

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7530904号
(P7530904)

(45)発行日 令和6年8月8日(2024.8.8)

(24)登録日 令和6年7月31日(2024.7.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	

請求項の数 24 (全26頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-544406(P2021-544406)
(86)(22)出願日	令和2年1月30日(2020.1.30)
(65)公表番号	特表2022-523507(P2022-523507 A)
(43)公表日	令和4年4月25日(2022.4.25)
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/052315
(87)国際公開番号	WO2020/157210
(87)国際公開日	令和2年8月6日(2020.8.6)
審査請求日	令和5年1月30日(2023.1.30)
(31)優先権主張番号	1901305.1
(32)優先日	平成31年1月30日(2019.1.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)

(73)特許権者	510019129 イムノコア リミテッド イギリス、アビンドン オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ、ミルトン パーク、パーク ドライブ 92 92 Park Drive Milton Park, Abingdon Oxfordshire OX14 4RY, United Kingdom
(74)代理人	110000796 弁理士法人三枝国際特許事務所
(72)発明者	コネストラーロ、マルティナ イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 特異的結合性分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫グロブリンVLドメイン及び免疫グロブリンVHドメインを有するポリペプチドを含んでなりCD3に結合する特異的結合性分子であって、VLドメインが相補性決定領域(CDR) VLCDR1、VLCDR2及びVLCDR3を含んでなり、VHドメインが相補性決定領域(CDR) VHCDR1、VHCDR2及びVHCDR3を含んでなり、

VLCDR1はQDIRNY (配列番号1) からなるアミノ酸配列、

VLCDR2はYTS、

VLCDR3はQQGNTLPWT (配列番号2) からなるアミノ酸配列を有し、

VHCDR1はGYSFTGYA (配列番号3) からなるアミノ酸配列を有し、

VHCDR2はINPYKGV (配列番号4) からなるアミノ酸配列を有し、

VHCDR3はARSGYYGDSDWYFDV (配列番号5) からなるアミノ酸配列を有する、特異的結合性分子。

【請求項2】

免疫グロブリンVLは、全体配列VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4(式中、VLFW1、VLFW2、VLFW3及びVLFW4はそれぞれVLフレームワーク(VLFW)配列1~4である)を含んでなり、免疫グロブリンVHは全体配列VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4(式中、VHFW1、VHFW2、VHFW3及びVHFW4はそれぞれVHフレームワーク(VHFW)配列1~4である)を含んでなる、請求項1に記載の特異的結合性分子。

10

20

【請求項 3】

VLFW及びVHFW配列はマウス、ヒト又はヒト化フレームワーク配列である、請求項 2 に記載の特異的結合性分子。

【請求項 4】

免疫グロブリンVLは全体配列VLFW1-VLCDR1-VLFW2-VLCDR2-VLFW3-VLCDR3-VLFW4(式中、VLFW1、VLFW2、VLFW3及びVLFW4はそれぞれフレームワーク(FW)配列1～4である)を含んでなり、

VLFW1はAIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS(配列番号6)からなるアミノ酸配列若しくはDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS(配列番号7)からなるアミノ酸配列を有し、

VLFW2はLNWYQQKPGKAPKLLIY(配列番号8)からなるアミノ酸配列を有し、

VLFW3はRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC(配列番号9)からなるアミノ酸配列を有し、

VLFW4はFGQGTKVEIK(配列番号10)からなるアミノ酸配列を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 5】

免疫グロブリンVHは全体配列VHFW1-VHCDR1-VHFW2-VHCDR2-VHFW3-VHCDR3-VHFW4(式中、VHFW1、VHFW2、VHFW3及びVHFW4はそれぞれフレームワーク(FW)配列1～4である)を含んでなり、

VHFW1はEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(配列番号11)からなるアミノ酸配列を有し、

VHFW2はMNWVRQAPGKGLEWVAL(配列番号12)からなるアミノ酸配列を有し、

VHFW3はTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC(配列番号13)からなるアミノ酸配列若しくはTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC(配列番号14)からなるアミノ酸配列を有し、

VHFW4はWGQGLTVTVS(配列番号15)からなるアミノ酸配列を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 6】

免疫グロブリンVLは配列：AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEIK(配列番号16)からなるアミノ酸配列；若しくはDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEI(配列番号17)からなるアミノ酸配列を含んでなる、請求項1～5のいずれか1項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 7】

免疫グロブリンVHは配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGSDWYFDVWGQGLTVTVSS(配列番号18)からなるアミノ酸配列；若しくはEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGSDWYFDVWGQGLTVTVSS(配列番号19)からなるアミノ酸配列を含んでなる、請求項1～6のいずれか1項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 8】

免疫グロブリンVLは配列：AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEIK(配列番号16)からなるアミノ酸配列を含んでなり、

免疫グロブリンVHは配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGSDWYFDVWGQGLTVTVSS(配列番号18)からなるアミノ酸配列；若しくはEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYN

10

20

30

40

50

QKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGSDSDWYFDVWVGQGLVT VSS (配列番号 1 9) からなるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 9】

scFvフラグメントの形態である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 10】

免疫グロブリンVL及びVHドメインがリンカーを介して接続されている請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 11】

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR FSGSGGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGQTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVA LINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGSDSDWY FDVWVGQGLVT VSS (配列番号 2 1) からなるアミノ酸配列を有する単鎖特異的結合性分子である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の特異的結合性分子。

【請求項 12】

i) ターゲッティング部分；及び

ii) 請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子を含んでなる二機能性結合性分子。

【請求項 13】

ターゲッティング部分がT細胞レセプター(TCR)、抗体又は抗体フラグメントである、請求項 12 に記載の二機能性結合性分子。

【請求項 14】

T細胞レセプター(TCR)がヘテロ二量体 / TCRポリペプチド対又は単鎖 / TCRポリペプチドである、請求項 13 に記載の二機能性結合性分子。

【請求項 15】

TCRが鎖の定常領域と鎖の定常領域との間に非天然型ジスルフィド結合を含んでなる、請求項 13 又は 14 に記載の二機能性結合性分子。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子が、ターゲッティング部分のC又はN末端に融合している、請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子が、ターゲッティング部分のC又はN末端にリンカーを介して融合している、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子又は請求項 12 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子を含んでなる医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子又は請求項 12 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子をコードする核酸。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の核酸又は請求項 20 に記載のベクターを含んでなり、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の、CD3に結合する特異的結合性分子又は請求項 12 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子をコードする核酸が単一オープンリーディングフレーム又はそれぞれ鎖及び鎖をコードする2つの別個のオープンリーディングフレームとして存在する、宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の宿主細胞を核酸の発現に適切な条件下で維持し、CD3 に結合する特異的結合性分子又は二機能性結合性分子を単離することを含んでなる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の、CD3 に結合する特異的結合性分子又は請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子の製造方法。

【請求項 2 3】

癌又は感染性疾患の治療薬であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の、CD3 に結合する特異的結合性分子又は請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子を含む治療薬。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の、CD3 に結合する特異的結合性分子又は請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の二機能性結合性分子を必要とする対象に投与することを含んでなる治療方法（ただし、ヒトの治療方法を除く）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、改善した特性を有する、CD3 に結合する特異的結合性分子、特に抗体及びそのフラグメントに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

CD3(分化抗原群 3)は、細胞傷害性 T 細胞(CD8+ T 細胞)及び T ヘルパー細胞(CD4+ T 細胞)の両方の活性化を助ける T 細胞コレセプターである。CD3 は T 細胞レセプター(TCR)及び 鎖(ゼータ鎖; CD247)と結合して、T リンパ球において活性化シグナルを生成する。TCR、鎖及び CD3 分子は一緒に TCR 複合体を構成する。

CD3 に結合する抗体は、公知であり、免疫抑制剤として有用である。例としては、ムロモナブ-CD3(Janssen-Cilag)、オテリキシズマブ(TRX4 としても知られる)、テプリズマブ(PRV-031 としても知られる)及びピジリズマブが挙げられる。

【0003】

抗 CD3 抗体もまた、T 細胞結合性二重特異性剤として広く知られるタンパク質ベース治療薬の 1 つのクラスの T 細胞動員薬剤としての有用性を有する(Baeuerle ら, Cancer Res. 2009 Jun 15;69(12):4941-4)この治療薬は、標的細胞認識ドメインと抗 CD3 ドメインとが組み合わされている。標的細胞(例えばガン細胞)と CD3+細胞傷害性 T 細胞との同時結合が、T 細胞レセプター特異性から独立して、CD3 シグナル経路の活性化を導き、最終的には標的細胞の死をもたらす。二重特異性抗体プリナツモマブ(Amgen)は、急性リンパ芽球白血病(ALL)の治療用の市販の T 細胞結合性治療薬の一例である。幾つかの更なる T 細胞結合性二重特異性剤が、種々の癌及び感染性疾患の治療について臨床試験で研究中被験している(例えば、Yuraszeck ら, Clin Pharmacol Ther. 2017 May;101(5):634-645 及び Husain ら, BioDrugs. 2018 Oct;32(5):441-464 の表を参照)。T 細胞結合性 T 細胞結合性二重特異性剤の大部分は、標的細胞上の細胞表面抗原を認識する。加えて、m 細胞内抗原に由来し、MHC と複合体化して細胞表面に提示される短いペプチド(pMHC)を認識する T 細胞結合性 T 細胞結合性二重特異性剤もまた知られている(Liddy ら, Nat Med. 2012 Jun;18(6):980-7)。

抗体 UCHT1 は、当該分野において公知である臨床的に該当する抗 CD3 抗体である(Shalaby ら, J Exp Med. 1992 Jan 1;175(1):217-25; US5821337)。ヒト化 UCHT1 抗体の ScFv フラグメントは、標的細胞上の pMHC に結合する T 細胞結合性二重特異性剤を構築するために可溶性 T 細胞レセプターに融合されている(例えば WO2011001152 を参照)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

発明の説明

本発明者らは、驚くべきことに、UCHT1のアミノ酸配列に或る特定の変異を導入することにより、特に臨床使用に有益である予想外の特性を有するT細胞結合性二重特異性分子が創出されることを見出した。

