれか1つと、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は約100%同一であるアミノ酸配列を含む、血清アルブミン特異性アンキリン反復ドメインを含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号52～54のいずれか1つと少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号53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

40

50

%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、本明細書に記載の半減期延長部分は、配列番号53と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0113】

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

【0114】

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

【0115】

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

【0116】

腫瘍関連抗原に対する結合特異性を有する更なる結合部分

更なる態様では、本発明は、CD33とは異なる腫瘍関連抗原(TAA)に対する結合特異性を有する少なくとも1つの結合部分を更に含む、上記の組換え結合タンパク質に関する。一実施形態では、CD33とは異なる当該1つ以上のTAAは、同じ癌に由来する細胞においてCD33と同時発現されるTAAである。更なる実施形態では、CD33とは異なる当該1つ以上のTAAは、液性腫瘍を特徴とする癌において、CD33と同時発現するTAAである。好ましい実施形態では、CD33とは異なる当該1つ以上のTAAは、白血病においてCD33と同時発現されるTAA、例えば、AML癌細胞においてCD33と同時発現されるTAAなどである。本発明における使用のための、CD33とは異なる腫瘍関連抗原(TAA)に対する結合特異性を有する結合部分の例としては、抗体、代替足場、及びポリペプチドが挙げられる。AML癌細胞で発現されるTAAを含む、多くのTAAが当技術分野で公知である。

【0117】

置換

いくつかの実施形態では、配列番号29~51及び配列番号79~81の配列に対する本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復モジュールにおいて、9個以上はなく(no more 9)、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、又は1個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号29~

10

20

30

40

50

51及び配列番号79～81の配列に対して、5個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号29～51及び配列番号79～81の配列に対して、4個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号29～51及び配列番号79～81の配列に対して、3個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号29～51及び配列番号79～81の配列に対して、2個以下の置換が行われる。いくつかの実施形態では、配列番号29～51及び配列番号79～81の配列に対して、1個以下の置換が行われる。

【0118】

いくつかの実施形態では、本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列の15%以下 (no more 15%)、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下、10%以下、9%以下、8%以下、又は7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、又は1%以下が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変されている。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の10%以下 (no more 10%) が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の8%以下 (no more 8%) が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の6%以下 (no more 6%) が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の4%以下 (no more 4%) が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変される。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列の2%以下 (no more 2%) が、配列番号1～16及び配列番号77～78の配列に対する置換によって改変される。

【0119】

いくつかの態様では、結合剤に対して行われるアミノ酸置換 (複数可) は、非置換結合剤の K_D 値と比較して、 K_D 値を約1000倍超、約100倍超、又は約10倍超変化させない。例えば、いくつかの態様では、アミノ酸置換 (複数可) は、配列番号1～16、配列番号29～51、配列番号77～81の配列のいずれかを含む結合剤のCD33に対する K_D 値と比較して、 K_D 値を約1000倍超、約300倍超、約100倍超、約50倍超、約25倍超、約10倍超、又は約5倍超変化させない。

【0120】

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

【0121】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 : アミノ酸置換

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

10

20

【0122】

特定の実施形態では、置換は、アンキリン反復ドメインの構造的コア残基内で行われる。他の実施形態では、置換は、アンキリン反復ドメインの構造的コア残基の外側で行われる。例示としては、アンキリンドメインは、コンセンサス配列：x D x x G x T P L H L A x x x G x x x L V x V L L x x G A D V N A（配列番号62）を含んでもよく、式中、「x」は、任意のアミノ酸（好ましくはシステイン、グリシン、又はプロリンではない）を表し、又はx D x x G x T P L H L A A x x G H L E I V E V L L K z G A D V N A（配列番号63）を含んでもよく、式中、「x」は、任意のアミノ酸（好ましくはシステイン、グリシン、若しくはプロリンではない）を表し、「z」は、アスパラギン、ヒスチジン、又はチロシンからなる群から選択される。一実施形態では、置換は、「x」として指定される残基に対して行われる。別の実施形態では、置換は、「x」として指定されない残基に対して行われる。

30

【0123】

くわえて、本発明の組換え結合タンパク質の任意のアンキリン反復ドメインの最後から2番目の位置は、「A」若しくは「L」であり得、かつ／又は最後の位置は、「A」若しくは「N」であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～16、配列番号52～59、及び配列番号77～78うちのいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、任意選択的には、最後から2番目の位置のAはLで置換され、かつ／若しくは最後の位置のAはNで置換されており、又は任意選択的には、最後から2番目の位置のLはAで置換されており、かつ／若しくは最後の位置のNはAで置換されている。例示的な実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～16、配列番号52

40

50

～58、及び配列番号77～78のいずれかと少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択的には、最後から2番目の位置のAはLで置換されており、かつ／又は最後の位置のAはNで置換されている。更に、本発明の結合タンパク質に含まれる任意のアンキリン反復ドメインの配列は、任意選択で、そのN末端でG、S、又はGSを含んでもよい（以下を参照されたい）。

【0124】

くわえて、本発明の組換え結合タンパク質に含まれる各アンキリン反復ドメインは、任意選択で、そのN末端に「G」、「S」、又は「GS」配列を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、各アンキリン反復ドメインは、配列番号1～16、配列番号52～59、及び配列番号77～78のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含み、更に、そのN末端にGS（例えば、配列番号64におけるように）を含むか、又はGSの代わりにG若しくはSのみを含む。

【0125】

結合親和性

特定の実施形態では、組換え結合タンパク質とその標的（すなわち、ヒトCD33）との間の親和性は、 K_D に関して記載されている。例示的な実施形態では、 K_D は、約 $10^{-1}M$ 以下、約 $10^{-2}M$ 以下、約 $10^{-3}M$ 以下、約 $10^{-4}M$ 以下、約 $10^{-5}M$ 以下、約 $10^{-6}M$ 以下、約 $10^{-7}M$ 以下、約 $10^{-8}M$ 以下、約 $10^{-9}M$ 以下、約 $10^{-10}M$ 以下、約 $10^{-11}M$ 以下、約 $10^{-12}M$ 以下、約 $10^{-13}M$ 以下、約 $10^{-14}M$ 以下、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-15}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-14}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、又は約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-9}M$ である。

【0126】

例示的な実施形態では、組換え結合タンパク質は、約900nM、約800nM、約700nM、約600nM、約500nM、約400nM、約300nM、約250nM、約200nM、約150nM、約100nM、約50nM、約40nM、約30nM、約20nM、約10nM、約5nM、約2nM、約1nM、約900pM、約800pM、約700pM、約600pM、約500pM、約400pM、約300pM、約200pM、約100pM、約10pM、又は約1pM以下の K_D 値で、ヒトCD33に結合する。例示的な一実施形態では、組換え結合タンパク質は、100nM以下の K_D 値でCD33に結合する。別の例示的な実施形態では、組換え結合タンパク質は、10nM以下の K_D 値でCD33に結合する。

【0127】

一態様では、組換え結合タンパク質は、約5000、約4000、約3000、約2000、約1000、約900、約700、約500、約400、約300、約200、約

150、約100、約70、約60、約50、約40、約30、約20、約15、約10、約7、約5、約3、約1、約0.5、又は約0.1 nM未満のEC₅₀でヒトCD33に結合する。したがって、一態様では、当該結合タンパク質は、約5 μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約4 μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約3 μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約2 μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約1 μM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約900 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約800 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約600 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する。別の態様では、当該結合タンパク質は、約700 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約500 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約400 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約300 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約200 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約100 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約70 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約60 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約50 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約40 nM未満のEC₅₀でT細胞上のヒトCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約30 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約20 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約15 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約10 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約7 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約5 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約3 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約1 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；別の態様では、当該結合タンパク質は、約0.5 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する；更なる態様では、当該結合タンパク質は、約0.1 nM未満のEC₅₀でCD33に結合する。

10

20

30

40

50

【0128】

追加的ポリペプチド

一態様では、本発明の組換え結合タンパク質は、ポリペプチドタグを更に含む。ポリペプチドタグは、ポリペプチド／タンパク質に結合されたアミノ酸配列であり、ここで、当該アミノ酸配列は、当該ポリペプチド／タンパク質の精製、検出、若しくは標的化に有用であり、又は、当該アミノ酸配列は、ポリペプチド／タンパク質の物理化学的挙動を改善し、又は、当該アミノ酸配列はエフェクター機能を有する。組換え結合タンパク質の個々のポリペプチドタグは、組換え結合タンパク質の他の部位に、直接又はペプチドリンカーを介して接続してもよい。ポリペプチドタグは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。

【0129】

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

10

【0130】

ペプチドリンカーの具体例は、グリシン-セリン-リンカー及び可変長のプロリントレオニンに富むリンカーである。本発明の文脈において、プロリントレオニンに富むリンカーは、そのアミノ酸配列中に少なくとも約20%のプロリン残基及び少なくとも約20%のトレオニン残基を含む。グリシン-セリン-リンカーの例は、アミノ酸配列GS及び配列番号67のアミノ酸配列であり、プロリントレオニンに富むリンカーの例は、配列番号65及び66のアミノ酸配列である。

【0131】

N末端及びC末端キャッピング配列

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

20

【0132】

N末端及び／又はC末端のキャッピング配列は、キャッピング単位、又は反復単位に隣接する天然に存在する反復タンパク質中に見出される他の構造単位に由来してもよい。キャッピング配列の例は、国際公開第2002/020565号及び同第2012/069655号、米国特許出願公開第2013/0296221号、並びにInterlandiら、「J Mol Biol.」2008 Jan 18; 375(3): 837-54に記載されている。N末端アンキリンキャッピングモジュール（すなわち、N末端キャッピング反復）の例としては、配列番号69～72が挙げられ、アンキリンC末端キャッピングモジュール（すなわち、C末端キャッピング反復）の例としては、配列番号73～76が挙げられる。

