

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-546875

(P2024-546875A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全96頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-535534(P2024-535534)	(71)出願人	520335347
(86)(22)出願日	令和4年12月13日(2022.12.13)		シーディアール・ライフ・アクチェンゲ
(85)翻訳文提出日	令和6年8月9日(2024.8.9)		ゼルシャフト
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/085689		C D R - L I F E A G
(87)国際公開番号	WO2023/110918		スイス8810ホルゲン、テーディシュ
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)		トラーセ46
(31)優先権主張番号	63/289,380	(74)代理人	100145403
(32)優先日	令和3年12月14日(2021.12.14)		弁理士 山尾 憲人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
(31)優先権主張番号	63/317,256	(74)代理人	100170520
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)		弁理士 笹倉 真奈美
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100221545
			弁理士 白江 雄介
(31)優先権主張番号	63/328,417	(72)発明者	ポッラス, レオナルド
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二連型MHC標的化T細胞エンゲージャー

(57)【要約】

本明細書では、免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するFabドメイン、第1のpMHC結合ドメイン、及び第2のpMHC結合ドメインを含む抗原結合タンパク質について記載する。抗原結合タンパク質によってがんまたはウイルス感染を治療する方法についても記載する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原結合タンパク質であって、

- a) 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する、重鎖と軽鎖とを含む単一の F a b ドメインと、
- b) 前記重鎖に機能的に連結された少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド - M H C (p M H C) 複合体に結合する前記第 1 の p M H C 結合ドメインと、
- c) 前記軽鎖に機能的に連結された少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインであって、第 2 の標的 p M H C 複合体に結合する前記第 2 の p M H C 結合ドメインと、を含み、 F c ドメインを含まない、前記抗原結合タンパク質。

10

【請求項 2】

前記 F a b ドメイン重鎖が、C H 1 ドメインと V H ドメイン、及び前記 F a b ドメインの前記 C H 1 ドメインの C 末端に位置する、抗体ヒンジ領域の少なくとも 5 個のアミノ酸、好ましくは前記抗体ヒンジ領域の 5 ~ 10 個のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

前記 F a b ドメイン軽鎖が、C L ドメインと V L ドメインとを含む、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

前記第 1 の標的 p M H C 複合体と前記第 2 の標的 p M H C 複合体とが同じである、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 5】

前記第 1 の標的 p M H C 複合体と前記第 2 の標的 p M H C 複合体とが異なる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

前記第 1 の p M H C 結合ドメインが、前記重鎖の C 末端または前記重鎖の N 末端に機能的に連結されている、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

前記第 2 の p M H C 結合ドメインが、前記軽鎖の C 末端または前記軽鎖の N 末端に機能的に連結されている、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

30

【請求項 8】

前記第 1 及び / または第 2 の p M H C 結合ドメインが、s c F v、s d A b、s c F a b、ダイアボディまたは F a b、好ましくは s c F v または s d A b である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

- 1) 前記 F a b ドメイン重鎖の C 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s c F v と、前記 F a b ドメイン軽鎖の C 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s c F v、
- 2) 前記 F a b ドメイン重鎖の N 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s c F v と、前記 F a b ドメイン軽鎖の N 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s c F v、
- 3) 前記 F a b ドメイン重鎖の N 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s c F v と、前記 F a b ドメイン軽鎖の C 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s c F v、
- 4) 前記 F a b ドメイン重鎖の C 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s c F v と、前記 F a b ドメイン軽鎖の N 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s c F v、
- 5) 前記 F a b ドメイン重鎖の N 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s d A b と、前記 F a b ドメイン軽鎖の N 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s d A b、
- 6) 前記 F a b ドメイン重鎖の C 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s d A b と、前記 F a b ドメイン軽鎖の C 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s d A b、
- 7) 前記 F a b ドメイン重鎖の N 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s d A b と、前記 F a b ドメイン軽鎖の C 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s d A b、または

40

50

8) 前記 F a b ドメイン重鎖の C 末端に連結された第 1 の p M H C 結合 s d A b と、前記 F a b ドメイン軽鎖の N 末端に連結された第 2 の p M H C 結合 s d A b を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 10】

前記 F a b ドメインが、K a b a t の番号付けに従って、11 位、89 位及び / または 108 位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

前記第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または前記第 2 の p M H C 結合ドメインが、K a b a t の番号付けに従って、11 位、89 位及び / または 108 位に極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

前記可変重鎖が、K a b a t の番号付けに従って、11 位のアミノ酸にロイシン (L) もしくはセリン (S)、K a b a t の番号付けに従って、89 位のアミノ酸にバリン (V)、セリン (S)、またはスレオニン (T)、及び / または K a b a t の番号付けに従って、108 位のアミノ酸にロイシン (L)、セリン (S)、またはスレオニン (T) を含む、請求項 11 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 13】

前記極性アミノ酸が、セリン (S) 及び / またはスレオニン (T) である、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 14】

前記可変重鎖が、K a b a t の番号付けに従って 11 位のアミノ酸にセリン (S) を、89 位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を、108 位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を含む、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 15】

前記可変重鎖が、K a b a t の番号付けに従って、11 位のアミノ酸にセリン (S) を、89 位のアミノ酸にセリン (S) を、108 位のアミノ酸にセリン (S) を含む、請求項 11 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 16】

前記第 1 の p M H C 結合ドメインが、K a b a t の番号付けに従って 113 位のセリン (S) が欠失した可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

前記第 2 の p M H C 結合ドメインが、K a b a t の番号付けに従って 113 位のセリン (S) が欠失した可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 18】

前記第 1 の p M H C 結合ドメインが、K a b a t の番号付けに従って 112 位のセリン (S) が欠失し、113 位のセリン (S) が欠失した可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

前記第 2 の p M H C 結合ドメインが、K a b a t の番号付けに従って 112 位のセリン (S) が欠失し、113 位のセリン (S) が欠失した可変重鎖を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 20】

K a b a t の番号付けに従って、S 113 A、S 113 G、または S 113 T の置換を含む、請求項 18 または 19 に記載の抗原結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

K a b a t の番号付けに従って、S 1 1 3 A、S 1 1 3 G、または S 1 1 3 T の置換を含み、S 1 1 2 が欠失している、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 2】

K a b a t の番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、または S 1 1 2 T の置換を含む、請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 3】

K a b a t の番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、または S 1 1 2 T の置換を含み、S 1 1 3 が欠失している、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 2 4】

前記第 1 の標的 p M H C 結合ドメイン及び / または前記第 2 の標的 p M H C 結合ドメインが、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 5】

免疫細胞の前記細胞表面タンパク質が、C D 3、T C R、T C R、C D 1 6、N K G 2 D、C D 8 9、C D 6 4、及び C D 3 2 a からなる群から選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 6】

免疫細胞の前記細胞表面タンパク質が、C D 3 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 2 7】

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、ナチュラルキラー T (N K T) 細胞、好中球細胞、単球、及びマクロファージからなる群から選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 8】

前記免疫細胞が、T 細胞である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 2 9】

前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 1 n M ~ 約 5 0 n M、場合により約 2 0 n M ~ 5 0 n M の結合親和性で C D 3 に特異的に結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

30

【請求項 3 0】

前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 1 n M、約 1 0 n M、または約 5 0 n M の結合親和性 (K_D) で C D 3 に特異的に結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 1】

前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ $M^{-1} s^{-1}$ の結合速度定数 k_a で C D 3 に特異的に結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

40

【請求項 3 2】

前記結合速度定数 k_a が、S P R により決定した場合に、少なくとも $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ または少なくとも $2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ である、請求項 3 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 3】

前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} s^{-1}$ の解離速度定数 k_d で C D 3 に特異的に結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3 4】

50

前記解離速度定数 k_d が、SPRにより決定した場合に、少なくとも $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ である、請求項 33 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 35】

前記結合速度定数 k_a 及び / または前記解離速度定数 k_d が、CD3 ヘテロ二量体 CD3 (イプシロン / ガンマ) 及び CD3 (イプシロン / デルタ) の両方について同等または同様である、請求項 31 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 36】

前記第 1 の pMHC 結合ドメイン及び / または前記第 2 の pMHC 結合ドメインが、前記標的 pMHC 複合体に、約 500 pM ~ 約 10 nM の結合親和性 (K_D) で結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。 10

【請求項 37】

前記第 1 の pMHC 結合ドメイン及び / または前記第 2 の pMHC 結合ドメインが前記標的 pMHC 複合体に結合し、前記 pMHC 結合ドメインの結合速度定数 k_a が、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは約 $0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 38】

前記結合速度定数 k_a が、少なくとも $0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である、請求項 37 に記載の抗原結合タンパク質。 20

【請求項 39】

前記第 1 の pMHC 結合ドメイン及び / または前記第 2 の pMHC 結合ドメインが前記標的 pMHC 複合体に結合し、前記 pMHC 結合ドメインの解離速度定数 k_d が、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば約 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 40】

前記解離速度定数 k_d が、少なくとも $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ である、請求項 37 に記載の抗原結合タンパク質。 30

【請求項 41】

約 75 kDa ~ 約 110 kDa の分子量を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 42】

約 60 kDa またはそれ以下の分子量の抗原結合タンパク質と比較して、血清中半減期が増加している、請求項 41 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 43】

抗原結合タンパク質であって、

a) T細胞上の CD3 に特異的に結合する単一の Fab ドメインであって、重鎖と軽鎖とを含む、前記単一の Fab ドメインと、 40

b) 前記重鎖の C 末端に機能的に連結された少なくとも第 1 の pMHC 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド-MHC (pMHC) 複合体に結合する、前記第 1 の pMHC 結合ドメインと、

c) 前記軽鎖の C 末端に機能的に連結された少なくとも第 2 の pMHC 結合ドメインであって、第 2 の標的 pMHC 複合体に結合する、前記第 2 の pMHC 結合ドメインと、を含み、

Fc ドメインを含まない、前記抗原結合タンパク質。

【請求項 44】

ネオアンチゲンを提示する主要組織適合複合体 (MHC) を含む標的細胞を殺傷するための方法であって、

a) 免疫細胞及び前記標的細胞を含む複数の細胞を、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質と接触させることであって、前記抗原結合タンパク質が、前記標的細胞の表面の前記 p M H C と前記免疫細胞の表面の C D 3 とに特異的に結合する、前記接触させることと、

b) 前記抗原結合タンパク質と前記標的細胞及び前記免疫細胞との相互作用によって特異的結合複合体を形成し、それにより前記免疫細胞を活性化することと、

c) 前記活性化された免疫細胞で前記標的細胞を殺傷することと、を含む前記方法。

【請求項 4 5】

請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質を含む、組成物。

【請求項 4 6】

がんを治療する方法であって、がんの治療を必要とする患者に、請求項 4 5 に記載の組成物を投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 4 7】

請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質をコードする、核酸。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞集団。

【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質を含む、キット。

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質を製造する方法であって、
(i) 請求項 4 9 に記載の宿主細胞を、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質の発現が可能な条件下で培養する工程と、

(i i) 前記抗原結合タンパク質または二重特異性抗原結合タンパク質を回収する工程と、場合により、

(i i i) 前記抗原結合タンパク質または二重特異性抗原結合タンパク質をさらに精製及び/または改変及び/または製剤化する工程と、を含む、前記方法。

【請求項 5 2】

本明細書で上記に記載した発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2021年12月14日出願の米国特許仮出願第63/289,380号、2022年3月7日出願の米国特許仮出願第63/317,256号、及び2022年4月7日出願の米国特許仮出願第63/328,417号の利益を主張するものであり、これらの開示内容の全体を参照によって本明細書に援用するものである。

【0 0 0 2】

本開示は、腫瘍ペプチド - M H C (p M H C) 複合体に高い特異性で結合し、さらに F a b フォーマットの C D 3 標的化部分を含む極めて強力な T 細胞エンゲージャー抗体フォーマットに関する。このような p M H C T 細胞エンゲージャーは、サイトカイン放出の調整における異なる親和性において、二価の p M H C 結合及び一価の C D 3 結合に依存している。がん細胞上の p M H C の二価の標的化は、細胞表面上の p M H C のレベルが非常に低いにもかかわらず、効率的な T 細胞媒介性のがん細胞の殺傷をもたらす。

【背景技術】

【0 0 0 3】

細胞内腫瘍関連抗原 (T A A) に由来するペプチド - M H C 複合体 (p M H C) は、免疫療法のための新規標的の大きなレパートリーを代表するものである。p M H C は、実質的にすべての有核細胞の表面に存在し、T細胞によって常に監視されている。T細胞受容

10

20

30

40

50

体 (T C R) が p M H C に結合すると、感染細胞及び/または悪性形質転換細胞が認識され、排除される。したがって、M H C クラス I 分子上にペプチドとして提示される細胞内腫瘍関連タンパク質は、免疫療法アプローチにとって魅力的な標的であり、臨床試験から有望なデータがすでに得られている。p M H C は、従来より、T C R 改変 T 細胞または抗 C D 3 断片に融合された可溶性組換え T 細胞受容体 (T C R) の標的とされてきた。しかしながら、天然に存在するがん反応性 T C R が、その p M H C 標的に対して示す結合親和性は通常 $0.1 \sim 500 \mu\text{M}$ である。したがって、天然のがん反応性 T C R は、薬物として開発されるうえで必要な結合親和性及び生物物理学的特性を付与するために多大な技術的努力を必要とするが、これにより、p M H C 標的に対する必要な特異性を損なうおそれがある。逆に、細胞内腫瘍関連抗原に由来する p M H C に対して高い特異性を有する高親和性可溶性抗体分子を開発することで、大幅な親和性の向上を必要とする、課題となる T C R の低い親和性が解消される。

10

【発明の概要】**【0004】**

本開示は、抗原結合タンパク質であって、免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する、重鎖と軽鎖とを含む F a b ドメインと、重鎖に機能的に連結された少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド - M H C (p M H C) 複合体に結合する第 1 の p M H C 結合ドメインと、c) 軽鎖に機能的に連結された少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインであって、第 2 の p M H C 複合体に結合する第 2 の p M H C 結合ドメインと、を含む、抗原結合タンパク質に関する。本発明の二重特異性抗原結合タンパク質による p M H C の二価標的化は、一価の二重特異性抗原結合タンパク質と比較してがん細胞の殺傷力が増加するが、同じ H L A アレルを保有するが標的タンパク質を発現していない細胞に対する全体的な特異性は実質的に影響されない。

20

【0005】

本発明の抗原結合タンパク質は、F c ドメインを欠く。したがって、本開示の抗原結合タンパク質は、エフェクター細胞上の F c 受容体、例えば、マクロファージ及び活性化好中球上の F c 受容体 F c R I I I、または F c R I I b のような阻害性受容体、ならびに血小板及び B 細胞のような非細胞傷害性細胞上の F c R I I a 複合体を介して認識されない。二重特異性 T 細胞エンゲージャーの場合、C D 3 と F c 受容体の架橋、及びそれに続く免疫細胞の非特異的活性化に起因する抗原非依存性のサイトカイン放出症候群 (C R S) を回避するために F c 媒介性免疫機能は望ましくない。むしろ、抗原結合タンパク質の F a b ドメインは、さらなる p M H C 結合ドメインが連結される特異的ヘテロ二量体化足場として機能する。F a b 断片の重鎖 (F d 断片) 及び軽鎖 (L) の天然の効率的なヘテロ二量体化特性は、F a b 断片を有用な足場とするものである。さらなる結合ドメインは、別の F a b ドメイン、s c F v、または s d A b を含む (ただし、これらに限定されない) いくつかの異なるフォーマットであり得る。さらに、特定の状況では、F c 含有抗原結合タンパク質は、半減期の延長によって不利となり得る。半減期の延長は、とりわけ、免疫細胞からの過剰なサイトカイン放出による傷害性の増加につながる可能性がある。半減期の延長はまた、T 細胞の疲弊も促進し得る。F c ドメインを欠いている本開示の抗原結合タンパク質は、F c を有する抗原結合タンパク質と比較して半減期が短縮されていることに一部起因して、細胞傷害性が低減されていると考えられる。

30

40

【0006】

一態様では、本開示は、抗原結合タンパク質であって、a) 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する、重鎖と軽鎖とを含む単一の F a b ドメインと、b) 重鎖に機能的に連結された少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド - M H C (p M H C) 複合体に結合する第 1 の p M H C 結合ドメインと、c) 軽鎖に機能的に連結された少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインであって、第 2 の p M H C 複合体に結合する第 2 の p M H C 結合ドメインと、を含み、F c ドメインを含まない、抗原結合タンパク質を提供する。

【0007】

50

特定の実施形態では、F a bドメインの重鎖は、C H 1ドメインとV Hドメイン、及び抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸を含む。その特定の実施形態では、F a bドメインの重鎖は、C H 1ドメインのC末端に抗体ヒンジ領域の最大で10個のアミノ酸を含む。特定の実施形態では、F a bドメインの重鎖は、C H 1ドメインのC末端に抗体ヒンジ領域の5～10個のアミノ酸を含む。特定の実施形態では、抗体ヒンジ領域の前記少なくとも5個のアミノ酸または前記最大10個のアミノ酸は、配列E P K S C（配列番号87）を含む。さらに、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸、最大10個のアミノ酸の後にそれぞれ、G G G G S（配列番号88）リンカーが続いてもよい。

【0008】

特定の実施形態では、F a bドメインの軽鎖は、C LドメインとV Lドメインとを含む。C Lドメインの後に、G G G G S（配列番号88）などのリンカーが続いてもよい。

10

【0009】

特定の実施形態では、第1の標的p M H C複合体と第2の標的p M H C複合体とは同じである。特定の実施形態では、第1の標的p M H C複合体と第2の標的p M H C複合体とは異なる。

【0010】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメインは、重鎖のC末端または重鎖のN末端に機能的に連結される。特定の実施形態では、第2のp M H C結合ドメインは、重鎖のC末端または重鎖のN末端に機能的に連結される。

【0011】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメインは、軽鎖のC末端または軽鎖のN末端に機能的に連結される。特定の実施形態では、第2のp M H C結合ドメインは、軽鎖のC末端または軽鎖のN末端に機能的に連結される。

20

【0012】

特定の実施形態では、p M H C結合ドメインは、s c F vまたはs d A bである。本明細書の他の箇所に記載されるように、p M H C結合ドメインは、s c F a b、ダイアボディ、またはF a bのうちのいずれか1つであってもよい。

【0013】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、1) F a bドメイン重鎖のC末端に連結された第1のp M H C結合s c F vと、F a bドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のp M H C結合s c F v、2) F a bドメイン重鎖のN末端に連結された第1のp M H C結合s c F vと、F a bドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のp M H C結合s c F v、3) F a bドメイン重鎖のN末端に連結された第1のp M H C結合s c F vと、F a bドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のp M H C結合s c F v、4) F a bドメイン重鎖のC末端に連結された第1のp M H C結合s c F vと、F a bドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のp M H C結合s c F v、5) F a bドメイン重鎖のN末端に連結された第1のp M H C結合s d A bと、F a bドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のp M H C結合s d A b、6) F a bドメイン重鎖のC末端に連結された第1のp M H C結合s d A bと、F a bドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のp M H C結合s d A b、7) F a bドメイン重鎖のN末端に連結された第1のp M H C結合s d A bと、F a bドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のp M H C結合s d A b、または8) F a bドメイン重鎖のC末端に連結された第1のp M H C結合s d A bと、F a bドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のp M H C結合s d A bを含む。

30

40

【0014】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って、11位、89位及び/または108位に極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

【0015】

特定の実施形態では、F a bドメインは、K a b a tの番号付けに従って、11位、89位及び/または108位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

50

【 0 0 1 6 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にロイシン(L)またはセリン(S)を、K a b a tの番号付けに従って89位のアミノ酸にバリン(V)、セリン(S)、またはスレオニン(T)を、及び/またはK a b a tの番号付けに従って108位のアミノ酸にロイシン(L)、セリン(S)、またはスレオニン(T)を含む。

【 0 0 1 7 】

特定の実施形態では、極性アミノ酸は、セリン(S)及び/またはスレオニン(T)である。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にセリン(S)を、89位のアミノ酸にセリン(S)またはスレオニン(T)を、108位のアミノ酸にセリン(S)またはスレオニン(T)を含む。

10

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にセリン(S)を、89位のアミノ酸にセリン(S)を、108位のアミノ酸にセリン(S)を含む。

【 0 0 2 0 】

特定の実施形態では、F a bドメインは、K a b a tの番号付けに従って、113位のセリン(S)が欠失した可変重鎖を含む。

20

【 0 0 2 1 】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って113位のセリン(S)が欠失した可変重鎖を含む。

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態では、F a bドメインは、K a b a tの番号付けに従って、112位のセリン(S)が欠失し、かつ113位のセリン(S)が欠失した可変重鎖を含む。

【 0 0 2 3 】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って、112位のセリン(S)が欠失し、かつ113位のセリン(S)が欠失した可変重鎖を含む。

30

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 3 A、S 1 1 3 G、またはS 1 1 3 Tの置換を含む。

【 0 0 2 5 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 3 A、S 1 1 3 G、またはS 1 1 3 Tの置換を含み、S 1 1 2が欠失している。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、またはS 1 1 2 Tの置換を含む。

40

【 0 0 2 7 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、またはS 1 1 2 Tの置換を含み、S 1 1 3が欠失している。

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態では、標的p M H C結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来するM H C拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態では、免疫細胞の細胞表面タンパク質は、C D 3、T C R、T C R、C D 1 6、N K G 2 D、C D 8 9、C D 6 4、及びC D 3 2 aからなる群から選択される。特定の実施形態では、免疫細胞の細胞表面タンパク質は、C D 3である。

50

【0030】

特定の実施形態では、免疫細胞は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、好中球細胞、単球、及びマクロファージからなる群から選択される。特定の実施形態では、免疫細胞は、T細胞である。

【0031】

特定の実施形態では、Fabドメインは、SPRによって決定した場合に、約1 nM ~ 約50 nM、場合により約20 nM ~ 50 nMの結合親和性（ K_D ）でCD3に特異的に結合する。

【0032】

特定の実施形態では、Fabドメインは、SPRによって測定した場合に約1 nM、約10 nM、または約50 nMの結合親和性（ K_D ）でCD3に特異的に結合する。

10

【0033】

特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的ペプチドpMHC複合体に約100 pM ~ 約5 nMの結合親和性（ K_D ）で結合する。特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的ペプチドpMHC複合体に約500 pM ~ 約5 nM、~ 約10 nM、または約20 nMの結合親和性（ K_D ）で結合する。

【0034】

特定の実施形態では、該抗原結合タンパク質は、約75 kDa ~ 約100 kDaの分子量、または約75 kDa ~ 約105 kDaもしくは110 kDaの分子量を有する。

20

【0035】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、約60 kDa未満の分子量を有する抗原結合タンパク質と比較して増加した血清中半減期を有する。

【0036】

したがって、一態様では、本開示は、抗原結合タンパク質であって、a) T細胞のCD3に特異的に結合する、重鎖と軽鎖とを含む単一のFabドメインと、b) 重鎖のC末端に機能的に連結された少なくとも第1のpMHC結合ドメインであって、第1の標的ペプチド-MHC（pMHC）複合体に結合する第1のpMHC結合ドメインと、c) 軽鎖のC末端に機能的に連結された少なくとも第2のpMHC結合ドメインであって、第2のpMHC複合体に結合する第2のpMHC結合ドメインと、を含み、Fcドメインを含まない、抗原結合タンパク質を提供する。

30

【0037】

一態様では、本開示は、T細胞結合多重特異性抗原結合タンパク質の非特異的T細胞活性化を低減する方法であって、多重特異性抗原結合タンパク質が、CD3を特異的に標的化する第1の結合ドメインと、腫瘍抗原を特異的に標的化する第2の結合ドメインとを含み、多重特異性抗原結合タンパク質が少なくとも1つの可変重鎖を含み、a) Kabatの番号付けに従って、11位、89位、及び/または108位の可変重鎖アミノ酸を極性アミノ酸に置換することを含む、方法を提供する。

【0038】

特定の実施形態では、方法は、b) Kabatの番号付けに従って、113位のセリン（S）を欠失させる工程をさらに含む。

40

【0039】

特定の実施形態では、工程a)の極性アミノ酸は、セリン（S）及び/またはスレオニン（T）である。

【0040】

特定の実施形態では、重鎖アミノ酸は、Kabatsの番号付けに従って、重鎖の11位のアミノ酸がセリン（S）に、重鎖の89位のアミノ酸がセリン（S）またはスレオニン（T）に、及び/または重鎖の108位のアミノ酸がセリン（S）またはスレオニン（T）に置換される。

【0041】

50

特定の実施形態では、重鎖アミノ酸は、K a b a tの番号付けに従って、重鎖の11位のアミノ酸がセリン(S)に、重鎖の89位のアミノ酸がセリン(S)に、重鎖の108位のアミノ酸がセリン(S)に置換される。

【0042】

特定の実施形態では、工程b)は、K a b a tの番号付けに従って、112位のセリン(S)を欠失させる工程をさらに含む。

【0043】

特定の実施形態では、方法は、K a b a tのアミノ112または113位でアラニン(A)、グリシン(G)またはスレオニン(T)を添加することをさらに含む。

【0044】

特定の実施形態では、方法は、K a b a tのアミノ酸112位または113位にアラニン(A)を付加することを含む。

【0045】

特定の実施形態では、置換及び/または欠失は、第2の結合ドメインの重鎖に行われる。

【0046】

特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質は、一価、二価または多価である。

【0047】

特定の実施形態では、かかる方法で使用することができる抗原結合タンパク質は、F a b - s d A b、F a b - (s d A b)₂、F a b - s c F vまたはF a b - (s c F v)₂、F (a b ')₂断片、ビス - s c F v (またはタンデム s c F v もしくは B i T E)、D A R T、ダイアボディ、s c D b、D V D - I g、I g G - s c F a b、s c F a b - F c - s c F a b、I g G - s c F v、s c F v - F c、s c F v - f c - s c F v、F v₂ - F c、F y n o m A B、クアドローマ、C r o s s M a b、デュオボディー、トリアボディ及びテトラボディ、またはM A T C Hである。

【0048】

特定の実施形態では、第2の結合ドメインは、p M H Cを特異的に標的とする。特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質は、さらに、p M H Cを特異的に標的とする第3の結合ドメインを含む。特定の実施形態では、第2の結合ドメインと第3の結合ドメインとは、同じp M H Cまたは異なるp M H Cを特異的に標的とする。

【0049】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、C D 3を特異的に標的とする1個の結合ドメインと、p M H Cを特異的に標的とする1個の結合ドメインとを含む。

【0050】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、C D 3を特異的に標的とする1個の結合ドメインと、p M H Cを特異的に標的とする2個の結合ドメインとを含む。

【0051】

特定の実施形態では、p M H Cを特異的に標的とする2個の結合ドメイン同士は同じである。いくつかの実施形態では、2個のp M H C結合ドメインは、6個のC D R配列の同じセットを含む。いくつかの実施形態では、2個のp M H C結合ドメインは、同じV L及びV H配列を含む。

【0052】

したがって、特定の実施形態では、抗原結合タンパク質はF a b - (s c F v)₂であり、F a bはC D 3を標的とし、一方または両方のs c F vは、腫瘍抗原、詳細には例えば以下に概説するようなH L Aを提示するM A G E - A 4由来ペプチドのようなp M H C複合体を標的とする。本明細書に記載される置換及び/または欠失は、s c F vの重鎖に行われる。

【0053】

特定の実施形態では、p M H C結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来す

10

20

30

40

50

る M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、C D 3 に対する結合親和性 (K _D) は、S P R により測定した場合に、約 1 n M ~ 約 5 0 n M、場合により約 2 0 n M ~ 5 0 n M である。特定の実施形態では、C D 3 に対する結合親和性 (K _D) は、S P R によって決定して、約 1 n M、約 1 0 n M、または約 5 0 n M である。特定の実施形態では、C D 3 に対する結合親和性 (K _D) は、S P R によって決定して、約 1 n M、約 1 0 n M、または約 5 0 n M である。

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態では、p M H C に対する結合親和性 (K _D) は、約 1 0 0 p M ~ 約 2 0 n M、例えば、約 5 0 0 p M ~ 約 1 0 n M または約 5 0 0 p M ~ 約 5 n M または約 5 0 0 p M ~ 約 2 n M である。 10

【 0 0 5 6 】

一態様では、本開示は、上記に記載の方法によって得ることが可能な多重特異性抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 0 5 7 】

一態様では、本開示は、C D 3 に対して特異的な少なくとも 1 つの第 1 の結合ドメインと、腫瘍抗原に対して特異的な少なくとも 1 つの第 2 の結合ドメインとを含む抗原結合タンパク質であって、それぞれの結合ドメインが少なくとも 1 つの可変重鎖を含み、少なくとも 1 つの可変重鎖が、K a b a t の番号付けに従って、1 1 位、8 9 位及び / または 1 0 8 位に極性アミノ酸を含む、抗原結合タンパク質を提供する。 20

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、第 2 の結合ドメインの可変重鎖である。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、極性アミノ酸は、セリン (S) 及び / またはスレオニン (T) である。

【 0 0 6 0 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a t の番号付けに従って重鎖の 1 1 位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の 8 9 位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を、重鎖の 1 0 8 位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を含む。

【 0 0 6 1 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a t の番号付けに従って、重鎖の 1 1 位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の 8 9 位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の 1 0 8 位のアミノ酸にセリン (S) を含む。 30

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a t の番号付けに従って、1 1 3 位のセリン (S) が欠失されている。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a t の番号付けに従って、1 1 2 位及び 1 1 3 位のセリン (S) が欠失されている。

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a t の番号付けに従って、1 1 2 位にアラニン (A)、グリシン (G) またはスレオニン (T)、特にアラニン (A) を含む。 40

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a t の番号付けに従って、1 1 2 位にアラニン (A)、グリシン (G) またはスレオニン (T)、特にアラニン (A) を含む。

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態では、腫瘍抗原は、p M H C である。

【 0 0 6 7 】

特定の実施形態では、pMHC結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来するMHC拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【0068】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のCD3に対する親和性(K_D)は、SPRにより測定した場合に、約1nM~約50nM、好ましくは約20nM~50nMである。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のCD3に対する親和性(K_D)は、SPRにより測定した場合に、約1nM、約10nM、または約50nMである。

【0069】

特定の実施形態では、CD3に対して特異的な第1の結合ドメインは、Fab断片である。

10

【0070】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、2個以上のpMHC結合ドメインを含む。

【0071】

特定の実施形態では、pMHC結合ドメインは、scFvまたはsdAbである。

【0072】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性(K_D)は、約100pM~約20nM、例えば、約500pM~約10nMまたは約500pM~約5nMである。

【0073】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、Fab-sdAb、Fab-(sdAb)₂、Fab-scFvまたはFab-(scFv)₂、F(ab')₂断片、ビス-scFv(またはタンデムscFvもしくはBiTE)、DART、ダイアボディ、scDb、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-Fc-scFab、IgG-scFv、scFv-Fc、scFv-fc-scFv、Fv₂-Fc、FynomAB、クアドローム、CrossMab、デュオボディー、トリアボディ及びテトラボディ、またはMATCHである。