【 0 0 0 5 】

第1の観点において、免疫グロブリンVLドメイン及び免疫グロブリンVHドメインを有するポリペプチドを含んでなりCD3に結合する特異的結合性分子であって、VLドメインが相補性決定領域(CDR) VLCDR1、VLCDR2及びVLCDR3を含んでなり、VHドメインが相補性決定領域(CDR) VHCDR1、VHCDR2及びVHCDR3を含んでなり、
 VLCDR1はQDIRNY又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VLCDR2はYTS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VLCDR3はQQGNTLPWT又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR1はGYSFTGYA又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR2はINPYKGVVS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR3はARSGYYGSDWYFDV又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有する、
 特異的結合性分子が提供される。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 6 】

【 図 1 】 図 1 は、改善したUCHT1バリエーションのVH及びVLアミノ酸配列を提供する。CDRには下線が付されている。変異を太字で示す。

【 図 2 】 図 2 は、改善した抗CD3 scFvバリエーションが組み込まれたTCR-抗CD3融合タンパク質の例示のアミノ酸配列を提供する。

【 図 3 】 図 3 は、改善した抗CD3 scFvバリエーション 1 を組み込まれたTCR-CD3融合体が非変異抗CD3(A)に比して良好な治療窓を有すること及び改善した抗CD3 scFvバリエーション 2 を組み込まれたTCR-CD3融合体が非変異抗CD3(B)に比してより高いE_{max}を有することを証明する。

【 図 4 】 図 4 は、UCHT1バリエーション 1 及びバリエーション 2 を組み込まれたTCR-CD3融合体により媒介される改善したT細胞殺傷性を証明する。

20

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 0 7 】

第1の観点において、免疫グロブリンVLドメイン及び免疫グロブリンVHドメインを有するポリペプチドを含んでなりCD3に結合する特異的結合性分子であって、VLドメインが相補性決定領域(CDR) VLCDR1、VLCDR2及びVLCDR3を含んでなり、VHドメインが相補性決定領域(CDR) VHCDR1、VHCDR2及びVHCDR3を含んでなり、
 VLCDR1はQDIRNY又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VLCDR2はYTS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VLCDR3はQQGNTLPWT又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR1はGYSFTGYA又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR2はINPYKGVVS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、
 VHCDR3はARSGYYGSDWYFDV又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有する、
 特異的結合性分子が提供される。

40

【 0 0 0 8 】

CDRは国際ImMunoGeneTics情報システム(IMGT(登録商標))に従って定義される(LeFrancら, Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D1006-12)。

具体的には、本発明の特異的結合性分子は、VHCDR1のC末端部(IMGT(登録商標)の番号付けで38位に相当する、本明細書中で165位とされる位置)にアラニンを含んでなる(図1の重鎖配列V1において太字で示される)。この変異を含む分子は改善された特性(この変

50

異を有さない分子と比較して向上した特異性ウィンドウ)を有することが見い出された。

CDRは、抗体可変ドメインのフレームワーク配列に提供され得る。フレームワーク配列は、マウスフレームワーク配列又はヒトフレームワーク配列又はヒト化フレームワーク配列又はその他の任意の適切なフレームワークであり得る。好適なフレームワークはヒト又はヒト化フレームワーク配列である。ヒト又はヒト化フレームワークは、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有する。或る特定の場合には、マウスフレームワーク、ヒトフレームワーク及びヒト化フレームワークは、任意の組合せで混合されてもよい。

【0009】

好ましくは、免疫グロブリンVLは、全体配列VLFW1-VLCSR1-VLFW2-VLCSR2-VLFW3-VLCSR3-VLFW4(式中、VLFW1、VLFW2、VLFW3及びVLFW4はそれぞれVLフレームワーク(VLFW)配列1~4である)を含んでなり、免疫グロブリンVHは、全体配列VHFW1-VHCSR1-VHFW2-VHCSR2-VHFW3-VHCSR3-VHFW4(式中、VHFW1、VHFW2、VHFW3及びVHFW4はそれぞれVHフレームワーク(VHFW)配列1~4である)を含んでなり、任意に、VLFW及びVHFW配列はマウス、ヒト又はヒト化フレームワーク配列である。

10

好ましくは、免疫グロブリンVLは、全体配列VLFW1-VLCSR1-VLFW2-VLCSR2-VLFW3-VLCSR3-VLFW4(式中、VLFW1、VLFW2、VLFW3及びVLFW4はそれぞれフレームワーク(FW)配列1~4である)を含んでなり、

VLFW1はAIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS若しくはDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

20

VLFW2はLNWYQQKPGKAPKLLIY又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

VLFW3はRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

VLFW4はFGQGTKVEIK又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有する。

【0010】

好ましくは、免疫グロブリンVHは、全体配列VHFW1-VHCSR1-VHFW2-VHCSR2-VHFW3-VHCSR3-VHFW4(式中、VHFW1、VHFW2、VHFW3及びVHFW4はそれぞれフレームワーク(FW)配列1~4である)を含んでなり、

VHFW1はEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

30

VHFW2はMNWVRQAPGKGLEWVAL又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

VHFW3はTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC若しくはTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有し、

VHFW4はWGQGTLVTVSS又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有する。

【0011】

具体的には、本発明の特異的結合性分子は、VHFW3中、IMGT(登録商標)の番号付けで78位に相当する位置(本明細書中では202位)にフェニルアラニンを含んでなる(図1の重鎖配列V2に例示され太字で示される)。38位のアラニンに加えてこの変異を含む分子は、これら変異を有しない分子と比較してT細胞活性化の効率が增大していることが見い出された。

40

【0012】

好ましくは、免疫グロブリンVLは、配列：AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK；若しくは

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含んでなる。

50

好ましくは、免疫グロブリンVHは、配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVST
YNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDVWVGQGLT
VTVSS；若しくは

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVST
YNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDVWVGQGLT
VTVSS

又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含んでなる。

【0013】

好ましくは、特異的結合性分子はscFvフラグメントの形態である。

好ましくは、免疫グロブリンVL及びVHドメインはリンカーを介して接続されている。リンカーは、任意のアミノ酸配列、好ましくは5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。好適なリンカーは、式(GGGGS)_nを有する配列と、任意に追加のその他のアミノ酸とを含む。したがって、配列：

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVA
LINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDV
FDVWVGQGLTVTVSS；若しくは

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVA
LINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDV
FDVWVGQGLTVTVSS

又は該配列と少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含んでなる単鎖特異的結合性分子が提供される。

【0014】

特異的結合性分子はまた、更なるドメインを含んでなる融合タンパク質の一部であってもよい。融合タンパク質は、VL又はVHのいずれかの免疫グロブリンドメインへのN末端又はC末端融合により構築され得る。更なるドメインはリンカーを介して融合され得る。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2~10アミノ酸長である。リンカーは任意のアミノ酸配列、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。適切なリンカーの例としては、GGGSGGGG、GGGGS、GGGSG、GGSGG、GSGGG、GSGGGP、GGEPS、GGEGGGP及びGGEGGGSEGGGS(WO2010/133828に記載のもの)が挙げられるが、これらに限定されない。好適なリンカーは、式(GGGGS)_nを有する配列と、任意に追加のその他のアミノ酸とを含む。

【0015】

好ましくは、特異的結合性分子は、二重特異性分子、好ましくは本明細書に記載するT細胞結合性二重特異性分子の一部として用いる場合、変異のない分子に比して1又は2以上の向上した治療特性を有する。好ましくは、向上した治療特性は、向上した治療窓及び/又は所与の濃度での最大T細胞活性化の増大から選択される。向上した治療窓は、オフターゲット活性化に起因する毒性を最小化しつつ、より高い投薬量を可能にし得る。二重特異性分子の所与の濃度での最大T細胞活性化の増大は、所与の薬物用量での標的細胞のより効率的な殺傷を可能にし得る。T細胞活性化を測定する方法は、当該分野において公知

10

20

30

40

50

であり、免疫活性化サイトカインの放出及びT細胞媒介性細胞死を含む。T細胞結合性二重特異性分子の治療窓は、抗原陽性細胞及び抗原陰性細胞の存在下でT細胞活性化を測定し、2つの測定値間の差を算出することにより決定し得る。好適な方法の更なる詳細は実施例2に記載される。

好ましくは、本発明の抗CD3抗体はCD3のCD3 サブユニットに結合する。

本発明による特異的結合性分子は、ヒト又は動物の身体を治療又は診断する方法、例えば、患者(好ましくはヒト)の病的状態を治療する方法であって、該患者に有効量の本発明の特異的結合性分子を投与することを含んでなる治療方法に用いてもよい。本発明はまた、医薬に用いるための本発明の特異的結合性分子、及び腫瘍の診断用又は治療用医薬の製造における本発明の特異的結合性分子の使用を提供する。

10

本発明のこれら及びその他の観点は、下記で更に詳細に説明される。

【0016】

本明細書で用いる場合、「治療」には、ヒト又は非ヒト動物、好ましくは哺乳動物の利益になり得る任意の養生法が含まれる。治療は、既存の病的状態に関してもよいし、病気予防のもの(予防的治療)であってもよい。

用語「抗体」は、本明細書で用いる場合、天然に産生されたか又は部分的若しくは全体的に合成されたかにかかわらず、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子をいう。この用語はまた、抗体結合性ドメインであるか又はこれと相同である結合性ドメインを有する任意のポリペプチド又はタンパク質を包含する。これらは天然の供給源から得ることができ、又は部分的若しくは全体的に合成により製造することができる。抗体の例は、免疫グロブリンアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD及びIgA)及びそれらのアイソタイプサブクラス；抗原結合性ドメインを含んでなるフラグメント、例えばFab、scFv、Fv、dAb、Fd；及びダイアボディである。抗体はポリクローナルであってもよいし、又はモノクローナルであってもよい。モノクローナル抗体は、本明細書において「mab」と表記し得る。

20

【0017】

モノクローナル及びその他の抗体を作製し、組換えDNA技術の技法を用いて、元の抗体の特異性を保持する他の抗体又はキメラ分子を製造することが可能である。このような技法には、抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域又は定常領域及びフレームワーク領域に導入することが含まれ得る。例えば、EP-A-184187、GB 2188638A又はEP-A-239400を参照。抗体を産生するハイブリドーマ又はその他の細胞を、産生される抗体の結合特異性を変更するか又は変更しない遺伝子変異又はその他の変化に供し得る。