30

【0133】

核酸及び方法

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

40

【0134】

組成物、使用及び治療方法

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

【0135】

50

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

【0136】

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。

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

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

【0143】

一態様では、本発明は、疾患の治療において使用するための、本発明による医薬組成物、組換え結合タンパク質、又は核酸に関する。その目的のため、本発明による医薬組成物、核酸又は組換え結合タンパク質は、これらを必要とする患者に、治療有効量で投与される。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、又はエマルションなどの単位用量の注射可能な形態で処方される。用量及び投与方法は、治療される個

体及び疾患によって異なる。

【0144】

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

【0145】

一態様では、本明細書に記載の当該組換え結合タンパク質又はそのような他の医薬組成物は、静脈内投与される。非経口用途のため、組換え結合タンパク質又は当該医薬組成物は、ボ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。

【0146】

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

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

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）。

【0150】

一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質を含むキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の組換え結合タンパク質をコードする核酸を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の医薬組成物を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明の組換えタンパク質、及び／又は本発明の核酸、及び／又は本発明の医薬組成物を備えるキットに関する。一態様では、本発明は、本発明のCD33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1～16及び配列番号77～78を含む組換えタンパク質、並びに／又はCD33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1～16及び配列番号77～78を含む組換えタンパク質をコードする核酸、並びに／又はCD33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1～16及び配列番号77～78を含む組換えタンパク質を含む医薬組成物を備える、キットに関する。一態様では、本発明は、配列番号1～59及び配列番号77～81のアミノ酸配列のいずれか1つを含む組換えタンパク質、並びに／又は当該組換えタンパク質をコードする核酸、並びに／又は組換えタンパク質を含む医薬組成物を備える、キットに関する。

【0151】

一態様では、本発明は、本発明の組換えタンパク質を産生するための方法に関する。一態様では、本発明は、組換え結合タンパク質、例えば、配列番号 1～59 及び配列番号 77～84 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む組換えタンパク質を生産するための方法であって、(i) 当該組換え結合タンパク質を好適な宿主細胞（例えば、細菌中）で発現させる工程と、(ii) 当該組換え結合タンパク質を（例えば、クロマトグラフィーを使用して）精製する工程と、を含む、方法に関する。当該方法は追加の工程を含んでもよい。本発明の組換え結合タンパク質のこのような産生方法は、実施例 1 に記載される。

【0152】

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

【0153】

定義

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

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

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。

【0157】

組換えタンパク質及び組換えポリペプチドなどで使用される用語「組換え」とは、当該

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

【0158】

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、CD33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。

【0159】

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。

【0160】

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。

【0161】

本明細書で使用される場合、用語「標的」は、核酸分子、ポリペプチド若しくはタンパク質、炭水化物、又は任意の他の天然に存在する分子などの個々の分子を指し、そのような個々の分子の任意の一部を含むか、又はそのような分子の2つ以上の複合体、又は細胞全体若しくは組織試料、又は任意の非天然化合物を指す。好ましくは、標的はCD33である。より好ましくは、標的はヒトCD33である。

【0162】

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。

【0163】

特許出願公開第WO2002/020565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。

【0164】

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

10

20

30

40

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

【0165】

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

【0166】

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

20

【0167】

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。

【0168】

用語「フレームワーク残基」は、反復モジュールのアミノ酸残基を指し、これは、折り畳みトポロジーに寄与する、すなわち、当該反復モジュールの折り畳みに寄与するか、又は隣接モジュールとの相互作用に寄与する。そのような寄与は、反復モジュール内の他の残基との相互作用、又は 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構造への影響、又は直鎖ポリペプチド若しくはループを形成するアミノ酸ストレッチへの関与であってもよい。そのようなフレームワーク及び標的相互作用残基は、X線結晶解析、NMR及び／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

【0169】

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

40

【0170】

したがって、用語「アンキリン反復モジュール」は、元々天然に存在するアンキリン反復タンパク質の反復単位に由来する反復モジュールを指す。アンキリン反復タンパク質は、当業者に周知である。設計アンキリン反復タンパク質は、以前に記載されており、例え

50

ば、国際公開第2002/020565号、同第2010/060748号、同第2011/135067号、同第2012/069654号、同第2012/069655号、同第2014/001442号、同第2014/191574号、同第2014/083208号、同第2016/156596号、及び同第2018/054971号を参照されたく、これらは全て、その全体が参照により組み込まれる。典型的には、アンキリン反復モジュールは、ループによって分離された2つのアルファヘリックスを形成する約31～33個のアミノ酸残基を含む。

【0171】

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

【0172】

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。

【0173】

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バリエーション反復単位が挙げられる。

【0174】

用語「標的に対して結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」、「高い特異性で標的に結合する」、「標的に対して特異的な」又は「標的特異性」、又は「特異的に結合する」などは、結合タンパク質又は結合ドメインが、大腸菌マルトース結合タンパク質(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。CD33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2に説明されている。様々なアッセイ形式を使用して、目的の薬物分子に特異的に結合する結合部分を選択又は特徴付けることができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイ、

10

20

30

40

50

免疫沈降、BIAcore（商標）（GE Healthcare、Piscataway、NJ）、蛍光活性化細胞選別（FACS）、Octet（商標）（FortéBio, Inc., Menlo Park, CA）及びウエスタンブロット分析は、標的薬物分子に特異的に結合する結合部分を同定するために使用され得る多くのアッセイの一部である。典型的には、特異的又は選択的結合は、少なくとも2倍のバックグラウンドシグナル又はノイズ、より典型的には10倍超のバックグラウンドシグナルである。より具体的には、結合剤は、平衡解離定数（ K_D ）値が $<1\ \mu\text{M}$ 、例えば、 $<500\ \text{nM}$ 、 $<100\ \text{nM}$ 、 $<10\ \text{nM}$ 、 $<1\ \text{nM}$ 、 $<100\ \text{pM}$ 、又は $<10\ \text{pM}$ である場合、標的に「特異的に結合する」と言われる。

【0175】

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

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

「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、

10

20

30

40

50

並びにCD3の活性の少なくとも一部を保持するその変異体、アイソフォーム、及び種相
同体を指し得る。したがって、本明細書に定義及び開示される結合タンパク質はまた、ヒ
ト以外の種からCD3に結合してもよい。他の場合では、結合タンパク質は、ヒトCD3
に完全に特異的であってもよく、種又は他のタイプの交差反応性を示さなくてもよい。ヒ
トCD3に対する特定の参照によってなど異なる指示がない限り、CD3は、天然配列C
D3、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CD
3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。

【0179】

10

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。

【0180】

「CD33」という用語は、骨髄細胞表面抗原CD33を指し、これは、細胞間相互作
用を媒介し、免疫細胞を静止状態に維持する役割を果たすシアル酸結合免疫グロブリン様
レクチン(Siglec)である。ヒトCD33(hCD33)のアミノ酸配列は、UniProt (www.uniprot.org) 参考資料第P20138号に示されてい
る。

【0181】

20

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。

【0182】

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

【0183】

30

「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、腫
瘍性疾患の治療のための薬剤の調製に使用することができる。「医学的状态」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、医学的状态を治療する方法であって、そのような治療を必要と
する患者に、本発明の組換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物の治療有効量を投与す
る工程を含む、治療方法に関する。好ましい態様では、当該医学的状态は、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。一態様では、
当該医学的状态は、悪性腫瘍性疾患である。一態様では、当該医学的状态は、癌、好
ましくは白血病、より好ましくは急性骨髄性白血病である。用語「治療有効量」は、患者
において所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。

40

【0184】

用語「抗体」は、インタクトな抗体分子だけでなく、免疫原結合能力を保持する抗体分
子の任意のフラグメント及び変異体も意味する。そのようなフラグメント及び変異体もま
た、当技術分野において周知であり、インビトロ及びインビボ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。

50

【0185】

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。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。

10

【実施例】

【0186】

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

20

【0187】

材料

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

【0188】

分子生物学

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

30

【0189】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーを生成する方法は、例えば、米国特許第7,417,130号；Binzら、「J. Mol. Biol.」第332巻第489～503頁、2003年；Binzら（2004年）、上記引用に記載されている。このような方法により、ランダム化アンキリン反復モジュール及び／又はランダム化キャッピングモジュールを有する、設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーを構築することができる。例えば、そのようなライブラリーはしたがって、固定化N末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号69、70、又は71のN末端キャッピングモジュール）、又はランダム化N末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号72による）、及び固定化C末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号73、74、又は75のC末端キャッピングモジュール）又はランダム化C末端キャッピングモジュール（例えば、配列番号76による）に基づいて組み立てられてもよい。好ましくは、そのようなライブラリーは、反復又はキャッ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のいずれも有することがないように組み立てられる。

40

50

【0190】

更に、そのようなライブラリー内のそのようなランダム化されたモジュールは、ランダム化されたアミノ酸位置を有する追加のポリペプチドループ挿入を含んでもよい。そのようなポリペプチドループ挿入の例は、抗体又はデノボ生成ペプチドライブラリーの補体決定領域（CDR）ループライブラリーである。例えば、そのようなループ挿入は、ガイドンスとして、ヒトリボヌクレアーゼLのN末端アンキリン反復ドメインの構造を用いて設計することができた（Tanaka, N., Nakanishi, M, Kusakabe, Y, Goto, Y., Kitade, Y, Nakamura, K. T., EMBO J... 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。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1の位置19～24に存在）、アンキリン反復タンパク質ライブラリーのいずれかのそのようなC末端キャッ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の最後の3つのアミノ酸に存在）。配列番号69～71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73～75は、K L Nモチーフ、K L Aモチーフ、又はK A Aモチーフを含むC末端キャッピングモジュールの例を提供する。

10

20

【0191】

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

【0192】

N2C及びN3C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。

30

【0193】

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。

40

【0194】

実施例1：CD33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CD33（hCD33）（UniProt ID P20138）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DARP

50

i n (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CD33 標的 (CD33のECDの全長細胞外ドメイン (ECD)、及びCD33のECDのスプライス変異体) への結合は、粗抽出物のホモジニアス時間分解蛍光測定 (HTRF) によって評価され、数百のhCD33 特異的結合タンパク質が正常に選択されたことを示した。例えば、配列番号61、3、5、7～9、及び14～16のアンキリン反復ドメインは、hCD33 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。