20

【0074】

一態様では、本開示は、ネオアンチゲンを提示する主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を含む標的細胞を殺傷するための方法であって、a)免疫細胞及び標的細胞を含む複数の細胞と上記に記載の抗原結合タンパク質とを接触させることであって、抗原結合タンパク質は、標的細胞の表面上のpMHCと免疫細胞の表面上のCD3とに特異的に結合する、前記接触させることと、b)抗原結合タンパク質と標的細胞及び免疫細胞との相互作用により特異的結合複合体を形成し、それによって免疫細胞を活性化することと、c)活性化された免疫細胞により標的細胞を殺傷することと、を含む、方法を提供する。

30

【0075】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質を含む組成物を提供する。

【0076】

一態様では、本開示は、がんを治療するための方法であって、上記に記載の組成物を、がんの治療を必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

40

【0077】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0078】

上記に記載の核酸を含む発現ベクター。

【0079】

一態様では、本開示は、上記に記載の発現ベクターを含む宿主細胞集団を提供する。

【0080】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質を含むキットを提供する

50

【 0 0 8 1 】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質を製造する方法であって、(i) 上記に記載の宿主細胞を、上記に記載の抗原結合タンパク質の発現を可能とする条件下で培養する工程と、(i i) 抗原結合タンパク質または二重特異性抗原結合タンパク質を回収する工程と、場合により、(i i i) 抗原結合タンパク質または二重特異性抗原結合タンパク質をさらに精製及び/または改変及び/または製剤化する工程と、を含む、方法を提供する。

【 0 0 8 2 】

本発明の上記及び他の特徴及び利点は、添付の図面と関連して記される以下の例示的な実施形態の詳細な説明から、より完全に理解されるであろう。本特許または出願書類には、カラーで作成された少なくとも1つの図面が含まれる。カラー図面(複数可)を含む本特許または特許出願公報の写しは、請求及び必要な手数料の支払いに応じて特許庁により提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 3 】

【 図 1 】 本開示の実施例 3 で使用される各抗原結合タンパク質フォーマットの概略図を示す。

【 図 2 】 フォーマット 1 及び 2 (A)、ならびにフォーマット 3 及び 4 (B) の一価 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした骨肉腫細胞におけるインビトロでの細胞殺傷力を示す。C は、フォーマット 5 及び 6 の二価 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした骨肉腫細胞におけるインビトロでの細胞殺傷力を示す。D は、それぞれ、フォーマット 3 及び 6 の一価及び二価 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーによって媒介される骨肉腫細胞のインビトロでの細胞殺傷力の直接比較を示す。

【 図 3 】 二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (四角) とインキュベートした骨肉腫細胞 (A) または黒色腫細胞 (B) におけるがん細胞殺傷率 (%) を、一連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (丸) と比較して示す。M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 : 0 1 陽性細胞株 U 2 O S (骨肉腫) をヒト P B M C と E : T 比 1 0 : 1 でインキュベートした。4 8 時間後に L D H 放出アッセイを用いて、がん細胞の殺傷力を異なる濃度の 2 つの抗原結合タンパク質で測定した。フローサイトメトリーを使用して、2 4 時間後の C D 8 T 細胞集団上の C D 6 9 及び C D 2 5 マーカーを定量することによって T 細胞活性化を測定した (C : 骨肉腫細胞、D : 黒色腫細胞) 。

【 図 4 】 本発明の二重特異性抗体の一実施形態の概略図を示す。示される実施形態である F a b - (s c F v) ₂ は、抗 C D 3 F a b 断片と、M H C 複合体上に提示される標的ペプチドに特異的に結合する 2 個の単鎖抗体断片 (s c F v) とを含む。各 p M H C 結合 s c F v は、グリシン - セリフレキシブルリンカーを介して C H 1 ドメインと C L ドメインの C 末端に連結され得る。

【 図 5 】 それぞれ、F a b - (s c F v) ₂ 及び F a b - s c F v フォーマットの、二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (丸) とインキュベートした骨肉腫細胞におけるがん細胞殺傷率 (%) を一連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (三角) と比較して示す。

【 図 6 】 一連型フォーマット及び二連型フォーマットの 2 つの異なる p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした肺扁平上皮癌細胞 (A) 及び結腸直腸腺癌細胞 (B) における細胞生存率 (%) を示す。

【 図 7 】 低い (丸)、中間 (四角) 及び高い (三角) 親和性を有する C D 3 結合 F a b に融合された 2 個の同一の V H H (A) または s c F v (B) を含む M A G E - A 4 結合アームを有する抗原結合タンパク質によるインビトロでの細胞殺傷力のグラフを示す。

【 図 8 】 F a b - V H H 2 フォーマットの 3 つの異なる二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした抗原陽性骨肉腫細胞におけるサイトカイン放出を示す。各エンゲージャーは、C D 3 に対する結合親和性のレベルが異なる (高い、中間、及び低

10

20

30

40

50

い)。MAGE-A4/HLA-A*02陽性細胞株をヒトPBMCとE:T比10:1でインキュベートした。サイトカインIL-2(A)及びIFNガンマ(B)を3つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で測定した。

【図9】がん抗原MAGE-A4に対する低い(41nM)及び高い(0.1nM)親和性を有し、CD3に対する親和性が等しい二連型pMHC-T細胞エンゲージャーのインビトロでの細胞殺傷力を示す。

【図10】T細胞と、腫瘍細胞上の2個のpMHC標的に結合する(抗MAGE-A4二連型エンゲージャー)本発明の例示的な二重特異性抗体の概略図と、抗CD3断片に融合させた、親和性を高めた組み換え可溶性T細胞受容体(sTCR)からなる比較分子の概略図を示す。Fab-(scFv)₂について示されるMAGE-A4親和性を一価フォーマットで測定した。

【図11】(A)は、二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャーまたはsTCR×CD3比較分子及び健常ドナーのPBMCと共培養した際のHLA-A*02:01拘束性ががん標的ペプチドMAGE-A4及び類似の生理学的に関連したオフターゲットS1(GLADGRTHTV、配列番号89)及びS16(GLYDGPVHEV、配列番号90)ペプチドをロードしたTAP欠損T2細胞におけるインビトロでのT細胞活性化を示す。(B)は、二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャー及び健常ドナーのPBMCと共培養した際のがん標的ペプチドMAGE-A4ならびに類似の生理学的に関連したオフターゲットS1及びS16ペプチドをロードしたT2細胞におけるT細胞の活性化に伴うIFNの放出を示す。

【図12】二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャーが、インビトロで抗原陰性細胞に対して限定的な交差反応性を示すことを示す。黒色腫SK-MEL-30細胞(A)、肺癌NCI-H441細胞(B)、乳癌MDA-MB-231細胞(C)、及び膀胱癌PANC-1細胞(D)について細胞傷害性(%)を測定した。

【図13】図10に示される異なる濃度の二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャーまたは親和性を高めた組換えsTCR-T細胞エンゲージャー比較分子とインキュベートした骨肉腫細胞及び黒色腫細胞におけるがん細胞の殺傷率(%)を示す。MAGE-A4/HLA-A*02:01陽性細胞株A375(黒色腫)及びU2OS(骨肉腫)を、ヒトPBMCとE:T比10:1でインキュベートした。LDH放出を、2つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度でがん細胞殺傷力のマーカーとして測定した。

【図14】図10に示される二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャーまたはsTCR-T細胞エンゲージャー比較分子とインキュベートした健常ドナー由来のPBMCと共培養された骨肉腫細胞または黒色腫細胞におけるサイトカイン放出を示す。MAGE-A4/HLA-A*02陽性細胞株A375(黒色腫)及びU2OS(骨肉腫)をヒトPBMCとE:T比10:1でインキュベートした。ELISAを使用してサイトカインIL-2及びIFNを定量化し、2つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で上清中に放出されたサイトカインのレベルを測定した。

【図15】MAGE-A4/HLA-A*02:01に対する特異性を有する二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャー(「二連型pMHC-TCE」)の存在下でヒトPBMCと共培養したMAGE-A4陽性NCI-H1703肺扁平上皮癌細胞の生細胞イメージングを示す。A(左)は、肺癌細胞及びPBMCのみを示し、B(右)は、二連型pMHC-TCEの存在下での肺癌細胞及びPBMCを示す。

【図16】比較分子及び既存のADAエピトープを欠く抗体に対する既存の抗薬物抗体(ADA)の検出を示す。比較分子と既存のADAエピトープを欠く抗体を、健康なナイーブ白人ヒトドナー10人に由来する血清試料で評価した。既存のADAをELISAによって検出した。

【図17】選択された改変を有するヒト化シングルドメイン抗体(sdAb)における既存のADAの検出を示す。「+A」は、アラニンの付加に対応する。「-S」は、Kabatatの番号付けに従って113位のセリンの欠失に対応する。「-SS」は、Kabatatの番号付けに従って112位及び113位のセリンの欠失に対応する。「SSS」は、K

10

20

30

40

50

a b a tによる11位、89位、及び108位の疎水性アミノ酸のセリンアミノ酸への置換に対応する。さまざまな試料の血清濃度でE L I S Aを使用してA D A反応を測定した。

【図18】s c F V結合アームに選択された改変を有するF a b _ s c F V抗原結合タンパク質中の既存のA D Aの検出を示す。「+ A」は、アラニンの付加に対応する。「- S」は、K a b a tの番号付けに従って113位のセリンの欠失に対応する。「- S S」は、K a b a tの番号付けに従って112位及び113位のセリンの欠失に対応する。「S S S」は、K a b a tによる11位、89位、及び108位の疎水性アミノ酸のセリンアミノ酸への置換に対応する。さまざまな試料の血清濃度でE L I S Aを使用してA D A反応を測定した。

10

【発明を実施するための形態】

【0084】

一般に、本明細書に記載される、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学ならびにタンパク質及び核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法は、当該技術分野においてよく知られ、一般的に使用されるものである。本明細書で提供される方法及び技術は、特に記載のない限り、一般に、当該技術分野においてよく知られている従来の方法に従って、また、本明細書全体を通して引用及び考察される一般的かつより具体的な様々な参考文献に記載されるように実施することができる。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って、当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように実施することができる。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品化学及び製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにその研究室での手順及び技術は、当該技術分野においてよく知られ、一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、医薬品の調製、製剤化及び送達、ならびに患者の治療には、標準的な技術が使用される。

20

【0085】

本明細書で特に定義のない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。何らかの潜在的な曖昧さがある場合、本明細書に提供される定義が、いかなる辞書または外部の定義よりも優先される。別段文脈によって要求されない限り、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数形を含むものとする。「含む (i n c l u d i n g) 」という用語、ならびに「含む (i n c l u d e) 」及び「含まれる (i n c l u d e d) 」などの他の形態の使用は、限定するものではない。

30

【0086】

本発明がより容易に理解され得るように、まず特定の用語を定義しておく。

【0087】

抗原結合タンパク質

本明細書で使用される場合、「抗体」または「抗原結合タンパク質」という用語は、抗原またはエピトープに特異的に結合するまたは免疫学的に反応性である免疫グロブリン分子または免疫グロブリン由来分子を指し、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を含み、また、限定するものではないが、断片抗原結合 (F a b) 断片、F (a b ')₂断片、F a b '断片、F v断片、組み換えI g G (r I g G)断片、単鎖可変断片 (s c F v)、及びシングルドメイン抗体 (例えば、s d A b、s d F v、ナノボディ、V H H)断片を含む機能性抗体断片も含む。したがって、抗体は、シングルドメイン抗体であるか、または少なくとも1つの可変軽鎖及び少なくとも1つの可変重鎖を含む。一実施形態において、少なくとも1つの可変軽鎖及び少なくとも1つの可変重鎖は、単一ポリペプチド鎖として提示される。「抗体」または「抗原結合タンパク質」という用語は、生殖細胞系列に由来する抗体を含む。「抗体」または「抗原結合タンパク質」という用語は、遺伝子操作されたまたは別様に改変された免疫グロブリンの形態、例えば、イントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、ヘテロコンジュゲート抗体 (例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、タンデムジ - s

40

50

c F v、タンデムトリ - s c F v) などを含む。別段の指示がない限り、「抗体」または「抗原結合タンパク質」という用語は、その機能性抗体断片を包含することを理解されたい。

【 0 0 8 8 】

ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、T細胞受容体 (T C R)、例えば、限定するものではないが、可溶性 T C R ではない。

【 0 0 8 9 】

特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、多重特異性である (すなわち、2つ以上の異なる標的分子または同じ標的分子上の2つ以上のエピトープに結合する)。特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、二重特異性であり、例えば、2つの異なる標的分子または同じ標的分子上の2つのエピトープに結合する。特定の実施形態において、抗体は、三重特異性であり、例えば、少なくとも3つの異なる標的分子に結合する。

10

【 0 0 9 0 】

抗原結合タンパク質は、一価または多価であり得、すなわち、1つ以上の抗原結合部位を有する。一価の抗原結合タンパク質の非限定的な例としては、s c F v、F a b、s c F a b、d A b、V H H、V (N A R)、D A R P i n、アフィリン及びナノボディが挙げられる。多価の抗原結合タンパク質は、2つ、3つ、4つ以上の抗原結合部位を有することができる。多価の抗原結合タンパク質の非限定的な例としては、全長免疫グロブリン、F (a b ')₂断片、ピス - s c F v (またはタンデム s c F v もしくは B i T E)、D A R T、ダイアボディ、s c D b、D V D - I g、I g G - s c F a b、s c F a b - F c - s c F a b、I g G - s c F v、s c F v - F c、s c F v - f c - s c F v、F v₂ - F c、F y n o m A B、クアドローマ、C r o s s M a b、デュオボディー、トリアボディ及びテトラボディが挙げられる。いくつかの実施形態において、多価の抗原結合タンパク質は、二価であり、すなわち、2つの結合部位が存在する。いくつかの実施形態において、多価の抗原結合タンパク質は、二重特異性であり、すなわち、抗原結合タンパク質は、2つの異なる標的または1つの標的分子上の2つの異なる標的部位を指向する。いくつかの実施形態において、多価の抗原結合タンパク質は、2つを超える、例えば、3つまたは4つの異なる抗原に対して、それぞれ3つまたは4つの異なる結合部位を含む。そのような抗原結合タンパク質は、多価であり、かつ多重特異性であり、特に、それぞれ三重または四重特異性である。

20

30

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、多重特異性 (例えば、二重特異性) であり、限定するものではないが、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディ、D A R T、B i T E、タンデム s c F v または I g G 様非対称ヘテロ二重特異性抗体などである。ある特定の実施形態において、多重特異性抗原結合タンパク質の1つまたは複数の結合特異性は、免疫細胞エンゲージャーである (すなわち、免疫細胞の細胞表面タンパク質への結合親和性を含む)。動員され得る免疫細胞の例としては、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、ナチュラルキラー T (N K T) 細胞、好中球、単球、及びマクロファージが挙げられるが、これらに限定されない。免疫細胞の動員に使用され得る表面タンパク質の例としては、C D 3、T C R、T C R、C D 1 6、N K G 2 D、C D 8 9、C D 6 4、及び C D 3 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 9 2 】

特定の実施形態では、免疫細胞標的抗原は、C D 3 である。C D 3 という用語は、T細胞受容体の分化抗原群 3 共受容体 (または共受容体複合体) を指す。

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用される場合、「単鎖可変断片」 (s c F v) は、軽鎖可変ドメイン (V L) に連結された重鎖可変ドメイン (V H) を含む抗原結合タンパク質である。s c F v の V H と V L ドメインとは、当該技術分野で認識されている任意の適切なリンカーを介して連結される。そのようなリンカーとしては、これに限定されるものではないが、反復 G G G S (配列番号 8 8) アミノ酸配列またはそのバリエーションが挙げられる。s c F v は

50

一般に抗体定常ドメイン領域を含まないが、本開示の s c F v は、血清中半減期または組織中半減期の延長を含む（ただし、これらに限定されない）s c F v のさまざまな特性を改変するために、抗体定常ドメイン領域（例えば、抗体の F c ドメイン）に連結または結合させることができる。s c F v は一般に約 25 k D a の分子量を有し、約 2.5 n m の流体力学的半径を有する。

【0094】

本明細書で使用する場合、「F a b 断片」または「F a b」または「F a b ドメイン」とは、軽鎖の可変軽鎖（V L）ドメインと定常ドメイン（C L）を含む軽鎖断片と、重鎖の可変重鎖（V H）ドメイン及び第 1 の定常ドメイン（C H 1）とを含む抗体断片である。

10

【0095】

本明細書で使用する場合、「V H H」、「ナノボディ」、「重鎖のみ抗体抗体」、「シングルドメイン抗体」、または「s d A b」とは、ラクダ、ラマ、アルパカを含むラクダ科の種に由来する単一重鎖可変ドメインを含む、抗原結合タンパク質である。V H H は、一般に、約 15 k D a の分子量を有する。

【0096】

本開示の抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質のドメインを連結する（例えば、s c F v を形成するために V H 及び V L を連結する、または多重特異性抗原結合タンパク質を形成するために複数の結合ドメインを連結する）ための 1 つ以上のリンカーを含み得る。

20

【0097】

リンカーの例示的な例としては、グリシンポリマー（G l y）_n；グリシン - セリンポリマー（G l y_nS e r）_n（式中、n は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、または 8 の整数である）；グリシン - アラニンポリマー；アラニン - セリンポリマー；及び当該技術分野において知られている他のフレキシブルリンカーが挙げられる。

【0098】

グリシン及びグリシン - セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、したがって、本明細書に記載される抗原結合タンパク質などの融合タンパク質のドメイン間の中性テザーとして機能することが可能であり得る。グリシンは、他の小さな側鎖アミノ酸よりも大幅に大きな - 空間にアクセスし、より長い側鎖を持つ残基よりもはるかに制限が少ない（S c h e r a g a, R e v. C o m p u t a t i o n a l C h e m. 1: 1173 - 142 (1992)）。当業者であれば、特定の実施形態における抗原結合タンパク質の設計には、完全にまたは部分的に柔軟性のあるリンカーが含まれ得、そのため、リンカーは、所望の構造を提供するために、フレキシブルリンカーのストレッチだけでなく、低い柔軟性を付与する 1 つ以上のストレッチも含み得ることを認識するであろう。

30

【0099】

しかしながら、リンカー配列は、例えば、ヒト C H 1 及び C 配列の最初の部分に対応するアミノ酸ストレッチまたはヒト I g G のヒンジ領域の部分に対応するアミノ酸ストレッチを使用して、天然リンカー配列に類似するように選択することができる。

【0100】

s c F v 部分において、V L ドメインと V H ドメインを接続するペプチドリンカーの設計は、一般に、例えば、G l y、S e r 及び T h r などの小さな非極性または極性残基からなるフレキシブルリンカーである。s c F v 部分の可変ドメインを接続する特定の例示的なリンカーは、（G l y₄S e r）₄ リンカーであり、式中、4 は、モチーフの例示的な繰り返し数である。

40

【0101】

各 s c F v 抗原結合タンパク質と F a b ドメインとを接続するリンカーも想到される。特定の実施形態では、各 s c F v 抗原結合タンパク質は、G l y - S e r リンカーを用いて F a b の C H 1 及び C L ドメインに連結される。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 G G G G S（配列番号 88）を含む。

50

【0102】

他の例示的なリンカーとしては、これらに限定されるものではないが、以下のアミノ酸配列：GGG、DGGGS（配列番号91）、TGEKP（配列番号92）（Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:5525-5530 (1997)）、GGRR（配列番号93）、(GGGS)_n（配列番号88）（n=1、2、3、4または5）（Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1156-1160 (1996)）、EGKSSGSGSESKVD（配列番号94）（Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:1066-1070 (1990)）、KESGVSSEQLAQFRSLD（配列番号95）（Bird et al., Science 242:423-426 (1988)）、GGRRGGS（配列番号96）、LRQRDGERP（配列番号97）、LRQKDGGSERP（配列番号98）、及びGSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号99）（Cooper et al., Blood, 101(4):1637-1644 (2003)）が挙げられる。あるいは、フレキシブルリンカーは、タンパク質及びペプチドの3D構造をモデリングすることが可能なコンピュータプログラムを使用して、またはファージディスプレイ法によって、合理的に設計することができる。

10

【0103】

抗体は、可変軽鎖（VL）ドメイン及び可変重鎖（VH）ドメインを含み得る。VL及びVHの各ドメインは、3つのCDRのセットをさらに含む。

【0104】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、抗原特異性及び結合親和性を付与する、抗体可変領域内のアミノ酸の非連続配列を指す。一般に、各重鎖可変ドメインには3つのCDR（CDRH1、CDRH2、CDRH3）があり、各軽鎖可変ドメインには3つのCDR（CDRL1、CDRL2、CDRL3）がある。「フレームワーク領域」または「FR」は、重鎖及び軽鎖の可変ドメインのCDR以外の部分を指すものとして当該技術分野において知られている。一般に、各重鎖可変ドメインに4つのFR（HFR1、HFR2、HFR3、及びHFR4）があり、各軽鎖可変ドメインに4つのFR（LFR1、LFR2、LFR3、及びLFR4）がある。したがって、抗体可変領域アミノ酸配列は、式FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4によって表すことができる。式の各セグメント、すなわち、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4は、別個のアミノ酸配列（またはそれをコードするポリヌクレオチド配列）を表し、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、及び挿入を含む変異がなされてもよい。ある特定の実施形態において、抗体可変軽鎖アミノ酸配列は、式LFR1-CDRL1-LFR2-CDRL2-LFR3-CDRL3-LFR4によって表すことができる。特定の実施形態では、抗体可変重鎖アミノ酸配列は、式HFR1-CDRH1-HFR2-CDRH2-HFR3-CDRH3-HFR4によって表すことができる。

20

30

【0105】

特定のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、いくつかのよく知られているスキームのいずれかを使用して容易に決定することができ、これらには、Kabata et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.（「Kabata」番号付けスキーム）、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948（「Chothia」番号付けスキーム）、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745.（「Contact」番号付けスキーム）、Lefranc M P et al., "IMGT u

40

50

nique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," *Dev Comp Immunol*, 2003 January; 27(1): 55-77 (「IMGT」番号付けスキーム)、及び Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," *J Mol Biol*, 2001 Jun. 8; 309(3): 657-70, (「Aho」番号付けスキーム)に記載されるものなどが挙げられる。

10

【0106】

特定のCDRまたはFRの境界は、識別に使用されるスキームに応じて異なり得る。例えば、Kabatスキームは配列アライメントに基づいており、Chothiaスキームは構造的な情報に基づいている。KabatとChothiaの両方のスキームの番号付けは、最も一般的な抗体領域配列長に基づいており、いくつかの抗体では、挿入文字、例えば、「30a」によって与えられる挿入及び欠失がみられる。この2つのスキームでは、特定の挿入及び欠失(「indel」)を異なる位置に配置するため、番号付けに差が生じることになる。Contactスキームは、複雑な結晶構造の分析に基づいており、多くの点でChothia番号付けスキームと類似している。

20

【0107】

以下の表1は、Kabat、Chothia、及びContactスキームによってそれぞれ特定された、抗体のCDRL1、CDRL2、CDRL3及びCDRH1、CDRH2、CDRH3の例示的な位置境界を示す。CDRH1については、残基番号付けは、Kabat及びChothiaの両方の番号付けスキームを使用して記載されている。CDRは、FRの間に位置し、例えば、CDRL1は、LFR1とLFR2の間に位置するなどである。示されるKabatの番号付けスキームは、H35A及びH35Bに挿入を置くため、示されるKabatの番号付け規則を使用して付番した場合のChothiaCDRH1ループの末端は、ループの長さに応じて、H32からH34の間で変化することに留意されたい。

30

【表1】

表1-CDRの例示的な位置境界

CDR	Kabat	Chothia	Contact
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L96
HCDR1 (Kabatの番号付け ¹⁾)	H31-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
HCDR1 (Chothia番号付け ²⁾)	H31-H35	H26-H32	H30-H35
HCDR2	H50-H65	H52-H56	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

40

1-Kabat et al.(1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2-Al-Lazikani et al. (1997), *J. Mol. Biol.* 273:927-948

【0108】

したがって、別段の指定がない限り、抗体またはその断片、例えば、その可変ドメインの「CDR」もしくは「相補性決定領域」、または個々の特定のCDR(例えば、CDR

50

H1、CDRH2)は、既知のスキームのいずれかによって定義される相補性決定領域(または特定の相補性決定領域)を包含すると理解されたい。同様に、別段の指定がない限り、抗体またはその断片、例えば、その可変ドメインの「FR」もしくは「フレームワーク領域」、または個々の特定のFR(例えば、「HFR1」、「HFR2」)は、既知のスキームのいずれかによって定義されるフレームワーク領域(または特定のフレームワーク領域)を包含すると理解されたい。いくつかの場合において、特定のCDRまたはFRの識別のためのスキームは、Kabata、Chothia、またはContact法によって定義されたCDRのように指定される。他の場合において、CDRまたはFRの特定のアミノ酸配列が与えられる。

【0109】

特定の実施形態では、本明細書に開示される抗原結合タンパク質は、ウサギ抗原結合タンパク質またはウサギ由来抗原結合タンパク質である。特定の実施形態では、ウサギ抗原結合タンパク質は、ヒト化されている。本明細書で使用される場合、「ヒト化される」または「ヒト化」という用語は、ヒト抗体により類似するように改変された抗原結合タンパク質を指す。ウサギ抗原結合タンパク質などの非ヒト抗原結合タンパク質は、治療目的でヒトに投与される場合、負の免疫応答を誘発する。したがって、ウサギ抗原結合タンパク質をヒト化することは、後の治療的使用に有利である。

【0110】

特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、リサーフェーシングによりヒト化される(すなわち、非ヒトフレームワークの溶媒露出残基を、よりヒトらしくなるようにリモデリングする)。リサーフェーシング戦略は、WO2004/016740、WO2008/144757、及びWO2005/016950に詳述されており、そのそれぞれが参照により本明細書に援用される。

【0111】

特定の実施形態において抗原結合タンパク質は、CDRグラフティングによりヒト化される(すなわち、ウサギ抗原結合タンパク質CDRをヒト抗体アクセプターフレームワークに挿入する)。グラフティング戦略及びヒトアクセプターフレームワークは、参照により本明細書に援用されるWO2009/155726に詳述されている。

【0112】

本明細書で使用する場合、「親和性」(または本明細書で互換的に使用される「結合親和性」という用語は、抗体の抗原結合部位と、抗原結合部位が結合するエピトープとの間の相互作用の強さを指す。当業者には容易に理解されるように、抗体または抗原結合タンパク質の親和性は、平衡解離定数(K_D)としてモル濃度単位(M)で報告され得る。平衡解離定数 K_D は、結合速度定数 k_a (単位 $M^{-1}s^{-1}$ を有する)及び解離速度定数 k_d (単位 s^{-1} を有する)から k_d/k_a によって計算される。本開示の抗体は、 $10^{-7} \sim 10^{-14}$ Mの範囲の K_D 値を有し得る。高親和性抗体は、 10^{-9} M(1ナノモル、nM)以下の K_D 値を有する。例えば、高親和性抗体は、約1 nM~約0.01 nMの範囲の K_D 値を有し得る。高親和性抗体は、約1 nM、約0.9 nM、約0.8 nM、約0.7 nM、約0.6 nM、約0.5 nM、約0.4 nM、約0.3 nM、約0.2 nM、または約0.1 nMの K_D 値を有し得る。極めて親和性の高い抗体は、 10^{-12} M(1ピコモル、pM)以下の K_D 値を有する。親和性の弱いまたは低い抗体は、 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ Mの範囲の K_D 値を有し得る。低親和性抗体は、 10^{-4} M以上、例えば、 10^{-4} M、 10^{-3} M、 10^{-2} M、または 10^{-1} Mの K_D 値を有し得る。特定の抗原決定基(例えば、標的のペプチド-MHC)に結合する抗体の能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)または当業者に知られている他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)技術(BIACore機器での分析)(Liljebblad et al., Glyco J 17, 323-329(2000))、及び従来の結合アッセイ(Healey, Endocr Res 28, 217-229(2002))のいずれかにより測定することができる。一般に、各結合パラメータは、 $20 \sim 30$ の範囲の温度で測定することができる。本明細書は、全体を通じてSPRによって測定される結合パラメ

10

20

30

40

50

ータを参照する。一般的には、本明細書全体を通じてSPRへのそれぞれの言及に関する実施形態では、本明細書に記載の結合速度定数値、解離速度定数値、及び平衡解離定数値は、25でSPRによって測定される。好ましくは、使用されるSPRベースのシステムは、BIACore SPRシステムである。当業者には、結合パラメータは、一価または二価の二重、三重、または多重特異性コンストラクトとの関連で測定され得ることは理解されよう。好ましくは、各パラメータは、コンストラクト全体との関連で測定される。

【0113】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、構造上、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属する2つの異なる鎖(TCR及びTCR)で構成されるヘテロ二量体タンパク質を指す。各鎖の細胞外部分は、可変(「V」及び「V」)及び定常(「C」及び「C」)ドメインと、安定化ジスルフィド結合の形成が生じるヒンジ領域とで構成される。細胞内領域は、別の膜貫通型タンパク質であるCD3と非共有結合的な相互作用を形成し、標的認識が正しい場合には、一連のコンフォメーション変化及び第1のT細胞活性化シグナルが生じる。TCRによるペプチド-MHC(Pmhc)の認識及び結合は、TCR(CDR1、CDR2、CDR3)及びTCR(CDR1、CDR2、CDR3)の可変ドメインに位置する相補性決定領域(CDR)と呼ばれる6つの超可変ループによって制御されている。CDR3ループ(CDR3及びCDR3)は、提示ペプチドのN末端及びC末端アミノ酸をそれぞれ認識することが示されているCDR1及びCDR1の助けを受けて、プロセシングされた抗原の認識をもたらす(Rudolph et al. Annu Rev Immunol. 24: 419-66. 2006)。MHCの認識は、典型的に、CDR2とCDR2の相互作用により達成される。TCRの高い配列多様性は、V(D)J再構成プロセスにより達成される。このプロセスにおいて、可変ドメインは、遺伝子の組み合わせから生成され、TCR及びTCRの両方はV(可変)及びJ(連結)遺伝子から、TCRは更なるD(多様性)遺伝子から生成される。TCRの高い抗原特異性は、胸腺での成熟プロセスによって制御され、自己反応性T細胞はここで負の選択を受ける。特定のpMHCに対するTCR親和性及び機能的なアビディティは、T細胞の活性化を制御する重要な因子である。しかしながら、抗原認識で重要な役割を果たすのは、親和性(K_D)、すなわち、TCRと細胞により提示されるpMHCとの間の結合の強さである(Tian et al. J Immunol. 179: 2952-2960. 2007)。TCRの生理学的親和性は、1mM~100mMの範囲であり(Davis et al. Annu Rev Immunol. 16: 523-544. 1998)、抗体と比較してかなり低い。

【0114】

本明細書で使用される場合、「ペプチド-MHC」という用語は、抗原性ペプチドが主要組織適合遺伝子複合体(MHC)のペプチド結合ポケットに結合したMHC分子(MHC-Iまたは-II)を指す。特定の実施形態において、MHCは、ヒトMHCである。

【0115】

二連型ペプチド-MHC-免疫細胞エンゲージング抗原結合タンパク質

本明細書に記載される特定の抗原結合タンパク質は、少なくとも2個のpMHC結合ドメインと、免疫細胞の細胞表面タンパク質(例えば、T細胞表面のCD3、「免疫細胞結合ドメイン」)に結合特異性を有する結合ドメインとを有する。標的細胞(例えば、がん細胞)の表面上の2個のpMHC複合体を標的とすることにより、アビディティが増強された結合を介した標的細胞の結合性が向上する。結合性の増強(すなわち、多価相互作用の見かけのK_Dの低下)によって、1つのpMHC結合ドメインのみを有する抗原結合タンパク質と比較して標的細胞の殺傷力を高めることができる。少なくとも2個のpMHC結合ドメインによって与えられるアビディティが増強された結合は、標的細胞(例えば、がん細胞)の表面上の低コピー数のpMHC複合体を標的とする場合に特に有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0116】