30

抗体は幾つかの方法で改変することができるので、用語「抗体」は、必要な特異性を伴う結合性ドメインを有する任意の特異的結合性分子又は物質を包含するものとして解釈されるべきである。よって、この用語は、天然であるか又は全体的若しくは部分的に合成であるかに関わらず、抗体(例えば、ヒト化抗体)(免疫グロブリン結合性ドメインを含んでなる任意のポリペプチドを含む)の抗体フラグメント、誘導體、機能的等価物及びホモログを包含する。したがって、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合性ドメイン又は等価物を含んでなるキメラ分子も含まれる。キメラ抗体のクローニング及び発現は、EP-A-0120694及びEP-A-0125023に記載される。ヒト化抗体は、非ヒト、例えばマウス抗体の可変領域と、ヒト抗体の定常領域とを有する改変抗体であり得る。ヒト化抗体を作製する方法は、例えば、米国特許第5225539号に記載される。

40

【0018】

全体抗体のフラグメントは、抗原に結合するように機能し得ることが示されている。結合性フラグメントの例は、(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii)VH及びCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iii)単一抗体のVL及びVHドメインからなるFvフラグメント；(iv)VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward, E.S.ら, Nature 341:544-546(1989))；(v)単離CDR領域；(vi)連結された2つのFabフラグメントを

50

含んでなる二価フラグメントであるF(ab')₂フラグメント(vii)単鎖Fv分子(scFv)、ここでVHドメイン及びVLドメインは(該2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能にする)ペプチドリッカーにより連結されている(Birdら, Science 242:423-426(1988); Hustonら, PNAS USA 85:5879-5883(1988)); (viii)二重特異性単鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)、及び(ix)遺伝子融合体により構築された多価又は多重特異性フラグメントである「ダイアボディ」(WO94/13804; P. Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448(1993))である。

ダイアボディは、ポリペプチドの多量体であって、各ポリペプチドは免疫グロブリン軽鎖の結合性領域を含む第1のドメインと、免疫グロブリン重鎖の結合性領域を含む第2のドメインとを含んでなり、該2つのドメインは(例えばペプチドリッカーにより)連結されているが、互いに会合して抗原結合部位を形成することができない多量体である：抗原結合部位は、多量体内の或る1つのポリペプチドの第1のドメインと多量体内の別の1つのポリペプチドの第2のドメインとの会合により形成される(WO94/13804)。

【0019】

二重特異性抗体を用いる場合、二重特異性抗体は、従来型の二重特異性抗体であってもよく(これは、種々の方法で製造することができ(Hollinger & Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449(1993))、例えば化学的に又はハイブリッドハイブリドーマから製造することができる)、又は上記の二重特異性抗体フラグメントのいずれかであってもよい。全体抗体よりscFv二量体又はダイアボディを使用することが好適であり得る。ダイアボディ及びscFvは、可変ドメインのみを用いてFc領域なしで構築することが可能であり、抗イデオタイプ反応の影響を低減できる可能性がある。その他の形態の二重特異性抗体としては、Trauneckerら, EMBO Journal 10:3655-3659(1991)に記載される単鎖「Janusins」が挙げられる。

二重特異性ダイアボディは、二重特異性全体抗体とは対照的に、E. coliにおいて容易に構築して発現させることが可能であるため、有用であり得る。適切な結合特異性を有するダイアボディ(及び多くのその他のポリペプチド、例えば抗体フラグメント)は、ライブラリからファージディスプレイを用いて容易に選択することができる(WO94/13804)。ダイアボディの1つのアームが、例えば抗原Xに対する特異性を有して、一定に維持されるべき場合、他のアームが変化するライブラリを作製することができ、適切な特異性の抗体を選択する。

【0020】

「抗原結合性ドメイン」は、抗原の一部又は全てに特異的に結合するか又は抗原の一部又は全てに相補的である領域を含んでなる抗体の部分である。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定の一部(エピトープと呼ばれる)のみに結合してもよい。抗原結合性ドメインは、1又は2以上の抗体可変ドメインにより提供されてもよい。抗原結合性ドメインは、抗体軽鎖可変領域(VL)及び抗体重鎖可変領域(VH)を含んでなり得る。

「特異的」は、一般には、特異的結合対の1つのメンバーが特異的結合パートナー以外の分子に対する有意な結合を示さず、例えば、任意の他の分子と約30%未満、好ましくは20%未満、10%未満又は1%未満の交差反応性を有する状況をいうために用いられる。この用語はまた、例えば抗原結合性ドメインが、(幾つかの抗原が有する)特定のエピトープに特異的である場合に適用可能である。この場合、抗原結合性ドメインを有する特異的結合性分子は、該エピトープを有する種々の抗原に結合可能である。

「単離された」とは、本発明の特異的結合性分子又は該結合性分子をコードする核酸が好ましくは本発明に従うものである状況をいう。分子及び核酸は、一般には、天然の環境又は(製造がインビトロ又はインビボで行われる組換えDNA技術による場合に)その製造環境(例えば細胞培養物)中に見い出される物質であって、天然に結合又は会合している物質(例えば、他のポリペプチド又は核酸)を含まないか実質的に含まない。特異的結合性分子及び核酸は、希釈剤又はアジュバントと共に製剤化されてもよく、実用目的では依然として単離されてもよい - 例えば、分子は、イムノアッセイ用マイクロタイタープレートを被覆するために用いる場合、通常、ゼラチン又はその他のキャリアと混合され、又は、診断又

10

20

30

40

50

は治療に用いる場合、薬学的に許容され得るキャリア又は希釈剤と混合される。特異的結合性分子は、天然に又は異種真核細胞系によりグリコシル化されていてもよいし、(例えば、原核細胞中での発現により製造する場合)グリコシル化されていなくてもよい。

「に実質的に」とは、本発明のCDR領域が図1a及び1cbの特定された領域と同一か又は高度に相同であることを意味する。「高度に相同」とは、CDRに1~5、1~4、1~3、2又は1つの置換がなされてもよいことを企図しているものである。

【0021】

本発明はまた、図1及び2に記載のアミノ酸配列並びに前記配列に対して実質的な同一性を有する配列、例えば前記配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%又は99%の同一性を有する配列を有するポリペプチドをその範囲内に含む。

10

可変ドメインは、任意の生殖細胞系列又は再配置ヒト可変ドメインから取得してもよいし、又は既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインであってもよい。本発明の配列は、CDR3領域を欠いている可変ドメインのレパートリに、組換えDNA技術、例えばStemmer(Nature 370:389-391(1994))(これは当該技法を ϕ -ラクターマーゼ遺伝子に関して記載するが、本アプローチは抗体の創出に用い得ることが観察されている)により開示されるシャッフリング又はコンビナトリアル技法を用いて、導入される。

更なる代替の方法は、全体可変ドメイン内に変異を作製するためのランダム変異誘発(例えばSC104 VH又はVL遺伝子のランダム変異誘発)を用いて、本発明の配列を有する新規VH又はVL領域を創出することである。この技法は、(エラープルーンPCRを用いた)Gramら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580(1992))により記載されている。

20

用い得る別の方法は、VH又はVL遺伝子のCDR領域に変異誘発を指向させることである。この技法は、Barbasら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994))及びSchierら(J. Mol. Biol. 263:551-567(1996))により記載される。

【0022】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的部分は、一般に、少なくとも、3つのCDR領域を介在するフレームワーク領域と共に含んでなる。この部分はまた、第1及び第4のフレームワーク領域のいずれか一方若しくは両方の少なくとも約50%を含んでなり得、当該50%は第1のフレームワーク領域のC末端側50%及び第4のフレームワーク領域のN末端側50%である。可変ドメインの実質的部分のN末端又はC末端での追加残基は、天然に存在する可変ドメイン領域と通常は結合していないものであってもよい。例えば、組換えDNA技法によってなされる本発明の特異的結合性分子の構築は、クローニング又は他の操作工程(本発明の可変ドメインを更なるタンパク質配列(免疫グロブリン重鎖を含む)と連結するためのリンカーの導入を含む)を容易にするために導入されたリンカー、他の可変ドメイン(例えば、ダイアボディの製造における)又は下記でより詳細に記載するタンパク質標識によりコードされるN末端又はC末端残基の導入をもたらしてもよい。

30

好ましくは、特異的結合性分子は、図1に実質的に記載されるVL及びVH領域についてのアミノ酸配列に基づく一対の結合性ドメインを含んでなる。これら配列のいずれかに基づく単一の結合性ドメインは、本発明の更なる観点を構成する。図1に実質的に記載されるVH領域についてのアミノ酸配列に基づく結合性ドメインの場合、免疫グロブリンVHドメインは特異的様式で標的抗原に結合可能であることが知られているので、当該結合性ドメインはターゲティング剤として用い得る。

40

【0023】

本発明の特異的結合性分子は、抗体の定常領域又はその部分を更に含んでなり得る。例えば、図1に示すVL領域に基づく特異的結合性分子は、C末端部で、抗体軽鎖定常ドメイン(ヒトC_H1又はC_H2鎖を含む)に付着されてもよい。同様に、図1に示すVH領域に基づく特異的結合性分子は、C末端部で、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgE及びIgM並びに任意のアイソタイプサブクラス、特にIgG1及びIgG4に由来する免疫グロブリン重鎖の全体又は部分に付着されてもよい。

50

本発明の特異的結合性分子は、追加的に、機能的標識で標識されていてもよい。この機能的標識としては、毒素(例えばリシン)及びプロドラッグを活性薬剤に変換することができる酵素(例えば細菌性カルボキシペプチダーゼ又はニトロレダクターゼ)が挙げられる。加えて、特異的結合性分子は、化学療法剤若しくは細胞毒性物質(例えばカリケアミシン)又は放射性標識(例えば⁹⁰Y又は¹³¹I)に付着又は会合され得る。