【0195】

リボソームディスプレイによるCD33 特異性アンキリン反復タンパク質の選択

hCD33 特異的アンキリン反復タンパク質の選択は、ヒトCD33のビオチン化細胞外ドメイン (ECD) を標的タンパク質として、上記のような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 (例えば、Zahnd、C.、Amstutz、P.、及びPluckthun、A.、「Nat. Methods」第4巻第69～79頁、2007年参照) を使用して、リボソームディスプレイ (Hanes and Pluckthun, loc. cit.) により行った。CD33 標的 (Evitria) は、C末端Fcタグ及びAviタグを含有し、酵素BirA-GSTを使用してビオチン化した。CD33の2つの異なる形態を、選択のために使用した。CD33の可変ドメイン及び定常ドメインの両方を含有するCD33の全長ECD (残基18～259) (配列番号60)、並びに定常ドメインのみを含有するCD33のECDのスプライス変異体 (残基140～259) (配列番号61) CD33。計4ラウンドの標準的なリボソーム選択を採用し、標的濃度を減少させ、洗浄ストリンジェンシを増加させて、ラウンド1からラウンド4への選択圧力を増加させた (Binzら、2004年、上記引用)。ビオチン化非CD33 Fcドメインと併せてストレプトアビジン及びニュートラアビジンビーズを使用することによって、各ラウンドにおいて脱選択戦略を適用した。各選択ラウンド後の逆転写 (RT) -PCRサイクルの数は、結合剤の富化のために、収率に合わせて調整する45から28に一定に減少させた。

【0196】

高親和性CD33 特異性アンキリン反復タンパク質を富化するために、標準リボソームディスプレイ選択 (上記) の第4ラウンドからの出力を、選択ストリンジェンシの増加を伴うオフ速度選択ラウンドに供した (Zahnd (2007年) 上記引用)。最後の標準選択ラウンドを、オフレート選択ラウンドの後に実施して、オフレート選択された結合タンパク質を増幅及び回収した。これら最後の2つの選択ラウンドでは、RT-PCRサイクルの数はそれぞれ30及び35であった。

【0197】

合計3つの異なる選択アプローチが、以下の差異を伴って、上記のように行われた。第1のアプローチでは、全長CD33タンパク質のECDに対してのみ選択を行った。第2のアプローチでは、全長CD33 ECD及びスプライス変異体ECDの標的を各ラウンドで交互にした。第3のアプローチでは、HIM-3-4 CD33結合抗体 (BD Pharmingen (商標)) を添加することによって、第1のアプローチの条件を使用して競合溶出工程を適用した。各アプローチから、全長CD33及び／又はそのスプライス変異体に対して結合剤を生成した。

【0198】

選択されたクローンは、粗抽出物HTRFによって示されるようにヒトCD33に特異的に結合する。

溶液中でhCD33に特異的に結合する個々の選択されたアンキリン反復タンパク質を、標準プロトコルを用いて、アンキリン反復タンパク質発現大腸菌細胞の粗抽出物を使用するホモジニアス時間分解蛍光測定 (HTRF) アッセイによって同定した。リボソームディスプレイによって選択されたアンキリン反復タンパク質クローンを、C末端CD3 特異性アンキリン反復ドメイン、引き続いてFlagタグを含有するpQE30 (Qiagen) 発現ベクター (pMPDV045) の誘導体にクローニングし、大腸菌のXL1-

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

【0199】

各溶解したクローンの抽出物を、PBSTB (0.1% Tween 20 (登録商標) 及び 0.2% (w/v) BSA、pH 7.4 を補充した PBS) 中で、6 nM (最終濃度) ビオチン化 hCD33 (ECD CD33 の全長又はスプライス変異体)、1:400 (最終濃度) の抗 strep-Tb HTRF 抗体-FRET 受容体コンジュゲート (Cisbio)、及び 1:400 (最終濃度) の抗 His-D2 抗体 FRET 受容体コンジュゲート (Cisbio) と一緒に、1:1000 希釈 (最終濃度) として 384 ウェルプレートのウェルへ適用し、室温で 60 分間インキュベートした。340 nm の励起波長及び 665 $\pm$ 10 nm の発光フィルタを使用して、Tecan M1000 で HTRF を読み取った。そのような粗細胞抽出物 HTRF による数百のクローンのスクリーニングは、hCD33 に特異的なアンキリン反復ドメインを明らかにした。hCD33 に特異的に結合する選択されたアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1、3、5、7~9、及び 14~16 で提供される。

【0200】

【表 2】

表 1 a

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 #3 (配列番号 3)
DARPin (登録商標) タンパク質 #5 (配列番号 5)
DARPin (登録商標) タンパク質 #7 (配列番号 7)
DARPin (登録商標) タンパク質 #8 (配列番号 8)
DARPin (登録商標) タンパク質 #9 (配列番号 9)
DARPin (登録商標) タンパク質 #14 (配列番号 14)
DARPin (登録商標) タンパク質 #15 (配列番号 15)
DARPin (登録商標) タンパク質 #16 (配列番号 16)

【0201】

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

【0202】

hCD33 に対して結合特異性を有する追加のアンキリン反復タンパク質の操作

【0203】

【表 3】

表 1 b

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#4(配列番号4)
DARPin(登録商標)タンパク質#6(配列番号6)
DARPin(登録商標)タンパク質#10(配列番号10)
DARPin(登録商標)タンパク質#11(配列番号11)
DARPin(登録商標)タンパク質#12(配列番号12)
DARPin(登録商標)タンパク質#13(配列番号13)

10

【0204】

配列番号2、4、6、及び10～13は、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#3(配列番号3)、DARPin(登録商標)タンパク質#5(配列番号5)、及びDARPin(登録商標)タンパク質#9(配列番号9)の配列にそれぞれ基づいて操作された、hCD33に対する結合特異性を有するアンキリン反復タンパク質である。

【0205】

配列番号1及び配列番号3については、芳香族残基の数を減少させ、表面電荷を変化させるために配列を改変した。両方のN末端キャッピングモジュールにおいて、RI L L A AモチーフをRI L L K Aで置換し、アスパラギン酸(18位)をロイシンで置換した。両方のC末端キャッピングモジュールにおいて、グルタミン酸(18位)をグルタミン酸で置換した。配列番号3については、N末端キャッピングモジュールにおいて追加のフェニルアラニン(14位)をバリンで置換した。配列番号1については、N末端キャッピングモジュールにおいて追加のトリプトファン(7位)をバリンで置換し、第2の内部反復(18～21位)におけるE D I AモチーフをL E I Vで置換した。操作された変異体は、5:1の比で汎T細胞及びM O L M-13細胞を使用して48時間インキュベートした後に標準的なLDH殺傷アッセイにおいて測定された2倍を超えて、親バージョンと比較して、T細胞殺傷(他のT A A及びC D 3結合アンキリン反復ドメインと組み合わせて評価された)を変化させなかった。

20

【0206】

配列番号9については、芳香族残基の数を減少させ、表面電荷を変化させ、及び／又はフレームワークを最適化するために配列を改変した。全てのN末端キャッピングモジュールにおいて、RI L L A Aモチーフは、R E L L K Aによって置換された。3つの変異体では、B i n zら(2004年)「Nature Biotechnology」に記載されているように標準的なアンキリン反復タンパク質フレームワークを得るために第2の内部反復中のバリン(12位)を除去するか、若しくはC末端キャッピング反復中のグリシン(18位)をグルタミン酸により置換するか、又は療法の組合せのいずれかを導入した。1つの変異体では、N末端キャッピングモジュール中のチロシン(7位)をバリンにより置換した。操作された変異体は、H T R Fによって測定される場合はhCD33に対する結合を維持し、F A C Sによって測定される場合はM O L M 13細胞に対する細胞結合を維持した。

30

【0207】

配列番号5については、セリン(6位)は、N末端キャッピングモジュールにおいてグリシンに置き換えられた。操作された変異体は、5:1の比で汎T細胞及びM O L M-13細胞を使用して48時間インキュベートした後に標準的なLDH殺傷アッセイにおいて測定された2倍を超えて、親バージョンと比較して、T細胞殺傷(C D 3結合アンキリン反復ドメインと組み合わせて評価された)を変化させなかった。

【0208】

C D 3 3 特異性アンキリン反復タンパク質の発現

40

50

更なる分析のために、上記のように粗細胞抽出物 H T R F で特異的なヒト C D 3 3 結合を示す選択されたクローンを、容易な精製のためにそれらの N 末端に融合される H i s タグ（配列番号 8 5）を用いて、大腸菌細胞で発現させた。発現したタンパク質を標準プロトコルに従って精製した。0.11 ml の静置一晚培養物（T B、1% のグルコース、50 mg / l のアンピシリン；37℃）を使用して、96 ディープウェルプレートで 0.99 ml の培養物（T B、50 mg / l のアンピシリン、37℃）に接種した。37℃（700 rpm）で 2 時間インキュベートした後、培養物を 0.5 mM IPTG で誘導し、振盪しながら（900 rpm）37℃で 6 時間インキュベートした。細胞を収集し、ペレットを -20℃で一晩凍結した後、DNAase I（200 ユニット / ml）及びリゾチーム（0.4 mg / ml）を補充した 50 µL の B - P E R I I（Thermo Scientific）中に再懸濁し、振盪（900 rpm）しながら室温で 1 時間インキュベートした。次いで、60 µL の低塩リン酸ナトリウム緩衝液を添加し、細胞片を遠心分離によって除去した（3220 g で 15 分間）。合計で、8 つの個々の発現をプールした後、遠心分離（3,200 g、60 分間、4℃）によって細胞破片を除去した。Multi Screen フィルタプレート（Millipore）を用いて上清を濾過した後、96 ウェル Thermo His Pur コバルトスピンプレートを用いて精製し、96 ウェル Thermo Zeba スピン脱塩プレートを用いて P B S 中でタンパク質溶液を再緩衝化した。精製されたタンパク質は、Agilent 1200 HPLC システム上で標準 Sephadex 150 / 5 カラムを使用して、P B S 中で可溶性及び単量体であった。