一態様では、本開示は、抗原結合タンパク質であって、a)免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する、重鎖と軽鎖とを含むFabドメインと、b)重鎖に機能的に連結された少なくとも第1のpMHC結合ドメインであって、第1の標的ペプチド-MHC(pMHC)複合体に結合する第1のpMHC結合ドメインと、c)軽鎖に機能的に連結された少なくとも第2のpMHC結合ドメインであって、第2のpMHC複合体に結合する第2のpMHC結合ドメインと、を含む、抗原結合タンパク質を提供する。

【0117】

特定の実施形態では、Fabドメインの重鎖は、CH1ドメインとVHドメインとを含む。特定の実施形態では、Fabドメインは、詳細にはFabドメインの重鎖のC末端に、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸をさらに含む。特定の実施形態では、Fabドメインは、抗体のヒンジ領域の最大で10個またはそれ以下のアミノ酸を含む。特定の実施形態では、Fabドメインは、抗体ヒンジ領域の最初のシステインまでの配列範囲を含む。特定の実施形態では、上記配列範囲は、配列EPKSC(配列番号87)であるか、またはこれを含む。システインの存在は、抗原結合タンパク質をさらに安定化させ得るさらなるジスルフィド架橋を可能にする。いくつかの実施形態では、抗体ヒンジ領域の上記最大10個のアミノ酸は、EPKSCDKTHT(配列番号100)を含む。抗体ヒンジ領域は、pMHC結合ドメイン(複数可)に対するリンカー配列として機能し得る配列GGGGS(配列番号88)をさらに含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、pMHC結合ドメインは、EPKSCGGGGS(配列番号101)、EPKSCDKTHT(配列番号100)、EPKSCDKTHTGGGGS(配列番号102)、DKTHT(配列番号103)、DKTHTGGGGS(配列番号104)またはGGGGSGGGGS(配列番号105)リンカーのいずれかを介してFabCH1ドメインのC末端に連結される。

【0118】

特定の実施形態では、Fabドメインの軽鎖は、CLドメインとVLドメインとを含む。CLドメインには、GGGGS(配列番号88)のようなリンカーが続いてもよい。

【0119】

免疫細胞結合ドメインとpMHC結合ドメインとの間の適当なリンカー配列としては、グリシンポリマー(Gly)_n、グリシン-セリンポリマー(Gly_nSer)_y(ただし、n及びyは、少なくとも整数1、2、3、4、5、6、7、または8である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野では周知の他のフレキシブルリンカーを含む。異なる実施形態において、免疫細胞結合ドメインとpMHC結合ドメイン(複数可)とを接続するリンカー配列は、(Gly₄Ser)₁(配列番号88)リンカー配列である。

【0120】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸(特定の実施形態では、抗体ヒンジ領域の最初のシステインまでの配列範囲)、例えば、Fabドメインの重鎖のC末端に位置する5~10個のアミノ酸または最大で10個のアミノ酸を含み、さらに、抗体ヒンジ領域の上記の少なくとも5個のアミノ酸に続き、本明細書の他の箇所に記載される第1または第2のpMHCドメインを接続するリンカーとして機能する配列を含む。好ましくは、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸は、配列EPKSC(配列番号87)を含むか、または配列EPKSCDKTHT(配列番号100)を含み、第1または第2のpMHC結合ドメインを接続するリンカーとして機能する配列は、上記に記載のリンカー配列を含む。いくつかの態様では、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸は、配列EPKSC(配列番号87)を含むか、または配列EPKSCDKTHT(配列番号100)を含み、第1または第2のpMHC結合ドメインを接続するリンカーとして機能する配列は、配列GGGGS(配列番号88)を含む。

【0121】

10

20

30

40

50

s c F v の可変ドメインを接続するリンカー配列は、グリシンポリマー (G l y) n 、グリシン - セリンポリマー (G l y n S e r) y (ただし、n 及び y は、少なくとも整数 1、2、3、4、5、6、7、または 8 である)、グリシン - アラニンポリマー、アラニン - セリンポリマー、及び当該技術分野では周知の他のフレキシブルリンカーを含む。特定の実施形態では、リンカー配列は、グリシン - セリンリンカー配列 (G l y n S e r) y (ただし、n 及び y は、少なくとも整数 1、2、3、4、5、6、7、または 8) である。特定の実施形態では、s c F v の可変ドメインを接続するリンカー配列は、(G l y 4 S e r) 4 (配列番号 1 0 6) リンカー配列である。

【 0 1 2 2 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、F c ドメインを含まない。その特定の実施形態では、F c ドメインを欠くそのような抗原結合タンパク質は、F a b - s d A b 、F a b - (s d A b) 2 、F a b - s c F v または F a b - (s c F v) 2 、F (a b ') 2 断片、ピス - s c F v (またはタンデム s c F v もしくは B i T E)、D A R T、ダイアポディ、s c D b、トリアポディ、テトラポディ、または M A T C H である。

【 0 1 2 3 】

特定の実施形態では、第 1 の標的 p M H C 複合体と第 2 の標的 p M H C 複合体とは同じである (すなわち、各複合体は、M H C 分子に結合した同じペプチドを含む)。特定の実施形態では、第 1 の p M H C 結合ドメインと第 2 の p M H C 結合ドメインとは同じである (すなわち、各結合ドメインは同じエピトープに結合する)。

【 0 1 2 4 】

特定の実施形態では、第 1 の標的 p M H C 複合体と第 2 の標的 p M H C 複合体とは異なる (すなわち、各複合体は、M H C 分子に結合した異なるペプチドを含む)。特定の実施形態では、第 1 の p M H C 結合ドメインと第 2 の p M H C 結合ドメインとは異なる (すなわち、各結合ドメインは異なるエピトープに結合する)。

【 0 1 2 5 】

特定の実施形態では、第 1 の p M H C 結合ドメインは、F a b 重鎖の C 末端または F a b 重鎖の N 末端に機能的に連結される。特定の実施形態では、第 1 の p M H C 結合ドメインは、F a b 軽鎖の C 末端または F a b 軽鎖の N 末端に機能的に連結される。

【 0 1 2 6 】

特定の実施形態では、第 2 の p M H C 結合ドメインは、F a b 重鎖の C 末端または F a b 重鎖の N 末端に機能的に連結される。特定の実施形態では、第 2 の p M H C 結合ドメインは、F a b 軽鎖の C 末端または F a b 軽鎖の N 末端に機能的に連結される。

【 0 1 2 7 】

特定の実施形態では、p M H C 結合ドメインは、s c F v または s d A b である。本明細書の他の箇所に記載されるように、p M H C 結合ドメインは、s c F a b、ダイアポディ、または F a b のうちのいずれか 1 つであってもよい。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、p M H C 結合ドメインは、詳細には s c F v または s d A b (V H H) であり、より詳細には、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインのそれぞれ及び / または少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインのそれぞれは、s c F v または s d A b (V H H) である。さらに、実験データによれば、特定の実施形態では、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインの両方がそれぞれ s c F v であるか、またはそれぞれ s d A b であり、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインとは同じである。またさらに、実施例及び図面に例示されるように、その特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、標的 p M H C 複合体に対して二価であり、2 個以下の p M H C 結合ドメインを含み、p M H C 結合ドメインはどちらも同じ p M H C 複合体を標的とする。

【 0 1 2 8 】

本明細書の他の箇所に記載され、また、上記から以下に示されるように、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインはどちらも F a b ドメインの重鎖に連結されてもよく、またはどちらも F a b ドメインの軽鎖に連結されても

10

20

30

40

50

よい。本明細書の他の箇所にさらに記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、いくつかの実施形態では、少なくとも第1のpMHC結合ドメインと少なくとも第2のpMHC結合ドメインとは、Fabドメインの同じ鎖に連結されない。すなわち、一方はFabドメインの重鎖に連結され、他方はFabドメインの軽鎖に連結される。本明細書の他の箇所にさらに記載されるように、特定の実施形態では、

(i) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または

(ii) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結されるか、または

(iii) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のN末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結されるか、または

(iv) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のN末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または

(v) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のN末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のC末端に機能的に連結されるか、または

(vi) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または

(vii) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインと少なくとも第2のpMHC結合ドメインの両方が、Fabドメインの軽鎖のC末端またはN末端に機能的に連結されるか、または

(viii) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインと少なくとも第2のpMHC結合ドメインの両方が、Fabドメインの重鎖のC末端またはN末端に機能的に連結される。

【0129】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、

1) Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合scFv、

2) Fabドメイン重鎖のN末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、Fabドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のpMHC結合scFv、

3) Fabドメイン重鎖のN末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合scFv、

4) Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、Fabドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のpMHC結合scFv、

5) Fabドメイン重鎖のN末端に連結された第1のpMHC結合sdAbと、Fabドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のpMHC結合sdAb、

6) Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合sdAbと、Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合sdAb、

7) Fabドメイン重鎖のN末端に連結された第1のpMHC結合sdAbと、Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合sdAb、または

8) Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合sdAbと、Fabドメイン軽鎖のN末端に連結された第2のpMHC結合sdAbを含む。

【0130】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、特定の実施形態では、(i) 少なくとも第1のpMHC結合ドメインがFabドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、少なくとも第2のpMHC結合ドメインがFabドメインの軽

10

20

30

40

50

鎖のC末端に機能的に連結されるか、または(i i)少なくとも第1のp M H C結合ドメインがF a bドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、少なくとも第2のp M H C結合ドメインがF a bドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結される。本明細書の他の箇所にさらに記載されるように、また、実施例及び図面に例示されるように、特定の実施形態では、かかる抗原結合タンパク質は、2個以下のp M H C結合ドメインを有する(すなわち、p M H C結合ドメインに関しては、1個の第1のp M H C結合ドメインと1個の第2のp M H C結合ドメインに限定される)。その特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、標的p M H C複合体に対して二価である。したがって、かかる実施形態では、抗原結合タンパク質は、M H C分子に結合した/M H C分子によって提示される同じ標的ペプチドを含むp M H C複合体にどちらも結合する2個以下のp M H C結合ドメインを含む。本明細書の他の箇所にさらに記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、かかる抗原結合タンパク質は二重特異性であり、好ましくはC D 3に対する結合特異性を有する。上記の各実施形態では、2個のp M H C結合ドメインは両方ともs c F vであるか、または両方ともs d A b (V H H)であることがさらに好ましい。したがって、本開示は、特定の実施形態において、二重特異性の二価抗原結合タンパク質であって、C D 3に特異的に結合するF a bドメインと、2個以下のp M H C結合ドメインとを含み、両方のp M H C結合ドメインが同じp M H C複合体を標的とし(すなわち、抗原結合タンパク質は、標的p M H C複合体に関して二価である)、両方のp M H C結合ドメインがそれぞれs c F vであるか、またはそれぞれs d A b (V H H)であり、(i)2個のp M H C結合ドメインのうち的一方がC D 3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のp M H C結合ドメインがC D 3結合ドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または(i i)2個のp M H C結合ドメインのうち的一方がC D 3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のp M H C結合ドメインがC D 3結合ドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結されている、抗原結合タンパク質を包含する。本明細書の他の箇所に記載されるように、2個のp M H C結合ドメインは、s c F a b、ダイアボディ、またはF a bのうちいずれか1つであってもよい。

【0131】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面にさらに例示されるように、いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、2個以下のp M H C結合ドメインを有し(すなわち、p M H C結合ドメインに関しては、1個の第1のp M H C結合ドメインと1個の第2のp M H C結合ドメイン、特にどちらもs c F vで同じ(またはどちらもs d A bで同じ)p M H C結合ドメインに限定される)、一方はF a bドメインの重鎖に機能的に連結され、他方はF a bドメインの軽鎖に機能的に連結され、(i)2個のp M H C結合ドメインのうち的一方がF a bドメイン重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のp M H C結合ドメインがF a bドメイン軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または(i i)2個のp M H C結合ドメインのうち的一方がF a bドメイン重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のp M H C結合ドメインがF a bドメイン軽鎖のN末端に機能的に連結されることがさらに好ましい。

【0132】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って、11位、89位及び/または108位に極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。示された位置の極性アミノ酸の存在により、抗薬物抗体を減らすことができる。

【0133】

特定の実施形態では、本明細書の他の箇所に記載されるF a bドメイン及び/またはC D 3結合ドメインのような免疫細胞結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って、11位、89位及び/または108位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

【0134】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にロイシン(L)またはセリン(S)を、K a b a tの番号付けに従って89位のアミノ酸

にバリン（V）、セリン（S）、またはスレオニン（T）を、及び/またはK a b a tの番号付けに従って108位のアミノ酸にロイシン（L）、セリン（S）、またはスレオニン（T）を含む。

【0135】

特定の実施形態では、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にロイシン（L）がある場合、89位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）があり、108位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）がある。

【0136】

特定の実施形態では、K a b a tの番号付けに従って89位のアミノ酸にバリン（V）がある場合、11位のアミノ酸にセリン（S）があり、108位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）がある。

10

【0137】

特定の実施形態では、K a b a tの番号付けに従って108位のアミノ酸にロイシン（L）がある場合、11位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）があり、89位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）がある。

【0138】

特定の実施形態では、極性アミノ酸は、セリン（S）及び/またはスレオニン（T）である。

【0139】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にセリン（S）を、89位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）を、108位のアミノ酸にセリン（S）またはスレオニン（T）を含む。

20

【0140】

特定の実施形態では、可変重鎖は、K a b a tの番号付けに従って11位のアミノ酸にセリン（S）を、89位のアミノ酸にセリン（S）を、108位のアミノ酸にセリン（S）を含む。

【0141】

特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメインは、特にC Hドメインを含まない場合（すなわち、F a bドメインではないが、例えばs c F vまたはs d A bである場合）、K a b a tの番号付けに従って113位のセリン（S）が欠失した可変重鎖を含む。

30

【0142】

特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って113位のセリン（S）が欠失した可変重鎖を含む。

【0143】

特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメインは、特にC Hドメインを含まない場合（すなわち、F a bドメインではないが、例えばs c F vまたはs d A bである場合）、K a b a tの番号付けに従って、112位のセリン（S）が欠失し、かつ113位のセリン（S）が欠失した可変重鎖を含む。特定の実施形態では、第1のp M H C結合ドメイン及び/または第2のp M H C結合ドメインは、K a b a tの番号付けに従って、112位のセリン（S）が欠失し、かつ113位のセリン（S）が欠失した可変重鎖を含む。

40

【0144】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 3 A、S 1 1 3 G、またはS 1 1 3 Tの置換を含む。

【0145】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 3 A、S 1 1 3 G、またはS 1 1 3 Tの置換を含み、S 1 1 2が欠失している。

【0146】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a tの番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、またはS 1 1 2 Tの置換を含む。

50

【 0 1 4 7 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、K a b a t の番号付けに従って、S 1 1 2 A、S 1 1 2 G、またはS 1 1 2 T の置換を含み、S 1 1 3 が欠失している。

【 0 1 4 8 】

p M H C 結合ドメインは、例えば、参照によって本明細書に援用するW O 2 0 2 2 1 9 0 0 0 7 A 1 に記載されるライブラリーアプローチを使用して作製することができる。

【 0 1 4 9 】

特定の実施形態では、標的 p M H C 結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【 0 1 5 0 】

本開示によれば、本開示によって提供される抗原結合タンパク質、詳細には少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインは高度に選択的であり、異なるペプチドを提示する p M H C 複合体などの異なる p M H C 複合体に結合しない。

【 0 1 5 1 】

特定の実施形態では、免疫細胞の細胞表面タンパク質は、C D 3、T C R、T C R、C D 1 6、N K G 2 D、C D 8 9、C D 6 4、及びC D 3 2 a からなる群から選択される。特定の実施形態では、免疫細胞の細胞表面タンパク質は、C D 3 (T 細胞受容体の分化抗原群 3 共受容体 (または共受容体複合体)) である。C D 3 タンパク質複合体は、4 個の別個の鎖で構成される。哺乳動物では、この複合体は、C D 3 (ガンマ) 鎖 / サブユニット、C D 3 (デルタ) 鎖 / サブユニット、及び 2 個の C D 3 (イプシロン) 鎖 / サブユニットを含む。免疫細胞の細胞表面タンパク質としての C D 3 への言及は、本明細書全体を通して行われ、C D 3 は、とりわけ実施例によって例示されるように特に好ましい細胞表面タンパク質である。本明細書では、本明細書全体を通じて記載され、免疫細胞、詳細には T 細胞の表面の C D 3 に特異的に結合する免疫細胞結合ドメイン、詳細には F a b ドメインに関するさまざまな態様及び実施形態において、F a b ドメインは、C D 3 の C D 3 (ガンマ) ドメイン / サブユニット、C D 3 (デルタ) 鎖 / サブユニット、及び/または C D 3 (イプシロン) 鎖 / サブユニットに特異的に結合することができる。好ましくは、免疫細胞結合ドメインは、C D 3 の C D 3 (イプシロン) 鎖 / サブユニットに特異的に結合することができる。

【 0 1 5 2 】

適当な抗 C D 3 結合ドメイン、詳細には T 細胞活性化 C D 3 - イプシロン結合ドメインは当該技術分野では周知のものである。「C D 3 結合ドメイン」と「抗 C D 3 結合ドメイン」という用語は、本明細書では互換的に使用される。本開示の特定の実施形態では、抗 C D 3 結合ドメインは、抗体 S P 3 4、O k t 3、もしくは U C H T 1 のいずれか 1 つ、またはその親分子と同じ特異性を保持しながら、これらの抗体と少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有するそれらのバリエーション配列である。S P 3 4、O k t 3、または U C H T 1 はマウス抗体であり、治療用途では、S P 3 4、O k t 3、または U C H T 1 のヒト化型、すなわち、h u S P 3 4、h u O k t 3、または h u U C H T 1 が好ましい。特定の実施形態では、S P 3 4、O k t 3、または U C H T 1 のヒト化バリエーション配列は、F a b フォーマットで使用するために最適化される。例えば、ヒト化 h u S P 3 4、h u O k t 3、または h u U C H T 1 は、C D 3 に対する選択的結合性を保持しながら、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、またはそれ以上の置換を含んでもよい。例示的な C D 3 結合ドメインは、本明細書にそれぞれを参照によって援用するところの U S 6 7 5 0 3 2 5、W O 2 0 0 8 0 7 9 7 1 3、U S 7 6 3 5 4 7 5、W O 2 0 0 5 0 4 0 2 2 0、U S 7 7 2 8 1 1 4、W O 9 4 0 4 6 7 9、U S 7 3 8 1 8 0 3、W O 2 0 0 8 1 1 9 5 6 7、W O 2 0 1 4 1 1 0 6 0 1、W O 2 0 1 4 1 4 5 8 0 6、W O 2 0 1 5 0 9 5 3 9 2、W O 2 0 1 6 0 8 6 1 8 9 及び/または W O 2 0 1 9 1 9 5 5 3 5 A 1 に開示されている。特定の実施形態では、免疫細胞は、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、ナチュ

10

20

30

40

50

ラルキラー T (NK T) 細胞、好中球細胞、単球、及びマクロファージからなる群から選択される。特定の実施形態では、免疫細胞は、T 細胞である。

【0153】

一実施形態では、抗 CD3 結合ドメインは、配列番号 76、77、及び 78 の HCDR 配列と配列番号 79、81、及び 82 の LCDR 配列、または特異的抗原結合性を保持しながら、1個、2個、または3個の置換を有するそれらのバリエーション配列を含む。一実施形態では、LCDR1 配列は1個の置換を含み、配列番号 80 である。

【0154】

一実施形態では、抗 CD3 結合ドメインは、配列番号 76、77、及び 78 の HCDR 配列と配列番号 80、81、及び 82 の LCDR 配列、または特異的抗原結合性を保持しながら、1個、2個、または3個の置換を有するそれらのバリエーション配列を含む。一実施形態では、LCDR1 配列は1個の置換を含み、配列番号 79 である。

10

【0155】

一実施形態では、抗 CD3 結合ドメインは、配列番号 83 の VL 配列と配列番号 84 の VH 配列、または特異的抗原結合性を保持しながら上記のアミノ酸配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるそれらのバリエーション配列を含む。特定の実施形態では、バリエーション配列は、親アミノ酸配列に関して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の置換、例えば、VL 配列に 1 個の置換、VH 配列に 4 個の置換を含む。

【0156】

一実施形態では、抗 CD3 結合ドメインは、配列番号 85 の VL 配列と配列番号 86 の VH 配列、または特異的抗原結合性を保持しながら上記のアミノ酸配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるそれらのバリエーション配列を含む。特定の実施形態では、バリエーション配列は、親アミノ酸配列に関して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の置換、例えば、VL 配列に 1 個の置換、VH 配列に 4 個の置換を含む。

20

【0157】

したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 79、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 80、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 83 の VL 配列及び配列番号 84 の VH 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 85 の VL 配列及び配列番号 86 の VH 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 79、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ sdAb (VHH) である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば Fab - (sdAb)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において

30

40

50

、配列番号76、77及び78のHCDR配列ならびに配列番号80、81及び82のLCDR配列、またはそれらのバリエーションを含む抗CD3結合ドメインと、同じpMHC複合体を標的とし、どちらもそれぞれsdAb(VHH)である2個以下のpMHC結合ドメインとを含む、例えばFab-(sdAb)₂のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号83のVL配列及び配列番号84のVH配列、またはそれらのバリエーションを含む抗CD3結合ドメインと、同じpMHC複合体を標的とし、どちらもそれぞれsdAb(VHH)である2個以下のpMHC結合ドメインと、を含む、例えばFab-(sdAb)₂のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号85のVL配列及び配列番号86のVH配列、またはそれらのバリエーションを含む抗CD3結合ドメインと、同じpMHC複合体を標的とし、どちらもそれぞれsdAb(VHH)である2個以下のpMHC結合ドメインと、を含む、例えばFab-(sdAb)₂のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。

10

【0158】

特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメイン、詳細にはFabドメインは、SPRによって測定した場合に、約1nM～約150nM(例えば、1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、8nM、9nM、10nM、11nM、12nM、13nM、14nM、15nM、16nM、17nM、18nM、19nM、20nM、21nM、22nM、23nM、24nM、25nM、26nM、27nM、28nM、29nM、30nM、31nM、32nM、33nM、34nM、35nM、36nM、37nM、38nM、39nM、40nM、41nM、42nM、43nM、44nM、45nM、46nM、47nM、48nM、49nM、50nM、51nM、52nM、53nM、54nM、55nM、56nM、57nM、58nM、59nM、60nM、61nM、62nM、63nM、64nM、65nM、66nM、67nM、68nM、69nM、70nM、71nM、72nM、73nM、74nM、75nM、76nM、77nM、78nM、79nM、80nM、81nM、82nM、83nM、84nM、85nM、86nM、87nM、88nM、89nM、90nM、91nM、92nM、93nM、94nM、95nM、96nM、97nM、98nM、99nM、100nM、101nM、102nM、103nM、104nM、105nM、106nM、107nM、108nM、109nM、110nM、111nM、112nM、113nM、114nM、115nM、116nM、M、117nM、118nM、119nM、120nM、121nM、122nM、123nM、124nM、125nM、126nM、127nM、128nM、129nM、130nM、131nM、132nM、133nM、134nM、135nM、136nM、137nM、138nM、139nM、140nM、141nM、142nM、143nM、144nM、145nM、146nM、147nM、148nM、149nM、150nM)の結合親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する。特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメイン、詳細にはFabドメインは、SPRによって測定した場合に約1nM～約50nMの結合親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する。特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメイン、詳細にはFabドメインは、SPRによって測定した場合に約20nM～約50nMの結合親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する。

20

30

40

【0159】

特定の実施形態では、免疫細胞結合ドメイン、詳細にはFabドメインは、SPRによって測定した場合に約1nM、約10nM、または約50nMの結合親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する。

【0160】

いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインの結合速度定数k_aは、約1×10⁵～約1×10⁷M⁻¹s⁻¹、例えば少なくとも1×10⁶M⁻¹s⁻¹または少なくとも2×10⁶M⁻¹s⁻¹である。

【0161】

50

いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインの解離速度定数 k_d は、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば少なくとも $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ である。理論に束縛されるものではないが、速い解離速度、例えば、 $2 \sim 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の k_d 値は、T細胞の過剰活性化を減らし、結果としてサイトカイン放出を減らすと考えられる。

【0162】

一実施形態では、結合速度定数 k_a 及び/または解離速度定数 k_d は、CD3-ヘテロ二量体CD3 (イプシロン/ガンマ)とCD3 (イプシロン/デルタ)の両方で同等または同様であり、すなわち、同じ条件下で測定した場合、詳細にはSPRによって25で測定した場合のCD3 (イプシロン/ガンマ)とCD3 (イプシロン/デルタ)に対する抗CD3結合ドメインの k_a もしくは k_d のいずれかまたはその両方に有意な差はない。その特定の実施形態では、結合速度定数 k_a 及び/または解離速度定数 k_d の値は、互いの1倍、互いの1.5倍、互いの2倍、互いの2.5倍、または互いの3倍以内である(すなわち、結合速度定数 k_a の値は、 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)。

10

【0163】

特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的pMHC複合体に、約100pM~約20nM(例えば、約100pM、約150pM、200pM、約250pM、約300pM、約350pM、約400pM、約450pM、約500pM、約550pM、約600pM、約650pM、約700pM、約750pM、約800pM、約850pM、約900pM、約950pM、約1nM(1,000pM)、約2nM、約3nM、約4nM、約5nM、約6nM、約7nM、約8nM、約9nM、約10nM、約11nM、約12nM、約13nM、約14nM、約15nM、約16nM、約17nM、約18nM、約19nM、または約20nM)の結合親和性(K_D)で結合する。特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的ペプチドpMHC複合体に約100pM~約1nMの結合親和性(K_D)で結合する。特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的pMHC複合体に約100pM~約400nMの結合親和性(K_D)で結合する。特定の実施形態では、第1のpMHC結合ドメイン及び/または第2のpMHC結合ドメインは、標的pMHC複合体に、約500pM~約2nM、または約500pM~約3nM、500pM~約5nM、または約500pM~約10nM、または約100pM~約20nMの結合親和性(K_D)で結合する。好ましい実施形態では、結合親和性は、本明細書の他の箇所に記載されるように、SPRによって測定される。

20

30

【0164】

いくつかの実施形態では、pMHC結合ドメインの結合速度定数 k_a は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは、約 $0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、例えば、少なくとも $0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。

40

【0165】

いくつかの実施形態では、pMHC結合ドメインの解離速度定数 k_d は、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、例えば、約 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、例えば、少なくとも $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ である。

【0166】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、約75kDa~約110kDaの分子量(例えば、約75kDa、約80kDa、約85kDa、約90kDa、約95kDa、

50

約100kDa、約105kDaまたは約110kDa)を有する。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、約60kDa未満の分子量を有する抗原結合タンパク質と比較して増加した血清中半減期を有する。

【0167】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質はFab-(scFv)₂であり、CD3に特異的に結合する単一のFabドメインと、Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合scFvと、を含み、どちらのpMHC結合scFvも同じ標的、例えば、HLA-A2複合体上に提示されるMAGE-A4由来ペプチドに結合し、どちらのpMHC結合scFvの可変重鎖も、場合により、またはさらに、Kababの番号付けに従って11位のアミノ酸にセリン(S)、89位のアミノ酸にセリン(S)、108位のアミノ酸にセリン(S)を含む。有利な点として、Fabドメインは、抗体ヒンジ領域の最初のシステインまでの最初の数個のアミノ酸を含む。

10

【0168】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、Fab-(scFv)₂であり、(i)約1nM~約50nMの親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する単一のFabドメインと、(ii)Fabドメイン重鎖のC末端に連結された第1のpMHC結合scFvと、(iii)Fabドメイン軽鎖のC末端に連結された第2のpMHC結合scFvと、を含み、どちらのpMHC結合scFvも約500pM~約10nMの標的pMHC複合体に対する結合親和性(K_D)を有する。

20

【0169】

本開示の抗原結合タンパク質足場の利点の1つは、約75~110kDaの中間分子サイズである。二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)であるブリナツモマブは、再発性または難治性の急性リンパ芽球性白血病患者において優れた結果を示している。ブリナツモマブは、その小さいサイズ(60kDa)のために血清中半減期が数時間と短い点の特徴であり、したがって継続的な注入が必要とされる(US7,112,324B1を参照)。本開示の抗原結合タンパク質は、ブリナツモマブのようなBiTEなどのより小さな二重特異性抗体と比較して大幅に長い半減期を有するものと予想され、したがって、その好ましい半減期のために継続的な注入を必要としない。中間のサイズの分子は、腎臓によるクリアランスを回避し、腫瘍蓄積量の改善に十分な半減期を与えることができる。本開示の抗原結合タンパク質は、他の小さな二重特異性フォーマットと比較して血漿中半減期が延びているが、依然、腫瘍透過能を保持している。これに対して、Fcドメインを欠く本開示の分子は、Fcドメインを含むより大きな分子よりも短い半減期を有すると予想される。半減期の延長は、T細胞を過剰刺激し、T細胞疲弊をもたらす恐れがある。また、特に固形腫瘍では、大きな分子量は低い腫瘍透過性につながり得る。いくつかの実施形態では、インビボ半減期は約7日である。

30

【0170】

本開示の抗原結合タンパク質のFabドメインは、さらなるpMHC結合ドメインを連結するための特異的ヘテロ二量体化足場として機能し得る。Fab断片の重鎖(Fd断片)及び軽鎖(L)の天然の効率的なヘテロ二量体化特性は、Fab断片を有用な足場とするものである。さらなる結合ドメインは、別のFabドメイン、scFv、またはsdAbを含む(ただし、これらに限定されない)いくつかの異なるフォーマットであり得る。

40

【0171】

Fab断片の各鎖は、さらなる結合ドメインによってN末端またはC末端で伸長することができる。各鎖は哺乳類細胞で共発現させることができ、宿主細胞の結合免疫グロブリンタンパク質(BiP)シャペロンが重鎖-軽鎖ヘテロ二量体(Fd:L)の形成を誘導する。これらのヘテロ二量体は安定しており、それぞれの結合要素がその特異的親和性を保持している。次いで、残りの2つのpMHC結合ドメインをscFvまたはsdAbとして別個のFab鎖に融合することができ、各鎖を例えばC末端でさらなるscFvまたはsdAbドメインにより伸長することができる(例えば、J. Immunology

50

, 165(12):7050-7057, 2000、Schoonjans et al. Biomolecular Engineering, 17:193-202, 2001を参照)。ヘテロ二量体化単位としてFabを使用することのさらなる利点としては、Fab分子は血清中に豊富に存在することから、対象に投与される際に非免疫原性であり得る点である。