更に、本発明の特異的結合性分子は、追加の治療用薬剤又はターゲティング部分と組み合わせられていてもよい。特異的結合性分子と組み合わせ得る治療用薬剤としては、免疫調整剤及びエフェクター、放射性化合物、酵素(例えば、パーフォリン)又は化学療法剤(例えば、シスプラチン)が挙げられる。毒性効果が確実に所望の位置で発揮されるために、毒物は、緩徐に放出されるように特異的結合性分子に連結されたリポソームの内部に存在し得る。このことにより、人体における輸送の間の損傷効果が防止され、該当する抗原提示細胞への特異的結合性分子の結合後に、毒物が最大効果を有することが保証される。

10

【0024】

他の適切な治療用薬剤として、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：

- ・小分子細胞傷害性物質、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有する分子量700ダルトン未満の化合物。このような化合物はまた、細胞傷害性効果を有することができる毒性金属を含有し得る。更に、これら小分子細胞傷害性物質にはまた、プロドラッグ、すなわち、生理学的条件下で崩壊又は変換して細胞傷害性物質を放出する化合物が含まれると理解される。このような物質の例として、シスプラチン、メイタンシン(maytansine)誘導体、ラケルマイシン(rachelmycin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、ドセタキセル、エトポシド、ゲムシタピン、イホスファミド、イリノテカン、メルファラン、ミトキサントロン、ソルフィマーソディウムホトフィリンII(sorfiner sodiumphotofrin II)、テモゾロマイド(temozolmide)、トポテカン、トリメトレキサート(trimetreate)、ラルブレート(larbourlate)、オーリスタチンE(auristatin E)、ピンクリスチン及びドキシソルピシンが挙げられる；

20

- ・ペプチド細胞毒素、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有するタンパク質又はそのフラグメント。例えば、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス細菌外毒素A、DNAアーゼ及びRNAアーゼ；

- ・放射性核種、すなわち、1又は2以上の粒子若しくは粒子又は線の同時放射を伴って崩壊する元素の不安定同位体。例えば、ヨウ素¹³¹I、レニウム¹⁸⁶Rn、インジウム¹¹¹In、イットリウム⁹⁰Y、ビスマス²¹⁰Bi及び²¹³Bi、アクチニウム²²⁵Ac及びアスタチン²¹³At；高親和性TCR又はその多量体へのこれら放射性核種の結合を容易にするために、キレート化剤が使用されてもよい；

30

- ・免疫刺激物質、すなわち、免疫応答を刺激する免疫エフェクター分子。例えば、サイトカイン(例えばIL-2及びIFN- γ)、

- ・スーパー抗原及びその変異体；

- ・TCR-HLA融合体、例えば、ペプチドが一般的なヒト病原体、例えばエプスタインバーウイルス(EBV)に由来するペプチド-HLA複合体との融合体；

- ・ケモカイン、例えばIL-8、血小板第4因子、メラノーマ増殖刺激タンパク質など；

- ・抗体又はそのフラグメント。抗T細胞又はNK細胞決定基抗体(例えば、抗CD3、抗CD28又は抗CD16)が挙げられる；

40

- ・抗体様結合特性を有するオルターナティブタンパク質足場

- ・補体活性化物質；

- ・異種タンパク質ドメイン、同種タンパク質ドメイン、ウイルス性/細菌性タンパク質ドメイン、ウイルス性/細菌性ペプチド。

【0025】

特異的結合性分子と組み合わせ得るターゲティング部分としては、下記のものが挙げられる：

- ・TCR(/ 及び / TCRを含む)

- ・標的細胞に提示される抗原(細胞表面抗原及び細胞内抗原に由来しMHC/HLAとの複合

50

体として細胞表面に提示されるペプチドを含む)を認識し、これに結合する抗体又はそのフラグメント；

- ・抗体様結合特性を有するオルターナティブタンパク質足場。

【0026】

更に、本発明の特異的結合性分子は、単独で投与されてもよいし、又は他の治療との組合せで、治療すべき病的状態に依存して、同時又は逐次のいずれかで投与されてもよい。よって、本発明は、腫瘍の治療における同時、別々又は逐次の使用のための組合せ製剤として、本発明の特異的結合性分子及び活性薬剤を含有する製品を更に提供する。活性薬剤としては、5-フルオロウラシル、シスプラチン、マイトマイシンC、オキサリプラチン及びタモキシフェン(これらは、本発明の結合性分子と相乗的に作用し得る)を含む化学療法剤又は細胞毒性が挙げられる。他の活性薬剤としては、適切な用量の疼痛緩和薬、例えば非ステロイド系抗炎症薬(例えばアスピリン、パラセタモール、イブプロフェン又はケトプロフェン)又はオピエート(例えばモルヒネ)又は制吐剤を挙げ得る。

10

本発明の特異的結合性分子は、通常、特異的結合性分子に加えて少なくとも1つの成分を含み得る医薬組成物の形態で投与される。医薬組成物は、活性成分に加えて、薬学的に許容され得る賦形剤、希釈剤、キャリア、緩衝剤、安定化剤又は当業者に周知の他の物質を含み得る。このような物質は非毒性であるべきであり、活性成分の効力に干渉すべきではない。キャリア又は他の物質の正確な性質は、投与経路(経口又は注射、例えば静脈内注射であり得る)に依存する。

【0027】

注射が本組成物の治療的投与についての一次経路であるが、カテーテル又は他の外科的チューブ類による送達もまた用いられる。幾つかの適切な投与経路としては、静脈内、皮下及び筋肉内投与が挙げられる。液体製剤は、粉体制剤から再構成後に使用され得る。

20

静脈内注射又は患部での注射のためには、活性成分は、パイロジェンフリーであり、適切なpH、等張性及び安定性を有する、非経口投与的に許容され得る水溶液の形態である。当業者は、例えば等張性ピヒクル、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液を用いて適切な溶液を調製することができる。防腐剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び/又は他の添加物も必要に応じて含まれ得る。

経口投与用医薬組成物は、錠剤、カプセル、粉剤又は液体形態であり得る。錠剤は、固体キャリア(例えばゼラチン)又はアジュバントを含み得る。液体医薬組成物は、一般に、液体キャリア、例えば水、石油、動物性又は植物性油、鉱油又は合成油を含んでなる。生理学的食塩水溶液、デキストロース若しくは他の糖溶液又はグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールが含まれ得る。製剤が液体である場合、例えば、非ホスフェート緩衝剤を含む生理学的塩溶液(pH6.8~7.6)又は凍結乾燥粉剤であり得る。

30

【0028】

組成物はまた、血液を含む或る特定の組織に配置されたミクロスフェア、リボソーム、他のマイクロ粒子送達システム又は持続放出製剤により投与されてもよい。持続性放出キャリアの適切な例としては、共有製品(shared article)、例えば坐薬又はマイクロカプセルの形態の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。埋め込み可能な又はマイクロカプセル状の持続放出マトリクスとしては、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号；EP-A-0058481)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタミン酸のコポリマー(Sidmanら, Biopolymers 22(1): 547-556, 1985)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はエチレンビニル酢酸(Langerら, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277, 1981、及びLanger, Chem. Tech. 12:98-105, 1982)が挙げられる。ポリペプチドを含有するリボソームは、周知の方法により調製される：DE 3,218,121A；Epsteinら, PNAS USA, 82: 3688-3692, 1985；Hwangら, PNAS USA, 77: 4030-4034, 1980；EP-A-0052522；E-A-0036676；EP-A-0088046；EP-A-0143949；EP-A-0142541；JP-A-83-11808；米国特許第4,485,045号及び同第4,544,545号。通常、リボソームは、脂質含量が約30モル%以上のコレステロールである(選択すべき比率はポリペプチドの最適な漏出速度

40

50

について調整される)小さな(約200~800)単層タイプのものである。

組成物は、所望の部位に局在する様式で投与されてもよいし、該当する細胞を標的する様式で送達されてもよい。

組成物は、好ましくは、個体に「治療有効量」(当該個体に有益性を示すに十分な量)で投与される。投与する実際の量並びに投与の速度及び時間経過は、治療すべき対象の性質及び重篤度に依存する。治療の処方、例えば用量の決定などは、総合医又は他の医師の担当事項であり、代表的には治療すべき疾患、個々の患者の状態送達部位、投与方法及び医師に知られるその他の因子を考慮する。

【0029】

最適な用量は、幾つかのパラメータ(例えば、年齢、性別、体重、治療すべき病的状態の重篤度、投与する活性成分及び投与経路を含む)に基づいて医師が決定することができる。一般には、レセプターの飽和を可能とするポリペプチド及び抗体の血清濃度が望ましい。通常、約0.1nMを超える濃度が十分である。例えば、用量100mg/m²の抗体は、約20nMの血清濃度を約8日間もたす。

10

凡その指針として、抗体の用量は、週ごとに10~300mg/m²の量であり得る。等用量の抗体フラグメントは、シアリルテトラオシル炭化水素セラミドの飽和を可能とする濃度を超えて血清レベルを維持するために、より高頻度の間隔で使用すべきである。

組成物の用量は、当業者である維持に周知であるように、結合性分子の特性、例えば結合活性及びインビボ血漿半減期、製剤中のポリペプチドの濃度、投与経路、投薬の部位及び速度、患者の臨床的耐性、患者を苦しめている病理学的状態などに依存する。例えば、用量300µg/患者/投与の抗体が好ましいが、投薬は、投与あたり約10µg~6mgの範囲であり得る。一連の逐次投与の間に異なる投薬量を用いる；医師は、最初の投与に続いて、比較的低用量の抗体でブースト投与してもよい。

20

【0030】

本発明の結合性分子は、全体的又は部分的に化学合成により作製されてもよい。結合性分子は、十分に確立された、標準的な液相又は(好ましくは)固相ペプチド合成法により容易に製造することができる。この方法の一般的な説明は広く入手可能である(例えば、J.M. Stewart及びJ.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois(1984), in M. Bodanzsky及びA. Bodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York(1984); 及びApplied Biosystems 430A Users Manual, ABI Inc., Foster City, California)。又は、結合性分子は、溶液中で、液相法により又は固相、液相及び溶液化学の任意の組合せにより、例えば先ず、それぞれのペプチド部分を製造した後、望ましく適切な場合には存在する保護基の除去後に、それぞれカルボン酸若しくはスルホン酸又はその反応性誘導体の反応により残基Xを導入することによって、製造し得る。