10

20

【0209】

親和性成熟 C D 3 3 特異的結合タンパク質の生成

最初に同定された C D 3 3 特異性結合タンパク質の更なる開発において、標的タンパク質に対して非常に高い親和性及び／又はそれからの非常に低いオフ速度を有する新たな変異体が、親和性成熟を用いて生成された。それにより、1 つの最初に同定された C D 3 3 特異性結合タンパク質 D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 2（「親」結合タンパク質）を、親和性成熟のための好適な出発点として選択した。親和性成熟手順は、出発点として使用されるアンキリン反復ドメインの各無作為化位置の飽和変異誘発を伴った。親和性成熟手順によって生成された配列を、競合 H T R F によってより低いオフレートについてスクリーニングした。簡単に説明する。単一アミノ酸点突然変異変異体を、単一の N N K 縮重コドンを含むプライマーを使用して親プラスミド（p M C H E 1190）上で標準的な Quick Change PCR によって生成して、潜在的な結合位置に 20 個全てのアミノ酸を導入した。N 末端 H i s タグ（配列番号 8 5）を含む、アンキリン反復タンパク質の粗抽出物（C E）を、ビオチン化標的と共にインキュベートした後、過剰の n f l a g タグ化親 C D 3 3 特異性結合タンパク質を添加し、H T R F シグナルを経時的に測定した。親クローンよりも高い H T R F シグナルに基づいて同定された有益な変異を、タンパク質工学によって結合タンパク質において組み合わせた。このようにして、親和性成熟タンパク質 # 29 及び D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 30 が、D A R P i n（登録商標）タンパク質 # 2 に由来して生成された。

30

【0210】

次いで、このような親和性成熟 C D 3 3 特異的結合ドメインを、p Q E 30（Qiagen）発現ベクターの誘導体にサブクローニングすることで、N 末端 H i s タグ（配列番号 8 5）をコードし、その後、配列番号 77 又は 78 の C D 3 3 特異的結合ドメイン、ペプチドリンカー（配列番号 65）、及び配列番号 57 の C 末端 C D 3 結合ドメインをコードする発現構築物を得た。T 細胞エンゲージフォーマット中のこれらの構築物を大腸菌細胞中で発現させ、標準プロトコルに従ってそれらの H i s タグを用いて精製した。タンパク質を、エフェクター細胞（E）としての健常ドナー P B M C、及び標的細胞（T）としての M o l m - 13 - N1 腫瘍細胞（5 : 1 の E : T 比）から単離された初代 T 細胞を使用して、用量依存的インビトロ T 細胞活性化及び腫瘍細胞殺傷アッセイについて試験した。48 時間の共培養物のアッセイインキュベーション並びにフローサイトメトリー及び

40

50

L D H放出による分析。全ての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H i s タグを用いて精製した。

【0211】

実施例2：表面プラズモン共鳴（S P R）分析によるヒトC D 3 3に対して結合特異性を有する組換えアンキリン反復タンパク質の解離定数（ K_D ）の決定

組換えヒトC D 3 3 標的上の精製されたアンキリン反復タンパク質の結合親和性を、P r o t e O n装置（B i o R a d）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D A R P i n（登録商標）タンパク質# 1、# 3、# 5、# 7～# 9、及び# 14～# 16をサブクロニングし、p Q E 3 0（Q i a g e n）発現ベクターの誘導体において上記のように発現させることで、N末端H i s タグ及びC D 3 3 特異的アンキリン反復ドメイン、続いて、配列表に列挙される5つのC D 3 特異的アンキリン反復ドメインのうち1つを含有する構築物を得た。

【0212】

簡潔には、P r o t e O n X P R 3 6装置（B i o R a d）を使用してS P R測定を行った。泳動用緩衝液は、0.005% T w e e n 2 0（登録商標）を含有するP B S p H 7.4（P B S T）であった。b i o . h C D 3 3全長標的（配列番号60）を、N L Cチップ（B i o R a d）上に540RUのレベルまで固定化し、スプライシングされた変異体（配列番号61）を560RUのレベルまで固定化した。全長及びC D 3 3 E C Dのスプライシング型変異体へのT C Eフォーマットの96ウェル精製C D 3 3 特異的結合タンパク質の相互作用を、100 μ L／分の一定流量を用いて、120秒の会合及び1200秒の解離を有する、50nMの結合タンパク質を注入することによって測定した。2M M g C l₂を用いて個々の測定の間に標的を再生した。シグナルを、泳動用緩衝液（P B S T）処理された対照レーンに対して二重参照した。

【0213】

表2aは、T C Eフォーマット（すなわち、C D 3 特異的アンキリン反復ドメインでフォーマット化）における、D A R P i n（登録商標）タンパク質# 1、# 3、# 5、# 7～9、及び# 14～16について得られた K_D 値を示す。解離定数（ K_D ）を、当業者に既知の標準的な手順を用いて、推定されたオンレート及びオフレートから算出した。選択されたアンキリン反復タンパク質とヒト切断及び全長C D 3 3との結合相互作用の K_D 値を、0.47～17nMの範囲ないであると単トレースS P Rによって決定した（表2a参照）。表2aの値は複数の反復の平均である。

【0214】

【表4】

表2a:アンキリン反復タンパク質－ヒトCD33相互作用の K_D 値		
DARPin(登録商標)タンパク質 (TCEフォーマット)	スプライス変異体CD33に対するSPR	全長CD33に対するSPR
	K_D	K_D
DARPin(登録商標)タンパク質#7	結合なし	4.7E-10
DARPin(登録商標)タンパク質#9	1.9E-09	7.6E-10
DARPin(登録商標)タンパク質#15	結合なし	1.70E-08
DARPin(登録商標)タンパク質#3	結合なし	7.4E-09
DARPin(登録商標)タンパク質#8	結合なし	2.3E-09
DARPin(登録商標)タンパク質#1	結合なし	4.8E-09
DARPin(登録商標)タンパク質#5	結合なし	1.2E-08
DARPin(登録商標)タンパク質#16	結合なし	結合なし
DARPin(登録商標)タンパク質#14	結合なし	6.4E-10

【0215】

更に、組換えヒトC D 3 3 標的に対する2つの追加的な精製アンキリン反復タンパク質

の結合親和性を、測定し、D A R P i nタンパク質# 1、# 3、# 6、# 7～# 9、及び# 14～# 16について上記と同様の手順で分析した。簡単に説明すると、b i o . h C D 3 3を、N L Cチップ（B i o R a d）上に1180RUのレベルまでコーティングした。D A R P i n（登録商標）タンパク質# 29及びD A R P i n（登録商標）タンパク質# 30を、100uL／分の一定流量で、120秒の会合相及び1200秒の解離相を有する、100nMの単一濃度で分析物として適用した。標的を4M M g C l 2で再生した。シグナルを、L 1及びA 6の泳動用緩衝液（0.005% T w e e n 20（登録商標））を含有するP B S T P B S p H 7.4）処理された対照レーンに対して二重参照した。1：1ラングミュアモデルをフィッティングに使用した。この研究で得られたK_D値を表2bに要約する。

10

【0216】

表2bは、b i o . h C D 3 3全長標的に結合する、本発明のC D 3 3特異的アンキリン反復タンパク質のK_D値を示す。K_D値を、当業者に既知の標準的な手順を用いて、推定されたオンレート及びオフレートから算出した。表2bの値は複数の反復の平均である。

【0217】

【表5】

タンパク質	K _D [M]
DARPinタンパク質#29	6.2E-10
DARPinタンパク質#30	8.8E-10

20

【0218】

図1（A～B）は、ヒトC D 3 3に対するアンキリン反復タンパク質結合の表面プラズモン共鳴（S P R）分析を示す。図1AはD A R P i n（登録商標）タンパク質# 29のS P R分析を示し、図1BはD A R P i n（登録商標）タンパク質# 30のS P R分析を示す。

実施例3：雌B A L B／cマウスにおけるC D 3 3特異的アンキリン反復タンパク質の薬物動態解析

本発明のC D 3 3特異性アンキリン反復ドメインが、治療剤の開発に有用であるためにインビボで適切な血清半減期を有し得るかどうかを決定するために、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# 29、及びD A R P i n（登録商標）タンパク質# 30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、D A R P i n構築物は、N末端H i sタグ（配列番号85）、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（配列番号53）、ペプチドリンカー（配列番号65など）、及びC D 3 3特異的結合ドメインの1つをC末端でコードする、p Q E 3 0（Q i a g e n）発現ベクターの誘導体へと、上記のようにサブクローニングされ、発現される。例えば、以下のアンキリン反復タンパク質をコードする発現ベクターを構築する。

30

【0219】

インビボ投与及び試料採取

上記のヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメイン（配列番号53）でフォーマットした、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# 29、及びD A R P i n（登録商標）タンパク質# 30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ラス注射として投与した。目標用量レベルは、5mL／kgの適用容量で1mg／kgである。アンキリン反復融合タンパク質を、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）溶液中に配合する。

40

【0220】

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

50

させ、続いて遠心分離し、血清を採取する。

【0221】

血清試料中のアンキリン反復タンパク質を測定するためのELISAによる生物分析
PBS中の10nMのポリクロナルヤギ抗ウサギIgG抗体（Ab18）の1ウェル当たり100 μ Lを、NUNC Maxisorb ELISAプレートに4℃で一晩コーティングする。1ウェル当たり300 μ LのPBST（0.1%のTween20を添加したPBS）で5回洗浄した後、Heidolph Titramax 1000振盪器（450rpm）で、0.25%のカゼイン（PBST-C）を補充した300 μ LのPBSTで、室温（RT）で1時間ウェルをブロックする。プレートを上記のように洗浄する。PBST-C中の100 μ Lの5nmol/Lのウサギ抗DARPin（登録商標）1-1-1抗体を添加し、プレートを軌道振盪（450rpm）しながら室温（22℃）で1時間インキュベートする。上記のようにプレートを洗浄する。