【0172】

本明細書の全体的な開示内容に基づいて、かつ本明細書の全体的な開示内容に沿って、本発明の態様及び実施形態には以下が含まれる。

【0173】

1. 抗原結合タンパク質であって、
 a) 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するFabドメインであって、重鎖と軽鎖とを含む、前記Fabドメインと、
 少なくとも第1のペプチド-MHC(pMHC)結合ドメイン及び少なくとも第2のpMHC結合ドメインと、を含み、前記少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び前記少なくとも第2のpMHC結合ドメインの両方が、前記Fabドメインの前記重鎖に機能的に連結され、前記第1のpMHC結合ドメインが第1の標的pMHC複合体に結合し、前記第2のpMHC結合ドメインが第2の標的pMHC複合体に結合し、
 前記少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び/または前記少なくとも第2のpMHC結合ドメインが、それぞれ、scFv、scFab、ダイアポディ、sdAb(VHH)またはFabのうちのいずれか1つであるか、

10

または

b) 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するFabドメインであって、重鎖と軽鎖とを含む、前記Fabドメインと、
 少なくとも第1のペプチド-MHC(pMHC)結合ドメイン及び少なくとも第2のpMHC結合ドメインと、を含み、前記少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び前記少なくとも第2のpMHC結合ドメインの両方が、前記Fabドメインの前記軽鎖に機能的に連結され、前記第1のpMHC結合ドメインが第1の標的pMHC複合体に結合し、前記第2のpMHC結合ドメインが第2の標的pMHC複合体に結合し、
 前記少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び/または前記少なくとも第2のpMHC結合ドメインが、それぞれ、scFv、scFab、ダイアポディ、sdAb(VHH)またはFabのうちのいずれか1つである、前記抗原結合タンパク質。

20

30

【0174】

2. 前記抗原結合ドメインが、免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する前記Fabドメインの前記CH1ドメインのC末端に位置する、抗体ヒンジ領域の少なくとも5個のアミノ酸を含む、実施形態1に記載の抗原結合タンパク質。

【0175】

3. 前記少なくとも第1の標的pMHC複合体と前記少なくとも第2の標的pMHC複合体とが同じであるかまたは異なる、前記1または2に記載の抗原結合タンパク質。好ましくは、それらは同じである。

【0176】

4. (i) 前記第1のpMHC結合ドメインが前記重鎖のC末端に機能的に連結され、前記第2のpMHC結合ドメインが前記重鎖のN末端に機能的に連結されているか、または

40

(ii) 前記第1のpMHC結合ドメインが前記重鎖のN末端に機能的に連結され、前記第2のpMHC結合ドメインが前記重鎖のC末端に機能的に連結されているか、または

(iii) 前記第1のpMHC結合ドメインが前記軽鎖のC末端に機能的に連結され、前記第2のpMHC結合ドメインが前記軽鎖のN末端に機能的に連結されているか、または

(iv) 前記第1のpMHC結合ドメインが前記軽鎖のN末端に機能的に連結され、前記第2のpMHC結合ドメインが前記軽鎖のC末端に機能的に連結されている、上記の1~3のいずれか1つに記載の抗原結合タンパク質。

50

【 0 1 7 7 】

5 . 上記の 1 ~ 4 のいずれか 1 つにおいて、免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する前記 F a b ドメインは、本明細書の他の箇所に記載されるように、K a b a t の番号付けに従って 1 1 位、8 9 位及び / または 1 0 8 位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

【 0 1 7 8 】

6 . 上記の 1 ~ 5 のいずれか 1 つにおいて、前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインは、

(i) 本明細書の他の箇所に記載されるように、K a b a t の番号付けに従って 1 1 位、8 9 位及び / または 1 0 8 位にセリンなどの本明細書の他の箇所に記載される極性アミノ酸、及び / または

(i i) 本明細書の他の箇所に記載されるように、1 1 2 位及び / または 1 1 3 位に欠失もしくは置換を有する可変重鎖を含む。

【 0 1 7 9 】

7 . 前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする、上記の 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 0 】

8 . 免疫細胞の前記細胞表面タンパク質が C D 3 であり、前記免疫細胞が T 細胞である、上記の 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 1 】

9 . 前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 1 n M ~ 約 5 0 n M の結合親和性 (K _D) で C D 3 に特異的に結合する、上記の 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 2 】

1 0 . 前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、前記標的ペプチド p M H C 複合体に約 1 0 0 p M ~ 約 2 0 n M の結合親和性 (K _D) で結合する、上記の 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。好ましい実施形態では、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインは、前記標的ペプチド p M H C 複合体に、約 5 0 0 p M ~ 約 1 0 n M または約 5 0 0 p M ~ 約 5 n M の結合親和性 (K _D) で結合する。

【 0 1 8 3 】

1 1 . 約 7 5 k D a ~ 約 1 1 0 k D a の分子量を有する、上記の 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 4 】

1 2 . 約 6 0 k D a 未満の分子量の抗原結合タンパク質と比較して、血清中半減期が増加している、上記の 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 5 】

1 3 . 好ましくは医薬組成物である、上記の 1 ~ 1 2 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質を含む組成物。

【 0 1 8 6 】

1 4 . がんまたはウイルス感染症を治療する方法であって、上記の 1 ~ 1 2 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質、または 1 3 の組成物を、がんまたはウイルス感染症の治療を必要とする患者に投与する工程を含む、前記方法。

【 0 1 8 7 】

1 5 . 抗原結合タンパク質であって、

a) T 細胞上の C D 3 に特異的に結合する F a b ドメインであって、重鎖と軽鎖とを含む、前記 F a b ドメインと、

b) 前記重鎖の C 末端に機能的に連結された少なくとも第 1 のペプチド - M H C (p M H C) 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド - M H C 複合体に結合する、前記第 1 の

10

20

30

40

50

p M H C 結合ドメインと、

c) 前記軽鎖の C 末端に機能的に連結された少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインであって、第 2 の標的 p M H C 複合体に結合する、前記第 2 の p M H C 結合ドメインと、を含み、

前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、それぞれ、s c F v、s c F a b、ダイアボディ、s d A b (V H H) または F a b のうちのいずれか 1 つである、前記抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 8 】

16. 抗原結合タンパク質であって、

a) T 細胞上の C D 3 に特異的に結合する F a b ドメインであって、重鎖と軽鎖とを含む、前記 F a b ドメインと、

b) 前記重鎖の C 末端に機能的に連結された少なくとも第 1 のペプチド - M H C (p M H C) 結合ドメインであって、第 1 の標的ペプチド - M H C 複合体に結合する、前記第 1 の p M H C 結合ドメインと、

c) 前記軽鎖の N 末端に機能的に連結された少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインであって、第 2 の標的 p M H C 複合体に結合する、前記第 2 の p M H C 結合ドメインと、を含み、

前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、それぞれ、s c F v、s c F a b、ダイアボディ、s d A b (V H H) または F a b のうちのいずれか 1 つである、前記抗原結合タンパク質。

【 0 1 8 9 】

17. 前記抗原結合ドメインが、前記 F a b ドメインの前記 C H 1 ドメインの C 末端に位置する、抗体ヒンジ領域の少なくとも 5 個のアミノ酸、場合により最大で 10 個のアミノ酸を含む、15 または 16 に記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 0 】

18. 前記少なくとも第 1 の標的 p M H C 複合体と前記少なくとも第 2 の標的 p M H C 複合体とが同じであるかまたは異なる、上記の 15 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。好ましくは、それらは同じである。

【 0 1 9 1 】

19. 上記の 15 ~ 18 のいずれか 1 つにおいて、前記 F a b ドメインは、本明細書の他の箇所に記載されるように、K a b a t の番号付けに従って、11 位、89 位及び/または 108 位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

【 0 1 9 2 】

20. 上記の 15 ~ 19 のいずれか 1 つにおいて、前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインは、

(i) 本明細書の他の箇所に記載されるように、K a b a t の番号付けに従って 11 位、89 位及び/または 108 位に例えばセリンなどの本明細書の他の箇所に記載される極性アミノ酸、及び/または

(i i) 本明細書の他の箇所に記載されるように、112 位及び/または 113 位に欠失もしくは置換を有する可変重鎖を含む。

【 0 1 9 3 】

21. 前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする、上記の 15 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 4 】

22. 前記 F a b ドメインが、S P R によって測定した場合に、約 1 n M ~ 約 50 n M の結合親和性 (K D) で C D 3 に特異的に結合する、上記の 15 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 5 】

23. 前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び/または前記少なくとも第 2 の

p M H C 結合ドメインが、前記標的ペプチド p M H C 複合体に約 1 0 0 p M ~ 約 2 0 n M の結合親和性 (K _D) で結合する、上記の 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。好ましい実施形態では、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインは、前記標的ペプチド p M H C 複合体に、約 5 0 0 p M ~ 約 1 0 n M または約 5 0 0 p M ~ 約 5 n M の結合親和性 (K _D) で結合する、上記 1 5 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 6 】

2 4 . 約 7 5 k D a ~ 約 1 1 0 k D a の分子量を有する、上記の 1 5 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 7 】

2 5 . 約 6 0 k D a 未満の分子量の抗原結合タンパク質と比較して、血清中半減期が増加している、上記の 1 5 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質。

【 0 1 9 8 】

2 6 . 好ましくは医薬組成物である、上記の 1 5 ~ 2 5 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質を含む組成物。

【 0 1 9 9 】

2 7 . がんまたはウイルス感染症を治療する方法であって、上記の 1 5 ~ 2 5 のいずれか 1 つに記載の抗原結合タンパク質、または 2 6 の組成物を、がんまたはウイルス感染症の治療を必要とする患者に投与する工程を含む、前記方法。

【 0 2 0 0 】

2 8 . 二価の二重特異性抗原結合タンパク質であって、
a) 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する F a b ドメインと、
b) 同じ p M H C 複合体を標的とする少なくとも 2 個のペプチド - M H C (p M H C) 結合ドメインと、を含み、

(i) 前記少なくとも 2 つの p M H C 結合ドメインのうち的一方が重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインが軽鎖の C 末端に機能的に連結されているか、または

(i i) 前記少なくとも 2 つの p M H C 結合ドメインのうち的一方が重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインが軽鎖の N 末端に機能的に連結されており、前記少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び / または前記少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインが、それぞれ、 s c F v 、 s c F a b 、 ダイアボディ、 s d A b (V H H) または F a b のうちのいずれか 1 つであり、

前記二価の二重特異性抗原結合タンパク質が、本明細書の他の箇所に記載されるように、M H C 拘束性 T 細胞の活性化を誘発するかまたはもたらし、及び / または

同じ条件下で測定した場合に、単一の p M H C 複合体を標的とする対応する一価の二重特異性抗原結合タンパク質と比較してより高い効力で p M H C 複合体を含む細胞に対する免疫細胞媒介性細胞傷害性を誘導する、前記二価の二重特異性抗原結合タンパク質。いくつかの実施形態では、前記 p M H C 複合体を含む前記細胞は、がん細胞である。T 細胞活性化は、実施例に例示されるように、例えば I F N - (ガンマ) 放出によって測定するか、またはフローサイトメトリーを使用して 2 4 時間後の C D 8 + T 細胞集団上の C D 6 9 及び C D 2 5 マーカーを定量化することによって測定することができる。

【 0 2 0 1 】

2 9 . 前記少なくとも第 1 の標的 p M H C 複合体と前記少なくとも第 2 の標的 p M H C 複合体とが同じであるかまたは異なる、2 8 に記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。好ましくは、それらは同じである。

【 0 2 0 2 】

3 0 . 免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する前記 F a b ドメインの前記 C H 1 ドメインの C 末端に位置する、抗体ヒンジ領域の少なくとも 5 個のアミノ酸を含む、2 8 または 2 9 に記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【0203】

31. 上記の28～30のいずれか1つにおいて、免疫細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合する前記Fabドメインは、本明細書の他の箇所に記載されるように、Kabatatの番号付けに従って11位、89位及び/または108位に非極性アミノ酸を有する可変重鎖を含む。

【0204】

32. 上記の28～31のいずれか1つにおいて、前記少なくとも2個のpMHC結合ドメインは、

(i) 本明細書の他の箇所に記載されるように、Kabatatの番号付けに従って11位、89位及び/または108位に例えばセリンなどの本明細書の他の箇所に記載される極性アミノ酸、及び/または

(ii) 本明細書の他の箇所に記載されるように、112位及び/または113位に欠失もしくは置換を有する可変重鎖を含む。

【0205】

33. 前記少なくとも2個のpMHC結合ドメインが、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来するMHC拘束性ペプチドを特異的に標的とする、上記の28～32のいずれかに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。

【0206】

34. 前記Fabドメインが、SPRによって測定した場合に、約1nM～約50nMの結合親和性(K_D)でCD3に特異的に結合する、上記の28～33のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。

【0207】

35. 前記少なくとも2個のpMHC結合ドメインが、前記標的ペプチドpMHC複合体に、約100pM～約20nMの結合親和性(K_D)で結合する、上記の28～34のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。好ましい実施形態では、少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び/または少なくとも第2のpMHC結合ドメインは、前記標的ペプチドpMHC複合体に、約500pM～約10nMまたは約500pM～約5nMの結合親和性(K_D)で結合する。

【0208】

36. 約75kDa～約110kDaの分子量を有する、上記の28～35のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。

【0209】

37. 分子量約60kDa未満の二価の二重特異性抗原結合タンパク質と比較して、血清中半減期が増加している、上記の28～36のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質。

【0210】

38. 好ましくは医薬組成物である、上記の28～36のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質を含む組成物。

【0211】

39. がんまたはウイルス感染症を治療する方法であって、上記の28～37のいずれか1つに記載の二価の二重特異性抗原結合タンパク質、または38の組成物を、がんまたはウイルス感染症の治療を必要とする患者に投与する工程を含む、前記方法。

【0212】

40. pMHC標的に対して二価である二重特異性T細胞エンゲージャーであって、対応する一価の二重特異性よりも高いpMHC細胞発現傷害性を示す、前記二価のT細胞エンゲージャー。

【0213】

41. 本明細書の他の箇所、例えば、1～14または15～25に記載の構造的及び機能的特徴を有する、40に記載の二重特異性T細胞エンゲージャー。

【0214】

10

20

30

40

50

42. CD3結合ドメインと、少なくとも1個のpMHC結合ドメイン、好ましくは2個のpMHC複合体結合ドメインと、を含む二重特異性T細胞エンゲージャーであって、前記CD3結合ドメインの結合速度定数 k_a 及び/または解離速度定数 k_d が、25でSPRによって測定した場合にCD3-ヘテロ二量体CD3 (イプシロン/ガンマ)及びCD3 (イプシロン/デルタ)の両方に対して同様である、前記二重特異性T細胞エンゲージャー。

【0215】

43. 本明細書の他の箇所、例えば、1~14または15~25に記載の構造的及び機能的特徴を有する、42に記載の二重特異性T細胞エンゲージャー。

【0216】

44. 前記CD3結合ドメインの前記結合速度定数 k_a が、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ であり、前記CD3結合ドメインの前記解離速度定数 k_d が、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} s^{-1}$ であり、前記pMHC結合ドメインの前記結合速度定数 k_a が、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ であり、前記pMHC結合ドメインの前記解離速度定数 k_d が、約 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6} s^{-1}$ である、42または43に記載の二重特異性T細胞エンゲージャー。

【0217】

45. 前記CD3結合ドメインの前記結合速度定数 k_a 及び/または前記解離速度定数 k_d が、前記pMHC結合ドメインの前記結合速度定数 k_a 及び/または前記解離速度定数 k_d と同様である、上記の44~42のいずれかに記載の二重特異性T細胞エンゲージャー。

【0218】

ペプチド-MHC複合体結合ドメイン

当該技術分野では周知であるように、MHC分子は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドを、免疫細胞によって認識されるように細胞の表面に提示する。したがって、当業者には理解されるように、本明細書で使用する「pMHC複合体」という用語は、MHC分子と、MHC分子によって提示されるペプチド、詳細には抗原性ペプチドとの複合体を指す。これは一般にMHC拘束性抗原提示として知られている。したがって、pMHC結合ドメインの標的となるペプチドはMHC拘束性ペプチドである。したがって、ペプチドは、標的ペプチドまたは標的抗原性ペプチドとみなすことができる。さらに、本開示によれば、「標的pMHC結合ドメイン」及び「pMHC結合ドメイン」という用語は、本明細書では互換的に使用することができ、いずれの場合も、本明細書の全体を通じて言及される少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び少なくとも第2のpMHC結合ドメインを指す。本明細書の全体を通じて使用される「MHC分子/複合体によって提示される標的ペプチド/抗原」と「MHC拘束性標的ペプチド/抗原」という用語、または類似の表現は、本明細書で互換的に使用され得る。

【0219】

MHCはすべての脊椎動物に存在するが、ヒトのMHCはHLA(ヒト白血球抗原)として知られる。MHC分子には3つのクラスがある。標的ペプチドは、MHCクラスI複合体(血清型HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-KまたはHLA-L、またはそれらの各サブタイプなど)またはMHCクラスII複合体(血清型HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、DMまたはDO、またはそれらの各サブタイプなど)上に提示され得る。血清型のそれぞれは、異なるサブタイプを含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、HLA-A*02、詳細にはHLA-A-A*02:01とも呼ばれる、HLA-A2-MHC複合体に結合したペプチドを標的とする。

【0220】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、特定のHLAサブタイプと標的ペプチドとのpMHC複合体に選択的に結合するが、異なるペプチドを提示する同じHLAサブタイプのpMHC複合体には結合しない。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、特

10

20

30

40

50

定のHLAサブタイプのpMHC複合体上に提示された標的ペプチドに特異的に結合するが、異なるHLAサブタイプのpMHC複合体上に提示された同じペプチドには結合しない。

【0221】

したがって、本開示は、特定の実施形態において、二重特異性の二価抗原結合タンパク質であって、CD3に特異的に結合するFabドメインと、2個以下のpMHC結合ドメインとを含み、両方のpMHC結合ドメインが、同じHLA-A2複合体のような同じHLA-A複合体を標的とする（すなわち、抗原結合タンパク質は、標的pMHC複合体に関して二価である）か、またはHLA-A複合体により提示される、詳細にはHLA-A2複合体により提示される同じペプチドを標的とし、両方のpMHC結合ドメインがそれぞれscFvであるか、またはそれぞれsdAb（VHH）であり、（i）2個のpMHC結合ドメインのうち的一方がCD3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のpMHC結合ドメインがCD3結合ドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または（ii）2個のpMHC結合ドメインのうち的一方がCD3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のpMHC結合ドメインがCD3結合ドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結されている、抗原結合タンパク質を包含する。

10

【0222】

特定の実施形態では、MHC拘束性ペプチドは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する。いくつかの実施形態では、MHC拘束性ペプチドは、がん精巢抗原である。いくつかの実施形態では、MHC拘束性ペプチドは、ネオアンチゲンである。特定の実施形態では、MHC拘束性ペプチドは、NY-ESO-1（ニューヨーク食道扁平上皮癌-1）タンパク質、PRAME（黒色腫で選択的に発現される抗原）タンパク質、またはSX-2（滑膜肉腫、Xブレークポイント2）タンパク質に由来する。

20

【0223】

特定の実施形態では、MHC拘束性標的ペプチドは、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-Cサブファミリーメンバーを含む、MAGEタンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、MHC拘束性標的ペプチドは、これらに限定されるものではないが、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、及びMAGE-A4を含む、MAGE-Aタンパク質に由来する。いくつかの実施形態では、MHC拘束性標的ペプチドは、MAGE-A4タンパク質に由来する。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、好ましい実施形態では、標的ペプチドは、血清型HLA-A、好ましくはHLA-A2のMHCクラスI分子上に提示され、標的ペプチドは、MAGE-Aタンパク質、好ましくはMAGE-A4タンパク質に由来し、したがって、本明細書に記載のある特定の抗原結合タンパク質は、MAGE-A4ペプチド-MHCに対する結合特異性を有する。

30

【0224】

一実施形態では、標的ペプチドは、MAGE-A4のアミノ酸230～239に対応するGVYDGREHTV（配列番号1）である。したがって、一実施形態では、本開示の二価抗原結合タンパク質は、標的ペプチドGVYDGREHTV（配列番号1）に対する結合親和性（ K_D ）を有することができ、及び/または本明細書の他の箇所に記載されるように、MHC拘束性T細胞の活性化を誘発またはもたらすことができる。T細胞活性化は、実施例に例示されるように、例えばIFN- γ （ガンマ）放出によって測定するか、またはフローサイトメトリーを使用して24時間後のCD8⁺T細胞集団上のCD69及びCD25マーカーを定量化することによって測定することができる。

40

【0225】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのいくつかの実施形態では、少なくとも第1のpMHC結合ドメインと少なくとも第2のpMHC結合ドメインとは同じであり、詳細にはそれぞれscFvであり、かつ同じであるか、またはそれぞれsdAbであり、かつ同じである。さらに、本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのいくつかの実施形態では、標的ペ

50

チドは、血清型 H L A - A 2 の M H C クラス I 分子上に提示される。そのいくつかの実施形態では、標的（抗原性）ペプチド（または M H C 拘束性標的ペプチド）は、M A G E タンパク質、好ましくは M A G E - A 4 タンパク質に由来する。本明細書の他の箇所にさらに記載されるように、また、実施例及び図面に例示されるように、いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、どちらも s c F V であり、かつ同じであるか、またはどちらも s d A b であり、かつ同じである 2 個以下の p M H C 結合ドメインを有する（すなわち、p M H C 結合ドメインに関しては、1 個の第 1 の p M H C 結合ドメインと 1 個の第 2 の p M H C 結合ドメインに限定される）。

【 0 2 2 6 】

したがって、さまざまな実施形態では、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、標的ペプチド G V Y D G R E H T V（配列番号 1）を提示する第 1 または第 2 の p M H C 複合体にそれぞれが結合する、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインを含む。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるいくつかの実施例によれば、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、p M H C 複合体に対して二価であり、2 個以下の p M H C 結合ドメインを含み、どちらの p M H C 結合ドメインも、標的ペプチド G V Y D G R E H T V（配列番号 1）を提示する p M H C 複合体に結合する。そのいくつかの実施形態では、二価抗原結合タンパク質は二重特異性であり（すなわち、標的ペプチド G V Y D G R E H T V（配列番号 1）に対する結合特異性に加えて）、本明細書の他の箇所に記載される免疫細胞の細胞表面タンパク質、例えば C D 3 に対する結合特異性を有する。さらに、その特定の実施形態では、配列番号 1 の標的ペプチドを提示する p M H C 複合体は p M H C クラス I 複合体である。すなわち、標的ペプチドは、M H C クラス I 分子上、詳細には、本明細書の他の箇所に記載されるように、血清型 H L A - A の M H C クラス I 分子上に提示され（「H L A - A p M H C 複合体」）、より詳細には、血清型 H L A - A 2 の M H C クラス I 分子上（「H L A - A 2 p M H C 複合体」）に提示される。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのいくつかの実施形態では、両方の p M H C 結合ドメインはそれぞれ s c F v であるか、またはそれぞれ s d A b（V H H）である。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのさらなる実施形態では、（i）2 個の p M H C 結合ドメインのうち的一方は C D 3 結合ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインは C D 3 結合ドメインの軽鎖の C 末端に機能的に連結されるか、または（i i）2 個の p M H C 結合ドメインのうち的一方は C D 3 結合ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインは C D 3 結合ドメインの軽鎖の N 末端に機能的に連結される。

【 0 2 2 7 】

本開示は、参照により本明細書に援用するところの W O 2 0 2 2 1 9 0 0 0 9 A 1 に記載される s c F v 及び s d A b を含む抗原結合タンパク質を包含する。したがって、さまざまな実施形態では、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインとを含み、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインのうち少なくとも一方は、

（a）重鎖可変（V H）ドメインであって、

（i）S N Y A M S（配列番号 2 6）の H C D R 1 アミノ酸配列、

（i i）I V S S G G T T Y Y A X₁ X₂ X₃ K G（配列番号 2 7）（ただし、X₁ は、アミノ酸 S または D に対応し、X₂ は、アミノ酸 W または S に対応し、X₃ は、アミノ酸 A または V に対応する）の H C D R 2 アミノ酸配列、及び

（i i i）D L Y Y G P X₄ T X₅ Y X₆ X₇ X₈ N L（配列番号 2 8）ただし、X₄ は、アミノ酸 T、N、または S に対応し、X₅ は、アミノ酸 D に対応するか、または不在であり、X₆ は、アミノ酸 S または F に対応し、X₇ は、アミノ酸 A または V に対応し、X₈ は、アミノ酸 F または A に対応する）の H C D R 3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変（V H）ドメインと、

10

20

30

40

50

(b) 軽鎖可変(VL)ドメインであって、
 (iv) TADTLRSYAS(配列番号29)のLCDR1アミノ酸配列、
 (v) RDTSRPS(配列番号30)のLCDR2アミノ酸配列、及び
 (vi) ATX₉X₁₀X₁₁SGSNFQX₁₂(配列番号31)(ただし、X₉は、アミノ酸SまたはRに対応し、X₁₀は、アミノ酸DまたはPに対応し、X₁₁は、アミノ酸G、S、またはFに対応し、X₁₂は、アミノ酸LまたはAに対応する)のLCDR3アミノ酸配列を含む、軽鎖可変(VL)ドメインと、を含み、
 抗原結合タンパク質(詳細には、少なくとも第1及び/または第2のpMHC結合ドメイン)は、標的ペプチドGVYDGREHTV(配列番号1)を提示するMHC複合体に対して結合親和性(K_D)を有し、及び/または
 抗原結合タンパク質は、MHC拘束性T細胞活性化を誘発またはもたらす。
 T細胞活性化は、実施例に例示されるように、例えばIFN-(ガンマ)放出によって測定するか、またはフローサイトメトリーを使用して24時間後のCD8⁺T細胞集団上のCD69及びCD25マーカーを定量化することによって測定することができる。

【0228】

本開示の特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、本明細書の他の箇所に記載されるように、低ナノモル濃度範囲及び/またはさらにはピコモル濃度範囲で、MHCに提示された標的ペプチドGVYDGREHTV(配列番号1)に対する特異的結合親和性(K_D)を示す。

【0229】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、pMHC複合体との結合について二価であり、2個以下のpMHC結合ドメインを含み、どちらのpMHC結合ドメインも上記に記載のVH及びVLドメインを含み(すなわち、配列番号26~31のCDRを含む)、抗原結合タンパク質は、GVYDGREHTV(配列番号1)、詳細には上記に記載のHLA-A2拘束性GVYDGREHTV(配列番号1)を提示するMHC複合体に特異的に結合し、及び/または抗原結合タンパク質は、上記に記載のMHC拘束性T細胞活性化を誘発またはもたらす。その特定の実施形態では、二価の抗原結合タンパク質は二重特異性であり、CD3のような、本明細書の他の箇所に記載される免疫細胞の細胞表面タンパク質に対する結合特異性を有する。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、その特定の実施形態では、両方のpMHC結合ドメインはそれぞれscFvであるか、またはそれぞれsdAb(VHH)である。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのさらなる実施形態では、(ii)2個のpMHC結合ドメインのうち的一方はCD3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のpMHC結合ドメインはCD3結合ドメインの軽鎖のC末端に機能的に連結されるか、または(ii)2個のpMHC結合ドメインのうち的一方はCD3結合ドメインの重鎖のC末端に機能的に連結され、他方のpMHC結合ドメインはCD3結合ドメインの軽鎖のN末端に機能的に連結される。

【0230】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号2、8、14または20のHCDR1配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

【0231】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号3、9、15または21のHCDR2配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

【0232】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号4、10、16または22のHCDR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

【0233】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号5、11、17または23のLCDR1配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 4 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号6、12、18または24のLCDR2配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

【 0 2 3 5 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号7、13、19または25のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

【 0 2 3 6 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号2のHC DR1配列、配列番号3のHC DR2配列、及び配列番号4のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

10

【 0 2 3 7 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号8のHC DR1配列、配列番号9のHC DR2配列、及び配列番号10のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

【 0 2 3 8 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号14のHC DR1配列、配列番号15のHC DR2配列、及び配列番号16のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

【 0 2 3 9 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号20のHC DR1配列、配列番号21のHC DR2配列、及び配列番号22のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインを含む。

20

【 0 2 4 0 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号5のLCDR1配列、配列番号6のLCDR2配列、及び配列番号7のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

【 0 2 4 1 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号11のLCDR1配列、配列番号12のLCDR2配列、及び配列番号13のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

30

【 0 2 4 2 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号17のLCDR1配列、配列番号18のLCDR2配列、及び配列番号19のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

【 0 2 4 3 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、配列番号23のLCDR1配列、配列番号24のLCDR2配列、及び配列番号25のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインを含む。

【 0 2 4 4 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、(a)配列番号2のHC DR1配列、配列番号3のHC DR2配列、及び配列番号4のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインと、(b)配列番号5のLCDR1配列、配列番号6のLCDR2配列、及び配列番号7のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインとを含む。

40

【 0 2 4 5 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、(a)配列番号8のHC DR1配列、配列番号9のHC DR2配列、及び配列番号10のHC DR3配列を含む重鎖可変(VH)ドメインと、(b)配列番号11のLCDR1配列、配列番号12のLCDR2配列、及び配列番号13のLCDR3配列を含む軽鎖可変(VL)ドメインとを含む。

【 0 2 4 6 】

一実施形態では、pMHC結合ドメインは、(a)配列番号14のHC DR1配列、配

50

列番号 15 の H C D R 2 配列、及び配列番号 16 の H C D R 3 配列を含む重鎖可変 (V H) ドメインと、(b) 配列番号 17 の L C D R 1 配列、配列番号 18 の L C D R 2 配列、及び配列番号 19 の L C D R 3 配列を含む軽鎖可変 (V L) ドメインとを含む。

【 0 2 4 7 】

一実施形態では、p M H C 結合ドメインは、(a) 配列番号 20 の H C D R 1 配列、配列番号 21 の H C D R 2 配列、及び配列番号 22 の H C D R 3 配列を含む重鎖可変 (V H) ドメインと、(b) 配列番号 23 の L C D R 1 配列、配列番号 24 の L C D R 2 配列、及び配列番号 25 の L C D R 3 配列を含む軽鎖可変 (V L) ドメインとを含む。

【 0 2 4 8 】

したがって、さまざまな実施形態では、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメインと少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインとを含み、少なくとも第 1 の p M H C 結合ドメイン及び少なくとも第 2 の p M H C 結合ドメインのうちの少なくとも一方は、(i) 配列番号 2 ~ 7、(i i) 配列番号 8 ~ 13、(i i i) 配列番号 14 ~ 19、または (i v) 配列番号 20 ~ 25 のいずれか 1 つの C D R 配列を含み、抗原結合タンパク質 (詳細には、少なくとも第 1 及び / または第 2 の p M H C 結合ドメイン) は、配列番号 26 ~ 31 に関連して上記に述べた標的ペプチド G V Y D G R E H T V (配列番号 1) を提示する M H C 複合体に対する結合特異性を有し、及び / または抗原結合タンパク質は、配列番号 26 ~ 31 に関連して上記に述べた M H C 拘束性 T 細胞活性化を誘発またはもたらす。

【 0 2 4 9 】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるさまざまな実施形態によれば、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、p M H C 複合体に対して二価であり、2 個以下の p M H C 結合ドメインを含み、どちらの p M H C 結合ドメインも上記に述べた V H 及び V L ドメインを含み (すなわち、(i) 配列番号 2 ~ 7、(i i) 配列番号 8 ~ 13、(i i i) 配列番号 14 ~ 19、または (i v) 配列番号 20 ~ 25 のいずれか 1 つの C D R を含む)、抗原結合タンパク質 (詳細には 2 個の p M H C 結合ドメイン) は、詳細には上記に記載の H L A - A 2 拘束性の標的ペプチド G V Y D G R E H T V (配列番号 1) を提示する M H C 複合体に対する結合親和性 (K_D) を有し、及び / または抗原結合タンパク質は、上記に記載の M H C 拘束性免疫細胞活性化を誘発またはもたらす。その特定の実施形態では、二価の抗原結合タンパク質は二重特異性であり、本明細書の他の箇所に記載されるように C D 3 に対する結合特異性を有する。より詳細には、C D 3 に特異的に結合する上記の抗原結合タンパク質の免疫細胞結合ドメインは、C D 3 に対して一価であり、F a b であってよい。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのいくつかの実施形態では、両方の p M H C 結合ドメインはそれぞれ s c F v であるか、またはそれぞれ s d A b (V H H) である。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのさらなる実施形態では、(i) 2 個の p M H C 結合ドメインのうち的一方は C D 3 F a b ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインは C D 3 結合 F a b ドメインの軽鎖の C 末端に機能的に連結されるか、または (i i) 2 個の p M H C 結合ドメインのうち的一方は C D 3 結合 F a b ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の p M H C 結合ドメインは C D 3 結合 F a b ドメインの軽鎖の N 末端に機能的に連結される。

【 0 2 5 0 】

特定の実施形態では、各 C D R は、表 2、3 または 4 に開示されているものなどの本明細書に開示される抗原結合タンパク質に由来する。

【 0 2 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2 HLA-A*02:01によって提示される配列番号1のペプチドを標的とする例示的なpMHC結合ドメインのCDR配列

配列番号2 (M1 HCDR1)	SNYAMS	
配列番号3 (M1 IICDR2)	IVSSGGTTYADSVKG	
配列番号4 (M1 IICDR3)	DLYYGPNTDYSAANL	10
配列番号5 (M1 LCDR1)	TADTLRSYAS	
配列番号6 (M1 LCDR2)	RDTSRPS	
配列番号7 (M1 LCDR3)	ATRPSSGSNFQA	
配列番号8 (M2 HCDR1)	SNYAMS	
配列番号9 (M2 HCDR2)	IVSSGGTTYADSVKG	20
配列番号10 (M2 HCDR3)	DLYYGPSTYFVANL	
配列番号11 (M2 LCDR1)	TADTLRSYAS	
配列番号12 (M2 LCDR2)	RDTSRPS	
配列番号13 (M2 LCDR3)	ATRPSSGSNFQL	30
配列番号14 (M3 HCDR1)	SNYAMS	
配列番号15 (M3 HCDR2)	IVSSGGTTYASWAKG	
配列番号16 (M3 HCDR3)	DLYYGPTTYSAANL	

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列番号 17 (M3 LCDR1)	TADTLRSYAS	
配列番号 18 (M3 LCDR2)	RDTSRPS	
配列番号 19 (M3 LCDR3)	ATRDFSGSNFQL	
配列番号 20 (M4 HCDR1)	SNYAMS	10
配列番号 21 (M4 HCDR2)	IVSSGGTTYASWAKG	
配列番号 22 (M4 HCDR3)	DLYYGPTTYSANL	
配列番号 23 (M4 LCDR1)	TADTLRSYAS	
配列番号 24 (M4 LCDR2)	RDTSRPS	
配列番号 25 (M4 LCDR3)	ATRPSSGSNFQA	20
配列番号 26 コンセンサス HCDR1	SNYAMS	
配列番号 27 コンセンサス HCDR2	IVSSGGTTYAX ₁ X ₂ X ₃ KG (ただし、X ₁ は、アミノ酸 S または D に対応し、X ₂ は、アミノ酸 W または S に対応し、X ₃ は、アミノ酸 A または V に対応する)	
配列番号 28 コンセンサス HCDR3	DLYYGPX ₄ TX ₅ YX ₆ X ₇ X ₈ NL (ただし、X ₄ は、アミノ酸 T、N、または S に対応し、X ₅ は、アミノ酸 D に対応するか、または不在であり、X ₆ は、アミノ酸 S または F に対応し、X ₇ は、アミノ酸 A または V に対応し、X ₈ は、アミノ酸 F または A に対応する)	30
配列番号 29 コンセンサス LCDR1	TADTLRSYAS	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

配列番号 30 コンセンサス LCDR2	RDTSRPS
配列番号 31 コンセンサス LCDR3	ATX ₉ X ₁₀ X ₁₁ SGSNFQX ₁₂ (ただし、X ₉ は、アミノ酸 S または R に対応し、X ₁₀ は、アミノ酸 D または P に対応し、X ₁₁ は、アミノ酸 G、S、または F に対応し、X ₁₂ は、アミノ酸 L または A に対応する)

10

【0252】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 32、34、36 または 38 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 33、35、37 または 39 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 32 及び 33 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 34 及び 35 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 36 及び 37 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 38 及び 39 のアミノ酸配列を含む。

20

【0253】

本明細書で開示される配列のパリアントも包含される。パリアントアミノ酸または核酸配列は、本明細書に開示される親配列の少なくとも 1 つの所望の活性、例えば、特異的な抗原結合性を保持しながら、それぞれ 1 つ以上のアミノ酸残基または核酸塩基の挿入（付加を含む）、欠失、及び/または置換によってその親配列とは異なる。パリアントは、人為的に操作されたものでも天然に存在するもの、例えば、アレルパリアントまたはスプライスパリアントでもよい。

【0254】

したがって、特定の実施形態では、パリアント抗原結合タンパク質は、その標的（例えば、HLA-A2 拘束性の G V Y D G R E H T V、配列番号 1）に対する特異的結合性を保持し、及び/またはその標的への結合について本明細書で開示される抗原結合タンパク質と競合する。特定の実施形態では、パリアント抗原結合タンパク質は、本明細書に開示されるアミノ酸配列と、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、パリアント抗原結合タンパク質は、親アミノ酸配列に関して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の置換を含む。

30

【0255】

40

50

【表 3】

表 3 例示的な pMHC ドメインの重鎖及び軽鎖アミノ酸配列
 CDR 配列は太字の下線付きテキストで強調されている。

配列番号32	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMS</u> WVRQ APGKGLEWIG <u>IVSSGGTTYADSVKGR</u> FTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTASY ^Y CAK <u>DLYYGPNTDYSAANL</u> WGQGT SVTVSS	
配列番号33	QSVLTQDPAVSVVALGQTVRITC <u>TADTLRSYAS</u> WYQQK GQAPVLVIY <u>RDTSRPS</u> GIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCA <u>TRPSSGSNFQA</u> FGGGTKLTVLG	10
配列番号34	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMS</u> WVRQ APGKCLEWIG <u>IVSSGGTTYADSVKGR</u> FTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTASY ^Y CAK <u>DLYYGPSTYFVANL</u> WGQGT VTVSS	
配列番号35	QSVLTQDPAVSVVALGQTVRITC <u>TADTLRSYAS</u> WYQQK GQAPVLVIY <u>RDTSRPS</u> GIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCA <u>TRPSSGSNFOL</u> FGCGTKLTVLG	20
配列番号36	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMS</u> WVRQ APGKCLEWIG <u>IVSSGGTTYASWAKGR</u> FTISKDTSKNTV YLQMNSLRAEDTASY ^Y CAK <u>DLYYGPTTYSANL</u> WGQGT SVTVSS	
配列番号37	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>TADTLRSYAS</u> WYQQKPG QSPVLVIY <u>RDTSRPS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EADYYCA <u>TRDFSGSNFOL</u> FGCGTKLTVLG	30
配列番号38	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMS</u> WVRQ APGKGLEYIG <u>IVSSGGTTYASWAKGR</u> FTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTASY ^Y CAK <u>DLYYGPTTYSANL</u> WGQGT VTVSS	
配列番号39	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>TADTLRSYAS</u> WYQQKPG QSPVLVIY <u>RDTSRPS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EADYYCA <u>TRPSSGSNFQA</u> FGGGTKLTVLG	40

【0256】

したがって、さまざまな実施形態では、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、少なくとも第1のpMHC結合ドメインと少なくとも第2のpMHC結合ドメインを含み、少なくとも第1のpMHC結合ドメイン及び少なくとも第2のpMHC結合ドメインのうちの少なくとも一方は、(i)配列番号32~33、(ii)配列番号34~35、(iii)配列番号36~37、または(iv)配列番号38~39のいずれか1つのVH/VL配列を含み、抗原結合タンパク質(詳細には、少なくとも第1及び/または第2のpMHC結合ドメイン)は、配列番号26~31に関連して上記に述べた標的ペプチドGVYDGREHTV(配列番号1)に対する結合特異性 K_D を有し、及び/または

抗原結合タンパク質は、配列番号 26 ~ 31 に関連して上記に述べた MHC 拘束性 T 細胞活性化を誘発またはもたらす。

【0257】

本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示される好ましい実施形態によれば、本開示によって提供される抗原結合タンパク質は、pMHC 複合体に対して二価であり、2 個以下の pMHC 結合ドメインを含み、どちらの pMHC 結合ドメインも上記に述べた VH 及び VL ドメインを含み（すなわち、(i) 配列番号 32 ~ 33、(ii) 配列番号 34 ~ 35、(iii) 配列番号 36 ~ 37、または (iv) 配列番号 38 ~ 39 のいずれか 1 つの VH / VL 配列を含む）、抗原結合タンパク質（詳細には 2 個の pMHC 結合ドメイン）は、詳細には上記に記載の HLA - A2 拘束性の G V Y D G R E H T V（配列番号 1）を提示する標的 pMHC に特異的に結合し、及び / または抗原結合タンパク質は、上記に記載の MHC 拘束性 T 細胞活性化を誘発またはもたらす。好ましい実施形態では、二価の抗原結合タンパク質は二重特異性であり、本明細書の他の箇所に記載される CD3 に対する結合特異性のような、本明細書の他の箇所に記載される免疫細胞の細胞表面タンパク質に対する結合特異性を有する。そのいくつかの実施形態では、免疫細胞結合ドメインは、CD3 に特異的に結合する Fab ドメインである。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのいくつかの実施形態では、両方の pMHC 結合ドメインはそれぞれ scFv であるか、またはそれぞれ sdAb (VHH) である。本明細書の他の箇所に記載され、また、実施例及び図面に例示されるように、そのさらなる実施形態では、(i) 2 個の pMHC 結合ドメインのうち的一方は CD3 結合 Fab ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の pMHC 結合ドメインは CD3 結合 Fab ドメインの軽鎖の C 末端に機能的に連結されるか、または (ii) 2 個の pMHC 結合ドメインのうち的一方は CD3 結合 (Fab) 結合ドメインの重鎖の C 末端に機能的に連結され、他方の pMHC 結合ドメインは CD3 結合 Fab ドメインの軽鎖の N 末端に機能的に連結される。

【0258】

したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 79、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ、配列番号 26 ~ 31 の CDR を含む scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば、Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 80、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ、配列番号 26 ~ 31 の CDR を含む scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば、Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 76、77 及び 78 の HCDR 配列ならびに配列番号 80、81 及び 82 の LCDR 配列、またはそれらのバリエーションを含む抗 CD3 結合ドメインと、同じ pMHC 複合体を標的とし、どちらもそれぞれ、(i) 配列番号 2 ~ 7、(ii) 配列番号 8 ~ 13、(iii) 配列番号 14 ~ 19、または (iv) 配列番号 20 ~ 25 の CDR を含む scFv である 2 個以下の pMHC 結合ドメインとを含む、例えば、Fab - (scFv)₂ のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。したがって、本開示は、特定の実施形態において、配列番号 83 の VL 配列及び配列番号 84 の VH 配列、または

それらのバリエーションを含む抗CD3結合ドメインと、同じpMHC複合体を標的とし、どちらもそれぞれ、(i)配列番号32~33、(ii)配列番号34~35、(iii)配列番号36~37、または(iv)配列番号38~39のいずれか1つのVH/VL配列、またはそれらのバリエーションをそれぞれ含むscFvである2個以下のpMHC結合ドメインとを含む、例えば、Fab-(scFv)₂のような二重特異性の二価抗原結合タンパク質を包含する。HLA-A*02:01によって提示される配列番号1のペプチドを標的とする例示的なpMHC結合ドメイン及び上記に記載の配列は、参照によって本明細書にそれぞれの内容を援用するところのUS20220380472A1及び2022年3月9日に出版された米国仮特許出願第63/318,163号にさらに詳細に記載されている。

10

【0259】

抗薬物抗体結合の低減

抗薬物抗体(ADA)は、生物製剤のリスクプロファイル及び有効性に影響を及ぼす可能性がある。中和する場合、ADAは、薬物とその標的に結合する能力を遮断する可能性がある。したがって、抗薬物抗体の結合及びそれらの中和能について生物製剤を試験することは規制要件となっている。抗薬物抗体アッセイは、例えば、参照によって本明細書にそれぞれを援用するところのWO2007101661A1(Hoffmann-La Roche)、WO2018178307A1(Ablynx)、WO2021046316A2(Adverm Biotechnologies, Charles River)、及びUS20180088140A1(Genzyme Corporation)に詳述されている。

20

【0260】

抗原結合タンパク質の腫瘍標的化ドメインに結合する抗薬物抗体は、ADAの各可変ドメインが2個の抗原結合タンパク質のうち一方の腫瘍標的化ドメインに結合する場合、抗原結合タンパク質のクラスター化を引き起こし得る。抗原結合タンパク質上の2個以上のCD3結合ドメインはクラスター化して、標的化されたT細胞を標的結合の非存在下で過剰刺激し、それによってオフターゲットの傷害性を引き起こす。T細胞の非特異的な刺激は、全身性のサイトカイン放出を引き起こす可能性がある。

【0261】

一般に、当該技術分野では、がん免疫療法のためのより安全かつより効果的な二重特異性抗体の開発が求められている。

30

【0262】

本発明者らは、T細胞エンゲージャーの腫瘍抗原結合ドメインの特定の変異が、標的結合の非存在下でADA反応を低下させると同時に非特異的T細胞刺激を減少させることを見出した。これにより、がん免疫療法のための極めて効果的かつ安全なアプローチが提供される。

【0263】

一態様では、本開示は、T細胞結合多重特異性抗原結合タンパク質の非特異的T細胞活性化を低減する方法であって、多重特異性抗原結合タンパク質が、CD3を特異的に標的化する第1の結合ドメインと、腫瘍抗原を特異的に標的化する第2の結合ドメインとを含み、多重特異性抗原結合タンパク質が少なくとも1つの可変重鎖を含み、a)Kababの番号付けに従って、11位、89位、及び/または108位の可変重鎖アミノ酸を極性アミノ酸に置換することと、b)Kababの番号付けに従って、113位のセリン(S)を欠失させることと、を含む、方法を提供する。

40

【0264】

特定の実施形態では、工程a)の極性アミノ酸は、セリン(S)及び/またはスレオニン(T)である。

【0265】

特定の実施形態では、重鎖アミノ酸は、Kababの番号付けに従って、重鎖の11位のアミノ酸がセリン(S)に、重鎖の89位のアミノ酸がセリン(S)またはスレオニン

50

(T) に、及び/または重鎖の 1 0 8 位のアミノ酸がセリン (S) またはスレオニン (T) に置換される。

【 0 2 6 6 】

特定の実施形態では、重鎖アミノ酸は、K a b a t の番号付けに従って、重鎖の 1 1 位のアミノ酸がセリン (S) に、重鎖の 8 9 位のアミノ酸がセリン (S) に、重鎖の 1 0 8 位のアミノ酸がセリン (S) に置換される。

【 0 2 6 7 】

特定の実施形態では、工程 b) は、K a b a t の番号付けに従って、1 1 2 位のセリン (S) を欠失させる工程をさらに含む。

【 0 2 6 8 】

特定の実施形態では、方法は、K a b a t のアミノ 1 1 2 または 1 1 3 位でアラニン (A)、グリシン (G) またはスレオニン (T) を添加することをさらに含む。

【 0 2 6 9 】

特定の実施形態では、方法は、K a b a t のアミノ酸 1 1 2 位または 1 1 3 位にアラニン (A) を付加することをさらに含む。

【 0 2 7 0 】

特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質は、一価、二価または多価である。

【 0 2 7 1 】

特定の実施形態では、上記の方法の抗原結合タンパク質は、F a b - s d A b、F a b - (s d A b)₂、F a b - s c F v または F a b - (s c F v)₂、F (a b ')₂ 断片、ビス - s c F v (またはタンデム s c F v もしくは B i T E)、D A R T、ダイアボディ、s c D b、D V D - I g、I g G - s c F a b、s c F a b - F c - s c F a b、I g G - s c F v、s c F v - F c、s c F v - f c - s c F v、F v₂ - F c、F y n o m A B、クアドローマ、C r o s s M a b、デュオボディー、トリアボディ及びテトラボディ、または M A T C H である。

【 0 2 7 2 】

特定の実施形態では、第 2 の結合ドメインは、p M H C を特異的に標的とする。

【 0 2 7 3 】

特定の実施形態では、多重特異性抗原結合タンパク質は、さらに、p M H C を特異的に標的とする第 3 の結合ドメインを含む。

【 0 2 7 4 】

特定の実施形態では、第 2 の結合ドメインと第 3 の結合ドメインとは、同じ p M H C または異なる p M H C を特異的に標的とする。

【 0 2 7 5 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、C D 3 を特異的に標的とする 1 個の結合ドメインと、p M H C を特異的に標的とする 1 個の結合ドメインとを含む。

【 0 2 7 6 】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、C D 3 を特異的に標的とする 1 個の結合ドメインと、p M H C を特異的に標的とする 2 個の結合ドメインとを含む。

【 0 2 7 7 】

特定の実施形態では、p M H C を特異的に標的とする 2 個の結合ドメイン同士は同じである。

【 0 2 7 8 】

特定の実施形態では、p M H C 結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来する M H C 拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【 0 2 7 9 】

特定の実施形態では、C D 3 に対する結合親和性 (K_D) は、S P R により測定した場合に、約 1 n M ~ 約 5 0 n M、場合により約 2 0 n M ~ 5 0 n M である。

【 0 2 8 0 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、CD3に対する結合親和性 (K_D) は、SPRにより測定した場合に、約1 nM、約10 nM、または約50 nMである。

【0281】

特定の実施形態では、CD3に対する結合親和性 (K_D) は、SPRにより測定した場合に、約1 nM、約10 nM、または約50 nMである。

【0282】

特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、約100 pM ~ 約20 nM (例えば、約100 pM、約150 pM、200 pM、約250 pM、約300 pM、約350 pM、約400 pM、約450 pM、約500 pM、約550 pM、約600 pM、約650 pM、約700 pM、約750 pM、約800 pM、約850 pM、約900 pM、約950 pM、約1 nM (1,000 pM)、約2 nM、約3 nM、約4 nM、または約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約11 nM、約12 nM、約13 nM、約14 nM、約15 nM、約16 nM、約17 nM、約18 nM、約19 nM、または約20 nM) である。特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、約100 pM ~ 約10 nMである。特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、約500 pM ~ 約10 nMである。特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、約500 pM ~ 約5 nMである。特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、約500 pM ~ 約2 nMである。特定の実施形態では、pMHCに対する結合親和性 (K_D) は、500 pM ~ 約1 nMである。

10

20

【0283】

別の態様では、本開示は、上記に記載の方法によって得ることが可能な多重特異性抗原結合タンパク質を提供する。

【0284】

別の態様では、本開示は、CD3に対して特異的な少なくとも1つの第1の結合ドメインと、腫瘍抗原に対して特異的な少なくとも1つの第2の結合ドメインとを含む抗原結合タンパク質であって、それぞれの結合ドメインが少なくとも1つの可変重鎖を含み、少なくとも1つの可変重鎖が、Kabatの番号付けに従って、11位、89位及び/または108位に極性アミノ酸を含む、抗原結合タンパク質を提供する。

【0285】

特定の実施形態では、可変重鎖は、第2の結合ドメインの可変重鎖である。

30

【0286】

特定の実施形態では、極性アミノ酸は、セリン (S) 及び/またはスレオニン (T) である。

【0287】

特定の実施形態では、可変重鎖は、Kabatの番号付けに従って重鎖の11位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の89位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を、重鎖の108位のアミノ酸にセリン (S) またはスレオニン (T) を含む。

【0288】

特定の実施形態では、可変重鎖は、Kabatの番号付けに従って、重鎖の11位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の89位のアミノ酸にセリン (S) を、重鎖の108位のアミノ酸にセリン (S) を含む。

40

【0289】

特定の実施形態では、可変重鎖は、Kabatの番号付けに従って、113位のセリン (S) が欠失されている。

【0290】

特定の実施形態では、可変重鎖は、Kabatの番号付けに従って、112位及び113位のセリン (S) が欠失されている。

【0291】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、Kabatの番号付けに従って、112

50

位にアラニン（A）、グリシン（G）またはスレオニン（T）、特にアラニン（A）を含む。

【0292】

特定の実施形態では、腫瘍抗原は、pMHCである。

【0293】

特定の実施形態では、pMHC結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来するMHC拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【0294】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のCD3に対する親和性（ K_D ）は、SPRにより測定した場合に、約1 nM～約50 nM、場合により約20 nM～50 nMである

10

【0295】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のCD3に対する親和性（ K_D ）は、SPRにより測定した場合に、約1 nM、約10 nM、または約50 nMである。

【0296】

特定の実施形態では、CD3に対して特異的な第1の結合ドメインは、Fab断片である。

【0297】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、2個以上のpMHC結合ドメインを含む

20

【0298】

特定の実施形態では、pMHC結合ドメインは、scFvまたはsdAbである。

【0299】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性（ K_D ）は、約100 pM～約20 nM（例えば、約100 pM、約150 pM、200 pM、約250 pM、約300 pM、約350 pM、約400 pM、約450 pM、約500 pM、約550 pM、約600 pM、約650 pM、約700 pM、約750 pM、約800 pM、約850 pM、約900 pM、約950 pM、約1 nM（1,000 pM）、約2 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約11 nM、約12 nM、約13 nM、約14 nM、約15 nM、約16 nM、約17 nM、約18 nM、約19 nM、または約20 nM）である。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性（ K_D ）は、約100 pM～約1 nMである。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性（ K_D ）は、約500 pM～約2 nMである。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性（ K_D ）は、約500 pM～約3 nMである。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質のpMHCに対する親和性（ K_D ）は、約500 pM～約5 nMである。

30

【0300】

特定の実施形態では、上記の抗原結合タンパク質は、Fab-sdAb、Fab-(sdAb)₂、Fab-scFvまたはFab-(scFv)₂、F(ab')₂断片、ビス-scFv（またはタンデムscFvもしくはBiTE）、DART、ダイアボディ、scDb、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-Fc-scFab、IgG-scFv、scFv-Fc、scFv-fc-scFv、Fv₂-Fc、FynomA B、クアドローマ、CrossMab、デュオボディー、トリアボディ及びテトラボディ、またはMATCHである。

40

【0301】

抗原結合タンパク質の発現

一態様では、本明細書で開示される抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは核酸が提供される。これらのポリヌクレオチドまたは核酸を発現させることを含む、抗原結合タンパク質を作製する方法も提供される。

【0302】

50

本明細書で開示される抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、一般的に、所望の量の抗原結合タンパク質を産生するために使用され得る宿主細胞に導入するための発現ベクターに挿入される。したがって、特定の態様において、本発明は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドを含む発現ベクター、ならびにこれらのベクター及びポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

【0303】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、細胞に所望の遺伝子を導入し、発現させるためのビヒクルとして本発明に従って使用されるベクターを意味するために本明細書で使用される。当業者に知られているように、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス及びレトロウイルスからなる群から容易に選択され得る。一般に、本発明と適合性のあるベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングを容易にするための適切な制限部位、ならびに真核細胞または原核細胞に進入する及び/または複製する能力を含む。

10

【0304】

本発明の目的のために、数多くの発現ベクター系が採用され得る。例えば、あるクラスのベクターは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（例えば、RSV、MMTV、MOMLVなど）、またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNAエレメントを利用する。その他は、内部リボソーム結合部位を含むポリシストロン系の使用を伴う。さらに、DNAが染色体に組み込まれた細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択され得る。このマーカーは、栄養要求性宿主に原栄養性を付与するか、殺生物剤（例えば抗生物質）耐性または銅のような重金属の耐性を付与し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結させてもよいし、同時形質転換によって同じ細胞に導入してもよい。mRNAの最適な合成のために追加のエレメントが必要とされる場合もある。これらのエレメントには、シグナル配列、スプライスシグナル、さらには、転写プロモーター、エンハンサー、及び終結シグナルが含まれ得る。いくつかの実施形態において、クローニングされた可変領域遺伝子は、上で考察されたように合成された重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子（例えば、ヒト定常領域遺伝子）とともに発現ベクターに挿入される。

20

【0305】

他の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ポリシストロン性コンストラクトを使用して発現され得る。そのような発現系において、抗体の重鎖及び軽鎖などの複数の目的の遺伝子産物が、単一のポリシストロン性コンストラクトから産生され得る。このような系は、配列内リボソーム進入部位（IRES）を有利に使用して、真核生物宿主細胞で比較的高レベルのポリペプチドを提供する。適合するIRES配列は、米国特許第6,193,980号に記載されており、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に援用される。当業者であれば、そのような発現系を使用して、本出願に開示される全範囲のポリペプチドを効果的に産生することができることを理解するであろう。

30

【0306】

より一般的には、抗体またはその断片をコードするベクターまたはDNA配列が調製されたら、適切な宿主細胞に発現ベクターを導入することができる。すなわち、宿主細胞が形質転換され得る。プラスミドの宿主細胞への導入は、当業者によく知られた様々な技術によって達成することができる。これらには、トランスフェクション（電気泳動及びエレクトロポレーションを含む）、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープDNAとの細胞融合、マイクロインジェクション、及びインタクトウイルスによる感染が含まれるが、これらに限定されない。Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)を参照されたい。プラスミドの宿主への導入は、エレクトロポレーションによるものであり得る。形質転換

40

50

された細胞は、軽鎖及び重鎖の産生に適切な条件下で成長させ、重鎖及び/または軽鎖タンパク質の合成についてアッセイされる。例示的なアッセイ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光標識細胞分取解析 (FACS)、免疫組織化学などが挙げられる。

【0307】

本明細書で使用される場合、「形質転換」という用語は、遺伝子型を変化させ、結果としてレシピエント細胞に変化をもたらす、DNAのレシピエント宿主細胞への導入を指す広い意味で使用されるものとする。

【0308】

これと同じ意味で、「宿主細胞」は、組み換えDNA技術を使用して構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードするベクターで形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からポリペプチドを単離するためのプロセスの説明において、「細胞」及び「細胞培養」という用語は、特に明示されない限り、抗体の供給源を示すために区別なく使用される。換言すれば、「細胞」からのポリペプチドの回収とは、遠心した全細胞、または培地と浮遊細胞の両方を含有する細胞培養液からのいずれかからの回収を意味し得る。

【0309】

一実施形態において、抗体発現に使用される宿主細胞株は、哺乳動物由来のものである。当業者であれば、発現させる所望の遺伝子産物に最も適した特定の宿主細胞株を決定することができる。例示的な宿主細胞株としては、DG44及びDUXB11 (チャニーズハムスター卵巣株、DHRマイナス)、HELA (ヒト子宮頸癌)、CV-1 (サル腎臓株)、COS (SV40 T抗原を含むCV-1の誘導体)、R1610 (チャニーズハムスター線維芽細胞)、BALBC/3T3 (マウス線維芽細胞)、HAK (ハムスター腎臓株)、SP2/O (マウス骨髄腫)、BFA-1c1BPT (ウシ内皮細胞)、RAJI (ヒトリンパ球)、293 (ヒト腎臓)などが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、細胞株は、細胞株から発現される抗体のグリコシル化に変更を与える (例えば、脱フコシル化) (例えば、PER.C6 (登録商標) (Crucell) またはFUT8ノックアウトCHO細胞株 (Potelligent (登録商標) 細胞) (Biowa, Princeton, N.J.))。宿主細胞株は、典型的に、商業的サービス、例えば、American Tissue Culture Collection、または公開されている文献から入手可能である。

【0310】

インビトロ産生では、所望のポリペプチドを多量に得るためのスケールアップが可能である。組織培養条件下で哺乳動物細胞を培養するための技術は、当該技術分野において知られており、例えば、エアリフトリアクターもしくは連続攪拌リアクターでの均一系懸濁培養、または、例えば、中空繊維、マイクロカプセル、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジでの固定化もしくは包括細胞培養が含まれる。必要であれば及び/または所望により、ポリペプチドの溶液は、慣用のクロマトグラフィー法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAEセルロース上のクロマトグラフィー及び/または(イムノ)アフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。

【0311】

本発明で取り上げられる抗原結合タンパク質をコードする遺伝子は、細菌もしくは酵母などの非哺乳動物細胞または植物細胞で発現させることもできる。この点に関して、細菌などのさまざまな単細胞非哺乳動物微生物、すなわち、培養または発酵で成長可能である微生物も形質転換できることが理解されよう。形質転換しやすい細菌には、腸内細菌科のメンバー、例えば、Escherichia coliまたはSalmonellaの株; Bacillaceae、例えば、Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus、及びHaemophilus influenzaeが含まれる。細菌で発現される場合、タンパク質は、封入体の一部となり得ることもさらに理解されよう。タンパク質は、単離され、精製され、次いで、機能性分子

10

20

30

40

50

に組み立てられる必要がある。

【0312】

原核生物に加えて、真核微生物も使用され得る。Saccharomyces cerevisiae、または一般的なパン酵母が真核微生物のなかでも最も一般的に使用されているが、他の菌株メンバーも一般的に利用可能である。Saccharomycesでの発現の場合、例えば、プラスミドYRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)) が一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の変異株、例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1に対して選択マーカーを提供するTRP1遺伝子を既に含有している (Jones, Genetics, 85:12 (1977))。そのため、酵母宿主細胞ゲノムの特徴であるtrp1損傷の存在により、トリプトファンの不在下での成長による形質転換体の検出に有効な環境がもたらされる。

10

【0313】

抗原結合タンパク質の操作及び最適化

本開示の抗原結合タンパク質は、操作または最適化され得る。本明細書で使用する場合、「最適化される」または「最適化」とは、1つ以上の機能特性を改善するために抗原結合タンパク質を改変することを指す。改変には、抗原結合タンパク質内の1つ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加、及び/または修飾が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0314】

本明細書で使用する場合、「機能特性」という用語は、例えば、抗原結合タンパク質の製造特性または治療効果を改善するために、当業者にとって、改善 (例えば、抗体などの従来の抗原結合タンパク質と比べて) が望ましい及び/または有利である抗原結合タンパク質の特性である。一実施形態において、機能特性は、安定性 (例えば、熱安定性) である。別の実施形態において、機能特性は、可溶性 (例えば、細胞条件下) である。さらに別の実施形態において、機能特性は、凝集挙動である。さらに別の実施形態において、機能特性は、タンパク質発現 (例えば、原核細胞において) である。さらに別の実施形態において、機能特性は、製造プロセスにおける封入体可溶化後のリフォールディング挙動である。ある特定の実施形態において、機能特性は、抗原結合親和性の改善ではない。別の実施形態において、1つ以上の機能特性の改善は、抗原結合タンパク質の結合親和性に実質的な影響を及ぼさない。

30

【0315】

ある特定の実施形態において、本開示の抗原結合タンパク質は、scFvであり、抗原結合タンパク質の目的のアミノ酸位置 (例えば、少なくとも1つの望ましい特性を有するscFv配列、例えば、品質管理 (QC) アッセイにより選択される配列のデータベースを、成熟抗体配列のデータベース、例えば、Kabataデータベースと比較することによって特定されるアミノ酸位置) に、置換、欠失、及び/または付加するのが好ましいアミノ酸残基を特定することによって、最適化される。したがって、本開示は、特定のアミノ酸残基を選択するための「濃縮/排除」法をさらに提供する。さらに本開示は、本明細書に記載される「機能的コンセンサス」アプローチを使用して特定された特定のフレームワークアミノ酸位置を変異させることによって、抗原結合タンパク質 (例えば、scFv) を操作する方法を提供する。ある特定の実施形態において、フレームワークアミノ酸位置は、既存のアミノ酸残基を、本明細書に記載される「濃縮/排除」分析法を使用して「濃縮された」残基であることが見出された残基で置換することによって変異される。一態様において、本開示は、単鎖抗体 (scFv) における変異のためのアミノ酸位置を特定する方法であって、scFvは、VH及びVLアミノ酸配列を有し、方法は、a) scFv VH、VLまたはVH及びVLアミノ酸配列を、多数の抗体VH、VLまたはVH及びVLアミノ酸配列を含むデータベースに入力して、scFv VH、VLまたはVH及びVLアミノ酸配列とデータベースの抗体VH、VLまたはVH及びVLアミノ酸配列をアラ

40

50

イメントすることと、b) s c F v V HまたはV Lアミノ酸配列内のアミノ酸位置を、データベースの抗体V HまたはV Lアミノ酸配列内の対応する位置と比較することと、c) s c F v V HまたはV Lアミノ酸配列内のアミノ酸位置が、データベースの抗体V HまたはV Lアミノ酸配列内の対応する位置に保存されているアミノ酸残基で占められているかどうかを決定することと、d) s c F v V HまたはV Lアミノ酸配列内のアミノ酸位置が、データベースの抗体V HまたはV Lアミノ酸配列内の対応する位置に保存されていないアミノ酸残基で占められている場合、そのアミノ酸位置を変異のためのアミノ酸位置として特定することを含む、方法を提供する。S c F V最適化は、いずれも参照によって本明細書に援用するところのW O 2 0 0 8 1 1 0 3 4 8、W O 2 0 0 9 0 0 0 0 9 9、W O 2 0 0 9 0 0 0 0 9 8、及びW O 2 0 0 9 1 5 5 7 2 5にさらに詳細に記載されている。

【0316】

F cドメインの存在が実施可能であるような本開示の態様では、抗原結合タンパク質は、細胞傷害性免疫応答を誘導しない及び/または補体を活性化しないように改変されたF cドメインを含んでもよい。例えば、A D C C / A D C PまたはC D Cエフェクター機能が不活性化されるように、1つ以上の置換がF cドメインに導入され得る。そのような抗原結合タンパク質は、分子量が60 k D a未満の抗体断片と比較して、細胞傷害性免疫応答を媒介することなく、半減期が増加するという利点がある。

【0317】

化学的及び/または生物学的修飾

一態様において、抗原結合タンパク質は、化学的及び/または生物学的に修飾される。例えば、抗原結合タンパク質は、グリコシル化、リン酸化、ヒドロキシル化、P E G化、H E S化、P A S化、硫酸化、色素及び/または放射性同位体による標識、酵素及び/または毒素とのコンジュゲート、及び/またはアルブミン結合または融合技術がなされ得る。同様に、本明細書に記載される任意の核酸配列、プラスミドもしくはベクター及び/または宿主細胞も適宜修飾され得る。

【0318】

そのような修飾は、例えば、薬物動態学、水溶性を最適化するために、または副作用を低減させるために行うことができる。例えば、P E G化、P A S化、H E S化及び/または血清アルブミンへの融合は、腎クリアランスを遅らせ、それにより、抗原結合タンパク質の血漿半減期を増加させるために適用され得る。一実施形態では、本開示の抗原結合分子は、ヒト血清アルブミンに機能的に連結される。一実施形態では、修飾により、抗原結合タンパク質に異なる機能、例えば、診断用の検出標識またはがん細胞とさらに効率的に戦うための毒素が付加される。

【0319】

一実施形態において、抗原結合タンパク質は、グリコシル化される。グリコシル化とは、タンパク質に炭水化物が結合するプロセスを指す。生物系において、このプロセスは、共翻訳及び/または翻訳後修飾の形態として細胞内で酵素的に実施される。タンパク質はまた、化学的にグリコシル化され得る。炭水化物は、アスパラギンもしくはアルギニン側鎖の窒素にN連結されるか、セリン、スレオニン、チロシン、ヒドロキシリジン、もしくはヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシ酸素にO連結されるか、ホスホセリンに結合したキシロース、フコース、マンノース、及びN - アセチルグルコサミンを利用するか、及び/または特定の認識配列に見出されるトリプトファン残基にマンノース糖が付加され得る。グリコシル化パターンは、例えば、適切な細胞株、培養培地、タンパク質工学の製造様式及びプロセス戦略を選択することによって、制御することができる(H O S S L E R , P . O p t i m a l a n d c o n s i s t e n t p r o t e i n g l y c o s y l a t i o n i n m a m m a l i a n c e l l c u l t u r e . G l y c o b i o l o g y 2 0 0 9 , v o l . 1 9 , n o . 9 , p . 9 3 6 - 9 4 9 参照)。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗原結合タンパク質のグリコシル化パターンは、A D C C及びC D Cエフェクター機能を増強するように修飾される。

【0320】

抗原結合タンパク質は、例えば、1つ以上のグリコシル化部位を欠失及び/または付加することによって、グリコシル化パターンを制御または変更するように操作され得る。グリコシル化部位の創出は、例えば、抗原結合タンパク質のアミノ酸配列に、対応する酵素認識配列を導入することによって達成することができる。

【0321】

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、PEG化される。PEG化により、タンパク質の薬力学及び薬物動態特性が変化し得る。さらに、PEG化は、PEG化された抗原結合タンパク質を免疫系から遮蔽することで免疫原性を低下させ、及び/または、例えば、抗原結合タンパク質の *in vivo* 安定性を増加させ、タンパク質分解から保護し、その半減期を延長し、その生体内分布を変えることによって、その薬物動態を変えることができる。典型的に、適切な分子量のポリエチレン-グリコール (PEG) がタンパク質に共有結合される。同様の効果は、PEGミメティックを使用すること、例えば、抗原結合タンパク質を HES 化、PAS 化、または XTEN 化することでも達成することができる。HES 化は、ヒドロキシエチルデンプン (「HES」) 誘導体を利用する。PAS 化の際、抗原結合タンパク質は、アミノ酸プロリン (P)、アラニン (A) 及びセリン (S) で構成されるコンフォメーションが無秩序化されたポリペプチド配列に連結され、XTEN 化では、同様の本質的に無秩序化された XTEN ポリペプチドを用いる。

10

【0322】

ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、1つ以上の補助的機能を抗原結合タンパク質に付与する第2の部分で標識されるか、またはコンジュゲートされる。例えば、第2の部分は、更なる免疫学的エフェクター機能を有し、薬物のターゲティングに効果的であり、または検出に有用であり得る。第2の部分は、例えば、当該技術分野において知られている方法を使用して、抗原結合タンパク質に化学的に連結または遺伝子的に融合することができる。本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、直接的または間接的のいずれかで物理的または化学的手段によって検出または測定したときに、抗原結合タンパク質の存在を示す任意の物質またはイオンを指す。例えば、標識は、限定するものではないが、吸光、蛍光、反射率、光散乱、リン光、もしくは発光特性、放射性によって検出可能な分子もしくはイオン、または核磁気共鳴もしくは常磁性によって検出可能な分子もしくはイオンによって、直接的に検出可能であり得る。間接的な検出の例としては、吸光または蛍光が挙げられ、例えば、適切な基質を、例えば、非吸光分子から吸光分子に、または非蛍光分子から蛍光分子に変換させる様々な酵素が挙げられる。標識された抗原結合タンパク質は、*in vitro* 及び *in vivo* での検出または診断目的に特に有用である。例えば、好適な放射性同位体、酵素、蛍光団または発色団で標識された抗原結合タンパク質は、それぞれラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、またはフローサイトメトリーによる単一細胞解析 (例えば、FACS 解析) によって検出することができる。同様に、本明細書で開示される核酸及び/またはベクターは、検出または診断目的のために標識され得、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、その標識断片をプローブとして使用することができる。

20

30

【0323】

第2の部分の非限定的な例としては、放射性同位体 (35S、32P、14C、18F、及び/または125I)、アポ酵素、酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、セイウワサビエルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ及び/またはアンジオゲニン)、共因子、ペプチド部分 (例えば、HIS タグ)、タンパク質 (例えば、レクチン、血清アルブミン)、炭水化物 (例えば、マンノース-6-リン酸タグ)、蛍光団 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート (FITC))、フィコエリトリン、緑/青/赤または他の蛍光タンパク質、アロフィコシアニン (APC)、発色団、ビタミン (例えば、ピオチン)、キレート剤、代謝拮抗物質 (例えば、メトトレキサート)、毒素 (例えば、細胞傷害性薬物、または放射性毒素) が挙げられる。

40

【0324】

50

一態様において、本発明は、特定の細胞、例えば、MAGE-A4陽性細胞などの効果的な殺傷をさらに増強する毒素にコンジュゲートされた本明細書に記載される抗原結合タンパク質を含む、薬物コンジュゲート（特に抗体薬物コンジュゲートADC）に関する。毒素部分は、典型的に、MMAE/MMAF、DM1、カリケアミシン、アントラサイクリン毒素、タキソール、グラミシジンD及び/またはコルヒチンなどの低分子量部分であり、ペプチドリンカーを介して抗原結合タンパク質に連結され得る。

【0325】

毒素は、抗原結合タンパク質に非部位特異的または部位特異的にコンジュゲートされ得る。非部位特異的コンジュゲーションは、典型的に、抗体のリジンまたはシステインアミノ酸側鎖へのコンジュゲーションを媒介する、例えば、マレイミド官能基を含む化学リンカーの使用を伴う。部位特異的コンジュゲーションは、当該技術分野において知られている化学的、化学酵素的、または酵素的コンジュゲーションを使用して、例えば、二官能性リンカー、細菌トランスグルタミナーゼもしくはソルターゼ酵素、ホルミルグリシン生成酵素で修飾した抗原結合タンパク質上でのPictet-Spengler化学反応を可能にするリンカー、またはグリカンリモデリングした抗原結合タンパク質を利用して達成され得る。

10

【0326】

抗原結合タンパク質を投与する方法

本開示の抗原結合タンパク質、さらには、本明細書に記載される核酸、本明細書に記載されるベクター、本明細書に記載される宿主細胞または本明細書に記載される組成物を調製し、対象に投与する方法は、当業者によく知られており、または当業者によって容易に決定される。本開示の抗原結合タンパク質の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入、または局所であり得る。本明細書で使用される非経口という用語は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸または腔内投与を含む。本明細書で使用される眼内という用語は、結膜下、硝子体内、球後、または房内を含むが、これらに限定されない。本明細書で使用される局所という用語は、液体または溶液の点眼薬、乳剤（例えば、水中油型乳剤）、懸濁剤、及び軟膏剤による投与を含むが、これらに限定されない。

20

【0327】

これらの全ての投与形態は、本開示の範囲内にあることが明確に企図されるが、投与形態は、注射用溶液であり得る。通常、好適な注射用医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸、リン酸またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意選択により、安定剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含み得る。しかしながら、本明細書における教示に適合する他の方法において、修飾抗体は、有害な細胞集団の部位に直接送達され得、それにより、罹患組織の治療薬剤への曝露が増加する。

30

【0328】

関連する状態の治療のための本開示の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の医薬、及び治療が予防であるか治療であるかを含む、多くの異なる因子に応じて変化する。通常、患者は、ヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物も治療することができる。治療投薬量は、安全性及び有効性を最適化するために、当業者に知られている常法を使用して滴定され得る。

40

【0329】

前述したように、本開示の抗原結合タンパク質、そのコンジュゲートまたは組み換え体は、哺乳動物の障害のin vivo治療のために、薬学的に有効な量で投与され得る。この点において、本開示の抗原結合タンパク質は、投与を容易にし、活性剤の安定性を促進するように製剤化されることが理解されよう。

【0330】

本開示に係る医薬組成物は、典型的に、薬学的に許容される非毒性の無菌担体、例えば、生理食塩水、非毒性の緩衝液、保存剤などを含む。本出願の目的上、抗原結合タンパク質の薬学的に有効な量は、抗原への効果的な結合を達成し、利益を得るのに十分な量、例

50

えば、疾患もしくは障害の症状を改善するか、物質もしくは細胞を検出するのに十分な量を意味するものとする。腫瘍細胞の場合、抗原結合タンパク質は、典型的に、新生物または免疫反応性細胞上の選択された免疫反応性抗原と相互作用することが可能であり、これらの細胞の死滅を増加させる。当然のことながら、本開示の医薬組成物は、修飾結合ポリペプチドの薬学的に有効な量を提供するために、単回用量または多用量で投与され得る。

【0331】

本開示の範囲に沿って、本開示の抗原結合タンパク質は、前述の治療方法に従って、治療効果または予防効果をもたらすのに十分な量でヒトまたは他の動物に投与され得る。本開示の抗原結合タンパク質は、そのようなヒトまたは他の動物に、既知の技術に従って、本開示の抗原結合タンパク質を従来の薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせることによって調製される従来の剤形で投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の形態及び特徴は、組み合わせられる活性成分の量、投与経路及び他のよく知られている変数によって決定されることが当業者には認識されるであろう。さらに、当業者であれば、本開示に記載される抗原結合タンパク質を1種以上含むカクテルが特に有効であることが証明され得ることは理解するであろう。同様に、本明細書に記載される核酸、本明細書に記載されるベクター、本明細書に記載される宿主細胞（特に、CARを有する免疫細胞）または本明細書に記載される組成物は、上記の治療方法に従って、治療効果または予防効果をもたらすのに十分な量でヒトまたは他の動物に投与され得る。

【0332】

本明細書で使用される「有効性」または「*in vivo*有効性」は、例えば、標準的な眼科効果判定基準などの標準的な効果基準を使用した、本開示の医薬組成物による治療に対する応答を指す。本開示の医薬組成物を使用した治療の成功または*in vivo*有効性は、意図する目的に対する組成物の有効性、すなわち、所望の効果をもたらす組成物の能力を指す。*in vivo*有効性は、特定の疾患について確立された標準的な方法によってモニタリングすることができる。加えて、疾患に特異的な様々な臨床化学パラメータ及び他の確立された標準的な方法が使用されてもよい。

【0333】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される化合物及び細胞は、1つ以上の異なる医薬化合物と組み合わせられて投与される。一般に、本明細書に記載される化合物及び細胞の治療的使用は、抗体療法、化学療法、サイトカイン療法、樹状細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、レーザー光療法、放射線療法またはワクチン療法からなる群から選択される1つ以上の治療法との組み合わせであってもよい。

【0334】

がんまたはウイルス感染症の治療方法

本明細書では、本開示の抗原結合タンパク質（例えば、第1及び第2のpMHC結合ドメインに連結された、免疫細胞の細胞表面タンパク質に結合するFabドメインを含む抗原結合タンパク質）でがんまたはウイルス感染症を治療する方法が提供される。特定の実施形態では、がんは、ウイルス感染によって引き起こされる。

【0335】

本開示の抗原結合タンパク質の特定の実施形態では、標的pMHC結合ドメインは、腫瘍抗原またはウイルス抗原に由来するMHC拘束性ペプチドを特異的に標的とする。

【0336】

一態様では、本開示は、ネオアンチゲンを提示する主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を含む標的細胞を殺傷するための方法であって、a)免疫細胞及び標的細胞を含む複数の細胞と上記に記載の抗原結合タンパク質とを接触させることであって、抗原結合タンパク質は、標的細胞の表面上のpMHCと免疫細胞の表面上のCD3とに特異的に結合する、前記接触させることと、b)抗原結合タンパク質と標的細胞及び免疫細胞との相互作用により特異的結合複合体を形成し、それによって免疫細胞を活性化することと、c)活性化された免疫細胞により標的細胞を殺傷することと、を含む、方法を提供する。

【0337】

50

一態様では、本開示は、がんを治療するための方法であって、上記に記載の抗原結合タンパク質を、がんの治療を必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0338】

キット

また、本明細書に記載される少なくとも1つの核酸ライブラリーまたは抗原結合タンパク質を、典型的には、説明書とともにパッケージ化された試薬の組み合わせと一緒に含む、キットも企図される。一実施形態において、キットは、単位剤形で有効量の当該抗原結合タンパク質を含有する組成物を含む。そのようなキットは、組成物を含む滅菌容器を含み得、そのような容器の非限定的な例としては、限定するものではないが、バイアル、アンプル、ボトル、チューブ、シリンジ、プリスターパックが挙げられる。いくつかの実施形態において、組成物は、医薬組成物であり、容器は、医薬品を保持するのに好適な材料で作製されている。一実施形態において、キットは、第1の容器に凍結乾燥形態の抗原結合タンパク質を含み、第2の容器に抗原結合タンパク質を再構成または希釈するための希釈剤（例えば、滅菌水）を含み得る。いくつかの実施形態において、当該希釈剤は、薬学的に許容される希釈剤である。一実施形態において、キットは、診断を目的とするものであり、抗原結合タンパク質は、診断用途のために製剤化される。一実施形態において、キットは、治療を目的とするものであり、抗原結合タンパク質は、治療用途のために製剤化される。

10

【0339】

典型的に、キットは、容器内または容器とともに提供される使用説明書が記載された別個のシート、パンフレットまたはカードをさらに含む。キットが医薬としての使用を目的としたものである場合、キットは、以下のうちの1つ以上をさらに含む得る：関連疾患または障害を有する対象に組成物を投与するための情報及び投与スケジュール、治療薬の説明、注意事項、警告、適応症、禁忌、過剰摂取情報及び/または副作用。

20

【0340】

本明細書に開示された実施形態の範囲から逸脱することなく、適当な均等物を使用して、本明細書に記載された方法の他の好適な修正及び適合を行うことができることは、当業者には直ちに明らかであろう。ここまで特定の実施形態を詳細に説明してきたが、実施形態は、以下の実施例を参照することにより、より明確に理解されるであろう。実施例は、あくまで例示の目的で含まれるものであって、限定を意図するものではない。

30

【0341】

40

50

【表 4 - 1】

表4 抗原結合タンパク質のアミノ酸配列CDR配列は太字の下線付きテキストで強調されている。

配列番号	化合物	配列
配列番号40	CDR-1	> CDR-1_HC EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASG FTF <u>STYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKA</u> <u>NNYATYYADSVKGR</u> FTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTATYYCVR <u>HGNFGDSYVSWFAY</u> WQGTTVTVSSASTKGPSVEPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI</u> CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
配列番号41		> CDR-1_LC

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

		<p>EVQLVESGGGLAQAGGSLRVSCVASGRPFT <u>KYAWGWFRQAPGKAREFVATITWDGGKT</u> <u>DYADSVKGRFTISKDSAENSIYLQMNSLKPE</u> DTAVYYCAADRNYCVGHRCYVRPDDYDY WGQGTQVTVSSGGGSAVVTQEPSLTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGK SPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAA LTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWFVGGG TKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	10
配列番号42	CDR-2	<p>> CDR-2_HC EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFST <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYA</u> <u>TYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u> AEDTATYYCVRIIGNFGDSYVSWFAYWGQ GITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSC</p>	20
配列番号43		<p>> CDR-2_LC AVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS <u>NYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVP</u> ARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCA <u>LWYSNIHWVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFP</u> PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSEVQLVESGGGLAQAGGSLRVS CVASGRPFTKYAWGWFRQAPGKAREFVAT</p>	30
			40

【表 4 - 3】

		<u>ITWDGGKTDYADSVKGR</u> FTISKDSAENSIY LQMNSLKPEDTAVYYCA <u>ADRNYCVGHRC</u> <u>YVRPDDYDY</u> WGQGTQVTVSS
配列番号44	CDR-3	> CDR-3_HC EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>ST</u> <u>YAMN</u> WVRQAPGKGLEWV <u>GRIRSKANNYA</u> <u>TYADSVKGR</u> FTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTATYYCVR <u>HGNFGDSYVSWFAYWGQ</u> GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSEVQLVES GGGLAQAGGSLRVSCVASGRP <u>FTKYAWGW</u> FRQAPGKAREFVA <u>TITWDGGKTDYADSVK</u> <u>GR</u> FTISKDSAENSIYLQMNSLKPEDTAVYYC AA <u>DRNYCVGHRCYVRPDDYDY</u> WGQGTQ VTVSS
配列番号45		> CDR-3_LC AVVTQEPSLTVSPGGTVTLT <u>CGSSTGAVTTS</u> <u>NYAN</u> WVQKPKGKSPRGLIG <u>TNKRAPGVP</u> ARFSGSLGGKAALTISGAQPEDEADYYCA <u>LWYSNHWVF</u> GGGTKLTVLGTVAAPSVEIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
配列番号46	CDR-4	> CDR-4_HC EVQLVESGGGLAQAGGSLRVSCVASGRP <u>FT</u> <u>KYAWG</u> WFRQAPGKAREFVA <u>TITWDGGKT</u> <u>DYADSVKGR</u> FTISKDSAENSIYLQMNSLKPE DTAVYYCA <u>ADRNYCVGHRCYVRPDDYDY</u>

10

20

30

40

【表 4 - 5】

		<p><u>AA</u><u>DRNYCVGHRCYVRPDDYDY</u>WGQGTQ VTVSS></p>	10
配列番号49		<p>> CDR-5_LC</p> <p>EVQLVESGGGLAQAGGSLRVSCVASGRPFT <u>KYAWGW</u>FRQAPGKAREFVA<u>TITWDGGKT</u> <u>DYADSVKGR</u>FRTISKDSAENSIYLMNSLKPE DTAVYYCAA<u>DRNYCVGHRCYVRPDDYDY</u> WGQGTQVTVSSGGGSAVVTQEPSLTVSPG GTVTLT<u>CGSSTGAVTTSNYANWVQKPGK</u> SPRGL<u>IGTNKRAP</u>GVPARFSGSLLGGKAA LTISGAQPEDEADYY<u>CALWYSNHVWVFGGG</u> TKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTL<u>SKADYEKHKVY</u> ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	20
配列番号50	CDR-6	<p>> CDR-6_HC</p> <p>EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFT<u>FST</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYA</u> <u>TYADSVKGR</u>FRTISRDDSKNTLYLMNSLR AEDTATYYCV<u>RHGNFGDSYVSWFAY</u>WGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVPEPKSCGGGGSEVQLVES GGGLAQAGGSLRVSCVASGRPFT<u>KYAWGW</u> FRQAPGKAREFVA<u>TITWDGGKTDYADSVK</u> <u>GR</u>FRTISKDSAENSIYLMNSLKPEDTAVYYC <u>AA</u><u>DRNYCVGHRCYVRPDDYDY</u>WGQGTQ VTVSS></p>	30
配列番号51		<p>> CDR-6_LC</p>	40

【表 4 - 6】

		<p>AVVTQEPSLTVSPGGTVILTC<u>GSSTGAVTIS</u> <u>NYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVP</u> ARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCA <u>LWYSNHWV</u>FGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNFPREKAVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSEVQLVESGGGLAQAGGSLRVS CVASGRPFT<u>KYAWG</u>WFRQAPGKAREFVAT <u>ITWDGGKTDYADSVKGR</u>RFTISKDSAENSIY LQMNSLKPEDTAVYYCA<u>DRNYCVGHRC</u> <u>YVRPDDYDYWGQGTQVTVSS</u></p>	
配列番号52	CDR-7	<p>> CDR-7_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF<u>ST</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYA</u> <u>TYYADSVKGR</u>RFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVR<u>HGNFGDSYVSWFAYWGQ</u> GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVPEPKSCGGGGSSYELTQP PSVSVSPGQTASITC<u>ADTLRSYASWYQQK</u> PGQSPVLVIY<u>RDTSRPS</u>GIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAMDEADYYC<u>ATRPSSGSNFOLF</u> GGGTKLTVLGGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSESQVLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMS</u>WVRQAPGKLEYIGIV<u>SSGGTTY</u> <u>ASWAKGR</u>RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAED TASYCAK<u>DLYYGPTTYS</u>AFNLWGQGTSV TVSS</p>	10 20 30
配列番号53		<p>> CDR-7_LC QAVVTQEPSLTVSPGGTVILTC<u>GSSTGAVT</u> <u>TSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPG</u> VPARFSGSLLGGKAAL.TISGAQPEDEADYYC <u>ALWYSNHWV</u>FGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS</p>	40

【表 4 - 7】

<p>配列番号54</p>	<p>CDR-8</p>	<p>> CDR-8_HC</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF<u>ST</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYA</u> <u>TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u> AEDTAVYYCVR<u>HGNEGDSYVSWFAYW</u>GQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVFPKSCGGGSSYELTQP PSVSVSPGQTASITC<u>TADTLRSYASWYQQK</u> PGQSPVLVIY<u>RDTSRPS</u>GIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAMDEADYYC<u>ATRPSSGSNFOLF</u> GGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSESQVLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMSWVRQAPGKGLEYIGIVSSGGTTY</u> <u>ASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAED</u> TASYCAK<u>DLYYGPTTYS</u>AFNLWGQGTSV TVSS</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>配列番号55</p>		<p>> CDR-8_LC</p> <p>QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC<u>GSSTGAVT</u> <u>TSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPG</u> VPAFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC <u>ALWYSNHWF</u>GGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>TADTLRSYASWYQQKPGQSPVLVIYRDT</u> <u>RPS</u>GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYYC<u>ATRPSSGSNFOLF</u>GGGTKLTVLGGG GGGGGGSGGGGSGGGGSESQVLESGGGSV QPGGSLRLSCTVSGFSL<u>SNYAMSWVRQAPG</u></p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 4 - 8】

		<p><u>KGLEYIGIVSSGGTTYASWAKGRFTISKD</u> <u>TSKNTVYLQMNSLRAEDTASYCAKDLYY</u> <u>GPTYSAFNLWGQGTSVTVSS</u></p>
配列番号56	CDR-9	<p>> CDR-9_HC</p> <p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST</u> <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYA</u> <u>TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQ</u> <u>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF</u> <u>PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSEVQLVES</u> <u>GGGLVQPGGSLRLSCVASGRPFTKYAWGW</u> <u>FRQAPGKAREFVA</u><u>TITWDGGKTDYADSVK</u> <u>GRFTISKDSAKNSIYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>AADRNYCVGHRCYVRPDDYDYWGQGLV</u> <u>TVSS</u></p>
配列番号57		<p>> CDR-9_LC</p> <p><u>QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT</u> <u>TSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPG</u> <u>VPARESGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC</u> <u>ALWYSNHWVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIF</u> <u>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL</u> <u>TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF</u> <u>NRGECGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL</u> <u>SCVASGRPFTKYAWGWFRQAPGKAREFVA</u> <u>TITWDGGKTDYADSVKGRFTISKDSAKNSI</u> <u>YLQMNSLRAEDTAVYYCAADRNYCVGHR</u> <u>CYVRPDDYDYWGQGLVTVS</u></p>
配列番号58	CDR-10	<p>> CDR-10_HC</p>

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST <u>YAMN</u>WVRQAPGKGLEWV<u>GRIRSKYNNYA</u> <u>TTYADSVK</u>GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCV<u>RHG</u>N<u>F</u>G<u>D</u>S<u>Y</u>V<u>S</u>W<u>F</u>A<u>Y</u>WGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCV<u>A</u>S<u>G</u>R<u>P</u>F<u>T</u>K<u>Y</u>A<u>W</u>G<u>W</u> FRQAPGKAREFVA<u>TITWDGGKTDYADSVK</u> <u>GR</u>F<u>T</u>I<u>S</u>K<u>D</u>S<u>A</u>K<u>N</u>S<u>I</u>Y<u>L</u>Q<u>M</u>N<u>S</u>L<u>R</u>AEDTAVYYC <u>A</u>A<u>D</u>R<u>N</u>Y<u>C</u>V<u>G</u>H<u>R</u>C<u>Y</u>V<u>R</u>P<u>D</u>D<u>Y</u>D<u>Y</u>WGQ<u>G</u>T<u>L</u>V TVSS</p>	10
配列番号59		<p>> CDR-10_LC QAVVTQEPSTVSPGGTVTLT<u>CSSTGAVT</u> <u>TSNYAN</u>WVQ<u>Q</u>K<u>P</u>G<u>K</u>SPRGLI<u>G</u>T<u>N</u>K<u>R</u>A<u>P</u>G V<u>P</u>A<u>R</u>F<u>S</u>G<u>S</u>L<u>L</u>G<u>G</u>K<u>A</u>A<u>L</u>T<u>I</u>S<u>G</u>A<u>Q</u>P<u>E</u>D<u>E</u>A<u>D</u>Y<u>Y</u>C <u>ALWYSNH</u>W<u>V</u>F<u>G</u>G<u>G</u>T<u>K</u>L<u>T</u>V<u>L</u>G<u>T</u>V<u>A</u>A<u>P</u>S<u>V</u>F<u>I</u>F P<u>P</u>S<u>D</u>E<u>Q</u>L<u>K</u>S<u>G</u>T<u>A</u>S<u>V</u>V<u>C</u>L<u>L</u>N<u>N</u>F<u>Y</u>P<u>R</u>E<u>A</u>K<u>V</u>Q<u>W</u> K<u>V</u>D<u>N</u>A<u>L</u>Q<u>S</u>G<u>N</u>S<u>Q</u>E<u>S</u>V<u>T</u>E<u>Q</u>D<u>S</u>K<u>D</u>S<u>T</u>Y<u>S</u>L<u>S</u>T<u>L</u> T<u>L</u>S<u>K</u>A<u>D</u>Y<u>E</u>K<u>H</u>K<u>V</u>Y<u>A</u>C<u>E</u>V<u>T</u>H<u>Q</u>G<u>L</u>S<u>S</u>P<u>V</u>T<u>K</u>S<u>F</u> N<u>R</u>G<u>E</u>C<u>G</u>G<u>G</u>G<u>S</u>E<u>V</u>Q<u>L</u>V<u>E</u>S<u>G</u>G<u>L</u>V<u>Q</u>P<u>G</u>G<u>S</u>L<u>R</u>L S<u>C</u>V<u>A</u>S<u>G</u>R<u>P</u>F<u>T</u>K<u>Y</u>A<u>W</u>G<u>W</u>F<u>R</u>Q<u>A</u>P<u>G</u>K<u>A</u>R<u>E</u>F<u>V</u>A <u>TITWDGGKTDYADSVKGR</u>F<u>T</u>I<u>S</u>K<u>D</u>S<u>A</u>K<u>N</u>S<u>I</u> Y<u>L</u>Q<u>M</u>N<u>S</u>L<u>R</u>AEDTAVYYC<u>A</u>A<u>D</u>R<u>N</u>Y<u>C</u>V<u>G</u>H<u>R</u> <u>CYVRPDDYDY</u>WG<u>Q</u>G<u>T</u>L<u>V</u>T<u>V</u>S<u>S</u></p>	20 30
配列番号60	CDR-11	<p>> CDR-11_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST <u>YAMN</u>WVRQAPGKGLEWV<u>GRIRSKYNNYA</u> <u>TTYADSVK</u>GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCV<u>RHG</u>N<u>F</u>G<u>D</u>S<u>Y</u>V<u>S</u>W<u>F</u>A<u>Y</u>WGQ</p>	40