30

本発明による結合性分子を製造する別の簡便な方法は、発現系において核酸を用いて、当該分子をコードする核酸を発現させることである。

本発明は更に、本発明の特異的結合性分子をコードする単離核酸を提供する。核酸には、DNA及びRNAが含まれる。好適な観点において、本発明は、上記の本発明の特異的結合性分子をコードする核酸を提供する。当業者は、本発明の特異的結合性分子を依然として提供し、該核酸に対する置換、欠失及び/又は付加を決定することができる。

40

【0031】

本発明はまた、少なくとも1つの上記核酸を含んでなるプラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態である構築物を提供する。本発明はまた、1又は2以上の上記構築物を含んでなる組換え宿主細胞を提供する。上記の通り、本発明の特異的結合性分子をコードする核酸、並びに特異的結合性分子をコードする核酸からの発現を含んでなる特異的結合性分子の製造方法は本発明の観点を構成する。発現は、簡便には、適切な条件下で、核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することにより達成し得る。発現により産生後、特異的結合性分子は、必要に応じて、任意の適切な技法を用いて単離及び/又は精製した後に使用してもよい。

50

種々の宿主細胞におけるポリペプチドのクローニング及び発現のための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母及びバキュロウイルスの系が挙げられる。当該分野において異種ポリペプチドの発現に利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベイビーハムスター肝臓細胞、NSOマウスメラノーマ細胞その他の多くの細胞が挙げられる。一般的な好適な細菌宿主はE. coliである。原核細胞、例えばE. coliにおける抗体及び抗体フラグメントの発現は、当該分野において十分に確立されている。概説として、例えばPluckthun, Bio/Technology 9:545-551(1991)を参照。培養中の真核細胞における発現もまた、特異的結合性分子の製造のための選択肢として、当業者に利用可能である。最近の概説としては、例えばReff, Curr. Opin. Biotech. 4:573-576(1993); Trillら, Curr. Opin. Biotech. 6:553-560(1995)を参照。

10

【0032】

適切なベクターは、必要に応じて、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアダニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及びその他の配列を含む適切な調節配列を含有して選択又は構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス性ベクター、例えばファージ又はファージミドであり得る。更なる詳細については、例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)を参照。例えば核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入及び遺伝子発現並びにタンパク質の分析における、核酸の操作のための多くの公知の技法及びプロトコルは、Ausubelら編, Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, John Wiley & Sons(1992)に記載されている。

20

よって、本発明の1つの更なる観点は、本明細書に開示される核酸を含有する宿主細胞を提供する。尚更なる観点は、前記核酸を宿主細胞に導入することを含む方法を提供する。導入には、任意の利用可能な技法を用い得る。真核細胞については、適切な技法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、及びレトロウイルス又は他のウイルス、例えばワクシニアを用いるか、昆虫細胞についてはバキュロウイルスを用いる形質導入が挙げられ得る。細菌細胞については、適切な技法としては、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション及びバクテリオファージを用いるトランスフェクションが挙げられ得る。導入に続いて、例えば宿主細胞を遺伝子発現のための条件下で培養することにより、核酸からの発現を引き起こすか又は許容してもよい。

30

本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム(例えば染色体)中に組み込まれてもよい。組み込みは、標準的な技法に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を含ませることにより促進させ得る。

本発明はまた、上記の特異的結合性分子又はポリペプチドを発現させるために、上記の構築物を発現系において用いることを含んでなる方法を提供する。

【0033】

1つの更なる観点において、下記を含んでなる二機能性結合性分子が提供される：

- i) T細胞レセプター(TCR)又は抗体；及び
- ii) 第1の観点に従う、CD3に結合する特異的結合性分子。

40

第1の観点に関する上記の任意の全ての特徴がこの更なる観点に等しく適用可能であることが理解される。

ターゲティング部分は、T細胞レセプター(TCR)、抗体又は抗体フラグメントであり得る。

抗CD3及びターゲティング部分の配置は、任意の公知の形式であることができる(例えば、Brinkmanら, MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212に記載の形式、図2)。

T細胞レセプター(TCR)は、ヘテロ二量体 / 又は / TCRポリペプチド対であり得る。T細胞レセプター(TCR)は単鎖TCRポリペプチドであり得る。

【0034】

CD3に結合する特異的結合性分子は、T細胞レセプター(TCR)の 又は 鎖のC又はN

50

末端に融合されてもよい。好ましくは、CD3エフェクターは、TCRの鎖のN末端に融合される。二機能性結合性分子は、TCR-Vaが抗CD3-VLに付着し、TCR-Vbが抗CD3-VHに付着するか、又はその逆であるダイアボディの形態であり得る。

幾つかの場合では、CD3に結合する特異的結合性分子は、ターゲッティング部分のC又はN末端に融合され得る。他の場合では、CD3に結合する特異的結合性分子は、ターゲッティング部分C又はN末端にリンカーを介して融合される。

CD3に結合する特異的結合性分子は、T細胞レセプター(TCR)又はTCR様抗体にリンカー(ポリペプチドリッカーであり得る)を介して融合され得る。ポリペプチドリッカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから作られている点で、可撓性である。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定される。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は5~10アミノ酸長である。リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長であり得る。好適なリンカーとしては、任意にその他のアミノ酸が付加されていてもよい式(GGGGS)_nを有する配列が挙げられる。

10

【0035】

TCRは、鎖の定常領域と鎖の定常領域との間に非天然型ジスルフィド結合を含み得る。

TCRは、ペプチド抗原と複合体化したMHCに結合し得る。好ましくは、ペプチド抗原は任意の疾患関連抗原である。好ましくは、ペプチド抗原は任意の腫瘍関連抗原である。好ましくは、ペプチド抗原は、WO2011001152、WO2017109496、WO2017175006及びWO2018234319に記載のような、GP100、NYESO、MAGEA4又はPRAMEに由来するペプチドである。

20

適切なTCRは、WO2011001152、WO2017109496、WO2017175006及びWO2018234319において規定されるアミノ酸配列を有し得る。

TCRは、下記のとおりのアミノ酸配列：

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIMGDEQKGD
IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGSAPIRFGPGTRLTVTEDLKN
VFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLK
EQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSA
EAWGRAD

30

又は上記配列に少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有し得る。

【0036】

二機能性結合性分子は、下記のとおりのアミノ酸配列：

AIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYSTGYAMNWVRQAPGKGLEWVA
LINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWY
FDVWGGQTLTVTSSGGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDP
GQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGG
SAPIRFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSW
WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGL
SENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRAD

40

又は上記配列に少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有し得る。

或いは、二機能性結合性分子は、下記のとおりのアミノ酸配列：

AIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYSTGYAMNWVRQAPGKGLEWVA
LINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWY

50

FDVWGGQTLVTVSSGGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDP
 GQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGG
 SAPIRFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSW
 WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGL
 SENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRAD

又は上記配列に少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有し得る。

【0037】

特異的結合性分子又は二機能性結合性分子の表現型上サイレントなバリエーションもまた本明細書に開示される。本明細書で用いる場合、用語「表現型上サイレントなバリエーション」は、1又は2以上の異なるアミノ酸変化(置換、挿入及び欠失を含む)をその可変ドメインに組み込まれた特異的結合性分子又は二機能性結合性分子であって、前記変化を有しない対応する分子又はポリペプチドに類似する表現型を有する分子をいうと理解される。

10

表現型上サイレントなバリエーションは、1若しくは2以上の保存的置換及び/又は1若しくは2以上の寛容される置換を含有していてもよい。許容される置換は、下記の「保存的」の定義に該当しないにもかかわらず表現型上サイレントである置換を意味する。当業者は、種々のアミノ酸が類似する特性を有し、よって「保存的」であることを理解する。タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのそのような1又は2以上のアミノ酸は、該タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの所望の活性を消失させないで1又は2以上の他のそのようなアミノ酸で置換し得る場合が多い。

【0038】

よって、アミノ酸グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)は、互いに置換し得る場合が多い。これら可能な置換のうち、(相対的に短い側鎖を有するので)グリシン及びアラニンを互いの置換に用い、(疎水性である、より長い脂肪族側鎖を有するので)バリン、ロイシン及びイソロイシンを互いの置換に用いることが好ましい。互いに置換し得る場合が多い他のアミノ酸として：フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸)；リジン、アルギニン及びヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸)；アスパラギン酸及びグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸)；アスパラギン及びグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸)；並びにシステイン及びメチオニン(イオウ含有側鎖を有するアミノ酸)が挙げられる。本発明の範囲内のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸を用いて行い得ることを理解すべきである。例えば、本明細書では、アラニンのメチル基はエチル基で置換されてもよく及び/又は軽微な変化がペプチド骨格になされてもよい。天然又は合成のアミノ酸が用いられているか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

20

30

【0039】

このような性質の置換は、「保存的」又は「半保存的」アミノ酸置換と呼ばれることがある。したがって、本発明は、上記のアミノ酸配列のいずれかを含んでなるが、該配列中に1若しくは2以上の保存的置換及び/又は1若しくは2以上の寛容される置換を有し、その結果、特異的結合性分子又は二機能性結合性分子のアミノ酸配列が上記の特異的結合性分子又は二機能性結合性分子に対して少なくとも80%の同一性、例えば90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有する特異的結合性分子又は二機能性結合性分子の使用にまで拡張される。

40

「同一性」は、当該分野において公知のように、2若しくは3以上のポリペプチド配列間又は2若しくは3以上のポリヌクレオチド配列間での配列比較により決定される両配列間の関係性である。当該分野において、同一性はまた、妥当な場合、ポリペプチド配列間又はポリヌクレオチド配列間の、配列の並びの一致性によって決定される配列関連性の程度を意味する。2つのポリペプチド配列間又は2つのポリヌクレオチド配列間の同一性を測定する方法は幾つか存在するが、同一性の決定に一般に用いられる方法は、コンピュータプログラム化されている。2つの配列間の同一性を決定する好ましいコンピュータプログラムとしては、GCGプログラムパッケージ(Devereuxら, Nucleic acid Research, 1

50

2, 387(1984)、BLASTP、BLASTN及びFASTA(Atschulら, J. Molec. Biol. 215, 403(1990))が挙げられるが、これに限定されない。