10

【0222】

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

【0223】

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

20

【0224】

薬物動態解析

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

30

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

【0225】

最大血清濃度（C_{max}）及びそれらの発生時間（T_{max}）は、血清濃度-時間プロファイルから直接得られる。血清濃度-時間曲線の下面積（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指数関数的減少を仮定した無限大への外挿によって決定する。無限大までの外挿は、C_{last}/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（CL_{pred}）及び見かけの終末相半減期を以下のように算出する：CL_{pred} = 静脈内用量 / AUC_{inf} 及び t_{1/2} = ln 2 / λ_z。定常状態分布体積V_{ss}は、以下によって決定する：V_{ss} = i.v. 投与量・AUMC_{inf} / (AUC_{inf})²。AUMC_{inf}は、AUC_{inf}の計算について記載したのと同じ外挿手順を使用して、無限大に外挿された薬物濃度-時間曲線の第1の瞬間の総面積を示す。nmol/Lの用量で与えられた濃度に基づいてPKパラメータを算出するために、mg/kgとして与えられた投与量値をアンキリン反復タンパク質の分子量を使用してnmol/kgに変換する。表3は、上記のようにヒト血清アルブミン特異的アンキリン反復ドメインでフォーマット化された、本発明の3つのアンキリン反復タンパク質、DARPin（

40

50

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 # 2 9、及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 3 0 のおよその予測半減期を示す。

【0 2 2 6】

【表 6】

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

パラメータ	単位	DARPin(登録商標) タンパク質 # 2	DARPin(登録商標) タンパク質 # 29	DARPin(登録商標) タンパク質 # 30
HL ₁ Lambda ₂ (半減期)	時間	約 23	約 27	約 33

10

【0 2 2 7】

結論として、本発明の C D 3 3 特異的アンキリン反復ドメインは、半減期延長部分、例えば血清アルブミン特異的結合ドメインなどと組み合わせて、治療剤の開発に有用であるためにインビボで適切な血清半減期を達成することができる。

【0 2 2 8】

実施例 4 : C D 3 3 発現腫瘍細胞への本発明のアンキリン反復タンパク質の結合の決定
細胞の表面上に発現された C D 3 3 に対する本発明の結合タンパク質の結合を、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) フローサイトメトリーによって分析した。この目的のために、C D 3 3 発現腫瘍細胞 (M o l m - 1 3 N 1) を、9 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 1 0 0 , 0 0 0 細胞で播種した。単一特異性フォーマットの D A R P i n タンパク質 # 2、D A R P i n タンパク質 # 2 9、及び D A R P i n タンパク質 # 3 0 を、2 0 0 0 n M で開始して、1 : 5 の希釈比で滴定した。腫瘍細胞を、希釈した D A R P i n タンパク質で再懸濁し、4 °C で 6 0 分間インキュベートした。アッセイは、2 % ウシ胎児血清を含み、ヒト血清アルブミン 2 0 μ M (H S A) を含まない P B S 中で行った。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄した後、D A R P i n (登録商標) タンパク質特異性腫瘍細胞結合を、非標識一次抗ウサギ D A R P i n (登録商標) 抗体 (抗ウサギ 1 - 1 - 1 抗体、C e P o w e r) を 2 μ g / m L で添加することによって検出した。続いて 4 °C で少なくとも 3 0 分間のインキュベーション工程を行った。その後、細胞を P B S で洗浄し、A l e x a F l u o r 4 8 8 抗体 (T h e r m o F i s h e r) で標識した 2 μ g / m L の抗ウサギ二次ヤギ抗体を添加した。同じインキュベーション条件を適用した。最後に、細胞を 2 回洗浄し、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) 中に室温 (R T) で 1 5 分間再懸濁した。A l e x a F l u o r 4 8 8 D A R P i n (登録商標) タンパク質標識腫瘍細胞の蛍光強度中央値 (M F I) を、分析用の F l o w J o ソフトウェア、及びデータプロット用の G r a p h P a d P r i s m 8 を用いて、A t t u n e N X T (T h e r m o F i s h e r) によって測定した (図 2 は、C D 3 3 発現腫瘍細胞に対する、D A R P i n (登録商標) タンパク質 # 2、D A R P i n タンパク質 # 2 9、及び D A R P i n (登録商標) タンパク質 3 0 の結合曲線を示す)。表 4 は、それらの E C 5 0 値によって表される、細胞上に発現された C D 3 3 に対する 3 つの例示的なアンキリン反復タンパク質の結合の定量化を示す。

20

30

40

【0 2 2 9】

【表 7】

表 4

タンパク質	EC50[nM]
DARPinタンパク質 # 2	1. 2
DARPinタンパク質 # 29	0. 32
DARPinタンパク質 # 30	1. 9

50

【0230】

結論として、本発明のCD33特異的結合タンパク質は、約2nM以下のEC50で細胞の表面上に発現されるCD33に結合する。

【0231】

実施例5：標的特異的短期T細胞活性化アッセイによる、本発明のCD33特異的アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力の評価。

本発明の上述の例示的なCD33特異性アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力を、CD8+T細胞上のCD25活性化マーカーのFACS測定によるインビトロ短期T細胞活性化アッセイにおいて評価した。試験したタンパク質、DARPinタンパク質#2、DARPinタンパク質#29、及びDARPinタンパク質#30を、二重特異性T細胞エンゲージフォーマットで評価した。このようなT細胞エンゲージタンパク質は、前述のCD33特異的アンキリン反復ドメインにくわえて、CD3特異的結合ドメイン（配列番号57）を含み、それぞれ、DARPinタンパク質#33、DARPinタンパク質#31、及びDARPinタンパク質#32として示されている。

【0232】

したがって、1ウェル当たり100,000個の精製された汎Tエフェクター細胞及び20,000個のMolm-13標的細胞を、600µMヒト血清アルブミンの存在下、37℃で48時間、選択されたDARPinタンパク質の段階希釈物と2連で同時インキュベートした（E：T比5：1）。48時間後、細胞を洗浄し、1：1,000のLive/Dead Green（ThermoFisher）、1：400マウス抗ヒトCD8Pacific Blue（BD）、及び1：100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Attune NxT（ThermoFisher）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。FlowJoソフトウェアを用いてFACSデータを分析し、GraphPad Prism8（3-PL-フィット）を用いてデータをプロットした。図3は、活性化マーカーCD25によって測定される、DARPinタンパク質#33、DARPinタンパク質#31、及びDARPinタンパク質#32によって引き起こされる短期T細胞活性化を示す。試験した本発明のCD33特異的結合タンパク質は全て、T細胞エンゲージフォーマットで、腫瘍細胞上に発現したCD733に結合し、T細胞を活性化することができた。

【0233】

実施例6：標的特異的短期腫瘍細胞殺傷アッセイを用いた、T細胞エンゲージフォーマットにおける本発明のCD33特異的アンキリン反復タンパク質の特異性及び効力の評価

T細胞エンゲージフォーマット（すなわち、それぞれDARPinタンパク質#33、DARPinタンパク質#31、及びDARPinタンパク質#32）における、本発明のCD33特異的アンキリン反復タンパク質、DARPinタンパク質#2、DARPinタンパク質#29、及びDARPinタンパク質#30の特異性及び効力もまた、LDH放出を測定するインビトロ短期細胞傷害性アッセイを用いて評価した。この目的のために、100,000個の精製汎Tエフェクター細胞及び20,000個のMolm-13標的細胞／ウェルを、600µMヒト血清アルブミンの存在下において、示されたT細胞エンゲージタンパク質の段階希釈物と2連で、37℃にて48時間にわたり共インキュベートした（E：T比5：1）。48時間のインキュベーション後、細胞をスピンドウンし、各ウェルの100µLの上清を、製造業者のプロトコル（LDH検出キット；Roche Applied Science、インキュベーション30分間）に従ってLDH放出について分析した。吸光度を、TECAN infinite M1000Proリーダーによって492nm～620nmで測定した。GraphPad Prism8を使用してOD値をプロットした。

【0234】

図4は、DARPinタンパク質#33、DARPinタンパク質#31、及びDARPinタンパク質#32によって引き起こされる腫瘍細胞殺傷を示す。試験した本発明のCD33特異的結合タンパク質は全て、T細胞エンゲージフォーマットで、腫瘍細胞上に発現したCD33に結合し、腫瘍細胞を次いで死滅させるT細胞を活性化することができた。

【0235】

実施例7：本発明のCD33特異的結合タンパク質によって結合されるCD33エピトープの決定

本発明のCD33特異的アンキリン反復タンパク質によって結合されるCD33エピトープを、HTRF、及びベンチマーク対照分子AMG330類似体に対する競合ELISAを用いて調査した（Evitriaから購入したCD3-CD33特異的BiTE（登録商標））。

【0236】

ヒトCD33（Evitriaから購入）への結合についての一価CD33特異的結合タンパク質DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14、並びにAMG330類似体の競合を、HTRF及び競合ELISAによって評価した。

【0237】

最初に、3つのCD33特異的結合タンパク質DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14の粗抽出物を用いて、HTRFによる全長（V/C2ドメイン）及び切断型CD33（C2ドメイン）に対する結合実験を行った。Strept-Tb及び抗His-D2 HTRF試薬を用いて、CD33標的への結合を検出した。簡単に記載すると、DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14の粗抽出物を、PBSTBで1:250（最終的1:1000）に希釈し、384ウェルプレート（PerkinElmer、6008280）へと添加した。次いで、ビオチン化標的_hCD33-Fc(kih)-Avi（全長CD33；Evitriaより購入）及びhCD33-C2-Fc(kih)-Avi（切断型CD33；Evitriaより購入）を、それぞれ8nM（最終6nM）まで希釈し、HTRF試薬Mab Anti-6His-d2及びStrept-Tbと混合し、両方とも1:200希釈した（最終1:400）。図5に示すように、3つ全てのCD33特異的結合タンパク質DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14は、全長CD33への結合を示すが、DARPin（登録商標）タンパク質#9のみが切断型CD33標的に結合する。これらのデータは、DARPin（登録商標）タンパク質#9がC2ドメインに結合し、一方で、DARPin（登録商標）タンパク質#91及びDARPin（登録商標）タンパク質#14がCD33のVドメインに結合することを示す。