【表 4 - 1 0】

		<p>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCVASGRPFT<u>TKYAWGW</u> FRQAPGKAREFVA<u>TITWDGGKTDYADSVK</u> <u>GRFTISKDSAKNSIYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>AADRNYCVGHRCYVRPDDYDYWGQGLTV</u> TVSS</p>	10
配列番号61		<p>> CDR-11_LC QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT<u>CRSSTGAVT</u> <u>TSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG</u> VPARTSGSLGGKAALTISGAQPEDEADYYC <u>ALWYSNHWFVGGGTKLTVLGTVAAPSVEIF</u> PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCVASGRPFT<u>TKYAWGW</u>FRQAPGKAREFVA <u>TITWDGGKTDYADSVKGRFTISKDSAKNSI</u> YLQMNSLRAEDTAVYYCA<u>ADRNYCVGHR</u> <u>CYVRPDDYDYWGQGLTVTVSS</u></p>	20
配列番号62	CDR-12	<p>> CDR-12_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF<u>ST</u> <u>YAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKANNYA</u> <u>TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u> AEDTAVYYCVR<u>HGNFGDSYVSWFAYWGQ</u> GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSSYELTQP</p>	30

40

50

【表 4 - 1 1】

		<p>PSVSVSPGQTASITCT<u>TADTLRSYASWYQOK</u> PGQSPVLVIY<u>RDTSRPS</u>GIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAMDEADYYC<u>ATSDGSGSNFOLF</u> GGGTKLTVLGGGGGGSGGGGGGGGGGG GSEQVLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMSWVRQAPGKGLEIYIVSSGGTTY</u> <u>ASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAED</u> TASYCAK<u>DLYYGPTTYSAFNL</u>WGQGTSV TVSS</p>	10
配列番号63		<p>> CDR-12_LC QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTC<u>GSSTGAVT</u> <u>TSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPG</u> VPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC <u>ALWYSNHWV</u>FGGGTKLTVLGTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASIT CT<u>TADTLRSYASWYQOKPGQSPVLVIYRDT</u> <u>SRPS</u>GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYC<u>ATSDGSGSNFOLF</u>FGGGTKLTVLGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEQVLESGGGS VQPGGSLRLSCTVSGFSL<u>SNYAMSWVRQAP</u> GKGLEIYIV<u>SSGGTTYASWAKGRFTISK</u> DTSKNTVYLQMNSLRAEDTASYCAK<u>DLY</u> <u>YGPTTYSAFNL</u>WGQGTSVTVSS</p>	20 30
配列番号64	CDR-13	<p>> CDR-13_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF<u>ST</u> <u>YAMN</u>WVRQAPGKGLEWVGR<u>RIRSKYNNYA</u> <u>TTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u></p>	40

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

		GKGLLEYIGIVSSGGTTYASWAKGRFTISK DTSKNTVYLLQMNSLRAEDTASYCAKDLY <u>YGPTTYSAFNLWGQGTSVTVSS</u>	
配列番号68	CDR-15	> CDR-15_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST <u>YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYA</u> <u>TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR</u> AEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGSSYELTQP PSVSVSPGQTASITCTADTLRSYASWYQQK PGQSPVLVIYRDTSRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAMDEADYYCATSDGSGSNFOLF GGGTKLTVLGGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEQVLESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSL <u>SNYAMSWVRQAPGKGLEYIGIVSSGGTTY</u> <u>ASWAKGRFTISKDTSKNTVYLLQMNSLRAED</u> TASYCAKDLYYGPTTQSAFNLWGQGTSV TVSS	10 20
配列番号69		> CDR-15_LC QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT <u>TSNYANWVQOKPGKSPRGLIGGTNKRAPG</u> VPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYC <u>ALWYSNHWFVGGGTKLTVLQPKAAPSVT</u> LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITC <u>TADTLRSYASWYQQKPGQSPVLVIYRDTIS</u>	30 40

【表 4 - 15】

		<p><u>RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA</u> <u>DYYCATSDGSGSNFQLFGGGTKLTVLGGG</u> <u>GGGSGGGSGGGSGGGGSESQVLESGGGS</u> <u>VQPGGSLRLSCTVSGFSLSNYAMSWVRQAP</u> <u>GKGLEYGIVSSGGTTYASWAKGRFTISK</u> <u>DTSKNTVYLMNSLRAEDTASYCAKDLY</u> <u>YGPTTOSAFNLWGQGTSVTVSS</u></p>	10
配列番号70		<p>> α 鎖_sTCR_比較分子</p> <p>MANQVEQSPQSLILEGKNVTLQCNYTVSPF SNLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNG RYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICV VNRADGLYIPTFGRGTSLIVHPYIQKPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDT</p>	20
配列番号71	sTCR 比較分子	<p>> β 鎖_sTCR_比較分子</p> <p>MAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQG NTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWV ALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTA YLMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWY FDVWGQGLVTVSSGGGGSDVKVTQSSRYL VKRTGEKVFLECVQDAPLSKMFWRQDPG LGLRLIYFSYDVKLKEKGDIPGYSVSREKK ERFSLILESASTNQTSMYLCASSDQNSGDP YEQYFGPGTRLTVTEDLKNVPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV</p>	30 40

【表 4 - 16】

		NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALS SRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVVTQIVSAEAWGRAD	
配列番号72	CDR-16	>CDR-16 EVQLVESGGGSAQAGGSLRVSCVASGRPFT KYAWGWFRQAPGKAREFVATITWDGGKTD YADSVKGRFTISKDSAENSIYLMNSLKPED TASYCAADRNYCVGHRCYVRPDDYDYW GQGTSVTVSSA	10
配列番号73	CDR-17	>CDR-17 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRPFTK YAWGWFRQAPGKAREFVATITWDGGKTDY ADSVKGRFTISKDSAKNSIYLMNSLRAEDT AVYYCAADRNYCVGHRCYVRPDDYDYWG QGTLVTVSS	20
配列番号74	CDR-18	>CDR-18_HC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSC	30
配列番号75		>CDR-18_LC DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL	40

【表 4 - 17】

		QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG GGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTG AVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAD YYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPG GSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGL EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGT TTVTVSS	10
配列番号76	CD3 CDRH1	STYAMN	
配列番号77	CD3 CDRH2	RIRSKANNYATYYADSVKG	
配列番号78	CD3 CDRH3	HGNFGDSYVSWFAY	20
配列番号79	CD3 CDRL1_a	GSSTGAVTTSNYAN	
配列番号80	CD3 CDRL1_b	RSSTGAVTTSNYAN	
配列番号81	CD3 CDRL2	GTNKRAP	
配列番号82	CD3 CDRL3	ALWYSNHWV	
配列番号83	VL CD3_a	AVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTS NYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVP ARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVLG	30
配列番号84	VH CD3_a	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKFNYYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRA EDTATYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGT TTVTVSS	40

【表 4 - 1 8】

配列番号85	VL CD3_b	AVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVP ARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCAL WYSNHWVFGGGTKLTVL
配列番号86	VH CD3_b	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYA TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTATYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQG TTVTVSS

10

【実施例】

【0342】

MHC (pMHC) クラス I 分子上にペプチドとして提示される細胞内腫瘍抗原は、より腫瘍選択的な免疫療法アプローチにとって魅力的な標的であり、臨床試験から有望なデータがすでに得られている。pMHC は、TCR 改変 T 細胞または抗 CD3 断片に融合された可溶性組換え T 細胞受容体 (TCR) の標的とされてきた。天然に存在するがん応答性 TCR は親和性が弱く、それらのコグネイトな pMHC に対する大幅な親和性の増強が必要である。しかしながら、このプロセスの結果は予測が困難であり、正常組織におけるオフターゲット交差反応のリスクを有し、臨床における重篤な有害事象につながり得る。

20

【0343】

本明細書では、HLA - A * 0 2 : 0 1 拘束性 MAGE - A 4 エピトープ G V Y D G R E H T V (配列番号 1) を利用した、腫瘍特異的 pMHC に対して高い特異性を有する二連型 pMHC T 細胞エンゲージャー (「TCE」) フォーマットを有する極めて強力な抗原結合タンパク質について記載する。親和性が 30 nM ~ 100 pM の範囲である抗 MAGE - A 4 結合アームで構成される一連の一価及び二価の抗体コンストラクトを、TCR 融合体に一般的に使用されるものと比較して低い親和性を有する抗 CD3 Fab 断片に融合させた。これらの異なる抗体コンストラクトを、異なる MAGE - A 4 陰性 / HLA - A * 0 2 陽性ヒト細胞株のパネルに対する、MAGE - A 4 / HLA - A * 0 2 陽性ヒト U 2 O S 骨肉腫及び A 3 7 5 黒色腫がん細胞の選択的殺傷力について評価した。二価の二重特異性抗体バリエーションは、一価の二重特異性抗体バリエーションと比較して少なくとも 7 倍高いがん細胞の殺傷力と、同様に増加した T 細胞の活性化を媒介した。IC50 値は、1 桁ピコモル程度の低い範囲であったが、MAGE - A 4 陰性 / HLA - A * 0 2 陽性細胞に対する全体的な交差反応性は実質的に影響を受けなかった。これらの結果は、がん細胞上の pMHC の二連標的化が、細胞表面上の pMHC のレベルが非常に低い場合でも、選択的かつ効率的な T 細胞媒介性の標的細胞の殺傷及び T 細胞の活性化をもたらすことを証明するものであり、個々のアームの親和性、価数、及びエピトープ密度が果たす極めて重要な役割を示すものである。MAGE - A 4 / HLA - A * 0 2 pMHC 以外についても二連型 pMHC 標的化の利点について試験した。MAGE - A 4 とは無関係の 2 つの異なるがん由来 pMHC に特異的な T 細胞エンゲージャーを、一価及び二価フォーマットで細胞傷害性アッセイで試験した。MAGE - A 4 標的化 TCE と同様、二連型エンゲージャーは、一価型エンゲージャーと比較してがん細胞の殺傷力の改善を示した。類似した生理学的に関連する非 MAGE - A 4 ペプチド (S 1、S 1 6) への結合を最小限に抑えることにより、MAGE - A 4 / HLA - A * 0 2 : 0 1 標的化二連型 pMHC TCE を CD3 親和性及び MAGE - A 4 / HLA - A * 0 2 : 0 1 標的親和性について最適化し

30

40

50

て、特異性を維持しながら高い効力を実現した。類似した生理学的に関連する非MAGE-A4ペプチドの認識による潜在的なオフターゲット効果について最適化された二連型pMHC-TCEを分析した。類似のペプチドでパルスし、PBMCエフェクター細胞と共培養したT2細胞は、MAGE-A4ペプチドでパルスしたT2細胞と比較して二連型pMHC-TCEの存在下で有意なT細胞の活性化もIFN γ の放出も示さなかった。最後に、二連型pMHC-TCEの効力、サイトカイン放出、及び特異性を、現在臨床開発中のコンストラクトである抗CD3-scFvに融合した組み換えTCRと比較した。興味深い点として、二連型pMHC-TCEは、サイトカイン産生への影響が有意に低いにもかかわらず、3倍強力ながん細胞殺傷力をもたらした。結論として、本明細書に記載の二連型pMHC-TCEによるpMHC標的化は、大がかりな親和性増強を必要とせず強力な腫瘍標的化を促進することから、可溶性の親和性増強TCRベースのがん免疫療法に代わる魅力的な選択肢となる。本明細書で提供される二連型pMHC-TCEは、(i)選択的かつ効率的なT細胞媒介性標的細胞殺傷、(ii)T細胞の効果的な活性化、及び(iii)比較分子よりも低いサイトカイン放出を示す。本明細書で提供される抗原結合タンパク質による二連型pMHC標的化は極めて強力である一方で、サイトカインの放出を減らすことによりT細胞の疲弊を回避することができることから、より効果的で持続的な抗がん応答の希望的な展望がもたらされる。

10

【0344】

実施例1 一価及び二価のpMHC標的化T細胞エンゲージャーの一般的な作製方法

以下の実施例に記載の二重特異性抗原結合タンパク質を、HEK293-6E細胞で一過性共トランスフェクションによって発現させた。ポリエチレンイミン(PEI 40kD直鎖)を使用して細胞を懸濁状態で培養した。HEK293-6E細胞を2mM L-グルタミンを添加したFreestyle F17培地中に 1.7×10^6 細胞/mLで播種した。DNAとPEIを添加剤なしの培地50 μ Lに別々に加えた。両方の画分を1:2.5のDNA:PEI比で混合し、ボルテックスし、15分間静置した。細胞とDNA/PEI混合物とを加え合わせ(細胞1mL当たり1 μ g DNA)、37、5%CO₂、80%RHでインキュベートした。24時間後、細胞にトリプトンN1を生産量1mL当たり25 μ Lで添加した。7日後、細胞を遠心分離によって回収し、上清を滅菌濾過した。抗原結合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーによって上清から精製した。上清を、6CVのPBS(pH7.4)で平衡化したタンパク質CHカラム(The rmo Fisher Scientific、カタログ番号494320005)にロードした。同じ緩衝液による洗浄工程の後、100mMクエン酸(pH3.0)による段階溶出によってタンパク質をカラムから溶出した。所望の抗原結合タンパク質を含む画分を1M Tris緩衝液(pH9.0)によって1:10の比率で直ちに中和した。追加の精製ステップとして、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。ランニング緩衝液としてPBS(pH7.4)を用いて、試料をSuperdex 200 10/300 GLカラムに流した。収集した画分をSE-HPLCによってモノマー含有量について分析し、それに応じてプールした。SDS-PAGE及びSE-HPLCによって最終的なタンパク質純度を評価した。

20

30

【0345】

実施例2 二重特異性pMHC標的化T細胞エンゲージャーのインビトロ特性評価の一般的方法

HLA-A2/MAGE-A4 \times CD3二重特異性抗体の親和性の特性評価を、表面プラズモン共鳴(SPR)によって行った。すべての実験は、Biacore(商標)T200装置(Cytiva)を使用して行った。HLA-A2/MAGE-A4複合体に対する二重特異性抗体の結合の速度論的パラメータを決定するため、ストレプトアビジンチップ(SAHC30M、Xantec)を、MAGE-A4ペプチドと複合化した500RU HLA-A*02:01で製造者の指示に従ってコーティングした。本明細書に示される結果として得られた親和性は、それぞれの一価抗原結合タンパク質を用いて行われた測定値に対応する。CD3に対する二重特異性抗体の速度論的パラメータを決定する

40

50

ため、HC30Mチップ(XanTec)を、製造者の指示に従って400RUのCD3ヘテロ二量体(Acro Biosystems)でコーティングした。コーティングされていないチャンネルを参照用に使用した。1:1ラングミュアモデルを用いてデータフィッティングを行った。

【0346】

二重特異性抗体のインビトロ細胞傷害性を決定するため、乳酸脱水素酵素(LDH)放出アッセイを行った。簡潔に述べると、標的細胞とエフェクター細胞(例えば、PBMC)を10:1のE:T比で共培養した。0.001nM~15nMの濃度範囲をカバーする二重特異性抗体の各溶液を該当するウェルに加えた。48時間後に損傷を受けた細胞から培地中に放出されるLDHの量を比色吸光度で測定することによって細胞傷害性を定

10

【0347】

二重特異性抗体の熱安定性を、Applied Biosystems(ThermoFisher)製Protein Thermal ShiftマニユアルMAN4461806Bに記載されるようにして示差走査蛍光定量法(DSF)を使用して測定した。

【0348】

実施例3 さまざまな二重特異性抗体フォーマットの作製及び特性評価

最適な二重特異性分子のフォーマットを決定するため、CD3結合Fabの軽鎖のN末端とC末端、及び重鎖のC末端とN末端でVHH MAGE-A4結合部分のローテーションを行った(フォーマット1~4ならびにそれぞれ化合物CDR1、CDR-2、CDR-3、及びCDR-4、図1)。一価の二重特異性T細胞エンゲージャーを、SPRによって測定したMAGE-A4への親和性、LDHアッセイによって測定したインビトロでの有効性、及びDSFによって測定した熱安定性について試験した。結果を表5に要約する。それぞれのT細胞媒介細胞傷害性の結果を図2A~Bに示す。

20

【表5】

表5 さまざまなFab-VHHフォーマットのHLA-A2/MAGE-A4特異的な一価の二重特異性抗体の親和性、細胞傷害性、熱安定性、及び発現収量の比較

化合物	フォーマット	α HLA-A2/MAGE-A4の K _D (nM)	U20S 細胞殺傷力、IC ₅₀ (nM)	融解温度(°C)	発現収量(mg/L)
CDR-1	フォーマット1	1.5	0.10	70.9	8.2
CDR-2	フォーマット2	2.6	0.18	71.3	8.2
CDR-3	フォーマット3	1.9	0.24	71.3	49
CDR-4	フォーマット4	1.3	0.50	70.7	10.6

30

40

【0349】

さまざまな一価の二重特異性抗体フォーマットの比較分析により、CD3結合Fab上のMAGE-A4結合部分の配置が、MAGE-A4抗原に対する親和性にもコンストラクトの熱安定性にも影響しないことが明らかとなった。しかしながら、MAGE-A4結合アームのN末端重鎖融合体(すなわち、フォーマット4)は、おそらくCD3結合アームの立体障害によるものと考えられるインビトロ有効性の低減をもたらした。さらに、C

50

D 3 結合アームの重鎖上の M A G E - A 4 結合アームの C 末端融合体は、発現収量の 4 倍超の増加をもたらした。

【 0 3 5 0 】

二価の p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーは、単一の腫瘍細胞の表面上への 2 個の p M H C 分子の結合を介して、T 細胞の天然のアピディティを模倣し得るという仮説を立てた（理論に束縛されるものではない）。そこで、二連型（すなわち、二価）の p M H C - M A G E - A 4 標的化 T 細胞エンゲージャーを、一価の p M H C - M A G E - A 4 標的化 T 細胞エンゲージャーと比較した。二価の二重特異性コンストラクトについては、重鎖上の M A G E - A 4 標的化 V H H の C 末端融合体を、軽鎖上の N 末端または C 末端融合体と組み合わせて調べた（フォーマット 5 及び 6、それぞれ化合物 C D R - 5 及び C D R - 6、図 1）。細胞傷害性アッセイ、熱安定性、及び発現収量における 2 つの二価の二重特異性フォーマットを比較した。結果を表 6 に要約する。それぞれの T 細胞媒介細胞傷害性の結果を図 2 C に示す。フォーマット 5 及び 6 は、一価のバリエーションと比較して約 10 倍低い I C 5 0 値の優れたインビトロの有効性を示し、一価と比較して二価の M A G E - A 4 結合様式の優位性が確認された。フォーマット 6 は、フォーマット # 5 と比較してわずかに高い熱安定性及びより良好な発現収量を示した。

【表 6】

表 6 さまざまなフォーマットの H L A - A 2 / M A G E - A 4 特異的な二価の二重特異性抗体の細胞傷害性、熱安定性、及び発現収量の比較

化合物	フォーマット	U20S 細胞殺傷力、IC50(nM)	融解温度 (°C)	発現収量(mg/L)
CDR-5	フォーマット 5	0.01	68.8	32.8
CDR-6	フォーマット 6	0.02	71.5	35.4

一価と二価の p M H C T 細胞エンゲージャー（フォーマット 3 と 6）を直接比較した（図 2 D）。二価の p M H C T 細胞エンゲージャーでは、一価の p M H C T 細胞エンゲージャーよりも優れたがん細胞殺傷力が確認された。

【 0 3 5 1 】

最後に、他のがん細胞株における細胞傷害性及び関連するサイトカイン放出プロファイルを、一価（化合物 C D R - 3、フォーマット 3）及び二価（化合物 C D R - 6、フォーマット 6）の p M H C T 細胞エンゲージャーについて比較した。図 3 に示されるように、同じ M A G E - A 4 と C D 3 結合抗体断片を含む二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーまたは一連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした骨肉腫（U 2 O S）及び黒色腫（A 3 7 5）細胞でがん細胞の殺傷率（%）を測定した。M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 陽性細胞株 U 2 O S（骨肉腫）を、E : T 比 1 0 : 1 でヒト P B M C とインキュベートした（図 3 A）。同様に、M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 陽性細胞株 A 3 7 5（黒色腫）を、E : T 比 1 0 : 1 でヒト P B M C とインキュベートした（図 3 B）。48 時間後に L D H 放出アッセイを用いて、がん細胞の殺傷力を 2 つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で測定した。データは、一連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーと比較して、二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーによるがん細胞殺傷力の 10 倍の増加を示す。T 細胞活性化を、フローサイトメトリーを使用して 24 時間後の C D 8 T 細胞集団の C D 6 9 及び C D 2 5 マーカーを定量することによって決定した（図 3 C ~ D）ところ、それぞれ U 2 O S（図 3 C）及び A 3 7 5（図 3 D）細胞株での T 細胞活性化が示された。M A G E - A 4 標的化 T C E の二価 F a b - (V H H) 2 フ

フォーマットは、一価のフォーマットと比較して優れたがん細胞殺傷力及びT細胞活性化を示している。したがって、抗原陽性がん細胞の二価標的化は、pMHC標的化T細胞エンゲージャーの活性を大幅に増強する。この実施例では、各抗原結合タンパク質は、低親和性の抗CD3 Fabを利用した（実施例4を参照）。

【0352】

pMHC結合部分がscFvを含むフォーマット3及び6の一価及び二価のpMHC標的化TCEのさらなる検証を行った。試験した化合物は、それぞれCDR-7及びCDR-8であった。scFvフォーマットの2個のpMHC特異的結合ドメインと、T細胞動員ドメインとしてCD3を標的とするFabドメインを有する二連型エンゲージャーである化合物CDR-8の概略図を図4に示す。二連型エンゲージャーであるCDR-8及びその一価のエンゲージャーであるCDR-7を、LDHアッセイで有効性について試験した。MAGE-A4陽性HLA-A*02:01陽性骨肉腫細胞株U2OSをヒトPBMCとE:T比10:1でインキュベートした。がん細胞の殺傷力をさまざまな濃度の各化合物で測定した（図5）。ここでもやはり、データは、二連型T細胞エンゲージャーがその一価のエンゲージャーよりも優れていることを示し、がん細胞の殺傷力は約10倍増加した。

10

【0353】

さらなる概念実証として、pMHCの二価標的化の利点を、他のがん細胞株及び他の標的pMHCでも試験した。2つの異なるpMHC抗原、すなわち、標的AとBを標的とする2つの異なるpMHC標的化T細胞エンゲージャーを、一価（すなわち、Fab-scFv）及び二価（すなわち、Fab-(scFv)₂）フォーマットで作製し、細胞傷害性アッセイで試験した。簡潔に述べると、肺扁平上皮癌（標的Aを発現）及び結腸直腸腺癌（標的Bを発現）の細胞を、E:T比10:1のヒトPBMC及びさまざまな濃度の一価及び二価のpMHC標的化TCEとインキュベートした。細胞傷害性を、48時間のインキュベーション後にCellTiter-Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Promega）を使用して製造業者の指示に従って測定した。結果を図6に示す。MAGE-A4標的化TCEと同様、他の無関係の標的に対して特異的な二価のpMHC TCEは、一価のTCEと比較してがん細胞の殺傷力の改善を示した。

20

【0354】

実施例4 二価のpMHC標的化T細胞エンゲージャーのCD3親和性は、T細胞媒介細胞傷害性及び対応するサイトカイン放出に影響する

30

低い（54 nM）、中間（11 nM）及び高い（1.2 nM）CD3親和性のFabを有する、2個の同一のVHH（図7A）またはscFv（図7B）を含むMAGE-A4アームを有する二連型pMHC T細胞エンゲージャーを、MAGE-A4陽性U2OS細胞及びMAGE-A4陰性H441細胞に対するLDHアッセイで試験した。CDR-9、CDR-10、及びCDR-11は、それぞれ、低い、中間、及び高い親和性のCD3結合性を有するFab-(VHH)₂化合物を含むものであった。CDR-12、CDR-13、及びCDR-14は、それぞれ、低い、中間、及び高い親和性のCD3結合性を有するFab-(scFv)₂化合物を含むものであった。低い親和性のCD3結合が低い効力をもたらす一方で、高い、及び中間の親和性のCD3結合は細胞傷害性効果の増加を示し、CD3親和性の増加と相関した。

40

【0355】

図8に示されるように、健康なドナーPBMC（E:T 10:1）、及びCD3に対する結合親和性のレベルがそれぞれ異なる（すなわち、低い（CDR-9、54 nM）、中間（CDR-10、11 nM）、及び高い（CDR-11、1.2 nM））、Fab-(VHH)₂フォーマットの3つの二連型pMHC標的化T細胞エンゲージャーと共インキュベートした抗原陽性骨肉腫細胞でサイトカイン放出が検出された。24時間のインキュベーション後、サイトカインIL-2及びIFNを3つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で測定した。各サイトカインをELISAによって測定した。まとめると、これらの結果は、抗CD3結合ドメインの結合親和性を変更することによってサイトカインの

50

放出及び効力のレベルを必要に応じて調整できることを示している。

【0356】

実施例5 二価 pMHC TCE の効力は MAGE - A4 結合アームの固有の親和性に強く影響される

低い (CDR - 15) 及び高い (CDR - 8) 親和性の MAGE - A4 バインダー (それぞれ $K_D = 41 \text{ nM}$ 及び 0.1 nM) を含む Fab - (scFv) 2 フォーマットの二連型 pMHC 標的化 T 細胞エンゲージャーを、PBMC と共インキュベーション (E : T = 10 : 1) した場合の MAGE - A4 陽性 U2OS がん細胞の殺傷力について評価した。T 細胞媒介細胞傷害性を、48 時間後の LDH 放出を測定することによって測定した。図 9 に示される結果は、MAGE - A4 結合アームの親和性の増加が、CD3 結合アームの増加よりも高い程度のがん殺傷力を媒介することを裏付けるものである。

10

【0357】

実施例6 二連型 pMHC TCE は、sTCR 比較分子と比較して高い選択性を示す

Fab - (scFv) 2 フォーマットの二連型 pMHC TCE (すなわち、CDR - 8) を、類似の生理学的に関連した非 MAGE - A4 ペプチドの認識により、潜在的なオフターゲット効果について分析した。溶出された HLA ペプチドの質量分析分析、ペプチドデータベース、及びアラニンスキャニングと組み合わせたペプチド配列類似性のインシリコ分析の適用によって、MAGE - A4 / MHC 標的化抗体の特異性はこれまでに評価されている (KAMAR PELED et al., 2015)。ヒト組織での発現が確認されている同定された類似のペプチド (S1、S16) を、表面に空の HLA - A * 02 : 01 分子を発現している TAP 欠損 T2 細胞に別々にロードして特異性の評価を行った。

20

【0358】

TAP 欠損 T2 細胞を、HLA - A * 02 : 01 拘束性ペプチド (関連するヒト組織で提示されると考えられる MAGE - A4 または類似のコントロールペプチド S1 (GLADGRTHTV、配列番号 89) 及び S16 (GLYDGPVHEV (配列番号 90)) でパルスし、PBMC (E : T = 5 : 1) 及び高親和性の MAGE - A4 scFv と中親和性の CD3 Fab を含む 0.1 nM の二連型 pMHC 標的化 TCE、またはインハウスで作製した臨床段階の比較分子 (sTCR x CD3) と共インキュベートした。比較分子は、 $K_D = 87 \text{ pM}$ の同じ pMHC - MAGE - A4 抗原に対する結合特異性を有し、 $K_D = 1 \text{ nM}$ で抗 CD3 scFv に連結され、それにより臨床段階の化合物 IMC - C103C と同様である可溶性 TCR から構成される。比較分子は、標的 pMHC 及び CD3 に対して一価であり、二連型エンゲージャーは、標的 pMHC に対しては二価であり、CD3 に対しては一価である。比較分子及び二重エンゲージャーを図 10 に概略的に示す。

30

【0359】

フローサイトメトリーを使用して、24 時間後の CD8 T 細胞集団上の CD25 マーカーを定量することによって T 細胞活性化を測定した (図 11A を参照)。T2 細胞を上記に記載したように処理し、高い MAGE - A4 親和性と中間の CD3 親和性を有する 0.1 nM の二連型 pMHC 標的化 T 細胞エンゲージャーとインキュベートした。ELISA を使用して 24 時間後の細胞上清中の IFN - ガンマを定量化することによってサイトカイン放出を測定した (結果を図 11B に示す)。これらの結果は、二連型 pMHC 標的化 T 細胞エンゲージャー (MAGE - A4 に対してピコモル濃度の親和性を有する) が、MAGE - A4 標的ペプチドに対するよりも、S1 及び S16 オフターゲットペプチドに対して大幅に低い T 細胞の機能的応答を誘発することを示している。したがって、類似の生理学的に関連したペプチドでパルスし、PBMC エフェクター細胞と共培養した T2 細胞は、MAGE - A4 ペプチドでパルスした T2 細胞と比較して二連型 pMHC TCE の存在下で有意な T 細胞の活性化も IFN g の放出も示さなかったことから、MAGE - A4 の二価標的化は二重特異性分子の選択性を低下させない。

40

【0360】

50

実施例 7 二価 p M H C T C E はインビトロで抗原陰性細胞に対して限定的な交差反応性を示す

M A G E - A 4 陰性 / H L A - A * 0 2 : 0 1 陽性細胞 (S K - M E L - 3 0 、 N C I - H 4 4 1 、 M D A - M B - 2 3 1 、 P A N C - 1) を、 P B M C (E : T 1 0 : 1) と、ピコモル濃度の M A G E - A 4 標的化 s c F v 及び中間の C D 3 親和性を有する C D 3 標的化 F a b を有する F a b - (s c F v) 2 フォーマットの二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (すなわち C D R - 8) 、またはインハウスで作製した臨床段階の比較分子のいずれかと実施例 6 で述べたように共インキュベートした。T 細胞媒介細胞傷害性を、48 時間後の L D H 放出を測定することによって測定した。結果を図 1 2 に示す。したがって、二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーは、M A G E - A 4 陰性 / H L A - A * 0 2 : 0 1 陽性細胞において、s T C R x C D 3 比較分子と同等以下の細胞傷害性を誘導する。

10

【 0 3 6 1 】

実施例 8 二連型 p M H C T 細胞エンゲージャーは、限定的なサイトカイン放出を伴う高い抗腫瘍細胞傷害性プロファイルを示す

図 1 3 に示されるように、実施例 6 で述べたような F a b - (s c F v) 2 フォーマットの二重 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャー (すなわち、C D R - 8) または比較分子とインキュベートした骨肉腫細胞及び黒色腫細胞におけるがん細胞殺傷率を測定した。M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 陽性細胞株 A 3 7 5 (黒色腫) 及び U 2 O S (骨肉腫) を、ヒト P B M C と E : T 比 1 0 : 1 で 4 8 時間インキュベートした。がん細胞の殺傷力を、2 つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で測定した。データは、二連型 p M H C 標的化 T C E が、比較分子と比較して両方のがん細胞株の殺傷をより強力に媒介したことを示す。これは、低コピー数の標的 p M H C - M A G E - A 4 抗原 (1 細胞当たり約 3 5 コピー) のみを発現する黒色腫細胞株でも同様であった。

20

【 0 3 6 2 】

図 1 4 に示されるように、二連型 p M H C 標的化 T C E (すなわち、C D R - 8) または比較分子とインキュベートした骨肉腫細胞及び黒色腫細胞におけるサイトカイン放出を測定した。サイトカイン放出は、E L I S A を使用して 2 0 時間後の細胞上清中の I F N - 及び I L - 2 を定量することによって測定した。M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 陽性細胞株 A 3 7 5 (黒色腫) 及び U 2 O S (骨肉腫) を、ヒト P B M C と E : T 比 1 0 : 1 でインキュベートした。サイトカイン I L - 2 及び I F N を 2 つの抗原結合タンパク質のさまざまな濃度で測定した。データは、二連型エンゲージャーが 2 つの炎症促進性サイトカインのレベルを低下させたことを示しており、サイトカインストーム症候群を誘発する可能性が低いことを示している。

30

【 0 3 6 3 】

M A G E - A 4 / H L A - A * 0 2 : 0 1 に対する特異性を有する F a b - (s c F v) 2 フォーマットの二連型 p M H C T C E (すなわち、C D R - 8) の存在下でヒト P B M C と共培養した M A G E - A 4 陽性 N C I - H 1 7 0 3 肺扁平上皮癌細胞の生細胞イメージングを行った。肺癌細胞をサイトライトラピッドレッドで染色したところ、細胞死は C y t o t o x G r e e n により示された。図 1 5 の A 及び B に示されるように、二連型 p M H C 標的化 T C E は、極めて効率的な抗腫瘍応答を誘発している。

40

【 0 3 6 4 】

実施例 9 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーによる抗薬物抗体 (A D A) の低減

A D A は、生物製剤のリスクプロファイル及び有効性に影響を及ぼす可能性がある。中和する場合、A D A は、薬物とその標的に結合する能力を遮断する可能性がある。したがって、抗薬物抗体の結合及びそれらの中和可能性について生物製剤を試験することは規制要件となっている。さらに、既存の A b が、C 末端に位置する s c F v または s d A b を認識する場合、既存の抗体への結合を介した T 細胞エンゲージャーのクラスター化を生じる可能性がある。このような現象は、クラスター化した遊離 T 細胞結合部分を有する既存の A D A : 二重特異性 A b 複合体の形成につながり得る。複数の遊離 C D 3 結合アームを

50

含むそのような複合体の存在は、がん細胞の非存在下でアビディティにより誘導される T 細胞活性化をもたらす可能性があり、それにより、サイトカイン放出症候群を引き起こし得る。一価の p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーを、s T C R 比較分子と比較して、A D A 結合を免れるその能力について試験した。

【 0 3 6 5 】

図 1 6 に示されるように、既存の A D A を、上記に述べた比較分子、及び脱免疫化した s d A b 化合物 C D R - 1 6 について定量化した。比較分子と脱免疫化した S d A b を、健康なナীব白人ヒトドナー 1 0 人に由来する血清試料で評価した。既存の A D A を E L I S A によって検出した。データは、脱免疫化された s d A b が A D A の標的とされなかったのに対して、比較分子は A D A によって結合されたことを示す。

10

【 0 3 6 6 】

二連型 p M H C 標的化 T 細胞エンゲージャーフォーマットでの A D A 結合を低減させるため、アミノ酸改変をシングルドメイン抗体フォーマット (s d A b) 及び s c F v フォーマットに行った。図 1 7 に示されるように、既存の A D A への結合を、選択された改変を含むヒト化 s d A b 化合物 C D R - 1 7 において定量化した。「 + A 」は、C 末端でのアラニンの付加に対応する。「 - S 」は、K a b a t の番号付けに従って 1 1 3 位のセリンの欠失に対応する。「 - S S 」は、K a b a t の番号付けに従って 1 1 2 位及び 1 1 3 位のセリンの欠失に対応する。「 S S S 」は、K a b a t による 1 1 位、8 9 位、及び 1 0 8 位の疎水性アミノ酸のセリンアミノ酸への置換に対応する。三重セリン置換「 S S S 」については、参照により本明細書に援用する W O 2 0 0 9 / 1 5 5 7 2 5 にさらに記載されている。さまざまな試料の血清濃度で E L I S A を使用して A D A 反応を測定した。これらのデータは、上記の改変のいずれか 1 つ以上を含めることにより、A D A への結合が減少することを示している。S S S と - S S 改変または S S S 、 - S S 、及び A 改変との組み合わせが、A D A への結合を最も減少させた。

20

【 0 3 6 7 】

図 1 8 に示されるように、既存の A D A への結合を、s c F V に選択された改変を有する化合物 C D R - 1 8 に基づいた F a b - s c F V 抗原結合タンパク質について定量化した。「 + A 」は、アラニンの付加に対応する。「 - S 」は、K a b a t の番号付けに従って 1 1 3 位のセリンの欠失に対応する。「 - S S 」は、K a b a t の番号付けに従って 1 1 2 位及び 1 1 3 位のセリンの欠失に対応する。「 S S S 」は、K a b a t による 1 1 位、8 9 位、及び 1 0 8 位の疎水性アミノ酸のセリンアミノ酸への置換に対応する。さまざまな試料の血清濃度で E L I S A を使用して A D A 反応を測定した。これらのデータは、上記の改変のいずれか 1 つ以上を含めることにより、A D A への結合が減少することを示している。

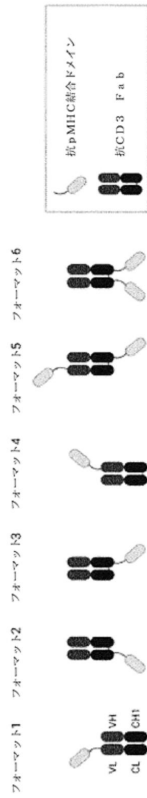
30

40

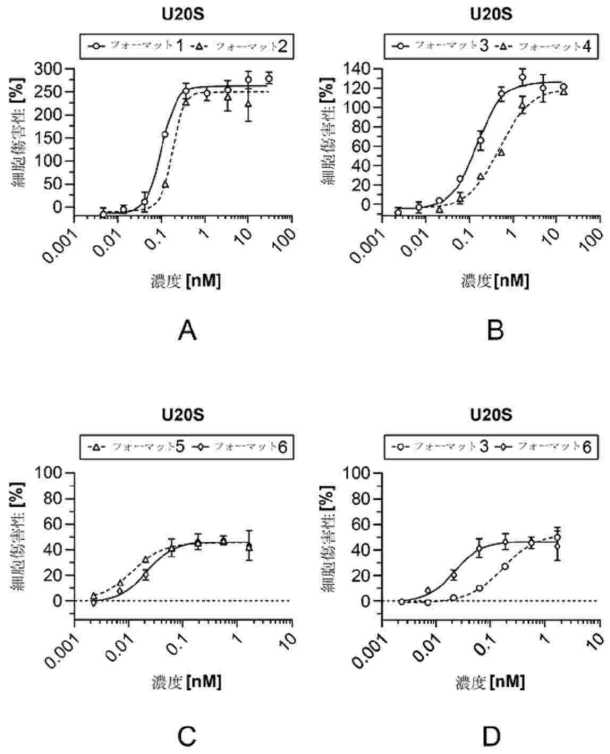
50

【 図 面 】

【 図 1 】



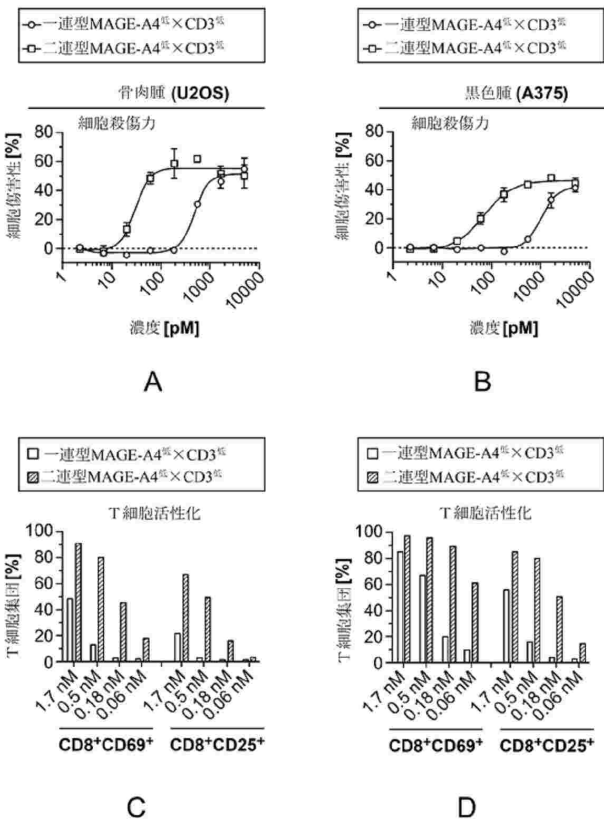
【 図 2 】



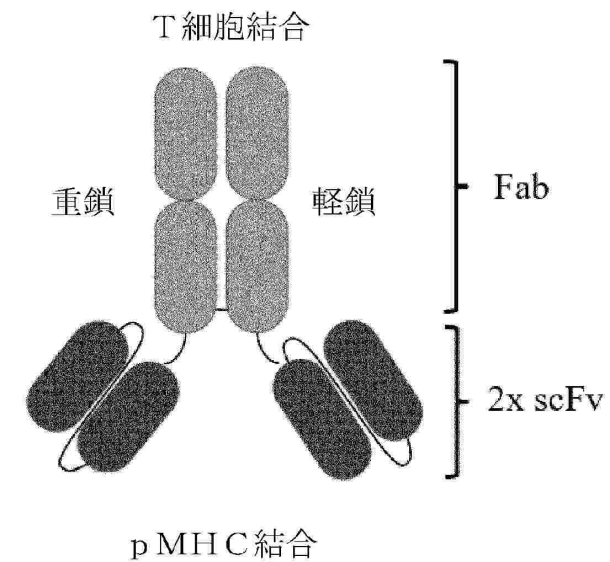
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

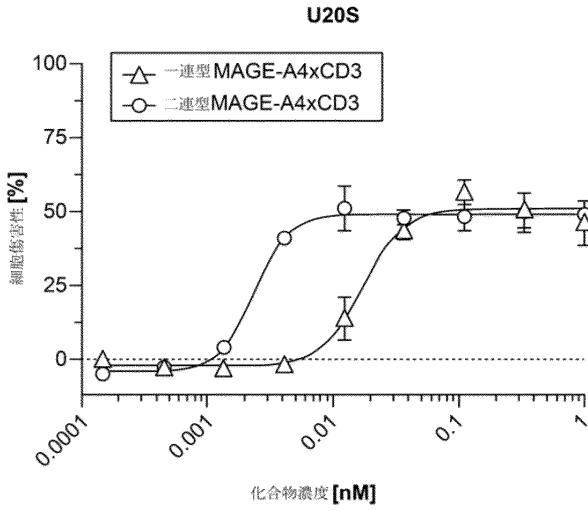


30

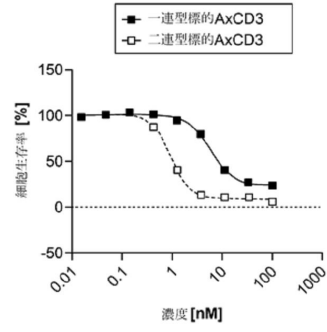
40

50

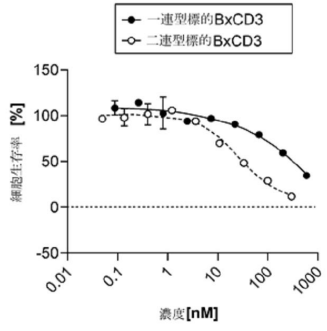
【 図 5 】



【 図 6 】

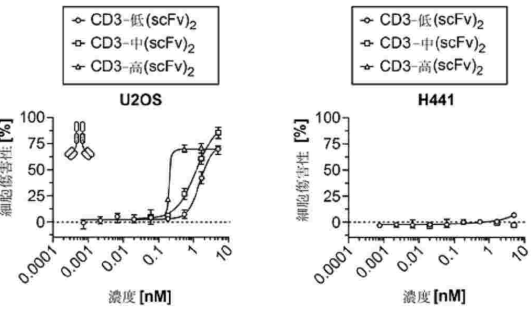
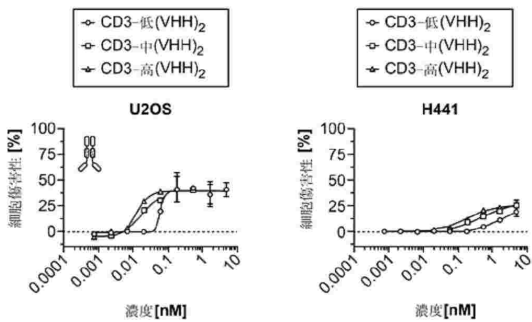


10

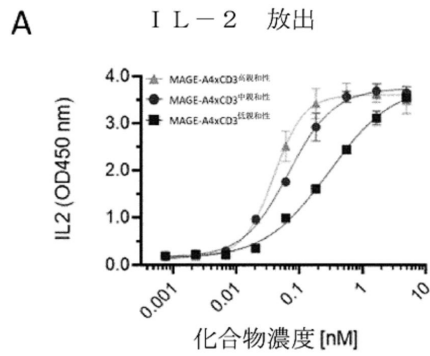


20

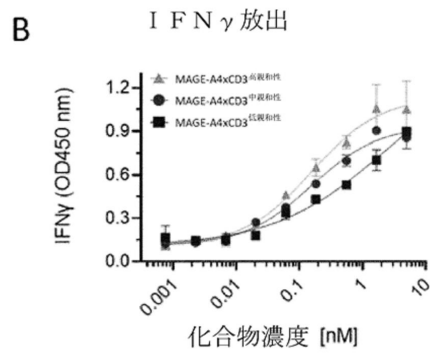
【 図 7 】



【 図 8 】



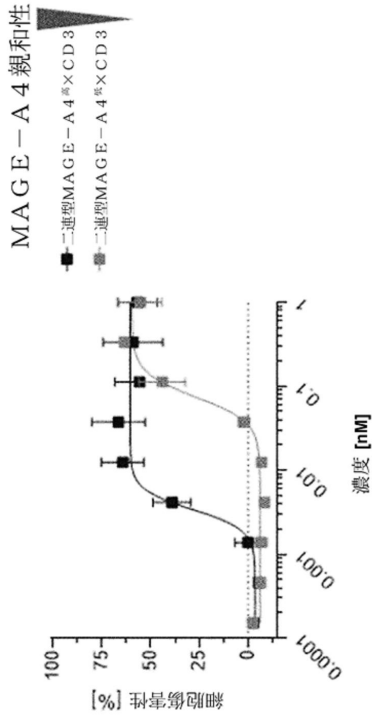
30



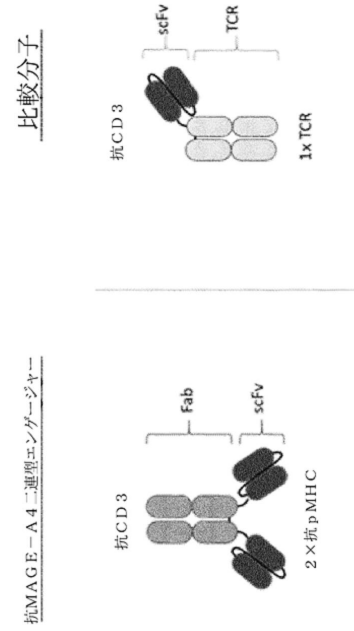
40

50

【 図 9 】



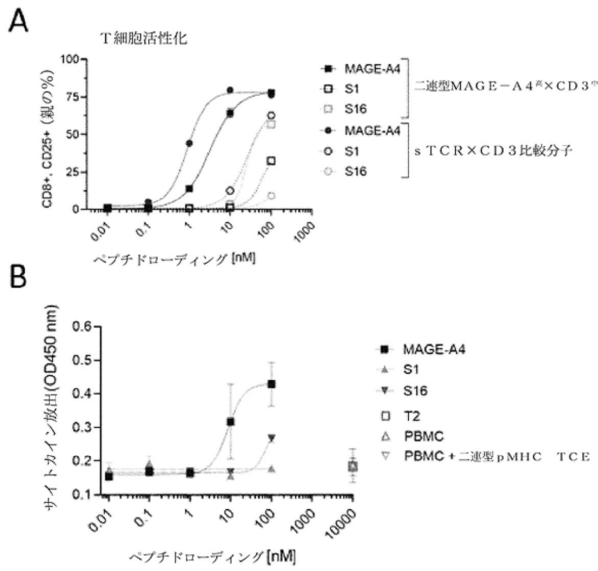
【 図 10 】



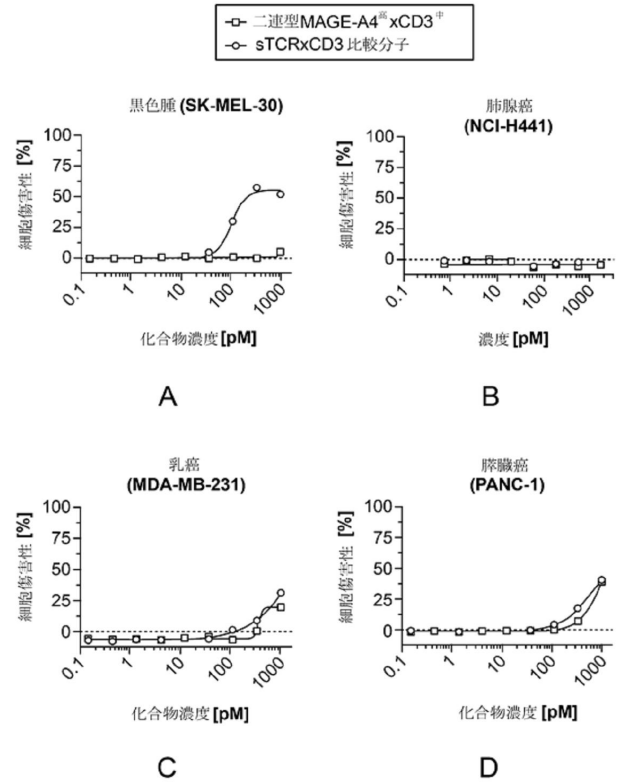
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

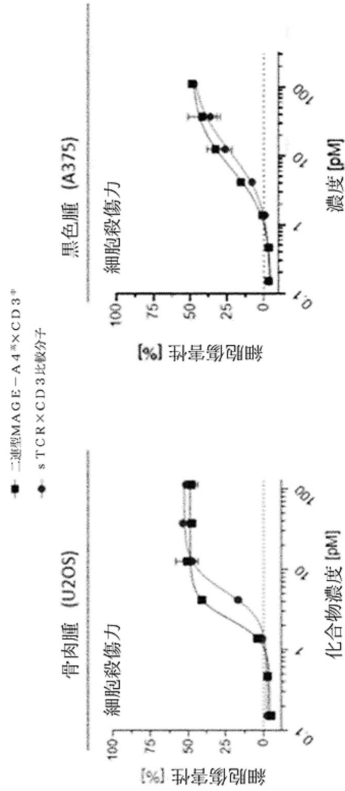


30

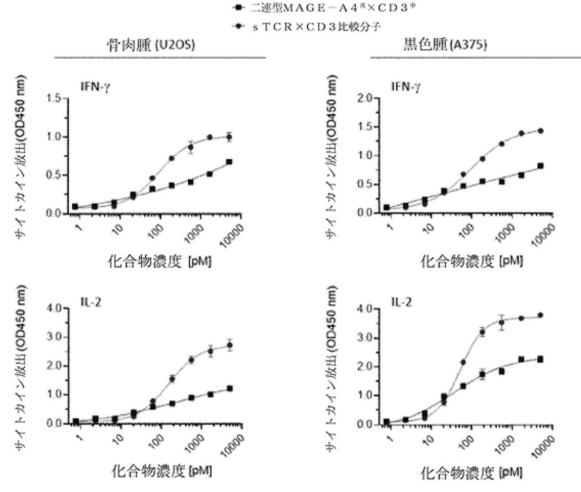
40

50

【 図 1 3 】



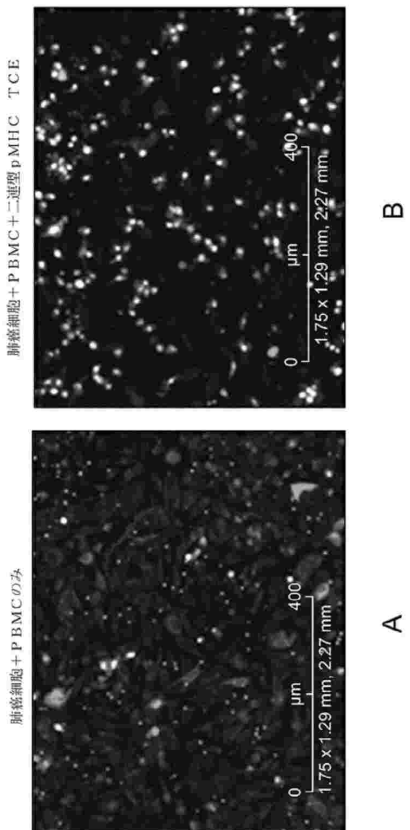
【 図 1 4 】



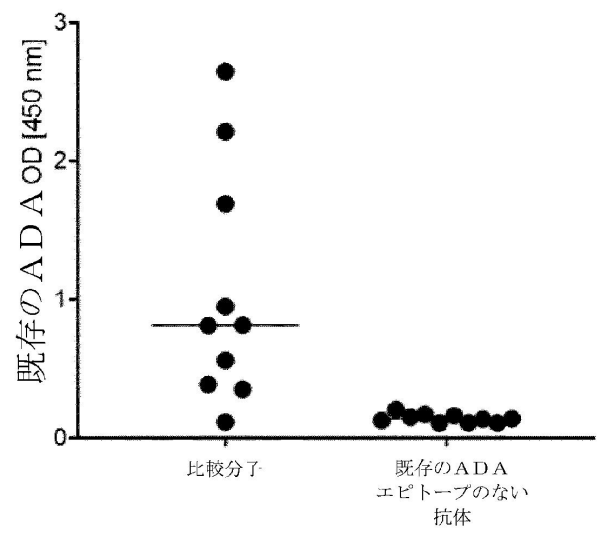
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

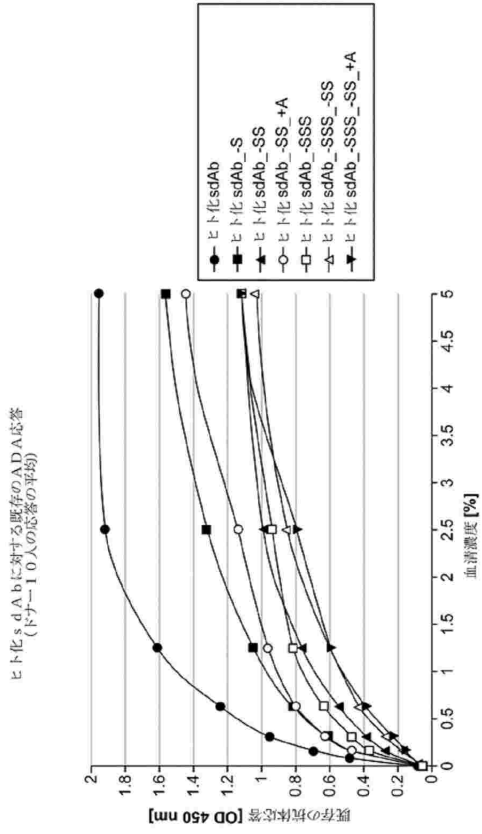


30

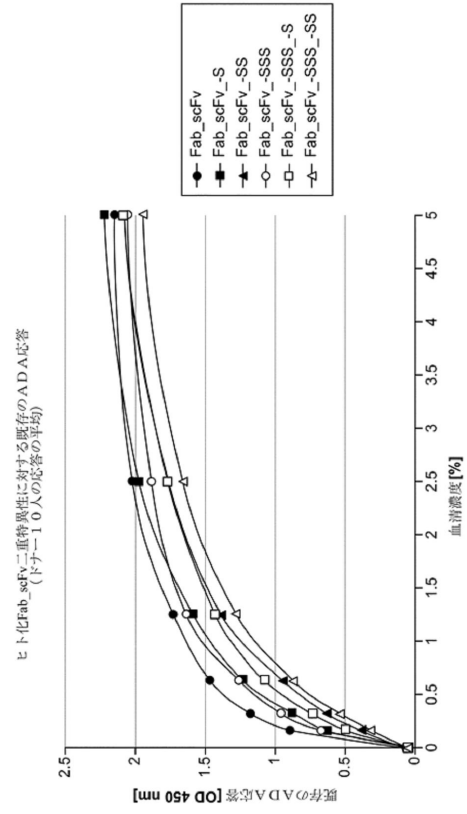
40

50

【 図 17 】



【 図 18 】



【 配列表 】

202454687500001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2022/085689
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28 C07K16/30		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/012138 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 17 January 2019 (2019-01-17) example 1	1-52
Y	WO 2021/116469 A2 (MOLECULAR PARTNERS AG [CH]) 17 June 2021 (2021-06-17) example 9	1-52
Y	WO 2020/243315 A1 (CUE BIOPHARMA INC [US]; CEMERSKI SASO [US]) 3 December 2020 (2020-12-03) example 8	1-52
Y	WO 2021/112676 A2 (APO T B V [NL]) 10 June 2021 (2021-06-10) example 8	1-52
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 March 2023	Date of mailing of the international search report 23/03/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hix, Rebecca	

1

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

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/085689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ROOSNEK E ET AL: "T CELL ACTIVATION BY A BISPECIFIC ANTI-CD3/ANTI-MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I ANTIBODY", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY-VCH, HOBOKEN, USA, vol. 20, no. 6, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 1393-1396, XP001053417, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.1830200627 the whole document</p> <p>-----</p>	1-52
Y,P	<p>AUGSBERGER CHRISTIAN ET AL: "Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RME-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody", BLOOD, vol. 138, no. 25, 23 December 2021 (2021-12-23), pages 2655-2669, XP093020501, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.2020010477 the whole document</p> <p>-----</p>	1-52
X,P	<p>Stephanie Jungmichel et al.: "Abstract 2891: Enhanced anti-tumor responses with a novel dual pMHC T-cell engager bispecific antibody Cancer Research American Association for Cancer Research", 15 June 2022 (2022-06-15), XP093026621, Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/cancerres/article/82/12_Supplement/2891/702581/Abstract-2891-Enhanced-anti-tumor-responses-with-a [retrieved on 2023-02-23] abstract</p> <p>-----</p>	1-52

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/085689

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.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.
b.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
	<input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/085689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019012138 A1	17-01-2019	AU 2018298881 A1	16-01-2020
		AU 2018298884 A1	27-02-2020
		BR 112020000762 A2	21-07-2020
		BR 112020000769 A2	21-07-2020
		CA 3069610 A1	17-01-2019
		CA 3069842 A1	17-01-2019
		CN 110914307 A	24-03-2020
		CN 110914308 A	24-03-2020
		CO 2020001029 A2	18-02-2020
		CO 2020001491 A2	28-02-2020
		CR 202000013 A	11-03-2020
		CR 202000014 A	11-06-2020
		DK 3428194 T3	15-11-2021
		DK 3652215 T3	25-05-2021
		EP 3428194 A1	16-01-2019
		EP 3652215 A1	20-05-2020
		EP 3985029 A1	20-04-2022
		ES 2871146 T3	28-10-2021
		ES 2898210 T3	04-03-2022
		HR P20211744 T1	04-02-2022
		HU E054568 T2	28-09-2021
		HU E057110 T2	28-04-2022
		JP 6784724 B2	11-11-2020
		JP 2019023184 A	14-02-2019
		JP 2020530762 A	29-10-2020
		KR 20200026994 A	11-03-2020
		KR 20200026995 A	11-03-2020
		LT 3428194 T	10-12-2021
		LT 3652215 T	25-05-2021
		MA 46299 A	31-07-2019
		MD 3428194 T2	28-02-2022
		MD 3652215 T2	30-06-2021
		PE 20200614 A1	11-03-2020
		PE 20200615 A1	11-03-2020
		PL 3428194 T3	17-01-2022
		PL 3652215 T3	02-08-2021
		PT 3428194 T	18-11-2021
		PT 3652215 T	18-05-2021
		RS 61817 B1	30-06-2021
		RS 62544 B1	31-12-2021
SG 112020000258 A	27-02-2020		
SG 11202000027W A	27-02-2020		
SI 3428194 T1	31-12-2021		
SI 3652215 T1	31-08-2021		
TW 201908340 A	01-03-2019		
US 2019016801 A1	17-01-2019		
US 2019016802 A1	17-01-2019		
US 2019016803 A1	17-01-2019		
US 2019016804 A1	17-01-2019		
US 2022185888 A1	16-06-2022		
US 2022195044 A1	23-06-2022		
WO 2019012138 A1	17-01-2019		
WO 2019012141 A1	17-01-2019		
ZA 202000842 B	29-06-2022		
WO 2021116469 A2	17-06-2021	AU 2020399230 A1	23-06-2022
		AU 2020402581 A1	23-06-2022
		BR 112022011177 A2	27-09-2022

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/085689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		BR 112022011456 A2	23-08-2022	
		CA 3161321 A1	17-06-2021	
		CA 3161326 A1	17-06-2021	
		CN 114929730 A	19-08-2022	
		CN 115003689 A	02-09-2022	
		EP 4073091 A1	19-10-2022	
		EP 4073092 A2	19-10-2022	
		IL 293698 A	01-08-2022	
		IL 293704 A	01-08-2022	
		JP 2023506757 A	20-02-2023	
		JP 2023506765 A	20-02-2023	
		KR 20220113491 A	12-08-2022	
		KR 20220113492 A	12-08-2022	
		US 2022064234 A1	03-03-2022	
		US 2022106707 A1	07-04-2022	
		WO 2021116462 A1	17-06-2021	
		WO 2021116469 A2	17-06-2021	

WO 2020243315	A1	03-12-2020	AU 2020282736 A1	28-10-2021
			CA 3137463 A1	03-10-2020
			CN 114126635 A	01-03-2022
			EP 3976084 A1	06-04-2022
			IL 287192 A	01-12-2021
			JP 2022534846 A	04-08-2022
			KR 20220015382 A	08-02-2022
			US 2022017596 A1	20-01-2022
			WO 2020243315 A1	03-12-2020

WO 2021112676	A2	10-06-2021	EP 4069744 A2	12-10-2022
			NL 2024375 B1	31-08-2021
			US 2023046744 A1	16-02-2023
			WO 2021112676 A2	10-06-2021

10

20

30

40

50

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)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
	C 1 2 N 15/13	

(32)優先日 令和4年4月7日(2022.4.7)

(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,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,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)

スイス、ビルメンスドルフ

(72)発明者 ユングミヒェル, シュテファニー
スイス、チューリッヒ(72)発明者 メルテン, ハンネス
スイス、チューリッヒ(72)発明者 リヒレ, フィリップ ローベルト
スイス、チューリッヒ(72)発明者 シャイフェレ, ファビアン ベルト
スイス、メーゲンヴィル - アールガウ(72)発明者 ソピエライ, アンナ マリア
スイス、チューリッヒ

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA05
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BC01 CA25
CA44
4C085 AA14 BB01 BB11 BB41 BB44 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06
GG08
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74