【0040】

CLUSTALプログラムのようなプログラムを用いてアミノ酸配列を比較することができる。このプログラムはアミノ酸配列を比較し、必要な場合にはいずれかの配列にスペースを挿入して最適な整列を見出す。最適な整列についてアミノ酸の同一性又は類似性(同一性+アミノ酸タイプの保存)を算出することができる。BLASTxのようなプログラムは、類似する配列を最も長く整列させ、そのフィッティングに対して値を割り当てる。よって、各々が異なるスコアを有する幾つかの類似領域を見出せる比較を行うことができる。いずれのタイプの同一性分析も本発明において企図されている。

10

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント同一性は、最適比較を目的として配列を整列させ(例えば、最良整列のために第1の配列にギャップを導入することができる)、対応する位置でアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較することにより決定する。「最良整列」は、最も高いパーセント同一性をもたらす2つの配列の整列である。パーセント同一性は、比較する配列中の同一アミノ酸残基又はヌクレオチドの数により決定する(すなわち、%同一性 = 同一位置の数/位置の総数 × 100)。

【0041】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、当業者に公知の数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列を比較する数学的アルゴリズムの例は、Karlin及びAltschul(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載されるように改変されたKarlin及びAltschul(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムである。Altschulら(1990), J. Mol. Biol. 215:403-410のBLASTn及びBLASTpプログラムには、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性の決定は、BLASTnプログラムを用いて行うことができる。2つのタンパク質配列間のパーセント同一性の決定は、BLASTpプログラムを用いて行うことができる。

20

比較目的でギャップを有する整列を得るためには、Altschulら(1997), Nucleic acid Res. 25:3389-3402に記載されるようにGapped BLASTを利用することができる。或いは、PSI-Blastを用いて、分子間の遠い関連性を検出する累次サーチを行うことができる(前出)。BLAST、Gapped BLAST及びPSI-Blastプログラムを用いる場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータを用いることができる(例えば、BLASTp及びBLASTn)。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照。デフォルトの一般的パラメータとしては、例えば、Word Size = 3、Expect Threshold = 10を挙げ得る。パラメータは短い入力配列について自動的に調節されるように選択し得る。配列比較に利用される数学的アルゴリズム別の例は、Myers及びMiller, CABIOS(1989)のアルゴリズムである。CGC配列整列ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)には、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。当該分野において公知の他の配列分析アルゴリズムとしては、Torellis及びRobotti(1994), Comput. Appl. Biosci., 10:3-5に記載されるADVANCE及びADAM;並びにPearson及びLipman(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載されるFASTAが挙げられる。FASTAにおいて、ktupは、サーチの感度及び速度を設定するコントロールオプションである。本開示においてパーセント同一性を評価する目的には、デフォルトパラメータを用いるBLASTpを比較法として使用する。加えて、記載したパーセント同一性がアミノ酸について非整数値である場合、得られた値は小数点以下を切り捨てて整数とする(すなわち、25アミノ酸の配列が90%配列同一性を有すると「22.5」となるが、「22」とする)。したがって、提供する実施例では、25アミノ酸のうち22がマッチする配列は、90%以内の配列同一性である。

30

40

【0042】

当業者に自明であるように、C末端及び/又はN末端に提供される配列は、特異的結合性分子の機能的特性に実質的に影響を及ぼすことなく、1、2、3、4、5又は6以上の残基を短縮化又は延長することができる。C末端及び/又はN末端に提供される配列は、1、

50

2、3、4又は5残基が短縮化又は延長され得る。このような全てのバリエーションは本発明に包含される。

任意の適切な方法を用いることを条件に、変異(保存的及び寛容される置換、挿入及び欠失を含む)を配列に導入してもよい。このような方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をベースにする方法、制限酵素ベースのクローニング又はライゲーション非依存性クローニング(LIC)手順が挙げられるが、これらに限定されない。これら方法は、多くの標準的な分子生物学の教科書に詳述されている。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及び制限酵素ベースのクローニングに関する更なる詳細については、Sambrook及びRussell(2001)、Molecular Cloning - A Laboratory Manual(第3版) CSHL Pressを参照。ライゲーション非依存性クローニング(LIC)手順についての更なる情報は、Rashtchian(1995)、Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6に見出すことができる。本発明により提供される配列は、固相合成又は当該分野において公知の任意の他の適切な方法から得てもよい。

【0043】

ターゲティング部分は、抗体又はそのフラグメントであり得る。好ましくは、抗体(そのフラグメント、誘導体及びバリエーションを含む)は、罹患細胞又はガン細胞に提示される抗原に結合する。

本発明の特異的結合性分子又は二機能性結合性分子は、ヒト又は動物対象におけるガン又は感染性疾患の診断方法及び治療方法において用いることができる。ガンの例としては、液体腫瘍(例えば、白血病、リンパ腫及びミエローマ)及び固体腫瘍(膀胱ガン、乳ガン、子宮頸ガン、結腸直腸ガン、食道ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膠芽腫、肝臓ガン、メラノーマ、肺ガン、卵巣ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、肉腫、甲状腺ガンを含む)が挙げられるが、これらに限定されない。感染性疾患の例としては、HIV、HBV、TB、HCVが挙げられるが、これらに限定されない。

診断に用いる場合、本発明の特異的結合性分子又は二機能性結合性分子は、検出可能な標識、例えば放射性標識、例えば ^{131}I 又は ^{99}Tc で標識化されてもよく、これら標識は、抗体イメージングの分野において公知である従来化学を用いて本発明の特異的結合性分子に付着させ得る。標識としてまた、酵素標識、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられる。標識として、更に、化学的部分、例えばビオチン(これは、特定の同族の検出可能な部分、例えば標識化アビジンに結合することにより検出され得る)が挙げられる。

本発明の特異的結合性分子又は二機能性結合性分子、特に可溶性形式の特異的結合性分子は、高収率精製が可能であり得る。収率は、精製プロセスの間に保持される材料の量に基づいて決定し得(すなわち、リフォールディング前に得られた可溶化した物質の量に対する、精製プロセスの終時に得られる正確にフォールディングした物質の量)、及び/又は収率は、元の培養体積に対する、精製プロセスの終時に得られる正確にフォールディングした物質の量に基づいて決定し得る。高収率は、1%以上、より好ましくは5%以上、又はより高い収率を意味する。高収率は、1 mg/ml以上、より好ましくは3 mg/ml以上、5 mg/ml以上、又はより高い収率を意味する。

【0044】

結合親和性(平衡定数 K_D に反比例する)及び結合半減期($T_{1/2}$ と表される)を決定する方法は当業者に公知である。好ましくは、結合親和性及び結合半減期は、(例えばそれぞれBIAcore装置又はOctet装置を使用する)表面プラズモン共鳴(SPR)又はBio-Layer Interferometry(BLI)を用いて測定する。親和性が2倍になれば K_D は $1/2$ になることが理解される。 $T_{1/2}$ は $\ln 2$ /解離速度(k_{off})として算出する。よって、 $T_{1/2}$ が2倍になれば k_{off} は $1/2$ になる。個々の測定値間の変動、特に20時間を超える解離時間を有する相互作用についての変動を説明するため、所与の分子の結合親和性及び/又は結合半減期は、数時間、例えば3時間以上、同じアッセイプロトコルを用いて測定して、結果の平均をとり得る。2つのサンプル(すなわち、2つの異なる分子及び/又は同じ分子の2つの調製物)間の結合データを比較するため、測定値は同じアッセイ条件(例えば温度)、例えばWO2018234319に記載される条件を用いて測定することが好ましい。

【0045】

10

20

30

40

50

本明細書に記載のTCRはヘテロ二量体であり得る。ヘテロ二量体TCRは、通常、鎖TRAC定常ドメイン配列及び/又は鎖TRBC1若しくはTRBC2定常ドメイン配列を含んでなる。定常ドメインは全長であってもよく(このことは、細胞外、膜貫通及び細胞質ドメインが存在することを意味する)、可溶性形式(すなわち、膜貫通ドメインも細胞質ドメインも有しない形式)であってもよい。一方又は両方の定常ドメインは、天然型TRAC及び/又はTRBC1/2配列に関して変異、置換又は欠失を含有し得る。用語TRAC及びTRBC1/2はまた、天然の多形バリエーション、例えばTRACの4位でのN Kを包含する(Bragadoら, *International immunology*. 1994 Feb;6(2):223-30)。

可溶性TCRに関しては、及び鎖定常ドメイン配列は、TRACのエキソン2のCys4とTRBC1又はTRBC2のエキソン2のCys2との間の天然型ジスルフィド結合を欠失させるように短縮化又は置換により改変されていてもよい。及び/又は鎖定常ドメイン配列は、例えばWO 03/020763に記載されるように、それぞれの定常ドメインの残基同士間に導入されたジスルフィド結合を有していてもよい。及び定常ドメインは、TRACのThr 48の位置及びTRBC1又はTRBC2のSer 57の位置でのシステイン残基の置換により改変され、該システインがTCRの定常ドメインと定常ドメインとの間のジスルフィド結合を形成していてもよい。TRBC1又はTRBC2は、追加的に、定常ドメインの75位でのシステインアラニン変異及び定常ドメイン89位でのアスパラギンアスパラギン酸変異を含んでいてもよい。ヘテロ二量体に存在する細胞外定常ドメインの一方又は両方は、一方又は両方のC末端で、例えば15まで又は10まで又は8までのアミノ酸が欠失されていてもよい(短縮化)。鎖細胞外定常ドメインのC末端は、8アミノ酸が欠失されていてもよい(短縮化)。可溶性TCRは、好ましくは、治療用薬剤及び/又は検出可能な標識と組み合わせられる。

【0046】

ヘテロ二量体TCRの定常ドメインは、膜貫通及び細胞質ドメインの両方を有する全長であり得る。これらTCRは、それぞれの及び定常ドメイン間に天然に見出されるものに対応するジスルフィド結合を含有し得る。追加的に又は代替的に、非天然型ジスルフィド結合は細胞外定常ドメイン間に存在し得る。前記非天然型ジスルフィド結合はWO03020763及びWO06000830に更に説明されている。非天然型ジスルフィド結合は、TRACの位置Thr 48とTRBC1又はTRBC2の位置Ser 57との間にあり得る。定常ドメインの一方又は両方は、天然型TRAC及び/又はTRBC1/2配列に対して1又は2以上の変異置換又は欠失を含有し得る。全長定常ドメインを有するTCRは、養子療法における使用に好適である。