【0238】

次に、CD33結合ベンチマーク分子AMG330を同様に用いて競合ELISA実験を行った。Friedrichら（2014年）によって示されるようにVドメインの頂部に結合するAMG330類似体を、マイクロプレート上に不動化した。ビオチン化CD33標的、並びに50倍過剰のDARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14を、2時間ブレインキュベートした後、ペルオキシダーゼに共有結合したストレプトアビジンを介してAMG330への結合を直接測定した。簡単に記載すると、Nunc MaxiSorp 96ウェルプレートを、10nMのDARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14、並びに5nMのAMG330類似体により一晚コーティングした。ELISAプレートを3回洗浄し、PBSTC（0.1%（v/v）Tween20（登録商標）及び0.25%カゼインを含有するPBS）で、450rpmにて4時間15分間にわたりブロッ

10

20

30

40

50

キングした。一方で、500 nMの競合物質DARPin（登録商標）タンパク質#1、DARPin（登録商標）タンパク質#9、及びDARPin（登録商標）タンパク質#14を、20 nMのbio.hCD33と、1:1の比で室温にて2時間にわたりプレインキュベートした。競合物質を含まないBio.hCD33を陽性対照として含めた。次いで、プレインキュベートした試料をコーティングしたMaxiSorpプレートに添加し、室温及び450 rpmで30分間インキュベートした。プレートを、PBSTで3回洗浄した後、ストレプトアビジン-POD抗体（Roche、カタログ番号：11 089 153 001）で標的を検出した。検出のために、新たに調製したTMB緩衝液（30 mMクエン酸緩衝液pH 4.1、5%（v/v）TMB溶液（Carl Roth GmbH製）及び0.16% H₂O₂）を添加し、反応を1 M H₂SO₄で停止させた。吸光度をOD₄₅₀で測定し、Sunriseマイクロプレートリーダー（Tecan）を用いてOD₆₂₀について参照した。緩衝液（PBS）値を差し引くことによってデータを分析した。GraphPad Prismを分析に使用した。

10

20

30

40

50

【0239】

予想されるように、C2ドメイン結合DARPin（登録商標）タンパク質#9は、AMG330と同様の競合的結合を示さない。Vドメイン結合分子DARPin（登録商標）タンパク質#1又はDARPin（登録商標）タンパク質#14の両方について、競合により、それぞれ、ELISAシグナルの完全又は部分的な阻害が得られた。したがって、DARPin（登録商標）タンパク質#1はVドメインに結合し、AMG330及びDARPin（登録商標）タンパク質#14との部分競合を示す。くわえて、DARPin（登録商標）タンパク質#14はまた、Vドメインにも結合し、かつAMG330との結合について完全に競合するが、一方で、DARPin（登録商標）タンパク質#9はC2ドメインに結合することで、CD33へのAMG330の同時結合を可能にする（図6）

【0240】

実施例8：PBMCヒト化マウス及びMOLM-13腫瘍モデルにおける、DARPin（登録商標）タンパク質#29を含む例示的なマルチドメインTCE結合タンパク質のインビボ有効性評価

ヒト血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つのアンキリン反復ドメイン、それぞれ腫瘍関連抗原1（TAA1）及び腫瘍関連抗原2（TAA2）に対する結合特異性を有する2つのアンキリン反復ドメイン、並びにCD3に対する結合特異性を有する1つのアンキリン反復ドメインを追加的に含む、マルチドメインT細胞エンゲージャ結合タンパク質でフォーマットされたDARPin（登録商標）タンパク質#29を、腫瘍細胞株MOLM-13を保有する末梢血単核細胞（PBMC）ヒト化マウスモデルで試験した。インビボ実験を、6～9週齢の雌免疫不全NXGマウス（Janvier Labsによって提供された）において実施した。マウスを、標準的な齧歯類マイクロアイソレーターケージ（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0.22 µm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。

【0241】

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

ーマルチドメインTCEフォーマットのDARPin（登録商標）タンパク質#29、又はビヒクルを、0.5 mg/kgで2週間にわたり、週に3回、i.v.投与した

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

【0242】

図7 (A~B) に見られるように、マルチドメインTCEフォーマットでのDARPin (登録商標) タンパク質#29は、実験の全期間にわたって (図7A)、及び最初の注射の17日後に (図7B)、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。

【0243】

実施例9：ヒト汎T細胞と共培養したMOLM13野生型及びMOLM13 CRISPR CD33ノックアウト (KO) 標的細胞を用いた、DARPin (登録商標) タンパク質#29又はDARPin (登録商標) タンパク質#30を含む例示的なマルチドメインTCE結合タンパク質のインビトロ有効性評価

ヒト血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つのアンキリン反復ドメイン、それぞれ腫瘍関連抗原1 (TAA1) 及び腫瘍関連抗原2 (TAA2) に対する結合特異性を有する2つのアンキリン反復ドメイン、並びにCD3に対する結合特異性を有する1つのアンキリン反復ドメインを追加的に含む、マルチドメインT細胞エンゲージャ結合タンパク質で各々フォーマットされたDARPin (登録商標) タンパク質#29及びDARPin (登録商標) タンパク質#30を、CD8+T細胞上のCD25活性化マーカーをFACSで測定することによって、インビトロ短期T細胞活性化アッセイで試験した。このアッセイでは、汎T細胞を標的細胞と共培養し、これにより、標的細胞は、(1) CD33、TAA1、及びTAA2の野生型標的発現を有するMolm-13腫瘍細胞、又は(2) CRISPRノックアウト (KO) 技術によってCD33 (TAA1及びTAA2ではない) の発現が排除されたMolm-13腫瘍細胞のいずれかであった (図8A及び図8B)。

【0244】

この目的のために、1ウェル当たり100,000個の精製された汎Tエフェクター細胞及び20,000個の標的細胞を、20µMのヒト血清アルブミンの存在下で、37℃で48時間、それぞれのマルチドメインT細胞エンゲージャ結合タンパク質の段階希釈物と2連で同時インキュベートした (E:T比5:1)。48時間後、細胞を洗浄し、1:1,000のLive/Dead Green (Thermo Fisher)、1:400マウス抗ヒトCD8 Pacific Blue (BD)、及び1:100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。FlowJoソフトウェアを用いてFACSデータを分析し、GraphPad Prism8 (3-PL-フィット) を用いてデータをプロットする。

【0245】

結果は、DARPin (登録商標) タンパク質#29 (図8A) 又はDARPin (登録商標) タンパク質#30 (図8B) のいずれかを含む例示的なマルチドメインT細胞エンゲージャ結合タンパク質の両方が、野生型発現を有するMolm-13腫瘍細胞の存在下においてT細胞を強力に活性化することができたことを実証している (曲線1; DARPin (登録商標) タンパク質#29 TCEのEC50値: 5.71pM; DARPin (登録商標) タンパク質#30 TCEのEC50値: 5.60pM)。更に、結果はまた、Molm-13腫瘍細胞におけるCD33の発現が排除された場合、T細胞の活性化が有意に減少したことも実証している (曲線2; DARPin (登録商標) タンパク質#29 TCEのEC50値: 27.36pM; DARPin (登録商標) タンパク質#30 TCEのEC50値: 47.00pM)。これは、DARPin (登録商標) タンパク質#29 (図8A) 及びDARPin (登録商標) タンパク質#30 (図8B) が、例示的なマルチドメインT細胞エンゲージャ結合タンパク質に関連して機能的であり、かつ標的細胞上のCD33に特異的に結合するそれらの能力のために、多重特異性T細胞エンゲージャタンパク質の全体的な効力に有意に寄与したという証拠を提供する。

【0246】

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。

【0247】

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。

【0248】

【表8-1】

配列

配列番号	配列表の説明	特許出願の記載	配列
1	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#1	DLGWKLLLAASRGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDIDEGYTPLHIAAAYGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAISGHEDIAEVLLKAGADVNAQDDKGDTPADLAADYGHEDIAEVLQKAA
2	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#2	DLGVKLLLAASRGQLDEVRIILKAGADVNAKDIDEGYTPLHIAAAYGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAISGHLEIVEVLLKAGADVNAQDDKGDTPADLAADYGHQDIAEVLQKAA
3	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#3	DLGVKLLRAAFHGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDDTGETPLHYAAQFGHLEIVEVLLKAGADVNAKDAYGATPLHWAAWHGHLEIVEVLLKAGADVNAQDVSGATPADLAACKVGHEDIAEVLQKAA
4	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#4	DLGVKLLRAAVHGGQLDEVRIILKAGADVNAKDDTGETPLHYAAQFGHLEIVEVLLKAGADVNAKDAYGATPLHWAAWHGHLEIVEVLLKAGADVNAQDVSGATPADLAACKVGHQDIAEVLQKAA
5	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#5	DLSKLLQAARAGQLDEVRELLKAGADVNAKDGIGQTPLHLAAQSGHLEIVEVLLKAGADVNAKDTEGWTPLVAAWEGHLEIVEVLLKAGADVNAKDWGTGETPLHLAAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAQDKSGKTPADLAARAGHQDIAEVLQKAA
6	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#6	DLGKLLQAARAGQLDEVRELLKAGADVNAKDGIGQTPLHLAAQSGHLEIVEVLLKAGADVNAKDTEGWTPLVAAWEGHLEIVEVLLKAGADVNAKDWGTGETPLHLAAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAQDKSGKTPADLAARAGHQDIAEVLQKAA
7	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#7	DLGLKLLRAAYDGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDWQGFTPLHYAAVLGHLEIVEVLLKAGADVNAKDQEGATPLHLAALHGHLEIVEVLLKAGADVNAQDESGWTPADLAACKVGHEDIAEVLQKAA
8	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#8	DLGWKLLSAATLGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDEWGKTPHWAASTGHLEIVEVLLKAGADVNAKDLDWGHTPLHEAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNIGDTPADLAAYQGHEDIAEVLQKAA
9	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#9	DLGYKLLWAASAGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAKDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNAQDEWGNTPADLAAYGHGDI AEVLQKAA
10	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#10	DLGYKLLWAASAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAKDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNAQDEWGNTPADLAAYGHGDI AEVLQKAA
11	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#11	DLGYKLLWAASAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAKDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNAQDEWGNTPADLAAYGHEDIAEVLQKAA
12	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#12	DLGVKLLWAASAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAKDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNAQDEWGNTPADLAAYGHGDI AEVLQKAA
13	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#13	DLGYKLLWAASAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNAKDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNAQDEWGNTPADLAAYGHEDIAEVLQKAA
14	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質#14	DLGWKLLNAAIAGQDDDEVRIILAAAGADVNAKDTEYGWTPHLHIAASDGHLEIVEVLLKAGADVNAKDYAGSTPLHAAAFVGHLEIVEVLLKAGADVNAQDHQGGTPADLAAGQGHVDIAEVLQKAA

【0249】

10

20

30

40

50

(上記表の続き)

20

(上記表の続き)

40

50

(上記表の続き)

配列番号	配列表の説明	特許出願の記載	配列
34	アンキリン反復モジュール		KDQIGQTPLHLAAQSGHLEIVEVLLKAGADVNA
35	アンキリン反復モジュール		KDTEGWTPHLVAAWEGHLEIVEVLLKAGADVNA
36	アンキリン反復モジュール		KDWTGETPLHLAAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNA
37	アンキリン反復モジュール		KDWQGFTPLHYAAVLGHLEIVEVLLKAGADVNA
38	アンキリン反復モジュール		KDQEGATPLHLAALHGHLEIVEVLLKAGADVNA
39	アンキリン反復モジュール		KDEWGKTPLHWAASTGHLEIVEVLLKAGADVNA
40	アンキリン反復モジュール		KDLWGHGTPLHEAAAKGHLEIVEVLLKAGADGNA
41	アンキリン反復モジュール		KDKDGATPLHFAAAKGHLEIVEVLLKAGADVNA
42	アンキリン反復モジュール		KDNRGATPLHYVAAASGHLEIVEVLLKAGADVNA
43	アンキリン反復モジュール		KDNRGATPLHYAAASGHLEIVEVLLKAGADVNA
44	アンキリン反復モジュール		KDTEYGWTPLHIAASDGHLEIVEVLLKAGADVNA
45	アンキリン反復モジュール		KDYAGSTPLHAAAFVGHLEIVEVLLKAGADVNA
46	アンキリン反復モジュール		KDLIGWTPHLHAAHYGHLEIVEVLLKAGADVNA
47	アンキリン反復モジュール		KDAQGWTPLHIAAWEGHLEIVEVLLKAGADVNA
48	アンキリン反復モジュール		KDWTGETPLHLAAAFEGHLEIVEVLLKAGADVNA
49	アンキリン反復モジュール		KDHQGETPLHLAASQGHLEIVEVLLKAGADVNA
50	アンキリン反復モジュール		KDLAGYTPLHLAAWTGHLEIVEVLLKAGADVNA
51	アンキリン反復モジュール		KDQWGRTPLHIAAASGHLEIVEVLLKAGADVNA
52	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGKKLLEAARAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHLAARNGHLKIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPHLHAAANEGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA
53	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGKKLLEAARAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHLAARNGHLKIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPHLHAAADGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA
54	ヒト血清アルブミンに特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGKKLLEAARAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDYFSHTPLHLAARNGHLKIVEVLLKAGADVNA KDFAGKTPHLHAAADGHLEIVEVLLKAGADVNAQDIFGKTPADIAADAGHEDIAEVLQKAA
55	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKKLEAAWAGQDDDEVRELLKAGADVNAKDSGGWTPLHTAAQGTGHLEIFEVLLKAGADVNA AKDDKGVTPHLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA
56	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKKLEAAWAGQDDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPPLHTAAQGTGHLEIFEVLLKAGADVNA AKDDKGVTPHLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA
57	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKKLEAAWAGQDDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPPLHTAAQGTGHLEIFEVLLKAGADVNA AKNDKRVTPHLHAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAQDSWGTTTPADLAAKYGHEDIAEVLQKAA

10

20

【表 8-5】

(上記表の続き)

配列番号	配列表の説明	特許出願の記載	配列
58	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKLLAAAWAGQLDEVIRILLKAGADVNAKNSRGWTPPLHTAAGTGHLEIFEVLLKAGADVNA KTNRKVPTPLHLAAALGHLAIVEVLVKAGADVNARDTWGTTPADLAACYGHRDIAEVLQKAA
59	CD3に特異的なアンキリン反復ドメイン		DLGQKLLAAAWAGQDDDEVIRILLAAGADVNAKNSRGWTPPLHTAAGTGHLEIFEVLLKAGADVNA KNDRKVPTPLHLAAALGHLAIVEVLVKAGADVNARDSWGTTTPADLAACYGHGDIAEVLQKLN
60	CD33標的タンパク質(ECD)		DPNFWLQVGESVTYVQGLCVLPCTFFHPPIYYDKNSPVHGYWFREGAIISGDSPVATNKLDQ EVQEETQGGRFRLLGDPSPRNNGSLSDARRRDNGSYFFRMERGSTKYYSKSPQLSVHVDTLTI RPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTTPPISWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPDHGHT NLTCQVKFAGAGVTITERITQLNVTVYPQNPTTGIFPGDGSGKGTRAGVVH
61	CD33標的タンパク質(ECDスプライズ変異体)		DLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWASEQGTTPPISWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPD DHGTNLTCQVKFAGAGVTITERITQLNVTVYPQNPTTGIFPGDGSGKGTRAGVVH
62	アンキリン反復モジュール		xDxxGxTPLHLAxxxGxxxIVxVLLxxGADVNA 式中、「x」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、システイン、グリシン、又はプロリンではない)
63	アンキリン反復モジュール		xDxxGxTPLHLAxxxGHLAIVEVLKKxGADVNA 式中、1、3、4、6、14、15位の「x」は、任意のアミノ酸(好ましくは、システイン、グリシン、若しくはプロリンではない)を表し、27位の「x」は、アスパラギン、ヒスチジン、又はチロシンからなる群から選択される
64	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン		GSDLGWKLLLLAASRGQDDDEVIRILLAAGADVNAKDIDEGYTPLHIAAYYGHLAIVEVLVKAGADV NAKDTRYGKTPPLHLAAISGHEDIAEVLVKAGADVNAQDDKGDTPADLAADYGHDIAEVLQKAA
65	高PTペプチドリッカー		GSPTPTPTPTPTPTPTPTPTPTGS
66	高PTペプチドリッカー		GSPTPTPTPTPTPTPTPTPTPTPT
67	コンセンサスGSリナー		[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser] _n 、式中、nは、1、2、3、4、5、又は6である
68	His-タグ		MRSHHHHHHH
69	N-キャップ		DLGKKLLQAARAGQLDEVRELLKAGADVNA
70	N-キャップ		DLGKKLLQAARAGQLDEVIRILLKAGADVNA
71	N-キャップ		DLGKKLLQAARAGQLDEVIRILLAAGADVNA
72	N-キャップ(ランダム化)		DLGXLLQAAXXGQLDXRXLXXXGADVNA 式中、「X」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、システイン、グリシン、又はプロリンではない)
73	C-キャップ		GDKFGKTPADIAADNGHEDIAEVLQKLN
74	C-キャップ		GDKSGKTPADLAARAGHQDIAEVLQKAA
75	C-キャップ		QDSSGFTPADLAALVGHEDIAEVLQKLA
76	Cキャップ(ランダム化)		DXXXGTXPPXXAARXGXQXXXXXXAA 式中、「X」は、任意のアミノ酸を表す(好ましくは、システイン、グリシン、又はプロリンではない)

30

40

【 0 2 5 3 】

50

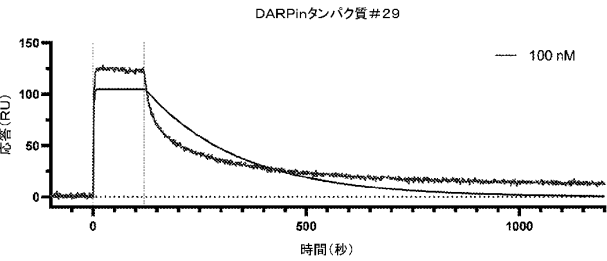
【表 8－6】

(上記表の続き)