本明細書に記載のTCRは単鎖形式であってもよい。単鎖形式としては、V-L-V、V-L-V、V-C-L-V、V-L-V-C又はV-C-L-V-Cタイプ(ここで、V及びVはそれぞれTCR及び可変領域であり、C及びCはそれぞれTCR及び定常領域であり、Lはリンカー配列である)のTCRポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない(Weidanzら(1998), *J Immunol Methods*. Dec 1;221(1-2):59-76; Epeleら(2002), *Cancer Immunol Immunother*. Nov;51(10):565-73; WO 2004/033685; WO9918129)。存在する場合、1つ又は両方の定常ドメインは全長であり得、又は上記のとおり、短縮化され及び/又は変異を含有し得る。好ましくは、単鎖TCRは可溶性である。単鎖TCRは、WO 2004/033685に記載されるように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有してもよい。単鎖TCRは、WO2004/033685; WO98/39482; WO01/62908; Weidanzら(1998), *J Immunol Methods* 221(1-2): 59-76; Hooら(1992), *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4759-4763; Schodin(1996), *Mol Immunol* 33(9): 819-829)に更に記載されている。

【0047】

特異的結合性分子又は二機能性結合性分子は、PK調整成分と(共有結合的又はその他の様式で)結合されていてもよい。PK調整成分の例としては、PEG(Dozierら(2015), *Int J Mol Sci*. Oct 28;16(10):25831-64及びJevsevarら(2010), *Biotechnol J*. Jan;5(1): 113-28)、PASylation(Schlapschyら(2013), *Protein Eng Des Sel*. Aug;26(8):48

9-501)、アルブミン及びアルブミン結合性ドメイン(Dennisら(2002), J Biol Chem. Sep 20;277(38):35035-43)及び/又は非構造化ポリペプチド(Schellenbergerら(2009), Nat Biotechnol. Dec;27(12):1186-90)が挙げられるが、これらに限定されない。更なるPK調整成分としては抗体Fcフラグメントが挙げられる。

本明細書で用いる場合、用語「抗体」は前記のようなフラグメント及びバリエーションを含む。本明細書に記載の組成物及び方法における使用に適切な抗体フラグメント及びバリエーション/アナログとしては、数例挙げるとすれば、ミニボディ、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、dsFv及びscFvフラグメント、ダイアボディ、ナノボディ™(Ablynx(ベルギー)から市販され、ラクダ科動物(例えば、ラクダ又はラマ)抗体に由来する合成の単鎖免疫グロブリン可変重鎖ドメインを含む構築物)及びドメイン抗体(Domantis(ベルギー));これは、親和性成熟単鎖免疫グロブリン可変重鎖ドメイン又は免疫グロブリン可変軽鎖ドメインを含む)又は抗体様結合特性を示す代替のタンパク質足場、例えばアフィボディ(Affibody(スウェーデン));工学的に操作されたプロテインA足場を含む)若しくはアンチカリリン(Anticalins)(Pieris(ドイツ));工学的に操作されたアンチカリリンを含む)が挙げられる。抗体はまた、TCR様抗体を含む(Changら, Expert Opin Biol Ther. 2016 Aug;16(8):979-87及びDahanら, Expert Rev Mol Med. 2012 Feb 24;14:e6)。

【0048】

ターゲティング部分及び第1の観点の特異的結合性分子の連結は、共有結合的又は非共有結合的付着を介するものであり得る。共有結合的付着は、直接的であってもよいし、リンカー配列を介する間接的であってもよい。リンカー配列は、通常、可撓性を限定する虞れがある嵩高い側鎖を有しないアミノ酸、例えばグリシン、アラニン及びセリンから主に作られている点で、可撓性である。或いは、より大きい剛性を有するリンカーが望ましくあり得る。リンカー配列の使用可能な又は最適な長さは、容易に決定され得る。多くの場合、リンカー配列は、約12アミノ酸長以下、例えば10アミノ酸長以下又は2~10アミノ酸長、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30アミノ酸長である。本発明のTCRに使用され得る適切なリンカーの例としては、GGGSGGGG、GGGGS、GGGSG、GGSSG、GSGGG、GSGGGP、GGEPS、GGEGGGP及びGGEGGGSEGGGS(WO2010/133828に記載のもの)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

当該分野において周知であるように、特異的結合性分子又は二機能性結合性分子は翻訳後修飾に付されていてもよい。グリコシル化はそのような修飾の1つであり、アミノ酸鎖中の規定のアミノ酸へのオリゴ糖部分の共有結合的付着を含む。例えば、アスパラギン残基又はセリン/スレオニン残基は、周知のオリゴ糖付着位置である。特定のタンパク質のグリコシル化状況は、タンパク質配列、タンパク質コンホメーション及び特定の酵素の利用可能性を含む幾つかの因子に依存する。更に、グリコシル化状況(すなわち、オリゴ糖タイプ、共有結合及び付着の総数)は、タンパク質の機能に影響することがある。したがって、組換えタンパク質を製造するときには、グリコシル化の制御が望ましい場合が多い。制御されたグリコシル化は、抗体ベースの治療薬を改善するために用いられる(Jefferisら(2009), Nat Rev Drug Discov Mar;8(3):226-34.)。可溶性TCRについて、グリコシル化は、例えば特定の細胞株(哺乳動物細胞株、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又はヒト胚性肝臓(HEK)細胞を含むがこれらに限定されない)を用いることにより、又は化学的修飾により制御されてもよい。このような修飾は、グリコシル化が薬物動態を改善し、免疫原性を低減させ及び天然型ヒトタンパク質をより厳密に模擬することができるので、望ましくあり得る(Sinclair and Elliott(2005), Pharm Sci. Aug; 94(8):1626-35)。

【0050】

患者への投与のために、本発明の分子(好ましくは、検出可能な標識若しくは治療用薬剤と組み合わせられているもの)又は本発明の核酸、発現ベクター若しくは細胞は、1又は2以上の薬学的に許容され得るキャリア又は賦形剤と共に、滅菌医薬組成物の部分として提供

されてもよい。この医薬組成物は、(患者への望ましい投与方法に依存して)任意の適切な形態であり得る。医薬組成物は、単位剤形で提供されてもよく、一般には密封容器内で提供され、キットの一部として提供されてもよい。このようなキットは、(必須ではないが)通常、使用指示書を含む。キットは複数の単位剤形を含み得る。

患者への投与のために、本発明の特異的結合性分子、二機能性結合性分子、核酸、発現ベクター又は細胞は、1又は2以上の薬学的に許容され得るキャリア又は賦形剤と共に、滅菌医薬組成物の部分として提供されてもよい。この医薬組成物は、(患者への望ましい投与方法に依存して)任意の適切な形態であり得る。医薬組成物は、単位剤形で提供されてもよく、一般には密封容器内で提供され、キットの一部として提供されてもよい。このようなキットは、(必須ではないが)通常、使用指示書を含む。キットは複数の単位剤形を含み得る。

10

【0051】

医薬組成物は、任意の適切な経路、例えば非経口経路(皮下、筋内、髄腔内又は静脈内経路を含む)、経腸(経口又は直腸経路を含む)、吸入又は鼻内経路による投与に適合していてもよい。このような組成物は、薬学分野において公知の任意の方法により、例えば活性成分をキャリア又は賦形剤と滅菌条件下で混合することにより、製造されてもよい。

本発明の物質の投薬量は、治療すべき疾患又は異常、治療すべき個体の年齢及び状態などに依存して広範に変化し得る。本発明の分子に適切な用量範囲は、25ng/kg~50µg/kg又は1µg~1gであり得る。医師が、使用すべき適切な投薬量を最終的には決定する。

本発明の特異的結合性分子、二機能性結合性分子、医薬組成物、ベクター、核酸及び細胞は、実質的に純粋な形態、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%純粋で提供されてもよい。

20

治療方法は、追加の抗新生物薬を別途に、組合せで又は逐次に投与することを更に含んでいてもよい。このような薬剤の例は、当該分野において公知であり、免疫活性化剤及び/又はT細胞調整剤を含み得る。

第1の観点に関して上述した核酸、発現ベクター、宿主細胞及び製造方法は、本明細書に記載の他の観点に関して企図される。

本発明の各々の観点の好適な特徴は、他の観点の各々についても同様である(ただし、必要な変更は加える)。本明細書において言及した先行技術文献は、法が許容する最大範囲で参照により組み込まれる。

30

【0052】

図面の説明

図1は、改善したUCHT1バリエーションのVH及びVLアミノ酸配列を提供する。CDRには下線が付されている。変異を太字で示す。

図2は、改善した抗CD3 scFvバリエーションが組み込まれたTCR-抗CD3融合タンパク質の例示のアミノ酸配列を提供する。

図3は、改善した抗CD3 scFvバリエーション1を組み込まれたTCR-CD3融合体が非変異抗CD3(A)に比して良好な治療窓を有すること及び改善した抗CD3 scFvバリエーション2を組み込まれたTCR-CD3融合体が非変異抗CD3(B)に比してより高いE_{max}を有することを証明する。

40

図4は、UCHT1バリエーション1及びバリエーション2を組み込まれたTCR-CD3融合体により媒介される改善したT細胞殺傷性を証明する。

【実施例】

【0053】

本発明を、以下の非限定的実施例において更に説明する。

実施例

以下の実施例は、本発明の二機能性結合性分子(TCR-抗CD3-二重特異性タンパク質とも呼ばれ得る)を説明する。

50

1) 改善した抗CD3を有するTCR-抗CD3二重特異性融合タンパク質の製造

TCR及び抗CD3 scFvを含んでなる融合タンパク質は、当該分野において公知である(例えば、WO2011001152、WO2017109496、WO2017175006及びWO2018234319を参照)。これら分子はヒト化UCHT1 scFvフラグメントを含んでなる。