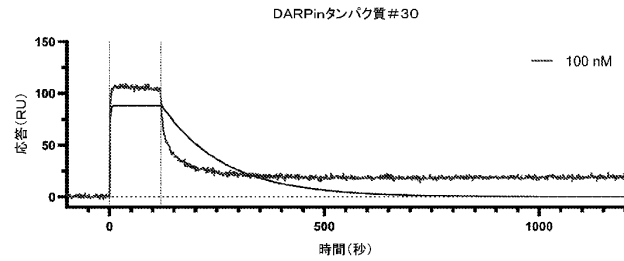
配列番号	配列表の説明	特許出願の記載	配列
77	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質 #29	DLGVKLLAAERGQLDEVRIILKAGADVNAKDIAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAJGGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNKGSTPADLAADYGHQDIAEVLQKAA
78	CD33に特異的なアンキリン反復ドメイン	DARPin(登録商標)タンパク質 #30	DLGKKLLAAERGQLDEVRIILKAGADVNAKDRAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAISGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNKGSTPADLAADYGHQDIAEVLQKAA
79	アンキリン反復モジュール		KDIAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNA
80	アンキリン反復モジュール		KDRYGKTPHLHAAJGGHLEIVEVLLKAGADVNA
81	アンキリン反復モジュール		KDRAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNA
82	CD33－CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標)タンパク質 #31	DLGVKLLAAERGQLDEVRIILKAGADVNAKDIAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAJGGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNKGSTPADLAADYGHQDIAEVLQKAAGSPTPTPTTPTPTPTPTPTPTGSDLGQKLLAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQTGHLEIFEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAARDSWGTTPADLAAKYGHQDIAEVLQKAA
83	CD33－CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標)タンパク質 #32	DLGKKLLAAERGQLDEVRIILKAGADVNAKDRAEGYTPLHIAAYQGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAISGHLEIVEVLLKAGADVNAQDNKGSTPADLAADYGHQDIAEVLQKAAGSPTPTPTTPTPTPTPTPTPTGSDLGQKLLAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQTGHLEIFEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAARDSWGTTPADLAAKYGHQDIAEVLQKAA
84	CD33－CD3に特異的なアンキリン反復タンパク質	DARPin(登録商標)タンパク質 #33	DLGVKLLAAERGQLDEVRIILKAGADVNAKDIDEGYTPLHIAAYYGHLEIVEVLLKAGADVNAKDRYGKTPHLHAAJGGHLEIVEVLLKAGADVNAQDDKGDTPADLAADYGHQDIAEVLQKAAGSPTPTPTTPTPTPTPTPTPTGSDLGQKLLAAWAGQDDEVRELLKAGADVNAKNSRGWTPLHTAAQTGHLEIFEVLLKAGADVNAKNDKRVTPHLAAALGHLEIVEVLLKAGADVNAARDSWGTTPADLAAKYGHQDIAEVLQKAA
85	His-タグ		MRGSHHHHHHGS

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

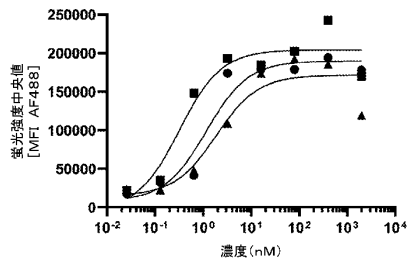
20

30

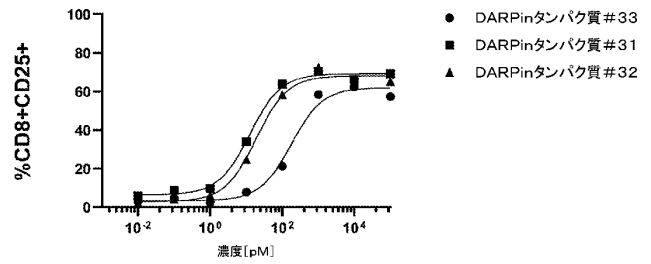
40

50

【図 2】

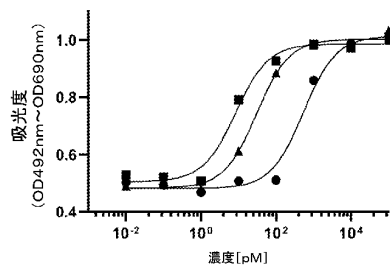


【図 3】

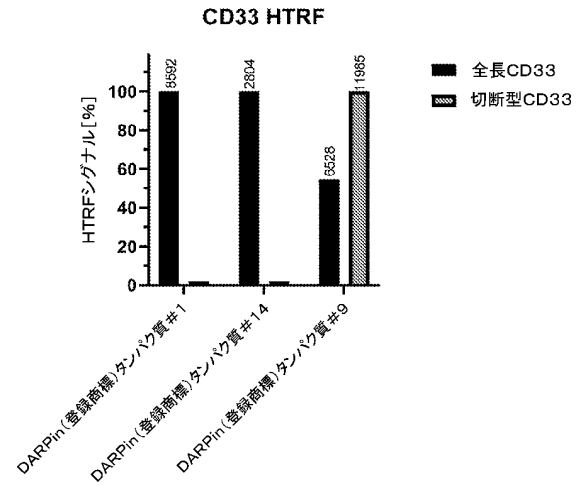


10

【図 4】

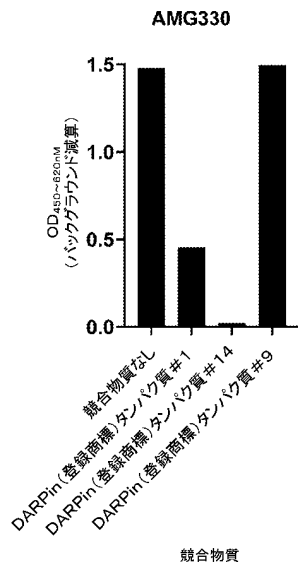


【図 5】

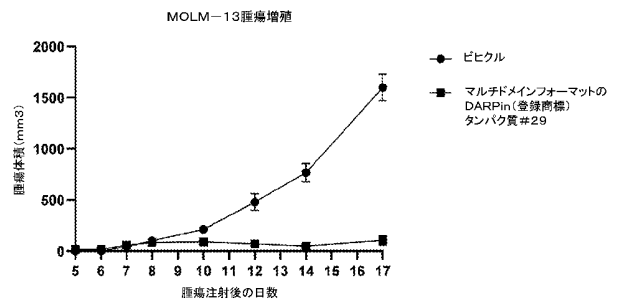


20

【図 6】



【図 7 A】

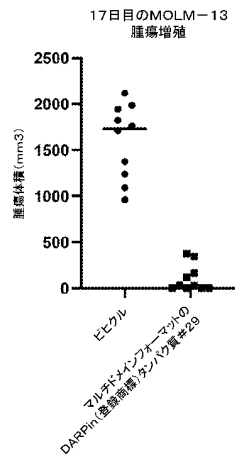


30

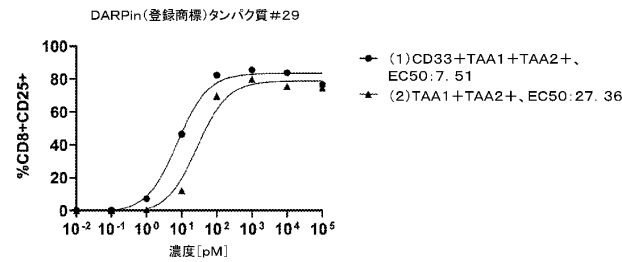
40

50

【図 7 B】

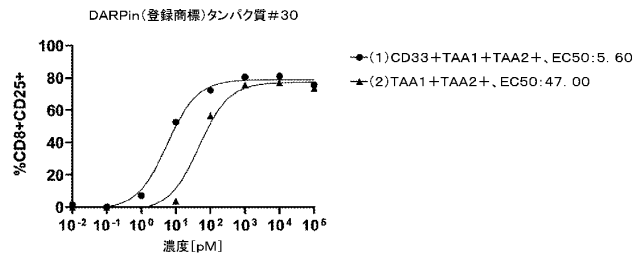


【図 8 A】



10

【図 8 B】



20

【配列表】

202450896900001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/052120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/02 C07K16/28 C07K16/46 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K		
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, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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/2/2/4/79/35906262/tbz010.pdf [retrieved on 2019-12-03] paragraph bridging page 83 and 84 ----- -/--	1-30
☒ 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2022		Date of mailing of the international search report 29/06/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Voigt-Ritzer, Heike

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/052120

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Anonymous: "Molecular Partners: Pioneering a new class of drugs with a broad portfolio and global partnerships", 1 November 2020 (2020-11-01), pages 1-36, XP55903556, Retrieved from the Internet: URL:https://investors.molecularpartners.com/static-files/2bbb524d-477e-451a-afd4-1a912bbcf55 [retrieved on 2022-03-21] page 5	1-30
A	BINZ H. KASPAR ET AL: "Design and characterization of MP0250, a tri-specific anti-HGF/anti-VEGF DARPIn drug candidate", MABS, vol. 9, no. 8, 16 October 2017 (2017-10-16), pages 1262-1269, XP55927972, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2017.1305529 abstract	1-30
A	VENUGOPAL SANGEETHA ET AL: "An Update on the Clinical Evaluation of Antibody-Based Therapeutics in Acute Myeloid Leukemia", CURRENT HEMATOLOGIC MALIGNANCY REPORTS, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 16, no. 1, 1 February 2021 (2021-02-01), pages 89-96, XP037429594, ISSN: 1558-8211, DOI: 10.1007/s11899-021-00612-w [retrieved on 2021-02-25] paragraph bridging page 91-92 table 1	1-30
Y	KRUPKA C ET AL: "Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism", LEUKEMIA, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 30, no. 2, 4 August 2015 (2015-08-04), pages 484-491, XP037784546, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/LEU.2015.214 [retrieved on 2015-08-04] the whole document	1-30

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/052120

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEINER D ET AL: "Efficient Selection of DARPins with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 382, no. 5, 24 October 2008 (2008-10-24), pages 1211-1227, XP025426617, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2008.07.085 [retrieved on 2008-08-06] abstract	1-30
A	----- DATABASE Geneseq [Online] 4 February 2021 (2021-02-04), "FAP-binding ankyrin repeat module, SEQ ID 132.", XP002806758, retrieved from EBI accession no. GSP:BIS20433 Database accession no. BIS20433 sequence	1-30
A	----- DATABASE Geneseq [Online] 17 October 2019 (2019-10-17), "Designed ankyrin repeat domain (binding specificity for albumin), SEQ 39.", XP002806759, retrieved from EBI accession no. GSP:BGS57221 Database accession no. BGS57221 sequence -----	1-30

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2022/052120
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:	

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	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(32)優先日 令和3年12月9日(2021.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766
弁理士 松田 七重

(72)発明者 レシュケ ニーナ
スイス 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーク 1 4 モレキュラー パートナーズ アクチエ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 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーク 1 4 モレキュラー パートナーズ アクチエ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 8 9 5 2 シュリーレン ヴァーギシュトラーク 1 4 モレキュラー パートナーズ アクチエンゲゼルシャフト内

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 NA14 ZB09 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 EA28 FA74 GA26