本実施例では、抗CD3バリエーション1(T165A)又は抗CD3バリエーション2(T165A+I202F)のいずれかを組み込んだ、WO2018234319に記載するTCR-抗CD3融合タンパク質のバリエーションを作製した。標準的な変異誘発及びクローニング法を用いて変異を導入した(例えば、Sambrook, Joseph.(2001), Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載の方法)。T165A及びT165A+I202FのVL及びVHのアミノ酸配列を図1に示す。図1に示す配列が組み込まれたTCR-抗CD3のアミノ酸配列を図2に示す。

T165A、T165A+I202F又は非変異(WT)UCHT1 scFvを含んでなるTCR-抗CD3融合タンパク質を、E. coliにおいて封入体として発現させ、その後、リフォールディングさせ、精製した(WO2018234319、実施例2に記載の方法を用いた)。

【0054】

2) バリエーションT165A及びT165A+I202Fを有するTCR-抗CD3により媒介される治療窓及び最大T細胞活性化の増大

A) IFN- 放出

上記のTCR-抗CD3融合タンパク質を、抗原陽性細胞及び抗原陰性細胞の存在下でCD3+T細胞の活性化を媒介する能力について評価した。インターフェロン- (IFN-) 放出をT細胞活性化に関する読取値として用いた。

ヒトIFN- ELISPOTキット(BD Biosciences)を製造業者の指示に従って用いてアッセイを行った。簡潔には、Mel624メラノーマ細胞を抗原陽性標的細胞として用いた。Granta-519 B細胞リンパ腫細胞を抗原陰性標的細胞として用いた。標的細胞を、アッセイ培地(10%熱不活化FBS及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミンを含有するRPMI 1640)中 1×10^6 /mlの密度で作製し、50,000細胞/ウェルにて体積50 μ lでプレートした。新鮮なドナー血液から単離した末梢血単核細胞(PBMC)をCD3+エフェクター細胞として用いて、体積50 μ l中35,000細胞/ウェルにてプレートした。TCR-抗CD3タンパク質を10nM~0.0001nMの最終濃度に滴定して、ウェルに体積50 μ lで添加した。

【0055】

プレートを製造業者の指示に従って調製し、発色させた。標的細胞、エフェクター細胞及び融合タンパク質を含有するウェルを、アッセイ培地で最終体積200 μ lにした。全ての反応は3連で行った。コントロールウェルは、融合タンパク質、エフェクター細胞又は標的細胞のいずれかを省いて調製した。プレートを一晚インキュベートした(37 / 5% CO₂)。翌日、プレートを洗浄緩衝剤(1 \times PBSサシェ、0.05% Tween-20含有、脱イオン水中に作製)で3回洗浄した。次いで、一次検出抗体を各ウェルに体積50 μ lで加えた。プレートを室温にて2時間インキュベートした後、再度3回洗浄した。50 μ lの希釈ストレプトアビジン-HRPを各ウェルに添加し、室温にて1時間インキュベートすることにより二次検出を行い、洗浄工程を繰り返した。使用前15分以内に、1滴(20 μ l)のAEC色素原を各1mlのAEC基質に加えて混合し、50 μ lを各ウェルに添加した。スポット発色を定期的にモニターし、プレートを水道水で洗浄して、発色反応を終止させた。次いで、プレートを室温にて少なくとも2時間乾燥させた後、CTLアナライザーをImmunospotソフトウェア(Cellular Technology Limited)と共に用いてスポットをカウントした。PRISMソフトウェアを用いてデータを調製し、分析した。

治療窓は、dTCR-抗CD3バリエーション及びWTにより媒介される抗原陽性細胞に対するT細胞活性化の相対的効力を決定し、Prismにおいて曲線フィッティング後にEc50値を比較することによって算出した。抗原陰性細胞については、明確なEc50値を得ることができず、そのため、「最小交差反応性濃度」を、スポットの閾値数(例えば25スポット/ウェル)を設定して、当該数を最初に超える濃度を補間により特定することによって決定した。

【0056】

10

20

30

40

50

結果

T165A

確固な治療窓決定を得るために、各々で非変異体及びT165Aが隣り合っている4つのAg+プレート及び4つのAg-プレートから平均してデータを得た。図3Aは1つのプレートから得た曲線を示す。個々のプレートの各々についてのデータを下記の表に示す。

【表1】

	プレート1	プレート2	プレート5	プレート6
標的細胞	Mel 624 (Ag+)	Mel 624 (Ag+)	Mel 624 (Ag+)	Mel 624 (Ag+)
エフェクター細胞	ドナー1	ドナー1	ドナー2	ドナー2
T165A EC50	116pM	137pM	160pM	446pM
Wt EC50	62.2pM	60.9pM	79.3pM	72.1pM
T165A相対的効力	0.54	0.44	0.50	0.16

10

【表2】

	プレート3	プレート4	プレート7	プレート8
標的細胞	Granta 519 (Ag-)	Granta 519 (Ag-)	Granta 519 (Ag-)	Granta 519 (Ag-)
エフェクター細胞	ドナー1	ドナー1	ドナー2	ドナー2
T165A 交差反応性濃度	1.56nM	7.16nM	0.698nM	0.615nM
Wt交差反応性濃度	0.165nM	0.811nM	0.206nM	0.152nM
T165A相対的交差反応性	0.11	0.11	0.29	0.25

20

抗原陽性細胞に対する相対的効力(すなわち、WTのEc50/T165AのEc50)は平均で0.41であった。抗原陰性細胞に対する相対的交差反応性(すなわち、25スポットが得られたWTの濃度/25スポットが得られたT165Aの濃度)は平均で0.19であった。これらデータにより、T165Aの治療窓はWTの治療窓より約2×大きいことが証明される。

【0057】

T165A+I202F

図3Bは、T165A+I202FバリエーションがWTに比してより高い最大T細胞活性化(Emax)をもたらすことを示す。この場合、治療窓はWTに類似している。これらデータにより、T165A+I202Fは、T細胞の活性化に関して、より効率的であることが証明される。

30

【0058】

B) T細胞媒介殺傷

TCR-抗CD3融合タンパク質が再指向化T細胞の抗原陽性及び抗原陰性腫瘍細胞殺傷を媒介する能力を、IncuCyteプラットフォーム(Essen BioScience)を用いて調べた。このアッセイは、顕微鏡による、カスパーゼ-3/7(アポトーシスのマーカー)の放出の実時間検出を可能にする。

方法

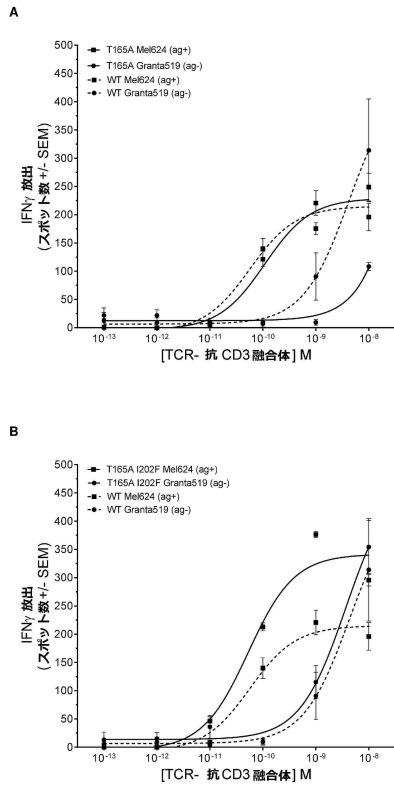
CellPlayer 96ウェルCaspase-3/7アポトーシスアッセイキット(Essen BioScience, Cat. No.4440)を製造業者のプロトコルに従って用いてアッセイを行った。簡潔には、標的細胞であるMel624(抗原陽性)又はMDA MB 231(抗原陰性)細胞を、10,000細胞/ウェルでプレートし、一晚インキュベートして接着させた。TCR-抗CD3融合タンパク質を0.05nM~0.0125nMの濃度(抗原陽性細胞について)及び20nM~0.125nMの濃度(抗原陰性細胞について)で加えた。CD3+エフェクター細胞(PBMC)を、10:1のエフェクター:標的細胞比(100,000細胞/ウェル)で用いた。NucViewアッセイ試薬を30µMで調製し、25µlを各ウェルに加え、最終体積を150µlとした(最終濃度5µMとなった)。プレートをIncuCyte装置内に置き、3~5日間にわたって定期的に撮像した。各画像においてアポトーシス細胞の数を決定し、mm²あたりオブジェクト数として記録した。アッセイは3連で行った。PRISMソフトウェアを用いてグラフを作成した。

40

50

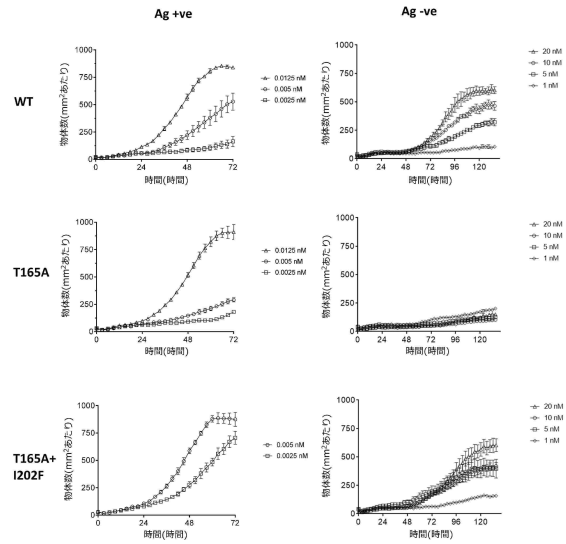
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



10

20

【 配 列 表 】

0007530904000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		Y
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
		A 6 1 K	39/395		D
		A 6 1 P	35/00		

ン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

ディークマン, ネレ

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

ハーパー, スティーブン

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

カーク, ピーター ベネディクト

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

マルバニー, レイチェル

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

オドワイヤー, ローナン

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

(72)発明者

ロバートソン, イアン バトラー

イギリス、オックスフォードシャー オーエックス14 4アールワイ アビンドン、ミルトン パーク、パーク ドライブ 1 0 1、イムノコア リミテッド

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 国際公開第2018/234319 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 P 2 1 / 0 0

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

A 6 1 K 4 7 / 6 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq