

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-145244
(P2016-145244A)

(43) 公開日 平成28年8月12日(2016.8.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B063
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4C084
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4H045
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-80105 (P2016-80105)	(71) 出願人	511001758
(22) 出願日	平成28年4月13日 (2016.4.13)		エマージェント プロダクト デベロッ メント シアトル, エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2014-179868 (P2014-179868) の分割		アメリカ合衆国 ワシントン 98121 , シアトル, フォース アベニュー 2401, スイート 1050
原出願日	平成21年10月9日 (2009.10.9)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/104,608		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成20年10月10日 (2008.10.10)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/148,341	(72) 発明者	バレリー オデガード
(32) 優先日	平成21年1月29日 (2009.1.29)		アメリカ合衆国 ワシントン 98103 , シアトル, 49ティーエイチ スト リート 912
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TCR複合体免疫治療

(57) 【要約】

【課題】免疫学的に活性な組換え結合タンパク質（特に、TCR複合体またはその構成要素に特異的な一本鎖融合タンパク質）、ならびに、自己免疫疾患および他の障害または状況（例えば、移植片拒絶）を処置するための組成物および方法を提供する。

【解決手段】本発明は、TCR複合体またはその構成要素に結合する融合タンパク質、そのような融合タンパク質を含む組成物および単位投薬形態、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび発現ベクター、固形臓器移植片の拒絶を減少させるためかまたは自己免疫疾患を処置するための方法、ならびにT細胞活性化を検出するための方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、2008年10月10日に出願された米国仮特許出願番号61/104,608、および2009年1月29日に出願された米国仮特許出願番号61/148,341の米国特許法119条(e)項の下での利益を主張し、これらの仮出願は、その全容が参照によって本明細書に援用される。

10

【0002】

(配列表に関する声明)

本願に関する配列表は、紙の複写物の代わりにテキスト形式で提供され、本明細書中に参考として援用される。その配列表を含むテキストファイルの名称は、910180__416PC__SEQUENCE__LISTING.txtである。このテキストファイルは、622KBであり、2009年10月9日に作成され、本明細書の出願と同時にEFS-Webを介して電子的に提出されている。

【0003】

(背景)

20

(技術分野)

本開示は、免疫学的に活性な組換え結合タンパク質、および特に、TCR複合体またはその構成要素(例えば、CD3)に特異的な一本鎖融合タンパク質に関する。本開示は、自己免疫疾患および他の障害または状況(例えば、移植片拒絶)を処置するための組成物および方法にも関する。

【背景技術】

【0004】

(関連技術の説明)

抗CD3モノクローナル抗体を用いてヒトT細胞上のTCR複合体を標的とすることが、長い間、臓器の同種移植片拒絶の処置に用いられてきた。ヒトCD3に特異的なマウスモノクローナル抗体、例えば、OKT3(非特許文献1)は、そのような処置法の第1世代だった。OKT3は、強い免疫抑制効果を有するが、その免疫原性および分裂促進の潜在能力に関連する重篤な副作用が原因でその臨床上の使用が阻まれていた(非特許文献2)。OKT3は、それ自体の迅速なクリアランスおよび中和を促進する抗グロブリン応答を誘導した(非特許文献3)。さらに、OKT3は、インビトロにおいてT細胞増殖およびサイトカイン産生を誘導し、インビボにおいて大量のサイトカインを放出させた(非特許文献4)。そして、このサイトカイン放出(「サイトカインストーム」とも呼ばれる)は、発熱、悪寒、頭痛、悪心、嘔吐、下痢、呼吸困難、敗血性髄膜炎および低血圧を特徴とする「インフルエンザ様」症候群をもたらした(Chatenoud, 2003)。そのような重篤な副作用を理由に、OKT3を移植においてより広範に使用すること、なら

30

40

【0005】

その第1世代の抗CD3モノクローナル抗体の副作用を減少させるために、マウス抗CD3モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)をヒトIgG配列に移植するだけでなく、FcRに結合しない変異をFcに導入することによって、第2世代の遺伝的に操作された抗CD3モノクローナル抗体が開発された(非特許文献5;非特許文献6)。マウスモノクローナル抗体をヒト化することにより、免疫原性が低下し、mAb半減期が改善される(同文献)。さらに、FcRに結合しないmAbは、インビボにおいてサイトカイン放出および急性毒性を誘導する潜在能力が低くなった(非特許文献7)。しかしながら

50

、サイトカイン放出は、低レベルであったとしても、なおも用量を制限させるものであり、非常に低薬物用量（マイクログラム／患者）でも毒性である（非特許文献 8）。

【0006】

抗CD3／TCRに向けた治療を改善するためには、いくつかの困難が存在している。例えば、抗CD3モノクローナル抗体によって媒介される免疫抑制の機序は、複雑であり、完全に理解されていない。そのような抗体は、4つの機序：細胞コーティング、細胞枯渇、TCRの下方調節（down-modulation）および細胞シグナル伝達（後半の2つが主要な機序として機能する）を通じて機能すると考えられている（非特許文献 9）。さらに、CD3／TCRに向けた治療が有効であるためには、サイトカインストームの誘導およびインビボにおけるT細胞の活性化が必要であると考えられている（非特許文献 10）。最後に、インビトロにおいて「活性化しない」と報告されている第2世代の抗CD3モノクローナル抗体は、インビボでは、なおもサイトカインストームを誘導した。

10

【0007】

現在、いくつかの抗CD3に向けられた抗体が、自己免疫疾患、炎症性疾患および移植患者において使用するために診療所で試験されている。これらの抗体には、hOKT3 1（Ala-Ala）（Macrogenics）、ビジリズマブ（visilizumab）（Nuviion（登録商標）、PDL）、TRX-4（Tolerx）およびNI-0401（NovImmune）が含まれる。しかしながら、これらの抗体の各々で処置された患者は、サイトカイン放出に関連する有害事象（中程度から重篤）、および時折、この患者集団に代表的に観察されるものよりも高いウイルスの再活性化を起こした。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Kungら、Science（1979）206：347-9

【非特許文献 2】Chatenoud、Nature Reviews（2003）3：123-132

【非特許文献 3】Chatenoudら、Eur. J. Immunol.（1982）137：830-8

【非特許文献 4】Hirschら、J. Immunol（1989）142：737-43, 1989

30

【非特許文献 5】Coleら、Transplantation（1999）68：563

【非特許文献 6】Coleら、J. Immunol.（1997）159：3613

【非特許文献 7】Chatenoudら、N. Engl. J. Med.（1989）320：1420

【非特許文献 8】Plevyら、Gastroenterology（2007）133：1414-1422

【非特許文献 9】Chatenoud、Nature Reviews（2003）123-132

40

【非特許文献 10】Carpenterら、J. Immunology（2000）165：6205-13

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

サイトカイン放出に関連する有害事象が、現在のT細胞抗体療法および他の生物学的療法に関係することを考慮に入れると、引き続き代替療法が必要である。本発明は、そのようなニーズを満たすものであり、さらに他の関連する利点を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

50

(簡単な要旨)

本開示は、TCR複合体またはその構成要素に結合する融合タンパク質、そのような融合タンパク質を含む組成物および単位投薬形態、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび発現ベクター、固形臓器移植片の拒絶を減少させるためかまたは自己免疫疾患を処置するための方法、ならびにT細胞活性化を検出するための方法を提供する。

【0011】

1つの態様において、本開示は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって：(a) TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、(b) リンカーポリペプチド、(c) 必要に応じて、(i) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換；(ii) 234～238位における1つ以上のアミノ酸置換または欠失；(iii) 253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失；(iv) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234～238位における1つ以上の置換または欠失；(v) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換または欠失；(vi) 234～238位における1つ以上のアミノ酸置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失；または(vii) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234～238位における1つ以上のアミノ酸置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失を含む免疫グロブリンC_H2領域ポリペプチド、ならびに(d) 免疫グロブリンC_H3領域ポリペプチドを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなる融合タンパク質を提供し、ここで、この融合タンパク質は、サイトカインストームを誘導しないか、または最小限の検出可能なサイトカイン放出を誘導し、その免疫グロブリンC_H2領域内のアミノ酸残基は、EUナンバリングシステムによってナンバリングされる。請求項2～20および本明細書中に記載されるさらなる融合タンパク質が、提供される。

10

20

【0012】

別の態様において、本開示は、本明細書中に提供される融合タンパク質および薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む組成物を提供する。

30

【0013】

別の態様において、本開示は、上で述べられた薬学的組成物を含む単位用量形態を提供する。

【0014】

別の態様において、本開示は、本明細書中に提供される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0015】

別の態様において、本開示は、発現制御配列に作動可能に連結された本明細書中に提供される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

40

【0016】

別の態様において、本開示は、固形臓器移植片の拒絶を減少させる方法を提供し、その方法は、固形臓器移植レシピエントに、有効量の本明細書中に提供される融合タンパク質を投与する工程を包含する。

【0017】

別の態様において、本開示は、自己免疫疾患(例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患、真性糖尿病、喘息および関節炎)を処置するための方法を提供し、その方法は、その必要のある患者に、有効量の本明細書中に提供される融合タンパク質を投与する工程を包含する。

【0018】

別の態様において、本開示は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結

50

合ドメインを含むタンパク質によって誘導されたサイトカイン放出を検出するための方法を提供し、その方法は：(a) マイトジェンで刺激(prime)されたT細胞を準備する工程、(b) 工程(a)の刺激されたT細胞を、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質(例えば、融合タンパク質および抗体)で処理する工程、および(c) 工程(b)において処理された刺激されたT細胞からのサイトカインの放出を検出する工程を包含する。

【0019】

別の態様において、本開示は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質によって誘導されたT細胞活性化を検出するための方法を提供し、その方法は：(a) マイトジェンで刺激されたT細胞を準備する工程、(b) 工程(a)の刺激されたT細胞を、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質(例えば、融合タンパク質および抗体)で処理する工程、および(c) 工程(b)において処理された刺激されたT細胞の活性化を検出する工程を包含する。

10

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

アミノ末端からカルボキシ末端に向かって：

(a) TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、

(b) リンカーポリペプチド、

(c) 必要に応じて、

20

(i) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234から238位における1つ以上の置換または欠失；

(ii) 234から238位における1つ以上の置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換；または

(iii) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234から238位における1つ以上の置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換

を含む免疫グロブリン C_{H2} 領域ポリペプチド、および

(d) 免疫グロブリン C_{H3} 領域ポリペプチド

を含む一本鎖融合タンパク質であって、ここで、該融合タンパク質は、サイトカイン放出を誘導しないか、または最小限の検出可能なサイトカイン放出を誘導し、該免疫グロブリン C_{H2} 領域内のアミノ酸残基は、EUNANバリングシステムによってナンバリングされる、一本鎖融合タンパク質。

30

(項目2)

上記結合ドメインが、上記TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する一本鎖Fv(scFv)である、項目1に記載の融合タンパク質。

(項目3)

上記TCR複合体またはその構成要素が、TCR、TCRまたはCD3である、項目2に記載の融合タンパク質。

(項目4)

40

上記scFvが、配列番号258~264に示されているアミノ酸配列のいずれか1つを含む、項目2に記載の融合タンパク質。

(項目5)

上記リンカーが、免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドである、項目1~4のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目6)

上記免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドが、野生型ヒトIgG1ヒンジ、少なくとも1つのシステインが変異したヒトIgG1ヒンジ、または野生型マウスIGHG2cヒンジである、項目5に記載の融合タンパク質。

(項目7)

50

上記免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドが、(a)配列番号212~218、300および379~434または(b)配列番号10のアミノ酸3~17に示されているアミノ酸配列のいずれか1つを含む、項目5に記載の融合タンパク質。

(項目8)

297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234から238位における1つ以上の置換または欠失を含む免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドを含む、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目9)

234~238位における1つ以上の置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換を含む免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドを含む、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

10

(項目10)

上記免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドが、297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234から238位における1つ以上の置換または欠失、および253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換を含む、項目8に記載の融合タンパク質。

(項目11)

297位における上記アミノ酸置換が、AsnからAlaへの置換である、項目1~8および10のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目12)

20

上記免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドが：

(i) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234、235、236または237位における1つのアミノ酸置換；

(ii) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234~237位の2つにおけるアミノ酸置換；

(iii) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234~237位の3つにおけるアミノ酸置換；

(iv) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234、235および237位におけるアミノ酸置換、ならびに236位におけるアミノ酸欠失；

(v) 234~237位の3つにおけるアミノ酸置換、ならびに318、320および322位におけるアミノ酸置換；または

30

(vi) 234~237位の3つにおけるアミノ酸置換、236位におけるアミノ酸欠失、ならびに318、320および322位におけるアミノ酸置換を含む、項目1~11のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目13)

配列番号102~104、75および375~378のいずれか1つに示されているような免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドを含む、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目14)

上記免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドが、ヒトIgG2 C_{H2}領域ポリペプチドであり、上記免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドが、ヒトIgG2 C_{H3}領域ポリペプチドである、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

40

(項目15)

上記免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドが、ヒトIgG4 C_{H2}領域ポリペプチドであり、上記免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドが、ヒトIgG4 C_{H3}領域ポリペプチドである、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目16)

上記融合タンパク質が、免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドを含まない、項目1~7のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

(項目17)

50

配列番号 11 ~ 16、74、101 および 307 ~ 309 のいずれか 1 つに示されているような配列を含む、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

(項目 18)

配列番号 80 ~ 97、265 ~ 299、304 および 306 のいずれか 1 つ、最初の 2 アミノ酸のリーダー配列を有しない配列番号 234、236、238、240 のいずれか 1 つ、または最初の 20 アミノ酸のリーダー配列を有しない配列番号 311、313、315、317、319、321、323、325 および 327 のいずれか 1 つに示されているような配列を含む、項目 1 に記載の融合タンパク質。

(項目 19)

上記融合タンパク質がさらに、T 細胞を活性化させないか、または最小限に活性化させる、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

(項目 20)

上記融合タンパク質がさらに、カルシウム流動の誘導、T 細胞レセプターシグナル伝達経路内の分子のリン酸化の誘導、同種抗原に対する T 細胞応答の阻止、抗原に対するメモリー T 細胞応答の阻止および上記 TCR 複合体の下方調節から選択される活性のうちの少なくとも 1 つを有する、項目 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

(項目 21)

項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、および薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤を含む、組成物。

(項目 22)

項目 21 に記載の薬学的組成物を含む、単位用量形態。

(項目 23)

項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

(項目 24)

発現制御配列に作動可能に連結された項目 23 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

(項目 25)

固形臓器移植片の拒絶を減少させる方法であって、固形臓器移植レシピエントに、有効量の、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、項目 21 に記載の組成物および項目 22 に記載の単位用量形態を投与する工程を包含する、方法。

(項目 26)

自己免疫疾患を処置するための方法であって、その必要のある患者に、有効量の、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、項目 21 に記載の組成物および項目 22 に記載の単位用量形態を投与する工程を包含する、方法。

(項目 27)

上記自己免疫疾患が、炎症性腸疾患である、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

上記炎症性腸疾患が、クローン病または潰瘍性大腸炎である、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

上記自己免疫疾患が、真性糖尿病、喘息または関節炎である、項目 26 に記載の方法。

(項目 30)

TCR 複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質によって誘導されたサイトカイン放出を検出するための方法であって：

(a) マイトジェンで刺激された T 細胞を準備する工程、

(b) 工程 (a) の刺激された T 細胞を、TCR 複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含む該タンパク質で処理する工程、および

(c) 工程 (b) において処理された、該刺激された T 細胞からのサイトカインの放出を検出する工程

を包含する、方法。

10

20

30

40

50

(項目31)

TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質によって誘導されたT細胞活性化を検出するための方法であって：

- (a) マイトジェンで刺激されたT細胞を準備する工程、
 - (b) 工程(a)の刺激されたT細胞を、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含む該タンパク質で処理する工程、および
 - (c) 工程(b)において処理された、該刺激されたT細胞の活性化を検出する工程
- を包含する、方法。

(項目32)

TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含む上記タンパク質が、項目1～20のいずれか1項に記載の融合タンパク質である、項目30または項目31に記載の方法。

10

(項目33)

TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含む上記タンパク質が、抗体である、項目30または項目31に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、PHAで刺激されたヒトT細胞を様々な抗体および小モジュール免疫薬small modular immunopharmaceutical (SMIPTM)製品で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「Rxなし」とは、ネガティブコントロールとして使用された、処理無しのことを指す。

20

【図2】図2は、混合リンパ球反応アッセイにおいて、応答物(responder)細胞を様々な抗体およびSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「MLR」とは、いかなる追加の処理も行わなかった混合リンパ球反応のことを指す。「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。「IgG2a」とは、10 μ g/ml IgG2a mAbで処理された応答物細胞のことを指す。

【図3】図3は、混合リンパ球反応アッセイにおいて、応答物細胞を様々な抗体およびSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「MLR」とは、いかなる追加の処理も行わなかった混合リンパ球反応のことを指す。「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。

30

【図4】図4は、メモリーT細胞をモノクローナル抗体および様々なSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「応答物(TTなし)」とは、破傷風トキソイドの非存在下における反応のことを指す。

【図5】図5Aおよび5Bは、(A)単離の直後(0日目)または(b)OKT3モノクローナル抗体または様々なOKT3 SMIP融合タンパク質で処理した4日後に染色されたヒトT細胞上のTCRおよびCD3のFACS分析のドットプロットである。

【図6】図6Aおよび6Bは、(A)単離の直後(0日目)または(B)OKT3 IgG1A AまたはOKT3 HM1 SMIP融合タンパク質で処理した4日後に染色されたヒトT細胞上のTCRおよびCD3のFACS分析のドットプロットである。

40

【図7】図7は、精製ヒトT細胞をモノクローナル抗体、抗体の組み合わせまたは様々なOKT3 SMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、経時的なカルシウム流動指示色素の蛍光の変化を示している。

【図8】図8Aおよび8Bは、ConAで刺激されたマウスT細胞をモノクローナル抗体(2C11 mAbおよびH57 mAb)またはSMIP融合タンパク質(2C11 Nu112およびH57 Nu112)で処理した後の、(A)IFN または(B)IP-10の放出を示している。

【図9】図9は、混合リンパ球反応アッセイにおいて、応答物細胞を様々な抗体またはSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージ

50

を示している。「Rのみ」とは、応答物細胞だけが存在する反応のことを指し；「Sのみ」とは、刺激物 (stimulator) 細胞だけが存在する反応のことを指し；「R:S」とは、応答物細胞と刺激物細胞の両方が存在する反応のことを指す。

【図10】図10Aおよび10Bは、様々な濃度の抗体 (H57mAb) および H57Null2 SMI P 融合タンパク質を静脈内投与した後の経時的な (A) 体重および (B) 臨床スコアの変化を示している。PBS および IgG2a をネガティブコントロールとして使用した。

【図11A】図11Aおよび11Bは、正常BALB/cマウスに抗TCR抗体 (H57mAb) または様々な濃度の抗TCR SMI P 融合タンパク質 (H57 Null2) を静脈内投与した2時間後、24時間後、72時間後の血清中の (A) IL-6 および (B) IL-4 の濃度を示している。マウスIgG2a抗体およびPBS (希釈剤) をネガティブコントロールとして使用した。

10

【図11B】図11Aおよび11Bは、正常BALB/cマウスに抗TCR抗体 (H57mAb) または様々な濃度の抗TCR SMI P 融合タンパク質 (H57 Null2) を静脈内投与した2時間後、24時間後、72時間後の血清中の (A) IL-6 および (B) IL-4 の濃度を示している。マウスIgG2a抗体およびPBS (希釈剤) をネガティブコントロールとして使用した。

【図12】図12は、様々な濃度の抗TCR SMI P 融合タンパク質 (H57 Null2) を静脈内投与した後の1日目または3日目のマウス脾臓に見られたH57 Null2 SMI P で覆われたT細胞のパーセンテージを示している。PBS および IgG2a をネガティブコントロールとして使用した。

20

【図13】図13は、急性移植片対宿主病 (aGVHD) のモデルにおいてドナー細胞を移入した後の14日間にわたるレシピエントマウスの開始体重からの変化のパーセンテージを示している。「ナイーブレシピエント」は、ネガティブコントロールとしてドナー細胞移入を受けなかったマウスであることを示す。レシピエントマウスを、H57 Null2 SMI P 融合タンパク質、デキサメタゾン (DEX) またはコントロール (PBS または IgG2a) で処置した。

【図14】図14A~14Cは、ドナー細胞移入後のそれぞれ14日目、14日目または7日目における (A) G-CSF、(B) KC または (C) IFN の血清濃度を示している。

30

【図15】図15は、ドナー細胞移入後の14日目におけるドナー:宿主リンパ球比を示している。「細胞移入なし」は、ドナー細胞を投与されなかったネガティブコントロールマウスであることを示す。PBS および IgG2a をコントロール処置として使用した。

【図16】図16は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG4 およびマウスIGHG2cのC_H2領域 (それぞれ配列番号64、66、68 および73) 間の配列アラインメントを示している。これらのアラインメントは、DNA STAR 5.03 (DNA STAR Inc.) の MegAlign プログラムのデフォルトパラメータを使用した Clustal W 法を用いて行った。ヒトIgG1 C_H2 のアミノ酸の位置は、Kabata に従う EU ナンバリングに基づいている (Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991) を参照のこと)。すなわち、ヒトIgG1の重鎖可変領域は、128アミノ酸長であると考えられるので、ヒトIgG1の定常領域における最もアミノ末端のアミノ酸残基は、129位である。他のC_H2領域のアミノ酸の位置は、それらとアラインメントされるヒトIgG1におけるアミノ酸残基の位置に基づいて示される。297位のAsn残基 (N297) は、下線が引かれ、太字で示されている。

40

【図17】図17は、混合リンパ球反応 (MLR) アッセイにおいて、応答物細胞を抗体またはSMI P 融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「R」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指し、「S

50

」とは、刺激物細胞だけが存在した反応のことを指し、「R + S」とは、いかなる追加の処理も行わなかった混合リンパ球反応のことを指し、「mu Ig G 2 b」とは、10 μg/ml マウス Ig G 2 b で処理された応答物細胞のことを指す。「コントロール S M I P」は、T細胞に結合しない s c F v 結合ドメインを有する S M I P 融合タンパク質である。C r i s - 7 I g G 1 N 2 9 7 A (配列番号 2 6 5) を用いて、これらの細胞を試験した。

【図 1 8】図 1 8 は、単離の直後に染色されたヒト T 細胞上の T C R および C D 3 の F A C S 分析のドットプロットを示している。上の 2 枚のパネルは、C r i s - 7 モノクローナル抗体で処理されたヒト T 細胞を示しており、下の 2 枚のパネルは、C r i s - 7 I g G 1 N 2 9 7 A (配列番号 2 6 5) による処理を示している。左のパネルは、処理当日 (0 日目) の細胞の分布を示しており、右のパネルは、処理の 2 日後 (2 日目) の細胞の分布を示している。

【図 1 9】図 1 9 は、ヒト T 細胞を B C 3 I g G 1 - N 2 9 7 A (配列番号 8 0, s c F v と C H 2 C H 3 ドメインとの間にヒンジとしてリンカー 8 7 を有する) で処理したことに起因する経時的なカルシウム流動指示色素の蛍光の変化を、ヒンジリンカー 8 7 を様々な長さの他のヒンジ (特に、配列番号 2 1 2 ~ 2 1 8 に対応する、それぞれリンカー 1 1 5 ~ 1 2 0 および 1 2 2) と交換した同じ融合タンパク質と比較して示している。

【図 2 0】図 2 0 は、M L R アッセイにおいて、応答物細胞を抗体または S M I P 融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化された T 細胞のパーセンテージを示している。「コントロール S M I P」とは、T細胞に結合しない s c F v 結合ドメインを有する S M I P 融合タンパク質のことを指す。「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。角括弧内の数字は、S M I P 融合タンパク質の配列識別番号である。

【図 2 1】図 2 1 は、M L R アッセイにおいて、応答物細胞を、様々なヒンジリンカーを含む B C 3 I g G 1 - N 2 9 7 A S M I P 融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化された T 細胞のパーセンテージを示している。

【図 2 2】図 2 2 は、M L R アッセイにおいて、応答物細胞をモノクローナル抗体 C r i s 7、キメラもしくはヒト化 C r i s 7 S M I P 融合タンパク質またはキメラ B C 3 S M I P 融合タンパク質 (配列番号 8 0) で処理したことに起因する、活性化された T 細胞のパーセンテージを示している。「コントロール S M I P」とは、T細胞に結合しない s c F v 結合ドメインを有する S M I P 融合タンパク質のことを指し、「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。角括弧内の数字は、S M I P 融合タンパク質の配列識別番号である。

【図 2 3】図 2 3 は、M L R アッセイにおいて、応答物細胞をヒト化 C r i s 7 I g G 1 - N 2 9 7、I g G 2 - A A - N 2 9 7 A および I g G 4 - A A - N 2 9 7 A、ならびに H M 1 S M I P 融合タンパク質またはキメラ C r i s 7 I g G 1 - N 2 9 7 A および H M 1 S M I P 融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化された T 細胞のパーセンテージを示している。「親 m A b」とは、C r i s 7 m A b のことを指し、「コントロール S M I P」とは、T細胞に結合しない s c F v 結合ドメインを有する S M I P 融合タンパク質のことを指す。

【図 2 4】図 2 4 は、P H A で刺激されたヒト T 細胞をヒト化 C r i s 7 (V H 3 - V L 1) I g G 1 - N 2 9 7 A またはヒト化 C r i s 7 (V H 3 - V L 2) I g G 1 - N 2 9 7 A S M I P 融合タンパク質で処理した後の、活性化された T 細胞のパーセンテージを示している。「コントロール S M I P」は、T細胞に結合しない S M I P 融合タンパク質である。

【図 2 5 A】図 2 5 A および 2 5 B は、P H A で刺激された T 細胞を様々なヒト化およびキメラ C r i s 7 S M I P 融合タンパク質、B C 3 S M I P 融合タンパク質 (配列番号 8 0)、ならびに様々な抗体 (B C 3 m A b、親 C r i s 7 m A b および N u v i o n F L) で再刺激した 2 4 時間後 (1 日目) および 7 2 時間後 (3 日目) における血清中の (A) I F N および (B) I L - 1 7 の濃度を示している。角括弧内の数字は、S M I P 融合タンパク質の配列識別番号である。

10

20

30

40

50

【図25B】図25Aおよび25Bは、PHAで刺激されたT細胞を様々なヒト化およびキメラCris7 SMI P融合タンパク質、BC3 SMI P融合タンパク質（配列番号80）、ならびに様々な抗体（BC3mAb、親Cris7mAbおよびNuvi on FL）で再刺激した24時間後（1日目）および72時間後（3日目）における血清中の（A）IFN および（B）IL - 17の濃度を示している。角括弧内の数字は、SMI P融合タンパク質の配列識別番号である。

【図26A】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26B】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26C】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26D】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26E】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26F】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26G】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質またはCris7mAbで24時間（d1）、48時間（d2）または72時間（d3）処理された初期のPBMCにおける、（A）IFN、（B）IL - 10、（C）IL - 1B、（D）IL - 17、（E）IL - 4、（F）TNF -、（G）IL - 6および（H）IL - 2のレベルを示している。

【図26H】図26A～26Hは、ヒト化Cris7（VH3 - VL1）IgG4 - AA - N297A SMI P融合タンパク質、ヒト化Cris7（VH3 - VL2）IgG4

10

20

30

40

50

- A A - N 2 9 7 A S M I P 融合タンパク質または C r i s 7 m A b で 2 4 時間 (d 1)、4 8 時間 (d 2) または 7 2 時間 (d 3) 処理された初期の P B M C における、(A) I F N 、(B) I L - 1 0、(C) I L - 1 B、(D) I L - 1 7、(E) I L - 4、(F) T N F - 、(G) I L - 6 および (H) I L - 2 のレベルを示している。

【図 2 7】図 2 7 は、I g G 2 a m A b (4 1 1 μ g)、H 5 7 m A b (5 μ g)、H 5 7 N u l l 2 S M I P 融合タンパク質 (3 0 0 μ g)、H 5 7 h a l f n u l l 1 S M I P 融合タンパク質 (3 0 0 μ g) または H 5 7 H M 2 S M I P 融合タンパク質 (3 0 0 μ g) を静脈内投与した後の経時的な体重の変化を示している。

【図 2 8】図 2 8 は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した 2 時間後の末梢血 T 細胞の濃度を示している。

【図 2 9】図 2 9 は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した 7 2 時間後の末梢 T 細胞の濃度を示している。

【図 3 0 A】図 3 0 A ~ 3 0 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 2 の濃度を示している。

【図 3 0 B】図 3 0 A ~ 3 0 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 2 の濃度を示している。

【図 3 0 C】図 3 0 A ~ 3 0 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 2 の濃度を示している。

【図 3 1 A】図 3 1 A ~ 3 1 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 1 B】図 3 1 A ~ 3 1 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 1 C】図 3 1 A ~ 3 1 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I L - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 A】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 B】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 C】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l 1 または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

10

20

30

40

50

【図33A】図33A～33Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のTNFの濃度を示している。

【図33B】図33A～33Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のTNFの濃度を示している。

【図33C】図33A～33Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のTNFの濃度を示している。

10

【図34A】図34A～34Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-4の濃度を示している。

【図34B】図34A～34Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-4の濃度を示している。

20

【図34C】図34A～34Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-4の濃度を示している。

【図35A】図35A～35Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

【図35B】図35A～35Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

30

【図35C】図35A～35Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

【図36A】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

40

【図36B】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図36C】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図37A】図37A～37Cは、IgG2a、H57 mAbおよびH57 Null2、half nullおよびHM2 SMIPを静脈内投与した2時間後(A)、24時

50

間後 (B) および 72 時間後 (C) の IL - 17 の濃度を示している。

【図 37B】図 37A ~ 37C は、IgG2a、H57mAb および H57 Null2、half null および HM2 SMIP を静脈内投与した 2 時間後 (A)、24 時間後 (B) および 72 時間後 (C) の IL - 17 の濃度を示している。

【図 37C】図 37A ~ 37C は、IgG2a、H57mAb および H57 Null2、half null および HM2 SMIP を静脈内投与した 2 時間後 (A)、24 時間後 (B) および 72 時間後 (C) の IL - 17 の濃度を示している。

【図 38A】図 38A ~ 38C は、図 27 で投薬されたように IgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half null または H57 HM2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 24 時間後 および (C) 72 時間後の血清中の IP - 10 の濃度を示している。

【図 38B】図 38A ~ 38C は、図 27 で投薬されたように IgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half null または H57 HM2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 24 時間後 および (C) 72 時間後の血清中の IP - 10 の濃度を示している。

【図 38C】図 38A ~ 38C は、図 27 で投薬されたように IgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half null または H57 HM2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 24 時間後 および (C) 72 時間後の血清中の IP - 10 の濃度を示している。

【図 39A】図 39A および 39B は、H57 - HM2 および H57 half null についての時間に対する平均血清濃度のグラフである。結果は、観察されたデータセットおよび WinNonLinTM ソフトウェアによって計算された予測値として表されている。Rs q 値 および Rs q 調整値は、HL_Lambda z の推定において使用された時点 (6.6 および 40.7 時間) の数値に対する調整の前および後の、末期排泄相 (terminal elimination phase) についての適合度統計量である。

【図 39B】図 39A および 39B は、H57 - HM2 および H57 half null についての時間に対する平均血清濃度のグラフである。結果は、観察されたデータセットおよび WinNonLinTM ソフトウェアによって計算された予測値として表されている。Rs q 値 および Rs q 調整値は、HL_Lambda z の推定において使用された時点 (6.6 および 40.7 時間) の数値に対する調整の前および後の、末期排泄相 (terminal elimination phase) についての適合度統計量である。

【図 40】図 40 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の G - CSF の濃度を示している。

【図 41】図 41 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の IFN - の濃度を示している。

【図 42】図 42 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の IL - 2 の濃度を示している。

【図 43】図 43 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の IL - 5 の濃度を示している。

【図 44】図 44 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の IL - 6 の濃度を示している。

【図 45】図 45 は、H57 - HM2 または H57 Null2 (各 200 μg) を静脈内投与した 15 分後、2 時間後、6 時間後、24 時間後 および 48 時間後の血清中の IL

10

20

30

40

50

- 10の濃度を示している。

【図46】図46は、H57-HM2またはH57 Null2(各200 μ g)を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-17の濃度を示している。

【図47】図47は、H57-HM2またはH57 Null2(各200 μ g)を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIP-10の濃度を示している。

【図48】図48は、H57-HM2またはH57 Null2(各200 μ g)を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図49】図49は、H57-HM2またはH57 Null2(各200 μ g)を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

【図50】図50は、応答物細胞をH57 Null2、H57 half null、H57-HM2、マウスIgG2a mAbまたはH57 mAbで処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。

【図51】図51は、応答物細胞をH57 Null2、H57 half null、H57-HM2またはH57 mAbで処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージ((R+S)-無処理=100%に正規化されたパーセンテージ)を示している。

【図52】図52は、H57 Null2、H57 half null、H57-HM2、マウスIgG2a mAb、H57 mAbまたは2C11 mAbの処理によって活性化された、ConAで刺激されたT細胞のパーセンテージを示している。

【発明を実施するための形態】

【0021】

(詳細な説明)

本開示は、小モジュール免疫薬(SMIPTM)製品の形態の、または独特のT細胞シグナル伝達プロファイルを誘導する、N末端からC末端方向と逆向きの方向でFcおよび結合ドメインを有するSMIP分子SMIP分子(PIMS)の形態の、TCR複合体に対する1つ以上の結合ドメインを含む融合タンパク質を提供する。このシグナル伝達プロファイルは、検出不可能の、または少量の、最小量のもしくはわずかなサイトカイン放出(すなわち、サイトカインストームが無いかまたは最小のサイトカインストーム)、カルシウム流動の誘導、T細胞を活性化させないままでのTCRシグナル伝達タンパク質のリン酸化、またはそれらの任意の組み合わせを特徴とする。そのようなシグナル伝達プロファイルは、モノクローナル抗体を用いても再現されないことから、SMIPまたはPIMSタンパク質がそれらの標的に結合することによって引き起こされる予想外のシグナル伝達のサイン(signaling signature)が証明される。現在、TCR複合体に対するタンパク質分子は、T細胞活性化とともに強力なT細胞シグナル(例えば、サイトカインストーム)を誘導するか、または架橋の非存在下では細胞に対してほとんど作用を有しないかのいずれかである。

【0022】

さらに、本開示は、そのような融合タンパク質をコードする核酸分子、ならびにそのようなタンパク質を組換え的に産生するためのベクターおよび宿主細胞、ならびに様々な治療への応用(疾患または状況(例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患および臓器移植片拒絶)の少なくとも1つの症状の処置ならびに回復を含む)において本開示の融合タンパク質を使用するための組成物および方法を提供する。

【0023】

本開示を詳細に示す前に、本明細書中で使用されるある特定の用語の定義を提供することが、本開示の理解に役立つ場合がある。さらなる定義が、本開示全体にわたって示される。

10

20

30

40

50

【0024】

本開示において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比の範囲または整数の範囲は、別段示されない限り、列挙された範囲内の任意の整数の値および適切な場合はその分数（例えば、ある整数の10分の1および100分の1）を含むと理解される。また、任意の物理的特徴（例えば、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚さ）に関して本明細書中で列挙される任意の値の範囲は、別段示されない限り、列挙された範囲内の任意の整数を含むと理解される。本明細書中で使用されるとき、「約」または「～から本質的になる」は、別段示されない限り、示された範囲、値または構造の±20%を意味する。本明細書中で使用されるとき、用語「含む(include)」および「含む(comprise)」は、同意語として使用される。用語「a」および「an」は、本明細書中で使用されるとき、列挙される構成要素の「1つまたはそれ以上」のことを指すと理解されるべきである。選択的な用語（例えば、「または」）の使用は、その選択的な用語が指示するものの一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。さらに、本明細書中に記載される構造および置換基の様々な組み合わせから得られる個別の化合物または化合物の群は、化合物または化合物の群の各々が個別に示されたかのように、同程度に本願によって開示されると理解されるべきである。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本発明の範囲内である。

10

【0025】

本開示の免疫グロブリン C_{H2} および C_{H3} 領域内アミノ酸残基は、別段示されない限り、EUナンバリングシステムによってナンバリングされる(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991)を参照のこと)。

20

【0026】

「小モジュール免疫薬(SMIPTM)タンパク質」とは、そのアミノ末端からカルボキシ末端に向かって：標的分子に特異的に結合する結合ドメイン、リンカーポリペプチド（例えば、免疫グロブリンヒンジまたはその誘導体）、免疫グロブリン C_{H2} ポリペプチドおよび免疫グロブリン C_{H3} ポリペプチドを含む一本鎖融合タンパク質のことを指す(米国特許公開第2003/0133939号、同2003/0118592号および同2005/0136049号を参照のこと)。

30

【0027】

「PIMSタンパク質」は、逆方向のSMIP分子であり、ここで、その結合ドメインは、融合タンパク質のカルボキシ末端に配置されている。PIMSタンパク質を作製するための構築物および方法は、PCT公開番号WO2009/023386に記載されている。通常、PIMS分子は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に向かって、任意の C_{H2} 領域ポリペプチド、 C_{H3} ドメイン、リンカーペプチド（例えば、免疫グロブリンヒンジ領域）および特異的な結合ドメインを含む一本鎖ポリペプチドである。

【0028】

本明細書中で使用されるとき、あるタンパク質は、そのタンパク質のいくつかのドメイン（例えば、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、リンカーポリペプチド、免疫グロブリン C_{H2} 領域および免疫グロブリン C_{H3} 領域）以外の部分（例えば、アミノ末端もしくはカルボキシ末端または2つのドメイン間のアミノ酸）が、あわせて、そのタンパク質の長さの多くとも20%（例えば、多くとも15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%または1%）に寄与し、そのタンパク質の活性（例えば、TCR複合体またはその構成要素に対する親和性、サイトカイン放出を誘導しない能力（または最小限の検出可能なサイトカイン放出を誘導する能力）、カルシウム流動またはT細胞レセプターシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導する能力、同種抗原に対するT細胞応答を阻止する能力、抗原に対するメモリーT細胞の応答を阻止する能力、および細胞のTCR複合体の下方調節）に実質的に影響しない（すなわち、その活性を

40

50

50%超（例えば、40%、30%、25%、20%、15%、10%または5%超）低下させない）場合、上記いくつかのドメイン「から本質的になる」。ある特定の形態において、融合タンパク質は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、リンカーポリペプチド、任意の免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドおよび免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドから本質的になる。そのような分子は、さらに、そのタンパク質のアミノ末端もしくはカルボキシ末端、または2つの異なるドメイン間（例えば、結合ドメインとリンカーポリペプチドとの間、リンカーポリペプチドと免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドとの間、または免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドと免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドとの間）に接合部アミノ酸を含み得る。

【0029】

抗体技術の分野の当業者によって理解されている用語の各々は、本明細書中で明確に異なって定義されない限り、当該分野において獲得されている意味が与えられる。抗体は、可変領域、ヒンジ領域および定常ドメインを有すると知られている。免疫グロブリンの構造および機能は、例えば、Harlowら、Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988)において概説されている。例えば、用語「VL」および「VH」とは、それぞれ抗体の軽鎖および重鎖に由来する可変結合領域のことを指す。この可変結合領域は、「相補性決定領域」(CDR)および「フレームワーク領域」(FR)として知られる、別個の詳細に明らかにされたサブ領域から構成されている。用語「CL」とは、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体軽重鎖に由来する定常領域のことを指す。用語「CH」とは、「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」のことを指し、これは、抗体アイソタイプに応じて、C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}(IgA、IgD、IgG)またはC_{H1}、C_{H2}、C_{H3}およびC_{H4}ドメイン(IgE、IgM)にさらに分離可能である。定常領域ドメインの一部は、抗体由来のFc領域(「フラグメント結晶化可能」領域)を構成し、免疫グロブリンのエフェクター機能(例えば、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)、ADCP(抗体依存性細胞食作用)、CDC(補体依存性細胞傷害)および補体結合)、Fcレセプター(例えば、CD16、CD32、FcRn)への結合、Fc領域を有しないポリペプチドよりも長いインビボにおける半減期、プロテインA結合、およびおそらくさらに胎盤通過(Caponら、*Nature*, 337:525(1989)を参照のこと)に關与する。

【0030】

さらに、抗体は、代表的にはFab領域とFc領域との間に位置するヒンジ配列を有する(しかし、下部のヒンジはFc領域のアミノ末端部分を含み得る)。バックグラウンドとして、免疫グロブリンヒンジは、Fab部分が空間内で自由に動くことを可能にする柔軟なスペーサーとして作用する。定常領域とは対照的に、ヒンジは、構造的に多種多様であり、免疫グロブリンクラス間およびさらにサブクラス間で配列と長さの両方が様々である。例えば、ヒトIgG1ヒンジ領域は、十分な柔軟性があり、これにより、Fabフラグメントが、その対称軸のまわりを回転すること、および2つの重鎖間ジスルフィド架橋の1つ目を中央に置く球形内で動くことが可能になる。それに対して、ヒトIgG2ヒンジは、比較的短く、4つの重鎖間ジスルフィド架橋によって安定化された堅いポリプロリン二重らせんを含むことにより、柔軟性が制限される。ヒトIgG3ヒンジは、62アミノ酸(21個のプロリンおよび11個のシステインを含む)を含み、柔軟性を欠くポリプロリン二重らせんを形成し、そしてFabフラグメントがFcフラグメントと比較的離れていることを理由として大きな柔軟性をもたらず、独特の長いヒンジ領域(IgG1ヒンジの約4倍の長さ)という点で他のサブクラスと異なる。ヒトIgG4ヒンジは、IgG1より短い、IgG2と同じ長さを有し、その柔軟性は、IgG1とIgG2との中間である。

【0031】

結晶学的研究によれば、IgGヒンジドメインは、機能的および構造的に3領域：上部

10

20

30

40

50

、コアまたは中央および下部ヒンジ領域に細分され得る (Shinら、Immunological Reviews 130:87 (1992))。例示的な上部ヒンジ領域は、IgG1に見られるようなEPKSCDKTHT (配列番号359)、IgG2に見られるようなERKCCVE (配列番号360)、IgG3に見られるようなELKTPLGDTTHT (配列番号361) またはEPKSCDTPPP (配列番号362)、およびIgG4に見られるようなESKYGPP (配列番号363) を含む。例示的な中央またはコアヒンジ領域は、IgG1およびIgG2に見られるようなCPPCP (配列番号364)、IgG3に見られるようなCPRCP (配列番号365)、およびIgG4に見られるようなCPSCP (配列番号366) を含む。IgG1、IgG2およびIgG4抗体の各々は、1つの上部および中央ヒンジを有するとみられるが、IgG3は、4つ (1つは、ELKTPLGDTTHTCPRCP (配列番号367) であり、3つは、EPKSCDTPPPCPRCP (配列番号368) である) をタンデムに有する。

10

【0032】

IgAおよびIgD抗体は、IgG様コア領域を有しないとみられ、IgDは、2つの上部ヒンジ領域をタンデムに有するとみられる (ESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNT (配列番号369) およびGRGEEKKKEKEEKEEQEERETKTP (配列番号370) を参照のこと)。IgA1およびIgA2抗体に見られる例示的な野生型上部ヒンジ領域は、それぞれVPSTPPTPSPSTPPTSPSPS (配列番号371) およびVPPPPP (配列番号372) である。

【0033】

対照的に、IgEおよびIgM抗体は、代表的なヒンジ領域を有さず、その代わりに、ヒンジ様特性を備えたC_{H2}ドメインを有する。IgEおよびIgMの例示的な野生型C_{H2}上部ヒンジ様配列は、それぞれ配列番号373

20

【0034】

【化1】

(VCSRDFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDG
QVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTL SQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFE
DSTKKCA) および配列番号374 (VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLIC
QATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTI
KESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVP)

30

に示されている。

【0035】

本明細書中で使用されるとき、「ヒンジ領域」または「ヒンジ」とは、(a)免疫グロブリンヒンジ領域 (例えば、上部およびコア領域から構成される) もしくはその機能的改変体、(b)レクチンドメイン間領域もしくはその機能的改変体、または(c)分化抗原 (cluster of differentiation (CD)) 分子のストーク (stalk) 領域もしくはその機能的改変体のことを指す。

【0036】

免疫グロブリンヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンヒンジ領域または変更された野生型免疫グロブリンヒンジ領域または変更された免疫グロブリンヒンジ領域であり得る。

40

【0037】

本明細書中で使用されるとき、「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」とは、抗体の重鎖に見られる、C_{H1}ドメインとC_{H2}ドメインとの間に挿入され、それらのドメインを接続する (IgG、IgAおよびIgDの場合) か、またはC_{H1}ドメインとC_{H3}ドメインとの間に挿入され、それらのドメインを接続する (IgEおよびIgMの場合)、天然に存在する上部および中央ヒンジアミノ酸配列のことを指す。

【0038】

「変更された野生型免疫グロブリンヒンジ領域」または「変更された免疫グロブリンヒンジ領域」とは、(a)最大30%のアミノ酸の変更 (例えば、最大25%、20%、1

50

5%、10%または5%のアミノ酸の置換または欠失)を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域、または(b)約5アミノ酸(例えば、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸)から、最大約120アミノ酸の長さを有し(好ましくは、約10~約40アミノ酸または約15~約30アミノ酸または約15~約20アミノ酸または約20~約25アミノ酸の長さを有し)、最大約30%のアミノ酸の変更(例えば、最大約25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%のアミノ酸の置換または欠失またはそれらの組み合わせ)を有し、かつ配列番号364、365または366に示されているようなIgGコアヒンジ領域を有する、野生型免疫グロブリンヒンジ領域の一部のことを指す。

【0039】

「可変ドメイン連結配列」は、軽鎖可変領域に重鎖可変領域を接続するアミノ酸配列であり、得られるポリペプチドが同じ軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む抗体の標的分子と同じ標的分子に対して特異的な結合親和性を保持するように、その2つの結合サブドメインの相互作用に適合したスペーサー機能を提供する。ある特定の実施形態において、結合ドメインを免疫グロブリンC_{H2}またはC_{H3}領域ポリペプチドに連結するために有用なヒンジは、可変ドメイン連結配列として使用され得る。

【0040】

「リンカーポリペプチド」とは、融合タンパク質において結合ドメインを免疫グロブリンC_{H2}またはC_{H3}領域ポリペプチドに連結するアミノ酸配列のことを指す。ある特定の実施形態において、リンカーポリペプチドは、本明細書中で定義されるようなヒンジである。ある特定の実施形態において、軽鎖可変領域に重鎖可変領域を接続するために有用な可変ドメイン連結配列は、リンカーポリペプチドとして使用され得る。

【0041】

ある特定の実施形態において、融合タンパク質の2つのドメイン間(例えば、結合ドメインとリンカーポリペプチドとの間、リンカーポリペプチドと免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドとの間、および免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドと免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドとの間)に1つまたはいくつかの(例えば、2~8つの)アミノ酸残基、例えば、融合タンパク質の構築物の設計によって生じるアミノ酸残基(例えば、一本鎖ポリペプチドをコードする核酸分子の構築中に制限酵素部位を使用することによって生じるアミノ酸残基)が存在し得る。本明細書中に記載されるように、そのようなアミノ酸残基は、「接合部アミノ酸」または「接合部アミノ酸残基」と呼ばれ得る。

【0042】

「誘導体」は、本明細書中で使用されるとき、親化合物と構造的に類似しており、親化合物から(実際にまたは理論的に)誘導可能である、化学的または生物学的に改変されたバージョンの化合物(例えば、タンパク質)のことを指す。

【0043】

本明細書中で使用されるとき、「アミノ酸」とは、天然のアミノ酸(自然界に存在するアミノ酸)、置換された天然のアミノ酸、非天然アミノ酸、置換された非天然アミノ酸またはそれらの任意の組み合わせのことを指す。天然のアミノ酸に対する名称は、本明細書中では、標準的な1文字または3文字コードとして示される。天然の極性アミノ酸としては、アスパラギン(AspまたはN)およびグルタミン(GlnまたはQ);ならびに塩基性アミノ酸(例えば、アルギニン(ArgまたはR)、リジン(LysまたはK)、ヒスチジン(HisまたはH)およびそれらの誘導体);ならびに酸性アミノ酸(例えば、アスパラギン酸(AspまたはD)およびグルタミン酸(GluまたはE)およびそれらの誘導体)が挙げられる。天然の疎水性アミノ酸としては、トリプトファン(TrpまたはW)、フェニルアラニン(PheまたはF)、イソロイシン(IleまたはI)、ロイシン(LeuまたはL)、メチオニン(MetまたはM)、バリン(ValまたはV)およびそれらの誘導体;ならびに他の無極性アミノ酸(例えば、グリシン(GlyまたはG)、アラニン(AlaまたはA)、プロリン(ProまたはP)およびそれらの誘導体)が挙げられる。中間の極性の天然のアミノ酸としては、セリン(SerまたはS)、トレ

10

20

30

40

50

オニン (Thr または T)、チロシン (Tyr または Y)、システイン (Cys または C) およびそれらの誘導体が挙げられる。別段特定されない限り、本明細書中に記載される任意のアミノ酸は、D 配置または L 配置で存在し得る。

【0044】

アミノ酸は、物理的特性ならびに 2 次および 3 次タンパク質構造に対する寄与に従って分類され得る。「保存的置換」は、当該分野において、1 つのアミノ酸を、類似の特性を有する別のアミノ酸で置換することと認識されている。例示的な保存的置換は、当該分野で周知である (例えば、1997 年 3 月 13 日公開の WO97/09433 の 10 頁; Lehninger, Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY: NY (1975), pp. 71-77; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY および Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8 を参照のこと)。ある特定の実施形態において、保存的置換は、ロイシンからセリンへの置換を含む。

10

【0045】

本明細書中で使用されるとき、別段提供されない限り、ヒト IgG1 重鎖の定常領域内のアミノ酸残基の位置は、ヒト IgG1 の可変領域が、Kabat ナンバリングの慣例に従って 128 アミノ酸残基から構成されると仮定して、ナンバリングされる。次いで、ヒト IgG1 重鎖のナンバリングされた定常領域は、他の免疫グロブリン重鎖の定常領域内のアミノ酸残基をナンバリングするための参照として使用される。ヒト IgG1 重鎖以外の免疫グロブリン重鎖の定常領域内の目的のアミノ酸残基の位置は、目的のアミノ酸残基とアラインメントされるヒト IgG1 重鎖内のアミノ酸残基の位置である。ヒト IgG1 重鎖の定常領域と他の免疫グロブリン重鎖の定常領域とのアラインメントは、デフォルトのパラメータを使用した Clustal W 法を用いる Megalign プログラム (DNASTAR Inc.) などの当該分野で公知のソフトウェアプログラムを使用して行われ得る。例示的な配列のアラインメントは、図 16 に示されている。本明細書中に記載されるナンバリングシステムによれば、ヒト IgG2 C_H2 領域は、図 16 中の他の C_H2 領域と比べてそのアミノ末端付近にアミノ酸欠失を有するが、ヒト IgG2 C_H2 内の下線の「N」の位置は、なおも 297 位である。なぜなら、この残基は、ヒト IgG1 C_H2 内の 297 位の「N」とアラインメントするからである。

20

30

【0046】

(TCR 複合体に対する融合タンパク質)

1 つの態様において、本開示は、そのアミノ末端からそのカルボキシ末端に向かって：
(a) TCR 複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、(b) リンカーポリペプチド、(c) 必要に応じて免疫グロブリン C_H2 領域ポリペプチド、および (d) 免疫グロブリン C_H3 領域ポリペプチドを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなる SMIP 融合タンパク質の形態の一本鎖融合タンパク質を提供する。その免疫グロブリン C_H2 領域ポリペプチドは、存在するとき、(1) 297 位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換；(2) 234 ~ 238 位における 1 つ以上のアミノ酸置換または欠失；(3) 253、310、318、320、322 または 331 位における少なくとも 1 つのアミノ酸置換または欠失；(4) 297 位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および 234 ~ 238 位における 1 つ以上の置換または欠失；(5) 297 位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および 253、310、318、320、322 または 331 位における 1 つ以上の置換または欠失；(6) 234 ~ 238、253、310、318、320、322 または 331 位における 1 つ以上のアミノ酸置換または欠失；または (7) 297 位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および 234 ~ 238、253、310、318、320、322 または 331 位における少なくとも 1 つのアミノ酸置換または欠失を含み得る。

40

【0047】

好ましい実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、そのアミノ末端からそ

50

のカルボキシ末端に向かって：(a) TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、(b) リンカーポリペプチド、(c) 免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチド、および(d) 免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなり、ここで、その免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドは、(i) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234～238位における1つ以上の置換または欠失；(ii) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234、235および237位における置換、ならびに236位における欠失；(iii) 234～238、253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つのアミノ酸置換または欠失；(iv) 234、235、237、318、320および322位におけるアミノ酸置換、ならびに236位における欠失；(v) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234～238、253、310、318、320、322または331位における少なくとも1つの置換または欠失；または(vi) 297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234、235、237、318、320および322位におけるアミノ酸置換、ならびに236位における欠失を含む。これらの好ましい実施形態の各々において、置換(substitution)に使用されるアミノ酸は、好ましくは、アラニンまたはセリンである。

10

【0048】

さらに好ましい実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、そのアミノ末端からそのカルボキシ末端に向かって：(a) TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメイン、(b) リンカーポリペプチド、および(c) 免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなり、ここで、その免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドは、ヒトIgMのC_{H3}領域およびヒトIgG(好ましくは、IgG1)のC_{H3}領域を含む。

20

【0049】

本融合タンパク質は、単に検出不可能に、わずかに、最小に、もしくは低レベルで、サイトカイン放出(すなわち、サイトカインストーム)を誘導するかまたはT細胞を活性化し、さらに、以下の活性：(1) カルシウム流動の誘導、(2) TCRシグナル伝達経路内の分子のリン酸化の誘導、(3) 同種抗原に対するT細胞応答の阻止、(4) 抗原に対するメモリーT細胞応答の阻止、および(5) TCR複合体の下方調節のうちの1つ以上が可能であり得る。

30

【0050】

好ましい実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号293、294、298または299に示されているようなアミノ酸配列を含む。関連する好ましい実施形態において、配列番号293、294、298および299のアミノ酸247～261におけるヒンジ配列は、配列番号379～434に示されているようなヒンジアミノ酸配列で置き換えられる。さらに好ましい実施形態において、配列番号293、294、298および299の免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドは、EUナンバリングによるところの318、320および322位におけるアミノ酸置換をさらに含む。

【0051】

関連する態様において、本開示は、そのアミノ末端からそのカルボキシ末端に向かって：(a) 必要に応じて免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチド、(b) 免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチド、(c) リンカーポリペプチド、および(d) TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなるPIMSタンパク質の形態の一本鎖融合タンパク質を提供する。その免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドは、存在するとき、本明細書中に提供されるSMIP融合タンパク質と同じタイプの変異を含み得る。さらに、PIMSタンパク質は、本明細書中に記載されるようにSMIP融合タンパク質が有する望ましい生物学的活性のうちの1つ以上を有する。

40

【0052】

(結合ドメイン)

50

本明細書中に記載されるように、本開示の融合タンパク質は、TCR複合体またはその構成要素（例えば、CD3、TCR、TCRまたはそれらの任意の組み合わせ）に特異的に結合する結合ドメインを含む。

【0053】

本開示に記載の「結合ドメイン」または「結合領域」は、例えば、生物学的分子（例えば、TCR複合体またはその構成要素）を特異的に認識してそれに結合する能力を有する任意のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドまたはペプチドであり得る。結合ドメインは、目的の生物学的分子に対する、任意の天然に存在するか、合成か、半合成か、または組換え的に生成された結合パートナーを含む。例えば、結合ドメインは、抗体の軽鎖可変ドメイン領域および重鎖可変ドメイン領域であり得、または軽鎖可変ドメイン領域および重鎖可変ドメイン領域は、一本鎖においていずれかの向き（例えば、VL-VHまたはVH-VL）で共に連結され得る。特定の標的と特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための種々のアッセイが知られており、それらとしては、ウエスタンブロット、ELISA、フローサイトメトリーまたはBiacore™分析が挙げられる。

10

【0054】

結合ドメイン（またはその融合タンパク質）は、例えば、約 $10^5 M^{-1}$ 以上の親和性または K_a （すなわち、 $1/M$ という単位を有する、特定の結合相互作用の平衡会合定数）で標的分子に結合するかまたはそれと会合する場合、その結合ドメインは、標的分子に「特異的に結合する」。ある特定の実施形態において、結合ドメイン（またはその融合タンパク質）は、約 $10^6 M^{-1}$ 、約 $10^7 M^{-1}$ 、約 $10^8 M^{-1}$ 、約 $10^9 M^{-1}$ 、約 $10^{10} M^{-1}$ 、約 $10^{11} M^{-1}$ 、約 $10^{12} M^{-1}$ または約 $10^{13} M^{-1}$ 以上の K_a で標的に結合する。「高親和性」結合ドメイン（またはその一本鎖融合タンパク質）とは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ またはそれ以上の K_a を有する結合ドメインのことを指す。あるいは、親和性は、 M という単位を有する、特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）として定義され得る（例えば、 $10^{-5} M \sim 10^{-13} M$ またはそれ未満）。本開示に記載の結合ドメインポリペプチドおよび融合タンパク質の親和性は、従来手法を用いて容易に測定され得る（例えば、Scatchardら（1949）Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660；および米国特許第5,283,173号；同第5,468,614号、または等価物を参照のこと）。

20

30

【0055】

「T細胞レセプター」（TCR）は、一般に、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に結合した抗原の認識にCD3とともに関与する、T細胞の表面上に見られる分子である。T細胞レセプターは、ほとんどのT細胞において、高度に可変性のおよび鎖がジスルフィドで連結されたヘテロ二量体からなる。他のT細胞では、可変および鎖から構成される代替のレセプターが、発現される。TCRの各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端に短い細胞質テイルを有する（Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (5th Ed.), Editor: Saunders, Philadelphia, 2003; Janewayら、Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th Ed., Current Biology Publications, p148, 149および172, 1999を参照のこと）。本開示に使用されるようなTCRは、ヒト、マウス、ラットまたは他の哺乳動物を含む様々な動物種に由来し得る。

40

【0056】

「抗TCR融合タンパク質、SMIPまたは抗体」とは、TCR分子またはその個別の鎖（例えば、TCR、TCR、TCRまたはTCR鎖）のうちの1つに特異的に結合する融合タンパク質、SMIPまたは抗体のことを指す。ある特定の実施形態におい

50

て、抗TCR融合タンパク質、SMIPまたは抗体は、TCR鎖、TCR鎖またはその両方に特異的に結合する。

【0057】

「CD3」は、6本の鎖の多タンパク質複合体として当該分野で知られている(Abbas and Lichtman, 2003; Janewayら、p172および178, 1999を参照のこと)。哺乳動物において、この複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2本のCD3鎖、およびCD3鎖のホモ二量体を含む。そのCD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連する細胞表面タンパク質である。そのCD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖の膜貫通領域は、負に帯電しており、これは、これらの鎖が正に帯電したT細胞レセプター鎖と会合することを可能にする特徴である。そのCD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖の各々の細胞内テイルは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフまたはITAMとして知られる保存されたモチーフを1つ含み、一方、各CD3鎖は、3つ含む。理論に拘束されるものではないが、これらのITAMが、TCR複合体(complex)のシグナル伝達能力にとって重要であると考えられる。本開示において使用されるようなCD3は、ヒト、マウス、ラットまたは他の哺乳動物を含む様々な動物種に由来し得る。

10

【0058】

「抗CD3融合タンパク質、SMIPまたは抗体」は、本明細書中で使用されるとき、個別のCD3鎖(例えば、CD3鎖、CD3鎖、CD3鎖)または2本以上の個別のCD3鎖から形成される複合体(例えば、2本以上のCD3鎖の複合体、CD3鎖とCD3鎖との複合体、CD3鎖とCD3鎖との複合体)に特異的に結合する融合タンパク質、SMIPまたは抗体のことを指す。ある特定の好ましい実施形態において、抗CD3融合タンパク質、SMIPまたは抗体は、CD3鎖、CD3鎖、CD3鎖またはそれらの任意の組み合わせ、より好ましくは、CD3鎖に特異的に結合する。

20

【0059】

「TCR複合体」は、本明細書中で使用されるとき、CD3鎖とTCR鎖の会合によって形成される複合体のことを指す。例えば、TCR複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2本のCD3鎖、CD3鎖のホモ二量体、TCR鎖およびTCR鎖から構成され得る。あるいは、TCR複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2本のCD3鎖、CD3鎖のホモ二量体、TCR鎖およびTCR鎖から構成され得る。

30

【0060】

「TCR複合体の構成要素」は、本明細書中で使用されるとき、TCR鎖(すなわち、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖またはTCR鎖)、CD3鎖(すなわち、CD3鎖、CD3鎖、CD3鎖またはCD3鎖)または、2本以上のTCR鎖またはCD3鎖によって形成される複合体(例えば、TCR鎖とTCR鎖との複合体、TCR鎖とTCR鎖との複合体、CD3鎖とCD3鎖との複合体、CD3鎖とCD3鎖との複合体、またはTCR鎖とTCR鎖と、CD3鎖と、CD3鎖と、2本のCD3鎖とのサブTCR複合体)のことを指す。

【0061】

バックグラウンドとして、TCR複合体は、一般に、MHC分子に結合した抗原に対するT細胞応答の惹起に参与する。TCRおよびコレセプター(すなわち、CD4またはCD8)にペプチド:MHCリガンドが結合することにより、TCR複合体、コレセプターおよびCD45チロシンホスファターゼが寄せ集められると考えられている。これによって、CD45が阻害性のリン酸基を除去し、それにより、LckおよびFynタンパク質キナーゼが活性化される。これらのタンパク質キナーゼが活性化されると、CD3鎖上のITAMがリン酸化され、そしてこのことは、この鎖をサイトゾルのチロシンキナーゼZAP-70に結合可能にする。続いて、結合したZAP-70がリン酸化によって活性化されることにより、3つのシグナル伝達経路が誘発され、それらのうちの2つは、PLC- β のリン酸化および活性化によって開始され、次いで、PLC- β は、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)リン酸(PIP)をジアシ

40

50

ルグリセロール (DAG) およびイノシトール三リン酸 (IP₃) に切断する。DAG によってタンパク質キナーゼ C が活性化されると、転写因子 NF- κ B が活性化される。IP₃ 作用の結果として、細胞内の遊離 Ca²⁺ が急激に上昇すると、細胞質のホスファターゼであるカルシニューリンが活性化され、それが転写因子 NFAT (活性化された T 細胞の核因子) を細胞質から核に移動させる。NFAT の完全な転写活性には、転写因子の AP-1 ファミリーのメンバー; 転写制御因子の Fos および Jun ファミリーのメンバーの二量体も必要である。活性化された ZAP-70 によって開始される第 3 のシグナル伝達経路は、Ras の活性化およびそれに続く MAP キナーゼカスケードの活性化である。これは、Fos の活性化、ゆえに AP-1 転写因子の活性化に至る。NF- κ B、NFAT および AP-1 が、共に T 細胞染色体に対して作用することにより、T 細胞の分化、増殖 およびエフェクター作用をもたらす新しい遺伝子転写が開始される。Janeway ら、p 178, 1999 を参照のこと。

10

【0062】

ある特定の実施形態において、本開示の結合ドメインは、個別の CD3 鎖 (例えば、CD3 α 、CD3 β または CD3 γ) または個別の CD3 鎖の 2 本以上の組み合わせ (例えば、CD3 α および CD3 β から形成された複合体または CD3 α および CD3 γ から形成された複合体) に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、本結合ドメインは、個別のヒト CD3 鎖 (例えば、ヒト CD3 α 鎖、ヒト CD3 β 鎖およびヒト CD3 γ 鎖) または個別のヒト CD3 鎖の 2 本以上の組み合わせ (例えば、ヒト CD3 α とヒト CD3 β との複合体またはヒト CD3 α とヒト CD3 γ との複合体) に特異的に結合する。ある特定の好ましい実施形態において、本結合ドメインは、ヒト CD3 鎖に特異的に結合する。

20

【0063】

ある特定の他の実施形態において、本開示の結合ドメインは、TCR α 、TCR β 、または TCR α および TCR β から形成されたヘテロ二量体に特異的に結合する。ある特定の好ましい実施形態において、結合ドメインは、ヒト TCR α 、ヒト TCR β 、またはヒト TCR α およびヒト TCR β から形成されるヘテロ二量体のうちの 1 つ以上に特異的に結合する。

【0064】

ある特定の実施形態において、本開示の結合ドメインは、1 本以上の TCR 鎖と 1 本以上の CD3 鎖から形成された複合体 (例えば、CD3 α 鎖、CD3 β 鎖、CD3 γ 鎖、TCR 鎖もしくは TCR α 鎖またはそれらの任意の組み合わせから形成された複合体) に結合する。他の実施形態において、本開示の結合ドメインは、1 本の CD3 鎖、1 本の CD3 鎖、2 本の CD3 鎖、1 本の TCR 鎖および 1 本の TCR 鎖から形成された複合体に結合する。さらに好ましい実施形態において、本開示の結合ドメインは、1 本以上のヒト TCR 鎖とともに 1 本以上のヒト CD3 鎖から形成された複合体 (例えば、ヒト CD3 α 鎖、ヒト CD3 β 鎖、ヒト CD3 γ 、ヒト TCR 鎖もしくはヒト TCR α 鎖またはそれらの任意の組み合わせから形成された複合体) に結合する。ある特定の実施形態において、本開示の結合ドメインは、1 本のヒト CD3 鎖、1 本のヒト CD3 鎖、2 本のヒト CD3 鎖、1 本のヒト TCR 鎖および 1 本のヒト TCR 鎖から形成された複合体に結合する。

30

40

【0065】

本開示の結合ドメインは、本明細書中に記載されるように、または当該分野で公知の種々の方法 (例えば、米国特許第 6,291,161 号; 同第 6,291,158 号を参照のこと) によって生成され得る。結合ドメインの供給源としては、ヒト、ラクダ科 (ラクダ、ヒトコブラクダまたはラマ; Hamers-Casterman ら (1993) Nature, 363: 446 および Nguyen ら (1998) J. Mol. Biol., 275: 413)、サメ (Roux ら (1998) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95: 11804)、魚類 (Nguyen ら (2002) Immunogenetics, 54: 39)、げっ歯類、鳥類またはヒツジをはじめとした、様々な

50

種由来の抗体可変ドメイン核酸配列が挙げられる(抗体、sFv、scFvまたはFabとして、例えば、ファージライブラリーにおいて、形式設定され得る)。本開示の結合ドメインが由来し得る例示的な抗CD3抗体としては、Cris-7モノクローナル抗体(Reinherz, E.L.ら(eds.), Leukocyte typing I I., Springer Verlag, New York, (1986))、BC3モノクローナル抗体(Anasettiら(1990) J. Exp. Med. 172:1691)、OKT3(Ortho multicenter Transplant Study Group(1985) N. Engl. J. Med. 313:337)およびそれらの誘導體(例えば、OKT3 ala-ala(Heroldら(2003) J. Clin. Invest. 11:409)、ピジリズマブ(Carpenterら(2002) Blood 99:2712)ならびに145-2C11モノクローナル抗体(Hirschら(1988) J. Immunol. 140:3766))が挙げられる。例示的な抗TCR抗体は、H57モノクローナル抗体(Lavasaniら(2007) Scand. J. Immunology 65:39-47)である。

【0066】

本開示の結合ドメインの代替の供給源としては、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列、または代替の非抗体骨格(例えば、フィブリノゲンドメイン(例えば、Weiselら(1985) Science 230:1388を参照のこと)、Kunitzドメイン(例えば、米国特許第6,423,498号を参照のこと)、リポカリンドメイン(例えば、WO2006/095164を参照のこと)、V様ドメイン(例えば、米国特許出願公開番号2007/0065431を参照のこと)、C型レクチンドメイン(Zelensky and Gready(2005) FEBS J. 272:6179)、mAb²またはFcab^{T M}(例えば、PCT特許出願公開番号WO2007/098934; WO2006/072620を参照のこと)など)のループ領域における操作された様々なアミノ酸をコードする配列が挙げられる。例えば、本開示の結合ドメインは、CD3鎖に特異的に結合するFabフラグメントについてFabファージライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る(Hoetら(2005) Nature Biotechnol. 23:344を参照のこと)。

【0067】

さらに、簡便な系(例えば、マウス、HuMAb mouse(登録商標)、TC mouse^{T M}、KM-mouse(登録商標)、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど)において免疫原としてCD3鎖を使用したハイブリドーマ開発のための従来のストラテジーを用いることにより、本開示の結合ドメインが開発され得る。

【0068】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、TCR複合体またはその構成要素に特異的なV_HおよびV_Lドメインを含む一本鎖Fvフラグメント(scFv)である。好ましい実施形態において、V_HおよびV_Lドメインは、ヒトV_HおよびV_Lドメインまたはヒト化V_HおよびV_Lドメインである。例示的なV_Hドメインとしては、それぞれ配列番号2、6、49および58に示されているようなBC3 V_H、OKT3 V_H、H57 V_Hおよび2C11 V_Hドメインが挙げられる。さらなる例示的なV_Hドメインとしては、配列番号220、243、244および245に示されているドメインなどのCris-7 V_Hドメインが挙げられる。例示的なV_Lドメインは、それぞれ配列番号4、8、51および60に示されているようなBC3 V_L、OKT3 V_L、H57 V_Lおよび2C11 V_Lドメインである。さらなる例示的なV_Lドメインとしては、配列番号222、241および242に示されているドメインなどのCris-7 V_Lドメインが挙げられる。ある特定の実施形態において、結合ドメインは、TCR複合体またはその構成要素(例えば、CD3、TCR、TCR、TCRおよびTCRまたはそれらの組み合わせ)に特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントもしくはは誘導體由来の軽鎖可変領域(V_L)(例えば、配列番号4、8、51、60、222

10

20

30

40

50

、241または242)もしくは重鎖可変領域(V_H) (例えば、配列番号2、6、49、58、220、243、244または245)またはその両方のアミノ酸配列と少なくとも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%、少なくとも99.5%または100%同一である配列を含むか、またはその配列である。

【0069】

「配列同一性」は、本明細書中で使用されるとき、配列をアラインメントし、必要であれば、最大パーセント配列同一性を達成するようにギャップを導入した後の、いかなる保守的置換も配列同一性の一部として考慮しない、別の参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である、1つの配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージのことを指す。そのパーセンテージ配列同一性の値は、Altschulら(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402によって定義されているようなNCBI BLAST 2.0ソフトウェアを、デフォルトの値に設定されたパラメータで使用して生成され得る。

【0070】

ある特定の実施形態において、本開示の結合ドメイン V_H 領域は、公知のモノクローナル抗体(例えば、Cris-7、BC3、OKT3(それらの誘導体を含む))の V_H に由来し得るか、または基づき得、公知のモノクローナル抗体の V_H と比べたとき、1つ以上の挿入、1つ以上の欠失、1つ以上のアミノ酸置換(例えば、保守的アミノ酸置換または非保守的アミノ酸置換)または上で述べた変更の組み合わせを含む。改変された V_H 領域を含む結合ドメインが、野生型結合ドメインに類似の親和性でその標的になおも特異的に結合し得るという条件で、その挿入、欠失または置換は、 V_H 領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両端を含むこの領域内の任意の位置に存在してよい。

【0071】

ある特定の実施形態において、本開示の結合ドメイン内の V_L 領域は、公知のモノクローナル抗体(例えば、Cris-7、BC3、OKT3(それらの誘導体を含む))の V_L に由来するか、または基づき、公知のモノクローナル抗体の V_L と比べたとき、1つ以上の挿入、1つ以上の欠失、1つ以上のアミノ酸置換(例えば、保守的アミノ酸置換)または上で述べた変更の組み合わせを含む。改変された V_L 領域を含む結合ドメインが、野生型結合ドメインに類似の親和性でその標的になおも特異的に結合し得るという条件で、その挿入、欠失または置換は、 V_L 領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両端を含むこの領域内の任意の位置に存在してよい。

【0072】

上記 V_H および V_L ドメインは、いずれかの向き(すなわち、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって V_H-V_L または V_L-V_H)で配置され得、可変ドメイン連結配列によって引き離され得る。ある特定の実施形態において、可変ドメイン連結配列は、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₁(配列番号343)、(Gly₃Ser)₂(Gly₄Ser)₁(配列番号344)、(Gly₃Ser)₃(Gly₄Ser)₁(配列番号345)、(Gly₃Ser)₄(Gly₄Ser)₁(配列番号346)、(Gly₃Ser)₅(Gly₄Ser)₁(配列番号347)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₁(配列番号348)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₂(配列番号349)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₃(配列番号350)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₄(配列番号351)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)₅(配列番号352)、(Gly₃Ser)₃(Gly₄Ser)₃(配列番号353)、(Gly₃Ser)₄(Gly₄Ser)₄(配列番号354)、(Gly₃Ser)₅(Gly₄Ser)₅(配列番号355)または(Gly₄Ser)₂(配列番号356)、(Gly₄Ser)₃(配列番号145)、(Gly₄Ser)₄(

10

20

30

40

50

配列番号 357) もしくは (Gly₄Ser)₅ (配列番号 358) を含む、GlySer、Gly₂Ser (配列番号 339)、Gly₃Ser (配列番号 340)、Gly₄Ser (配列番号 341) および Gly₅Ser (配列番号 342) のファミリーに属するものを含む。ある特定の実施形態において、可変ドメイン連結配列は、GGGGSSGGGGSSGGGGSSAQ (配列番号 98) である。好ましい実施形態において、これらの (Gly_xSer) ベースのリンカーは、可変ドメインを連結するために使用され、結合ドメイン (例えば、scFv) をFcテイル (例えば、IgG CH2CH3) に連結するために使用されない。ある特定の実施形態において、可変ドメイン連結配列は、約 5 ~ 約 35 アミノ酸を含み、好ましくは、約 15 ~ 約 25 アミノ酸を含む。

【0073】

本明細書中に記載されるような、特定のドメインまたは領域のアミノ末端またはカルボキシ末端における任意の挿入、欠失または置換は、例えば、1つの可変領域が別の可変領域に連結されるように操作された結果 (例えば、V_H領域とV_L領域との間またはV_L領域とV_H領域との間の接合部におけるアミノ酸の変更) または結合ドメインが定常領域に連結されるように操作された結果 (例えば、結合ドメインとヒンジリンカーとの間の接合部におけるアミノ酸の変更) であり得る。例えば、1つ以上 (例えば、2 ~ 8つ) のアミノ酸が、以下で詳細に記載されるような融合タンパク質接合部の1つ以上において付加され得るか、欠失され得るか、または置換され得る。

【0074】

本開示の例示的な結合ドメインは、配列番号 18、20、48、62 および 258 ~ 264 に示されているようなものを含む。ある特定の好ましい実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、配列番号 258 ~ 264 のいずれか1つに示されているようなアミノ酸配列を有する結合ドメインを含む。

【0075】

(リンカーポリペプチド)

本明細書中に記載されるように、本開示の融合タンパク質は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを、免疫グロブリンC_{H2}領域または免疫グロブリンC_{H3}領域に連結するリンカーポリペプチドを含む。リンカーは、融合タンパク質の結合ドメインとその残りとの間にスペースを入れる機能を提供することに加えて、その標的 (すなわち、TCR複合体またはその構成要素、例えば、CD3) と相互作用するために融合タンパク質の結合ドメインを正しい向きにするのに適した柔軟性または剛性を提供し得る。さらに、リンカーは、完全長融合タンパク質の発現を補助し得、インビトロと、ヒトなどのその必要のある被験体に投与した後のインビボの両方において精製タンパク質に安定性を提供し得、好ましくは、リンカーは、そのような被験体において免疫原性でないか、または免疫原性が乏しい。

【0076】

本開示において企図されるリンカーは、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーのドメイン間領域に由来するペプチド、免疫グロブリンドメイン間領域 (例えば、抗体ヒンジ領域) またはC型レクチンのストーク領域 (II型膜タンパク質のファミリー) (例えば、PCT出願公開番号WO2007/146968に示されている例示的なレクチンストーク領域配列、例えば、その公報の配列番号 111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、287、289、297、305、307、309 ~ 311、313 ~ 331、346、373 ~ 377、380 または 381 を参照のこと (これは、本明細書中で参考として援用される)) および分化抗原 (CD) 分子のストーク領域を含む。

【0077】

10

20

30

40

50

本開示の融合タンパク質における使用に適したリンカーは、I g G ヒンジ、I g A ヒンジ、I g D ヒンジ、I g E C_H2、I g M C_H2 またはそれらのフラグメントもしくは改変体から選択される抗体ヒンジ領域を含む。ある特定の好ましい実施形態において、リンカーは、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3、ヒト I g G 4 またはそれらのフラグメントもしくは改変体から選択される抗体ヒンジ領域であり得る。いくつかの実施形態において、そのリンカーは、野生型ヒト免疫グロブリンヒンジ領域などの野生型免疫グロブリンヒンジ領域である。例示的なリンカーは、野生型ヒト I g G 1 ヒンジ領域および野生型マウス I G H G 2 c ヒンジ領域であり、それらの配列は、それぞれ配列番号 6 3 および 7 2 に示されている。

【0078】

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸残基が、融合タンパク質構築物設計の一部として野生型免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ末端またはカルボキシ末端に付加され得る。代表的な改変リンカーは、アミノ末端に追加の接合部アミノ酸残基（例えば、「RT」（例えば、配列番号 1 0 0 および 5 2 に示されている）、「RSS」（例えば、配列番号 3 2 8 および 3 3 1 ~ 3 3 8 に示されている）、「TG」（例えば、配列番号 1 7 7 に示されている）または「T」（例えば、配列番号 3 0 0 に示されている））；カルボキシ末端に追加の接合部アミノ酸残基（例えば、「SG」（例えば、配列番号 2 1 2 および 2 1 3 に示されている））；または付加と組み合わせられる欠失（例えば、カルボキシ末端に付加される「SG」を伴う P（例えば、配列番号 2 1 2 に示されている））を有し得る。

【0079】

好ましい実施形態において、リンカーは、変異 I g G 免疫グロブリンヒンジ領域などの変異免疫グロブリンヒンジ領域である。例えば、野生型ヒト I g G 1 ヒンジ領域は、3つのシステイン残基を含む：ヒンジ領域の最もアミノ末端側のシステインが、第1システインと呼ばれ、一方、最もカルボキシ末端側のシステインが、第3システインと呼ばれる。ある特定の実施形態において、リンカーは、第1システインがセリンで置換されているヒト I g G 1 ヒンジ領域などの、2つのシステイン残基しか有しない変異ヒト I g G 1 ヒンジ領域である。ある特定の他の実施形態において、リンカーは、第1、第2または第3システインなどの1つのシステイン残基しか有しない変異ヒト I g G 1 ヒンジ領域である。ある特定の実施形態において、ヒト I g G 1 ヒンジ領域内の第3システインに対してカルボキシ末端の第1プロリンが、例えば、セリンによって置換される。融合タンパク質の結合ドメインとその残りとの間のリンカーポリペプチドとして使用され得る例示的な変異ヒト I g G 1 ヒンジ領域は、配列表に列挙されている（例えば、リンカー 4 7 ~ 4 9、5 1 および 5 3 ~ 6 0（それぞれ配列番号 9 9、1 4 6 ~ 1 4 8 および 1 5 0 ~ 1 5 7））。ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸残基が、融合タンパク質構築物設計の一部として変異免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ末端またはカルボキシ末端に付加され得る。そのような改変リンカーの例は、配列番号 1 0、3 3 5 および 3 0 0 に示されており、ここで、それぞれアミノ酸残基「RT」、「RSS」または「T」が、変異ヒト I g G 1 ヒンジ領域のアミノ末端に付加されている。

【0080】

ある特定の実施形態において、リンカーは、1つまたは1つより多いシステイン残基を有し得るが、鎖間ジスルフィド結合を形成するために単一のシステイン残基（例えば、I g G 1 の第2または第3のシステイン）を有する。他の実施形態において、リンカーは、3つ以上のシステイン残基を有し得るが、鎖間ジスルフィド結合を形成するために2つのシステイン残基を有する。

【0081】

ある特定の実施形態において、本開示のリンカーポリペプチドは、野生型免疫グロブリンヒンジ領域（例えば、I g G 1 ヒンジ領域）に由来し、野生型免疫グロブリンヒンジ領域と比べたとき、改変ヒンジが、その標的と相互作用するために融合タンパク質の結合ドメインを正しい向きにするのに適した柔軟性または剛性を保持するという条件で、1つ以

10

20

30

40

50

上（例えば、1、2、3または4つ）の挿入、1つ以上（例えば、1、2、3または4つ）の欠失、1つ以上（例えば、1、2、3または4つ）のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換）または上で述べた変異の組み合わせを含む。その挿入、欠失または置換は、アミノ末端もしくはカルボキシ末端または両端を含む野生型免疫グロブリンヒンジ領域内の任意の位置に存在してよい。ある特定の実施形態において、リンカーポリペプチドは、野生型免疫グロブリンヒンジ領域（例えば、野生型ヒトIgG1ヒンジ、野生型ヒトIgG2ヒンジまたは野生型ヒトIgG4ヒンジ）と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一の配列を含むか、またはその配列である。

10

20

30

40

50

【0082】

代替のヒンジ配列またはリンカー配列は、IgV様ドメインまたはIgC様ドメインを接続する細胞表面レセプターの一部から作製され得る。細胞表面レセプターが複数のIgV様ドメインをタンデムに含むときのIgV様ドメイン間の領域、および細胞表面レセプターが複数のタンデムIgC様領域を含むときのIgC様ドメイン間の領域もまた、接続領域またはリンカーペプチドとして使用され得る。IgV様ドメインとIgC様ドメインとの間またはIgC様ドメイン間もしくはIgV様ドメイン間のドメイン間領域の代表的なヒンジ配列またはリンカー配列は、CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD96、CD150、CD166およびCD244に見られる。さらなる代替のヒンジは、非免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー（例えば、CD69、CD72およびCD161）由来のII型レセプターのジスルフィド含有領域から作製され得る。

【0083】

ある特定の実施形態において、ヒンジ配列またはリンカー配列は、2～150個のアミノ酸、5～60個のアミノ酸、2～40個のアミノ酸を有し、好ましくは、8～20個を有し、より好ましくは、12～15個のアミノ酸を有し、主に柔軟性であり得るが、より剛性の特徴も提供し得、または、シート構造は最小で主にヘリックス構造を含み得る。好ましくは、ヒンジ配列およびリンカー配列は、血漿中および血清中で安定であり、タンパク分解性切断に対して抵抗性である。ある特定の実施形態において、IgG1上部ヒンジ領域内の第1リジンが変異することにより、タンパク分解性切断が最小になり、好ましくは、そのリジンがメチオニン、トレオニン、アラニンまたはグリシンで置換されるか、または欠失される（例えば、アミノ末端に接合部アミノ酸（好ましくは、RT）を含み得る配列番号379～434を参照のこと）。いくつかの実施形態において、配列は、分子のカルボキシ末端を安定化させる1つのジスルフィド結合または複数のジスルフィド結合を形成する能力を付与するコア構造CPPC（配列番号330）などの、天然に存在するモチーフまたは付加されたモチーフを含み得る。他の実施形態において、配列は、1つ以上のグリコシル化部位を含み得る。ヒンジの長さを変更することの予想外の特徴は、本開示の一本鎖融合タンパク質によって引き起こされるカルシウム流動のレベルの調節が可能になることである（実施例5を参照のこと）。カルシウム流動を調節するための例示的なヒンジは、配列番号212～218を含む。さらに、ヒンジの長さおよび/または配列は、同種抗原に対するT細胞応答を阻止する際の融合タンパク質の活性にも影響し得る（実施例10を参照のこと）。本開示の融合タンパク質において接続領域として有用なリンカーは、配列番号379～434に示されている。

【0084】

（免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチド）

本明細書中に記載されるように、本開示の融合タンパク質は、297位のアスパラギンにアミノ酸置換（例えば、アスパラギンからアラニンへの置換）を含む免疫グロブリンC_{H2}領域を含み得る。そのようなアミノ酸置換によって、この部位におけるグリコシル化

が減少するかまたは除去され、Fc RおよびC1qへの効率的なFc結合ができなくなる。

【0085】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、234～238位に少なくとも1つの置換または欠失を含む免疫グロブリンC_{H2}領域を含み得る。例えば、免疫グロブリンC_{H2}領域は、234、235、236、237または238位、234および235位、234および236位、234および237位、234および238位、234～236位、234、235および237位、234、236および238位、234、235、237および238位、236～238位、または、234～238位における2、3、4または5つのアミノ酸の他の任意の組み合わせの置換を含み得る。さらに、
10
またはあるいは、変異C_{H2}領域は、234～238位、好ましくは、236位または237位の1つにおいて1つ以上（例えば、2、3、4または5つ）のアミノ酸欠失を含み得、同時に、他の位置が置換される。上で述べた変異は、本融合タンパク質の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）活性またはFcレセプター結合能を低下させるか、または喪失させる。ある特定の好ましい実施形態において、234～238位の1つ以上におけるアミノ酸残基は、1つ以上のアラニン残基で置き換えられている。さらに好ましい実施形態において、234～238位におけるアミノ酸残基のうちただ1つが、欠失されており、234～238位における残りのアミノ酸の1つ以上が、別のアミノ酸（例えば、アラニンまたはセリン）で置換され得る。

【0086】

ある特定の他の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、253、310、318、320、322および331位に1つ以上のアミノ酸置換を含む免疫グロブリンC_{H2}領域を含み得る。例えば、免疫グロブリンC_{H2}領域は、253、310、318、320、322または331位、318および320位、318および322位、318、320および322位、または、253、310、318、320、322および331位における2、3、4、5または6つのアミノ酸の他の任意の組み合わせの置換を含み得る。上で述べた変異は、本融合タンパク質の補体依存性細胞傷害性（CDC）を低下させるか、または喪失させる。

【0087】

ある特定の他の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異C_{H2}領域は、297位におけるアミノ酸置換に加えて、234～238位に1つ以上（例えば、2、3、4または5つ）の追加の置換をさらに含み得る。例えば、免疫グロブリンC_{H2}領域は、234および297位、234、235および297位、234、236および297位、234～236および297位、234、235、237および297位、234、236、238および297位、234、235、237、238および297位、236～238および297位、または297位に加えて234～238位における2、3、4もしくは5つのアミノ酸の任意の組み合わせの置換を含み得る。さらに、またはあるいは、
30
変異C_{H2}領域は、236位または237位などの234～238位に1つ以上（例えば、2、3、4または5つ）のアミノ酸欠失を含み得る。その追加の変異は、本融合タンパク質の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）活性またはFcレセプター結合能を
40
低下させるか、または喪失させる。ある特定の実施形態において、234～238位の1つ以上におけるアミノ酸残基は、1つ以上のアラニン残基で置き換えられている。さらなる実施形態において、234～238位におけるアミノ酸残基のうちただ1つが、欠失しており、234～238位における残りのアミノ酸の1つ以上が、別のアミノ酸（例えば、好ましくは、アラニンまたはセリン）で置換され得る。

【0088】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異C_{H2}領域は、234～238位における1つ以上（例えば、2、3、4または5つ）のアミノ酸置換に加えて、補体結合に関与する1つ以上の位置（例えば、I253、H310、E318、K320、K322またはP331位）に1つ以上（例えば、2、3、4、5または6つ）の追
50

加のアミノ酸置換（例えば、アラニンによる置換）を含み得る。好ましい変異免疫グロブリンC_{H2}領域としては、234、235、237（存在する場合）、318、320および322位にアラニン置換を有する、ヒトIgG1、IgG2、IgG4およびマウスIgG2aのC_{H2}領域が挙げられる。例示的な変異免疫グロブリンC_{H2}領域は、L234、L235、G237、E318、K320およびK322にアラニン置換を有するマウスIGHG2c C_{H2}領域である（配列番号50）。

【0089】

なおもさらなる実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異C_{H2}領域は、297位におけるアミノ酸置換、および234～238位における追加の欠失または置換に加えて、253、310、318、320、322および331位に1つ以上（例えば、2、3、4、5または6つ）の追加の置換をさらに含み得る。例えば、免疫グロブリンC_{H2}領域は、（1）297位における置換、（2）234～238位における1つ以上の置換もしくは欠失またはそれらの組み合わせ、および、I253、H310、E318、K320、K322およびP331位における1つ以上（例えば、2、3、4、5または6つ）のアミノ酸置換（例えば、E318、K320およびK322位における1、2、3つの置換）を含み得る。好ましくは、上で述べた位置におけるアミノ酸は、アラニンまたはセリンによって置換される。

10

【0090】

ある特定の実施形態において、免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチドは：（i）297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234、235、236または237位における1つのアミノ酸置換；（ii）297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234～237位の2つにおけるアミノ酸置換；（iii）297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、および234～237位の3つにおけるアミノ酸置換；（iv）297位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換、234、235および237位におけるアミノ酸置換、ならびに236位におけるアミノ酸欠失；（v）234～237位の3つにおけるアミノ酸置換、ならびに318、320および322位におけるアミノ酸置換；または（vi）234～237位の3つにおけるアミノ酸置換、236位におけるアミノ酸欠失、ならびに318、320および322位におけるアミノ酸置換を含む。

20

【0091】

本開示の融合タンパク質中の297位のアスパラギンにアミノ酸置換を有する例示的な変異免疫グロブリンC_{H2}領域は：L234、L235、G237およびN297にアラニン置換、ならびにG236に欠失を有するヒトIgG1 C_{H2}領域（配列番号103）、V234、G236およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG2 C_{H2}領域（配列番号104）、F234、L235、G237およびN297にアラニン置換、ならびにG236に欠失を有するヒトIgG4 C_{H2}領域（配列番号75）、F234およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 C_{H2}領域（配列番号375）、L235およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 C_{H2}領域（配列番号376）、G236およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 C_{H2}領域（配列番号377）、ならびに、G237およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 C_{H2}領域（配列番号378）を含む。

30

40

【0092】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異C_{H2}領域は、上に記載されたアミノ酸置換に加えて、上で述べた位置以外の1つ以上の位置に1つ以上の追加のアミノ酸置換を含み得る。そのようなアミノ酸置換は、保存的または非保存的なアミノ酸置換であり得る。例えば、ある特定の実施形態において、P233は、変異IgG2 C_{H2}領域ではE233に変更され得る（例えば、配列番号104を参照のこと）。さらに、またはあるいは、ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異C_{H2}領域は、1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失またはその両方を含み得る。その挿入、欠失または置換は、免疫グロブリンC_{H2}領域内の任意の位置（例えば、リンカーを介してC_{H2}領域を別の領域（例えば、可変領域）と連結することによって生じる野生型免疫グ

50

ロブリン C_{H2} 領域のN末端またはC末端)に存在し得る。

【0093】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異 C_{H2} 領域は、野生型免疫グロブリン C_{H2} 領域(例えば、野生型ヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4またはマウスIgG2a(例えば、IGHG2c)の C_{H2} 領域)と少なくとも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%同一の配列を含むか、またはその配列である。

【0094】

本開示の融合タンパク質中の変異免疫グロブリン C_{H2} 領域は、様々な種(ヒト、マウス、ラットおよび他の哺乳動物を含む)由来の様々な免疫グロブリンアイソタイプ(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2およびIgD)の C_{H2} 領域に由来し得る。ある特定の好ましい実施形態において、本開示の融合タンパク質中の変異免疫グロブリン C_{H2} 領域は、配列が配列番号64、66、68および73に示されている、ヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4またはマウスIgG2a(例えば、IGHG2c)の C_{H2} 領域に由来し得る。

【0095】

Fcレセプター(CD16、CD32、CD64、CD89、FcR1、FcRn)または補体成分C1qとのFc相互作用を変化させ得る変異をFcドメインの内側または外側に作製するための方法は、当該分野で公知である(例えば、米国特許第5,624,821号; Presta(2002) Curr. Pharma. Biotechnol. 3:237を参照のこと)。

【0096】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、いかなる免疫グロブリン C_{H2} 領域も含まない。

【0097】

(免疫グロブリン C_{H3} 領域ポリペプチド)

本明細書中に記載されるように、本開示の融合タンパク質は、1つ以上の免疫グロブリン C_{H3} 領域ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、いかなる C_{H2} 領域も含まない。そのような実施形態において、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインは、リンカー(例えば、ヒンジ)ポリペプチドを介して免疫グロブリン C_{H3} 領域に直接連結される。 C_{H2} 領域が存在しないある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、ただ1つの C_{H3} 領域を含み得る。代替の実施形態は、2つの C_{H3} 領域を含み、 C_{H2} 領域を含まない、本開示の融合タンパク質を含む。

【0098】

融合タンパク質が変異免疫グロブリン C_{H2} 領域と免疫グロブリン C_{H3} 領域の両方を含む実施形態において、その C_{H2} および C_{H3} 領域は、同じかまたは異なる免疫グロブリン、抗体アイソタイプまたは対立遺伝子改変体に由来し得る。好ましくは、その C_{H2} 領域は、 C_{H3} 領域のアミノ末端に直接連結される。 C_{H3} 領域のアミノ末端に直接連結される C_{H2} 領域を含む例示的な配列は、配列番号11~14および101に示されている。あるいは、その C_{H2} 領域は、1つ以上のアミノ酸またはリンカーを介してその C_{H3} 領域に連結され得る(例えば、配列表に示されているようなリンカーを参照のこと)。

【0099】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、2つの免疫グロブリン C_{H3} 領域を含み得る。これらの C_{H3} 領域は、同じ免疫グロブリンアイソタイプ由来の野生型 C_{H3} 領域もしくは変異 C_{H3} 領域であり得、または異なる免疫グロブリンアイソタイプに由来し得る。例えば、ある特定の他の実施形態において、融合タンパク質は、ヒトIgMの C_{H3} 領域およびヒトIgG1の C_{H3} 領域を含む。ヒトIgMの C_{H3} 領域とヒトIgG1の C_{H3} 領域とが共に連結されている例示的な配列としては、配列番号15お

10

20

30

40

50

よび74が挙げられる。ある特定の他の実施形態において、融合タンパク質は、マウスC_{H3}_μ領域およびマウスC_{H3}領域を含む。マウスC_{H3}_μ領域とマウスC_{H3}領域とが共に連結されている例示的な配列としては、配列番号308および309が挙げられる。

【0100】

本融合タンパク質が2つの免疫グロブリンC_{H3}領域を含む実施形態において、他方のC_{H3}領域に対してアミノ末端に位置するC_{H3}領域は、「第1C_{H3}領域」と呼ばれる。その他方のC_{H3}領域は、「第2C_{H3}領域」と呼ばれる。そのような実施形態において、それら2つの免疫グロブリンC_{H3}領域は、互いに直接融合され得る。換言すれば、第1C_{H3}領域のC末端は、第2C_{H3}領域のアミノ末端に、それらの間にいかなる介在アミノ酸残基もなしに（すなわち、リンカーの非存在下で）直接連結される。あるいは、それら2つのC_{H3}領域は、1つ以上（例えば、2～8つ）のアミノ酸またはリンカー（例えば、配列表に示されているようなリンカーを参照のこと）を介して連結され得る。

10

【0101】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の免疫グロブリンC_{H3}領域は、1つ以上（例えば、2～8つ）の追加のアミノ酸置換を含み得る。そのようなアミノ酸置換は、保存的であってもよいし、非保存的であってもよい。さらに、またはあるいは、ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中のC_{H3}領域は、様々な位置に1つ以上（例えば、2～8つ）のアミノ酸の挿入、欠失またはその両方を含み得る。その挿入、欠失または置換は、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方を含む、免疫グロブリンC_{H3}領域内の任意の位置に存在してよい。

20

【0102】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質中の免疫グロブリンC_{H3}領域は、野生型免疫グロブリンC_{H3}領域（例えば、野生型ヒトIgM、IgG1、IgG2またはIgG4のC_{H3}領域）と少なくとも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%同一の配列を含むか、またはその配列である。

【0103】

ある特定の実施形態において、免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドは、様々な種（すなわち、ヒト、マウス、ラットまたは他の哺乳動物）由来の様々な免疫グロブリンアイソタイプ（例えば、IgA、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgEまたはIgM）のいずれか1つの野生型C_{H3}領域を含む野生型免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドである。例えば、その免疫グロブリンC_{H3}領域は、野生型ヒトIgG1 C_{H3}領域（例えば、配列番号65）、野生型ヒトIgG2 C_{H3}領域（例えば、配列番号67）、野生型ヒトIgG4 C_{H3}領域（例えば、配列番号69）、野生型ヒトIgM C_{H3}領域（例えば、配列番号71）、マウスC_{H3}_μ領域（例えば、配列番号329）または野生型マウスIGHG2c C_{H3}領域（例えば、配列番号54）であり得る。さらなる実施形態において、免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドは、変異免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドである。その免疫グロブリンC_{H3}領域内の変異は、補体結合に関与する、H433またはN434などの1つ以上の位置に存在し得る。

30

40

【0104】

（追加の配列および改変）

本明細書中に記載されるように、本開示の一本鎖融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって：（a）CD3（例えば、CD3）に特異的に結合する結合ドメイン、（b）リンカーポリペプチド、（c）必要に応じて免疫グロブリンC_{H2}領域ポリペプチド、および（d）免疫グロブリンC_{H3}領域ポリペプチドを含み得る。さらに、本開示の融合タンパク質は、1つ以上の追加領域、例えば、融合タンパク質を発現するための、そのアミノ末端におけるリーダー配列、追加のFcサブ領域（例えば、IgMまたはIgEの野生型または変異C_{H4}領域）、または識別目的もしくは精製目的のための、

50

そのカルボキシ末端におけるテイル配列を含み得る。例示的なテイル配列としては、検出用または精製用のエピトープタグ（例えば、6 - ヒスチジン領域またはFLAGエピトープ）が挙げられ得る。

【0105】

例えば、本融合タンパク質は、特定の発現系の使用に起因する追加のアミノ酸残基を有し得る。例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ（GST）融合生成物の一部として所望のポリペプチドを発現する市販のベクターを使用することにより、その所望のポリペプチドからGST成分を切断した後、-1位に追加のグリシン残基を有する所望のポリペプチドがもたらされる。通常、配列のカルボキシ末端および/またはアミノ末端のアミノ酸配列にヒスチジンタグが組み込まれているものを含む、他のベクター系における発現から生じる改変体もまた、企図される。融合タンパク質のカルボキシ末端またはアミノ末端に存在し得る例示的な追加配列は、配列番号70に示されているように、3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含む。

10

【0106】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、そのN末端にリーダーペプチドを含む。そのリードペプチドは、発現された融合タンパク質の分泌を促進する。任意の従来のリーダーペプチド（シグナル配列）を用いることにより、新生の発現ポリペプチドまたは融合タンパク質を分泌経路に向かわせ、そして、そのリーダーペプチドと融合タンパク質との間の接合部または接合部付近でリーダーペプチドが成熟融合タンパク質から切断されると予想される。特定のリーダーペプチドは、当該分野において公知の考慮事項に基づいて選択される（例えば、分子的操作を容易にするため、制限エンドヌクレアーゼ切断部位をリーダーペプチドのコード配列の最初または最後に容易に含めることを可能にする核酸分子にコードされた配列を用いること）。ただし、そのリーダーペプチドが、そのポリペプチドまたは融合タンパク質の成熟中に切断されない場合に、そのような導入された配列は、新生の発現タンパク質からのリーダーペプチドの任意の所望のプロセッシングを容認しがたく干渉しないか、または、ポリペプチドまたは融合タンパク質の任意の所望の機能を容認しがたく干渉しないアミノ酸を規定する。本開示の例示的なリーダーペプチドは、天然のリーダー配列またはその他のもの（例えば、 $H_3N - MDFVQVQIFSFLLISASVIMSRG - CO_2H$ （配列番号9））を含む。

20

【0107】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、グリコシル化され、ここで、グリコシル化のパターンは、種々の因子に依存し、その因子としては、そのタンパク質が発現される宿主細胞（組換え宿主細胞内で調製される場合）および培養条件が挙げられる。

30

【0108】

さらなる実施形態において、本開示の融合タンパク質の免疫グロブリン C_{H2} または C_{H3} 領域は、免疫グロブリン参照配列の C_{H2} または C_{H3} 領域と比べて、変更されたグリコシル化パターンを有し得る。例えば、任意の種々の遺伝子操作を用いることにより、グリコシル化部位を形成する1つ以上の特定のアミノ酸残基が変更され得る（Coら（1993）*Mol. Immunol.* 30:1361; Jacquemonら（2006）*J. Thromb. Haemost.* 4:1047; Schusterら（2005）*Cancer Res.* 65:7934; Warnockら（2005）*Biotechnol. Bioeng.* 92:831を参照のこと）。あるいは、本開示の融合タンパク質を産生する宿主細胞が、変更されたグリコシル化パターンをもたらすように操作され得る。

40

【0109】

ある特定の実施形態において、本開示は、本明細書中に記載される融合タンパク質の誘導体も提供する。誘導体には、アミノ酸残基の挿入、欠失または置換以外の改変を有する融合タンパク質が含まれる。好ましくは、その改変は、本質的に共有結合性であり、例えば、ポリマー、脂質、他の有機部分および無機部分との化学結合が挙げられる。本開示の

50

誘導体は、特定の融合タンパク質の循環半減期を延長するように調製され得、またはその融合タンパク質が所望の細胞、組織または臓器を標的とする能力を改善するように設計され得る。

【0110】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質のインビボ半減期は、大分子の半減期を延長するための当該分野で公知の方法を用いて延長され得る。例えば、本開示は、1つ以上の水溶性ポリマー付着物（例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコール）を含むように共有結合的に改変されたかまたは誘導体化された融合タンパク質を包含する（例えば、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号；同第4,179,337号を参照のこと）。当該分野で公知のなお他の有用なポリマーとしては、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロースおよび他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）およびポリビニルアルコール、ならびにこれらのポリマーの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコール（PEG）で誘導体化されたタンパク質が、特に好ましい。水溶性ポリマーは、特定の位置、例えば、本開示に記載の融合タンパク質のアミノ末端に結合され得るか、またはそのポリペプチドの1つ以上の側鎖にランダムに付着され得る。治療能力を改善するためのPEGの使用は、米国特許第6,133,426号に記載されている。

10

20

【0111】

いくつかの実施形態において、本開示に記載の融合タンパク質は、アミノ末端に配置された免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含むPIMS分子である。そのアミノ末端のヒンジ領域は、免疫グロブリンC_{H3}領域と結合ドメインとの間に見られるリンカーと同じであってもよいし、異なってもよい。いくつかの実施形態において、アミノ末端に配置されたリンカーが、天然に存在するモチーフまたは付加されたモチーフ（例えば、CPPC、配列番号330）を含むことにより、二量体化または多量体化された分子のアミノ末端を安定化する少なくとも1つのジスルフィド結合の形成が促進される。

30

【0112】

（融合タンパク質を作製するためおよび精製するための方法）

本開示の融合タンパク質は、当該分野で公知の方法に従って作製され得る。例えば、SMIP融合タンパク質を作製するための方法は、米国特許公開第2003/0133939号、同第2003/0118592号および同第2005/0136049号に記載されており、PIMSタンパク質を作製するための方法は、例えば、PCT出願公開番号WO2009/023386に記載されている。

【0113】

ある特定の実施形態において、本開示は、本明細書中に記載されるような精製された融合タンパク質を提供する。用語「精製された」は、本明細書中で使用されるとき、その融合タンパク質がその天然で入手可能な状態に比べて任意の程度に精製されている、他の成分から単離可能な組成物のことを指す。ゆえに、「精製されたタンパク質」とは、それが天然に存在する環境から単離された、そのようなタンパク質のことも指す。ある特定の実施形態において、本開示は、本明細書中に記載されるような実質的に精製された融合タンパク質を提供する。「実質的に精製された」とは、タンパク質がその組成物の主成分を形成している（例えば、その組成物においてそのタンパク質が少なくとも約50重量%、例えば、少なくとも約60重量%、約70重量%、約80重量%、約90重量%、約95重量%、約99重量%を構成する）タンパク質の組成物のことを指す。

40

【0114】

タンパク質精製法は、当業者に周知である。これらの手法は、1つのレベルにおいて、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分の粗分画を含む。クロマトグラフィおよび電

50

気泳動の手法を用いることによって部分的または完全な精製（または均一までの精製）が達成されるさらなる精製が望まれることが多い。純粋な融合タンパク質の調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィ、排除クロマトグラフィ；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；および等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィおよびHPLCである。

【0115】

精製の程度を定量化するための様々な方法は、本開示に鑑みて当業者に公知である。これらとしては、例えば、活性画分の比結合活性を測定すること、またはSDS/PAGE分析によって画分中のタンパク質の量を評価することが挙げられる。タンパク質画分の純度を評価するための好ましい方法は、その画分の結合活性を計算し、それを最初の抽出物の結合活性と比較し、そして、「精製倍数」によって本明細書中で評価される精製の程度を計算することである。結合活性の量を表すために使用される実際の単位は、当然のことながら、精製を追跡するのに選択される特定のアッセイ手法、および発現されたタンパク質が検出可能な結合活性を示すか否かに依存する。

10

【0116】

（例示的な融合タンパク質）

本開示の例示的な一本鎖融合タンパク質としては、それぞれ配列番号80～85、88～93、96および97に示されているような、BC3 IgG1 N297、BC3 IgG1 AA、BC3 IgG2 AA、BC3 IgG4 AA、BC3 HM1、BC3 C_H2、OKT3 IgG1 AA、OKT3 IgG2 AA、OKT3 IgG4 AA、OKT3 HM1、OKT3 C_H2、H57 null2および2C11 null2が挙げられる。本開示の例示的な好ましい一本鎖融合タンパク質としては、それぞれ配列番号265～299に示されているような、キメラCris-7 IgG1 AA、キメラCris-7 IgG2 AA、キメラCris-7 IgG4 AA、キメラCris-7 HM1、ヒト化Cris-7 IgG1 AA、ヒト化Cris-7 IgG2 AA、ヒト化Cris-7 IgG4 AAおよびヒト化Cris-7 HM1が挙げられる。追加の例示的な一本鎖融合タンパク質としては、それぞれ配列番号86、87、94および95に示されているような、カルボキシ末端のタグを有しない、BC3 HM1、BC3 C_H2、OKT3 HM1およびOKT3 C_H2が挙げられる。さらなる例示的な融合タンパク質としては、配列番号22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、47、56、76～79、224、226、228、230、232、234、236、238、240、247、249、251、253、255および257に示されているような、アミノ末端にリーダー配列を有する、上で述べた融合タンパク質が挙げられる。アミノ末端にリーダー配列を有する追加の例示的な融合タンパク質としては、H57 half null（配列番号304）およびH57 HM2（配列番号306）が挙げられる。さらなる例示的な融合タンパク質は、配列番号311、313、315、317、319、321、323、325および327に示されているような、様々なリンカー配列を有するBC3 IgG1 N297である。これらの例示的な一本鎖融合タンパク質のうちのいくつかは、下記の実施例の項に詳細に記載される。

20

30

【0117】

（機能的特徴）

本明細書中に記載されるように、本開示の一本鎖融合タンパク質は、以下の特性または機能的特徴：（1）T細胞を活性化させないこと、（2）サイトカイン放出を誘導しないかまたは最小のサイトカイン放出を誘導すること、（3）TCRシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導すること、（4）対応するモノクローナル抗体よりもカルシウム流動を増加させること、（5）同種抗原に対するT細胞応答を阻止すること、（6）抗原に対するメモリーT細胞の応答を阻止すること、および（7）TCR複合体を下方調節することのうちの一つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7つ）またはそれらの任意の組み合わせを有し得る。

40

【0118】

50

ある特定の好ましい実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、T細胞を活性化させないか、またはT細胞を最小に活性化させる。融合タンパク質が、T細胞（例えば、PHAまたはConAで刺激されたT細胞）を処理するために使用されるとき、本開示の実施例に提供される少なくとも1つのインビトロまたはインビボアッセイにおいて無処理細胞と比べて活性化されたT細胞のパーセンテージを統計学的に有意に増加させない場合に、その融合タンパク質は、「T細胞を活性化させないか、または最小にもしくはわずかに活性化させる」。好ましくは、T細胞の活性化は、実施例1に記載される、刺激されたT細胞の活性化のインビトロアッセイにおいて測定される。

【0119】

さらに好ましい実施形態において、本開示の融合タンパク質は、サイトカインストームを誘導しないか、または臨床的に関連性のあるサイトカイン放出を誘導しない。融合タンパク質が、T細胞を処理するために使用されるとき、当該分野で公知であるかまたは本開示の実施例に提供される少なくとも1つのインビトロもしくはインビボアッセイにおいて処理されないときと比べて、処理された細胞から放出される、IFNを含む少なくとも1つのサイトカイン；好ましくは、IFNおよびTNFまたはIL-6およびTNFを含む少なくとも2つのサイトカイン；好ましくは、IL-6、IFNおよびTNFを含む3つのサイトカイン；好ましくは、IL-2、IL-6、IFNおよびTNFを含む4つのサイトカイン；および好ましくは、IL-2、IL-6、IL-10、IFNおよびTNFを含む少なくとも5つのサイトカインの量を統計学的に有意に増加させない場合に、その融合タンパク質は、「サイトカインストームを誘導しない」（「検出不可能な、わずかなまたは最小のサイトカイン放出を誘導する」または「サイトカイン放出を誘導しないかまたは最小限の検出可能なサイトカイン放出を誘導する」とも言及される）。好ましくは、そのサイトカインストームは、実施例1に記載される刺激されたT細胞のアッセイによって、インビトロにおけるサイトカイン放出において測定される。臨床的には、サイトカイン放出症候群は、ある特定のサイトカイン（例えば、IFNならびにIL-2、IL-6およびTNF）の最大の放出を伴う、発熱、悪寒、発疹、悪心ならびに時折、呼吸困難および頻拍を特徴とする。インビトロアッセイまたはインビボにおいて放出について試験され得るサイトカインとしては、G-CSF、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP1、IFNおよびTNFが挙げられ；より好ましくは、IL-2、IL-6、IL-10、IFNおよびTNFが挙げられる。

【0120】

さらに好ましい実施形態において、本開示の融合タンパク質は、T細胞などの細胞においてカルシウム流動の増加を引き起こす。融合タンパク質が、T細胞を処理するために使用されるとき、当該分野で公知であるかまたは本明細書中に提供されるインビトロアッセイにおいて、対応する抗体（すなわち、本開示の一本鎖融合タンパク質と同じ結合ドメインを有する抗体）で処理された細胞と比べて、処理された細胞のカルシウム流動の統計学的に有意な急増を（好ましくは、処理の300秒以内、より好ましくは、200秒以内、最も好ましくは、100秒以内に）引き起こす場合、その融合タンパク質は、「カルシウムの増加」を引き起こす。好ましくは、本開示の一本鎖融合タンパク質によって引き起こされるカルシウム流動は、実施例5に記載されるインビトロカルシウム流動アッセイにおいて、対応する抗体によって引き起こされる流動と比較され、処理の少なくとも最初の100～300秒以内に観察されるかまたは測定される。

【0121】

さらなる実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、TCRシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導する。「TCRシグナル伝達経路」とは、ペプチド：MHCリガンドのTCRおよびそのコレセプター（CD4またはCD8）への結合を介して惹起されるシグナル伝達経路のことを指す。「TCRシグナル伝達経路内の分子」とは、TCRシグナル伝達経路に直接関与する分子（例えば、そのリン酸化状態（例えば、その分子がリン酸化されているか否か）、別の分子に対する結合親和性、または酵素活性が、ペプ

10

20

30

40

50

チド：MHCリガンドのTCRおよびそのコレセプターへの結合からのシグナルにตอบสนองして変化される分子)のことを指す。TCRシグナル伝達経路内の例示的な分子としては、TCR複合体またはその構成要素(例えば、CD3鎖)、ZAP-70、Fyn、Lck、ホスホリパーゼc、タンパク質キナーゼC、転写因子NF- κ B、ホスファターゼ(phosphatase)カルシニューリン、転写因子NFAT、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)、Ras、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)、MAPキナーゼキナーゼ(MAPKK)、MAPキナーゼ(ERK1/2)およびFosが挙げられる。

【0122】

本開示の一本鎖融合タンパク質が、T細胞を処理するために使用されるとき、本開示の実施例に記載されるようなインビトロもしくはインビボアッセイまたは当該分野で公知のレセプターシグナル伝達アッセイにおいて、TCRシグナル伝達経路内の分子(例えば、CD3鎖、ZAP-70およびERK1/2)のリン酸化を統計学的に有意に増加させる場合、本開示の一本鎖融合タンパク質は、「TCRシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導する」。当該分野で公知のほとんどのレセプターシグナル伝達アッセイからの結果は、ウエスタンブロットまたは蛍光顕微鏡観察などの免疫組織化学的方法を用いて決定される。

10

【0123】

さらなる実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、同種抗原に対するT細胞応答を阻止し得る。「同種抗原」は、ある種において代替(対立遺伝子)の形態で存在する抗原であり、ゆえに、ある形態が、その同種抗原を有しないその種の別のメンバーに移入されると免疫応答を誘導する。例示的な同種抗原は、例えば、血液細胞上(すなわち、血液型抗原)または組織移植片(すなわち、同種移植片)上に見られ得る。

20

【0124】

本開示の一本鎖融合タンパク質が、T細胞を処理するために使用されるとき、インビトロまたはインビボアッセイ(例えば、本開示の実施例に提供される、ヒト混合リンパ球反応(MLR)アッセイおよび急性移植片対宿主病(aGVHD)モデル)において、同種抗原にตอบสนองして活性化されたT細胞のパーセンテージを統計学的に有意に減少させる場合、本開示の一本鎖融合タンパク質は、「同種抗原に対するT細胞応答を阻止する」。当該分野で公知の他のアッセイ(例えば、結合アッセイ、および遅延型過敏反応を検出するマウスにおける足蹠腫脹アッセイのような皮膚試験)もまた、同種抗原に対する反応性を測定するために使用され得る。

30

【0125】

さらなる実施形態において、本開示の融合タンパク質は、抗原に対するメモリーT細胞の応答を阻止する。一本鎖融合タンパク質が、メモリーT細胞を処理するために使用されるとき、インビトロまたはインビボアッセイ(例えば、本開示の実施例に提供される、破傷風トキソイドを用いてメモリーT細胞の活性化を分析するアッセイ)において、特定の抗原(例えば、破傷風トキソイド)にตอบสนองして活性化されたT細胞のパーセンテージを統計学的に有意に減少させる場合、その一本鎖融合タンパク質は、「抗原に対するメモリーT細胞の応答を阻止する」。動物免疫モデルもまた、抗原提示アッセイによって、インビボとエキソビボの両方において二次的な抗原特異的T細胞応答を検出するために使用され得る。上に記載された遅延型過敏アッセイに加えて、⁵¹Cr放出アッセイなどの細胞傷害アッセイが、T細胞活性を検出するために利用され得る(Lavieら(2000)International Immunology 12(4):479-486)。

40

【0126】

さらなる実施形態において、本開示の融合タンパク質は、T細胞の表面からのTCR複合体を下方調節する。一本鎖融合タンパク質が、T細胞を処理するために使用されるとき、インビトロまたはインビボアッセイにおいて、T細胞集団の表面上のTCR複合体の数を統計学的に有意に減少させる場合、その一本鎖融合タンパク質は、「TCR複合体を下方調節する」。有用なインビトロまたはインビボアッセイとしては、本開示の実施例にお

50

いて提供される、T細胞表面からのTCRおよびCD3の下方調節を評価するためのアッセイが挙げられる。そのようなアッセイは、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光顕微鏡観察などの当該分野で公知の手法によって測定して、刺激の前後に細胞表面に発現されるTCRまたはCD3の量を比較する。

【0127】

(T細胞活性化またはサイトカイン放出を検出するための方法)

関連する態様において、本開示は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質によって誘導されるT細胞活性化を検出するための方法を提供し、その方法は：(a)マイトジェンで刺激されたT細胞を準備する工程、(b)工程(a)の刺激されたT細胞を、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質で処理する工程、および(c)工程(b)において処理された刺激されたT細胞の活性化を検出する工程を包含する。

10

【0128】

用語「マイトジェン」は、本明細書中で使用されるとき、様々な特異性またはクローン起源のリンパ球において有糸分裂を誘導する化学物質のことを指す。T細胞を刺激するために使用され得る例示的なマイトジェンとしては、フィトヘマグルチニン(PHA)、コンカナバリンA(ConA)、リポ多糖(LPS)、アメリカヤマゴボウマイトジェン(PWM)および酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)が挙げられる。

【0129】

本明細書中に提供されるT細胞活性化を検出するための方法のある特定の実施形態において、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質は、本明細書中に提供される融合タンパク質である。ある特定の他の実施形態において、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質は、モノクローナル抗体である。

20

【0130】

T細胞活性化は、当該分野で公知の活性化マーカー(例えば、CD25、CD40リガンドおよびCD69)の発現を測定することによって検出され得る。活性化されたT細胞は、CFSE標識アッセイおよびチミジン取り込みアッセイ(Adams(1969)Exp. Cell Res. 56:55)などの細胞増殖アッセイによっても検出され得る。

30

【0131】

関連する態様において、本開示は、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質によって誘導されるサイトカイン放出を検出するための方法を提供し、その方法は：(a)マイトジェンで刺激されたT細胞を準備する工程、(b)工程(a)の刺激されたT細胞を、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質で処理する工程、および(c)工程(b)において処理された刺激されたT細胞からのサイトカインの放出を検出する工程を包含する。

【0132】

本明細書中に提供されるサイトカイン放出を検出するための方法のある特定の実施形態において、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質は、本明細書中に提供される融合タンパク質である。ある特定の他の実施形態において、TCR複合体またはその構成要素に特異的に結合する結合ドメインを含むタンパク質は、モノクローナル抗体である。

40

【0133】

(ポリヌクレオチド、発現ベクターおよび宿主細胞)

本開示は、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド(単離されているかまたは精製されているかまたは純粋なポリヌクレオチド)、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター(クローニングベクターおよび発現ベクターを含む)、および本開示に記載のポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞(例えば、宿主細胞)を提供する。

50

【0134】

ある特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド (DNA または RNA) が企図される。例示的なポリヌクレオチドとしては、配列番号 21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、46、55、303、306、310、312、314、316、318、320、322、324 および 326 が挙げられる。

【0135】

本発明は、本開示のポリヌクレオチドを含むベクター、特に、組換え発現構築物にも関する。1つの実施形態において、本開示は、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、融合タンパク質の転写、翻訳およびプロセッシングを引き起こし得るかまたは促進し得る他のポリヌクレオチド配列とともに含むベクターを企図する。

10

【0136】

原核生物および真核生物の宿主とともに使用するための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY、(1989)に記載されている。例示的なクローニング/発現ベクターとしては、プラスミド、ファージミド、ファスミド、コスミド、ウイルス、人工染色体、またはその中に含まれるポリヌクレオチドの増幅、移入および/もしくは発現に適した当該分野で公知の任意の核酸ビヒクルに基づき得る、クローニングベクター、シャトルベクターおよび発現構築物が挙げられる。

20

【0137】

本明細書中で使用されるとき、「ベクター」は、それに連結された別の核酸を運搬することができる核酸分子のことを意味する。例示的なベクターとしては、プラスミド、酵母人工染色体およびウイルスゲノムが挙げられる。ある特定のベクターは、宿主細胞内で自律的に複製し得、一方、他のベクターは、宿主細胞のゲノム内に組み込まれ得、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」)と本明細書中で呼ばれ、それは、発現制御配列に作動可能に連結された核酸配列を含み、ゆえにそれらの配列の発現を指示することができる。

【0138】

ある特定の実施形態において、発現構築物は、プラスミドベクターに由来する。例証となる構築物としては、アンピシリン耐性遺伝子をコードする核酸配列、ポリアデニル化シグナルおよびT7プロモーター部位を有する改変pNASSベクター(Clontech, Palo Alto, CA); CHEF1プロモーターを有するpDEF38およびpNEF38(CMC ICOS Biologics, Inc.); ならびにCMVプロモーターを有するpEE12.4(Lonza)が挙げられる。他の適当な哺乳動物発現ベクターが、周知である(例えば、Ausubelら、1995; Sambrookら、前出を参照のこと; また、例えば、Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ)のカタログも参照のこと)。適切な選択薬剤(例えば、メトトレキサート)の適用後の遺伝子増幅に起因する、融合タンパク質の高い産生レベルを促進するために、適当な調節管理下においてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)のコード配列を含む有用な構築物が、調製され得る。

30

40

【0139】

一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする複製開始点および選択マーカー、ならびに上に記載されたような下流の構造配列の転写を指示する、高度に発現される遺伝子に由来するプロモーターを含む。本開示に記載のポリヌクレオチドと作動可能に連結されたベクターは、クローニング構築物または発現構築物をもたらす。例示的なクローニング/発現構築物は、本開示のポリヌクレオチドに作動可能に連結された、少なくとも1つの発現制御因子、例えば、プロモーターを含む。追加の発現制御因子(例え

50

ば、エンハンサー、因子特異的結合部位、ターミネーターおよびリボソーム結合部位)もまた、本開示に記載のベクターおよびクローニング/発現構築物において企図される。本開示に記載のポリヌクレオチドの異種構造配列は、翻訳開始配列および翻訳終結配列とともに、適切な相において組み立てられる。したがって、例えば、本明細書中に提供されるような融合タンパク質をコードする核酸は、宿主細胞内でそのようなタンパク質を発現するための組換え発現構築物として種々の発現ベクター構築物のいずれか1つに含められ得る。

【0140】

適切なDNA配列は、例えば、種々の手順によってベクターに挿入され得る。通常、DNA配列は、当該分野で公知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ切断部位に挿入される。クローニング、DNAの単離、増幅および精製、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含む酵素反応、ならびに様々な分離手法に対する標準的な手法が企図される。いくつかの標準的な手法が、例えば、Ausubelら(1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrookら(1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatisら(1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 DNA Cloning Vol. IおよびII, IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK); およびその他に記載されている。

10

20

【0141】

発現ベクター内のDNA配列は、mRNA合成を指示する少なくとも1つの適切な発現制御配列(例えば、構成的プロモーターまたは制御性プロモーター)に作動可能に連結される。そのような発現制御配列の代表的な例としては、上に記載されたような真核細胞またはそれらのウイルスのプロモーターが挙げられる。プロモーター領域は、CAT(クロラムフェニコルトランスフェラーゼ)ベクターまたは選択マーカーを含む他のベクターを用いて任意の所望の遺伝子から選択され得る。真核生物プロモーターとしては、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTRならびにマウスメタロチオネイン-Iが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、当該分野における通常のスکیلレベルの範囲内に十分入り、本開示に記載のタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーターまたは制御性プロモーターを含むある特定の特に好ましい組換え発現構築物の調製が、本明細書中に記載される。

30

【0142】

本開示のポリヌクレオチドの改変体もまた、企図される。改変体ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるような規定される配列のポリヌクレオチドの1つと少なくとも90%、好ましくは、95%、99%または99.9%同一であるか、または約65~68%の0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムもしくは約42%の0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、規定される配列のポリヌクレオチドのうち1つにハイブリダイズする。そのポリヌクレオチド改変体は、本明細書中に記載される機能性を有する結合ドメインまたはその融合タンパク質をコードする能力を保持する。

40

【0143】

用語「ストリンジェント」は、当該分野においてストリンジェントと通常理解されている条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主に、

50

温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に対するストリンジентな条件の例は、約65～68の0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは約42の0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989を参照のこと)。

【0144】

よりストリンジентな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、ホルムアミドまたは別の変性剤のより高い濃度)もまた使用され得る;しかしながら、ハイブリダイゼーションの速度が影響され得る。

【0145】

ある特定の実施形態において、あまりストリンジентではない条件(例えば、より低い温度、より高いイオン強度、ホルムアミドまたは別の変性剤のより低い濃度)が、使用され得る。ハイブリダイゼーション(hybridization)および洗浄に対する例示的なあまりストリンジентではない条件は、約42の0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムである。ポリヌクレオチド改変体は、本明細書中に記載される機能性を有する結合ドメインまたはその融合タンパク質をコードする能力を保持する。

【0146】

本開示のさらなる態様は、本開示のポリヌクレオチドまたはベクター/発現構築物のいずれかで形質転換されたかもしくはトランスフェクトされた宿主細胞、またはそうでなければ本開示のポリヌクレオチドまたはベクター/発現構築物のいずれかを含む宿主細胞を提供する。本開示のポリヌクレオチドまたはクローニング/発現構築物は、形質転換、トランスフェクションおよび形質導入を含む当該分野で公知の任意の方法を用いて、適当な細胞に導入される。宿主細胞には、例えば、エキソピボ遺伝子治療をはじめとした、エキソピボ細胞治療を受けている被験体の細胞が含まれる。本開示のある態様として企図される真核生物宿主細胞としては、それが本開示に記載のポリヌクレオチド、ベクターまたはタンパク質を内部に有するとき、被験体自身の細胞(例えば、ヒト患者自身の細胞)に加えて、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(発現される多価結合分子のグリコシル化パターンを改変することができる改変CHO細胞が挙げられる。米国特許出願公開番号2003/0115614を参照のこと)、COS細胞(例えば、COS-7)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、HEK293細胞、HepG2細胞、N細胞、3T3細胞、Spodoptera frugiperda細胞(例えば、Sf9細胞)、Saccharomyces cerevisiae細胞、ならびに本開示に記載のタンパク質またはペプチドを発現する際および必要に応じて単離する際に有用であると当該分野で公知の他の任意の真核細胞が挙げられる。大腸菌、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、Streptomyces、または本開示に記載のタンパク質もしくはペプチドを発現するため、および必要に応じて単離するために適していると当該分野で公知の任意の原核細胞を含む原核細胞もまた企図される。原核細胞からタンパク質またはペプチドを単離する際、特に、封入体からタンパク質を抽出するために当該分野で公知の手法が使用され得ると企図される。適切な宿主の選択は、本明細書中の教示から、当業者の範囲内である。本開示の融合タンパク質をグリコシル化する宿主細胞が、企図される。

【0147】

用語「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)とは、組換え発現ベクターを含む細胞のことを指す。そのような用語は、特定の対象細胞のことだけでなく、そのような細胞の子孫のことも指すと意図されると理解されるべきである。変異または環境の影響に起

10

20

30

40

50

因して、ある特定の改変が後の世代に生じ得るので、そのような子孫は、実際は親細胞と同一でない場合があるが、本明細書中で使用されるとき、なおも用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0148】

組換え宿主細胞は、プロモーターを活性化させるため、形質転換体を選択するため、または特定の遺伝子を増幅するために適切に改変された従来の栄養培地中で培養され得る。発現のために選択される特定の宿主細胞に対する培養条件（例えば、温度、pHなど）は、当業者に容易に明らかになる。様々な哺乳動物細胞の培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために使用され得る。哺乳動物の発現系の例としては、Gluzman (1981) Cell 23: 175に記載されているサル腎臓線維芽細胞のCOS-7系、ならびに適合するベクターを発現することができる他の細胞株、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株が挙げられる。哺乳動物の発現ベクターは、複製起点、適当なプロモーターおよび必要に応じてエンハンサー、ならびに例えば、多価結合タンパク質発現構築物の調製に関して本明細書中に記載されるような任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプター部位、転写終結配列、ならびに5'-フランキング非転写配列を含む。SV40のスライシングに由来するDNA配列およびポリアデニル化部位は、必要な非転写遺伝的エレメントを提供するために使用され得る。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションまたはエレクトロポレーション(Davisら(1986) Basic Methods in Molecular Biology)をはじめとした、当業者によく知られた種々の方法によって行われ得る。

10

20

【0149】

1つの実施形態において、宿主細胞は、本開示に記載のタンパク質またはポリペプチドの発現を指示する組換えウイルス構築物によって形質導入される。その形質導入された宿主細胞は、ウイルスの出芽中にウイルス粒子によって組み込まれる宿主細胞膜の一部に由来する、発現されたタンパク質またはポリペプチドを含むウイルス粒子を産生する。

【0150】

(組成物および使用方法)

TCR複合体またはその構成要素に対する融合タンパク質に加えて、本開示は、その融合タンパク質を含む薬学的組成物および単位用量形態、ならびにその融合タンパク質、薬学的組成物および単位用量形態を使用するための方法も提供する。

30

【0151】

TCRシグナル伝達に関連する疾患状態または状況に罹患しているヒトまたは非ヒト哺乳動物を処置するために、1回以上の投与の経過後にその疾患状態または状況の症状を回復させるのに有効な量で、融合タンパク質がその被験体に投与される。本開示のタンパク質は、ポリペプチドであるので、下記でより十分に検討されるような安定剤または他の薬学的に許容可能な賦形剤を必要に応じて含む薬学的に許容可能な希釈剤に懸濁され得るか、または溶解され得、それは、注射または注入による静脈内投与に使用され得る。

40

【0152】

薬学的に有効な量または用量は、ある疾患状態または状況を予防するため、その発生を阻害するため、またはそれらを処置するために（症状をある程度軽減するため、好ましくは、すべての症状を軽減するために）必要な量または用量である。好ましい実施形態において、薬学的に有効な量の本開示の一本鎖融合タンパク質が、T細胞媒介性疾患を処置するために使用される。薬学的に有効な用量は、疾患のタイプ、使用される組成物、投与経路、処置される被験体のタイプ、処置について考慮される特定の被験体の身体的特性、併用される医薬および医学分野の当業者が認識する他の因子に左右される。例えば、本開示の融合タンパク質の力価に応じて、0.1mg/kg ~ 100mg/kg体重の量（毎日、毎週、毎月または任意の適切な間隔で1回用量として投与され得る量）の活性成分が、投与され得る。

50

【0153】

上に記載され、実施例で例証されるように、本明細書中に提供されるTCR複合体またはその構成要素（例えば、CD3）に対する融合タンパク質は、T細胞の分裂促進性（mitogenicity）を誘導せずにTCRシグナル伝達経路に独自に関与する。以前の研究から、末梢T細胞の機能および分化が、TCR関連シグナル伝達カスケードの操作によって駆動され得ることが証明されている。例えば、T細胞アネルギーと適応性の制御性T細胞との両方が、強力な非活性化シグナルによって誘導され得る。さらに、ある特定のサブセットのT細胞は、強力なTCRシグナルの送達の際に、より細胞死を起こしやすいことがある。したがって、本明細書中に提供される融合タンパク質は、T細胞の機能および運命を調節するために使用され得、それにより、T細胞が重要な寄与物である自己免疫疾患または炎症性疾患を含むT細胞媒介性疾患の治療的な処置がもたらされ得る。さらに、本開示の融合タンパク質は、T細胞を活性化させず、そして/またはサイトカイン放出を誘導しないので、本融合タンパク質は、サイトカイン放出症候群および急性毒性などの副作用を有しないかまたはその副作用が少ないということについて、TCR複合体に対する他の分子（例えば、抗CD3抗体）よりも有益である。

10

【0154】

本融合タンパク質ならびにその組成物および単位用量形態によって処置され得る例示的な自己免疫障害または炎症性障害（A I I D）としては、炎症性腸疾患（例えば、クローン病または潰瘍性大腸炎）、真性糖尿病（例えば、I型糖尿病）、皮膚筋炎、多発性筋炎、悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変、急性散在性脳脊髄炎（A D E M）、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群（A P S）、自己免疫性肝炎、グッドパスチャー症候群、グレーブズ病、ギラン・バレー症候群（G B S）、橋本病、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、神経精神ループス、多発性硬化症（M S）、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、喘息、乾癬性関節炎、関節リウマチ、シェーグレン症候群、側頭動脈炎（「巨細胞性動脈炎」としても知られる）、自己免疫性溶血性貧血、水疱性類天疱瘡、血管炎、セリアック病（c o e l i a c d i s e a s e）、慢性閉塞性肺疾患、子宮内膜症、化膿性汗腺炎、間質性膀胱炎、限局性強皮症、強皮症、ナルコレプシー、神経性筋強直症、白斑および自己免疫性内耳疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0155】

ある特定の実施形態において、本明細書中に提供される融合タンパク質ならびに組成物および単位用量形態は、サイトカイン放出に関連する副作用を有しないかまたは副作用が最小であるかもしくは少ない免疫抑制剤として使用され得る。例えば、本明細書中に提供される一本鎖融合タンパク質ならびに組成物および単位用量形態は、急性拒絶、臓器移植後臓器機能障害（delayedgraftfunction）および固形臓器移植（例えば、腎臓、肝臓、肺、心臓移植）の移植片損失の誘導と、その予防（すなわち、そのリスクの低下）の両方または減少において使用され得る。さらに、ある特定の実施形態において、本開示の一本鎖融合タンパク質は、T細胞活性化を誘導せずに、免疫抑制性かつT細胞分裂促進的であると知られているTCR複合体に対する他の分子よりも有効な免疫抑制剤であり得る。さらなる実施形態において、本明細書中に提供される融合タンパク質ならびに組成物および単位用量形態は、他のT細胞媒介性疾患（例えば、移植片対宿主病（G V H D）ならびに自己免疫性障害および炎症性障害（A I I D））を処置するために使用され得る。

30

40

【0156】

別の態様において、融合タンパク質の組成物が、本開示において提供される。本開示の薬学的組成物は、通常、本明細書中に提供される融合タンパク質を、薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む。そのようなキャリアは、使用される投薬量および濃度においてレシピエントにとって無毒性である。治療上使用するための薬学的に許容可能なキャリアは、薬学分野において周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro (Ed.) 1985)に記載されている。例えば、生

50

理学的 pH の滅菌された食塩水およびリン酸緩衝食塩水が、使用され得る。保存剤、安定剤、色素などが、その薬学的組成物中に提供され得る。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸または p - ヒドロキシ安息香酸のエステルが、保存剤として加えられ得る。同文献の 1449。さらに、酸化防止剤および懸濁化剤が使用され得る。同文献。本発明の化合物は、遊離塩基または塩の形態で使用され得、その両方の形態が、本発明の範囲内であると考えられる。

【0157】

薬学的組成物は、緩衝液などの希釈剤、アスコルビン酸などの酸化防止剤、低分子量（約 10 残基未満の）ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、デキストリン）、キレート剤（例えば、EDTA）、グルタチオン、ならびに他の安定剤および賦形剤も含み得る。中性緩衝食塩水または非特異的な血清アルブミンと混合された食塩水が、例示的な希釈剤である。好ましくは、本生成物は、適切な賦形剤溶液（例えば、スクロース）を希釈剤として使用する凍結乾燥物として処方される。

10

【0158】

第 2 の薬剤と組み合わせられる本開示の融合タンパク質組成物の投与もまた企図される。第 2 の薬剤は、特定の疾患状態または障害（例えば、移植、炎症および自己免疫におけるもの）に対する標準的な処置として当該分野において認められている薬剤であり得る。企図される例示的な第 2 の薬剤としては、ステロイド、NSAIDs、mTOR インヒビター（例えば、ラパマイシン（シロリムス）、テムシロリムス、デフォロリムス（deforolimus）、エベロリムス、ゾタロリムス、クルクミン、ファルネシルチオサリチル酸）、カルシニューリンインヒビター（例えば、シクロスポリン、タクロリムス）、抗代謝産物（例えば、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル）、ポリクローナル抗体（例えば、抗胸腺細胞グロブリン）、モノクローナル抗体（例えば、ダクリズマブ、パシリキシマブ）もしくは他の活性な薬剤および補助的な薬剤またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

20

【0159】

「薬学的に許容可能な塩」とは、薬学的に許容可能であり、親化合物の所望の薬理的活性を有する、本開示の融合タンパク質、SMIP または抗体の塩のことを指す。そのような塩としては、以下：（1）無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など）；または有機酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、ヘキサ酸、シクロペンタンプロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3 - （4 - ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1, 2 - エタン - ジスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4 - クロロベンゼンスルホン酸、2 - ナフタレンスルホン酸、4 - トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4 - メチルピシクロ [2 . 2 . 2] - オクト - 2 - エン - 1 - カルボン酸、グルコヘプトン酸、ラウリル硫酸、3 - フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、第 3 級ブチル酢酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸など）で形成された酸付加塩；または（2）親化合物に存在する酸性プロトンが金属イオン、例えば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオンまたはアルミニウムイオンによって置き換えられるとき；または有機塩基（例えば、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、N - メチルグルカミンなど）と配位結合するとき形成される塩が挙げられる。

30

40

【0160】

例証となる特定の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、例えば、ボーラス注射または注入によって静脈内に投与される。投与経路としては、静脈内に加えて、経口、局所的、非経口（例えば、舌下または頬側）、舌下、直腸、膣および鼻腔内が挙げられる。非経口という用語は、本明細書中で使用されるとき、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内、空洞内、鞘内、道内（intrameatal）、尿道内の注射または注入手法を含む。本薬学的組成物は、その組成物が患者に投与された際にそれに含まれる活性成分を生

50

物が利用できるように処方される。患者に投与される組成物は、1つ以上の投薬単位の形態を取り得、ここで、例えば、錠剤が、1つの投薬単位であってもよいし、エアロゾル形態の本開示の1つ以上の化合物が入った容器が、複数の投薬単位を保持してもよい。

【0161】

経口投与の場合、賦形剤および/または結合剤（例えば、スクロース、カオリン、グリセリン、デンプンデキストラン、シクロデキストリン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースおよびエチルセルロース）が、存在し得る。甘味剤、保存剤、色素/着色料、矯味矯臭向上剤またはそれらの任意の組み合わせが、必要に応じて存在し得る。コーティングシェルもまた、必要に応じて使用され得る。

【0162】

注射による投与が意図された組成物において、界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定剤、等張剤またはそれらの任意の組み合わせの1つ以上が、必要に応じて含められ得る。

【0163】

核酸ベースの処方物または本開示に記載の発現産物を含む処方物の場合、約0.01 μg/kg ~ 約100 mg/kg 体重が、例えば、皮内、皮下、筋肉内もしくは静脈内の経路または所与の一連の状況下で適する当該分野で公知の任意の経路によって、投与される。好ましい投薬量は、例えば、約1 μg/kg ~ 約20 mg/kg であり、約5 μg/kg ~ 約10 mg/kg が特に好ましい。投与の回数および頻度が宿主の応答に依存することは、当業者に明らかである。

【0164】

本開示の薬学的組成物は、患者への投与を可能にする任意の形態（例えば、固体、液体または気体（エアロゾル）の形態など）で存在し得る。本組成物は、液体、例えば、エリキシル剤、シロップ剤、溶液、エマルジョンまたは懸濁物の形態で存在し得る。その液体は、2つの例として、経口投与用または注射による送達用であり得る。

【0165】

液体の薬学的組成物は、本明細書中で使用されるとき、溶液、懸濁物または他の類似の形態に関わらず、以下の成分：滅菌された希釈剤、例えば、注射用水、食塩水溶液、好ましくは、生理食塩水、リンガー溶液、等張性塩化ナトリウム、固定油、例えば、溶媒または懸濁媒体として働き得る合成モノまたはジグリセリド（diglycerides）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；緩衝剤（例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）、および張度調整用の薬剤（例えば、ナトリウム、塩化物またはデキストロース）のうち1つ以上を含み得る。非経口調製物は、ガラス製またはプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器または複数回用量バイアルに封入され得る。生理食塩水が、好ましい添加物である。注射可能な薬学的組成物は、好ましくは、滅菌されたものである。

【0166】

上記調製物中に他の成分（例えば、アルミニウム塩、油中水エマルジョン、生分解性オイルビヒクル、水中油エマルジョン、生分解性マイクロカプセルおよびリポソームを含む送達ビヒクル）を含めることも望ましい場合がある。そのようなビヒクルにおいて使用するためのアジュバントの例としては、N-アセチルムラミル-L-アラニン-D-イソグルタミン（MDP）、リポ多糖類（LPS）、グルカン、IL-12、GM-CSF、-インターフェロンおよびIL-15が挙げられる。

【0167】

当業者に公知の任意の適当なキャリアが、本開示の薬学的組成物中で使用され得るが、キャリアのタイプは、投与様式および徐放が望まれるか否かに応じて変化する。非経口投与の場合、そのキャリアは、水、食塩水、アルコール、脂肪、ろう、緩衝剤またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。経口投与の場合、上記のキャリアまたは固体キャリア（

10

20

30

40

50

例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムまたはそれらの任意の組み合わせ)のいずれかが使用され得る。

【0168】

本開示は、本開示の薬学的組成物を含む投薬単位を企図する。そのような投薬単位としては、例えば、1回用量または複数回用量のバイアルまたは注射器(2区画(一方は、凍結乾燥された形態の本開示の薬学的組成物を含み、他方は、再構成用の希釈剤を含む)のバイアルまたは注射器を含む)が挙げられる。複数回用量の投薬単位は、例えば、静脈内注入デバイスに接続するためのバッグまたはチューブでもあり得る。

【0169】

本開示は、単位用量または複数回用量の本開示の薬学的組成物、容器(例えば、バイアル)、およびその組成物を上に記載された障害などの障害に罹患している患者に投与するための一連の指示書を含むキットも企図する。

【実施例】

【0170】

(実施例)

(モノクローナル抗体および例示的な一本鎖融合タンパク質)

例示的なモノクローナル抗体(それ由来の結合ドメインおよびその改変体が例示的な一本鎖融合タンパク質を作製するために使用された)および一本鎖融合タンパク質が、簡潔に本明細書中に記載される。

【0171】

Cris-7(Cris-7mAbまたはCris-7FLとも呼ばれる)は、マウス抗ヒトCD3 IgG2aモノクローナル抗体(mAb)である(Reinherz, E.L.ら(eds.), Leukocyte typing II., Springer Verlag, New York, (1986))。Cris-7mAbは、ヒト、ヒビ、カニクイザル(cynomolgous)およびアカゲザルのT細胞に結合することが示された(データ示さず)。本明細書中に記載されるCris-7一本鎖融合タンパク質の各々もまた、この異種間の反応性を有すると示された(データ示さず)。

【0172】

キメラおよびヒト化Cris-7 IgG1-N297A(配列番号265、270、275、280、285、290、295)は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって：キメラまたはヒト化Cris-7重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、キメラまたはヒト化Cris-7軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、297位にアラニン置換を有するヒトIgG1のC_H₂領域、およびヒトIgG1のC_H₃領域を含む。

【0173】

キメラおよびヒト化Cris-7 IgG1-AA-N297A(配列番号266、271、276、281、286、291、296)は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって：キメラまたはヒト化Cris-7重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、キメラまたはヒト化Cris-7軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、L234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG1のC_H₂領域(すなわち、LLGG(234-237)AAA)、ならびにヒトIgG1のC_H₃領域を含む。

【0174】

キメラおよびヒト化Cris-7 IgG2-AA-N297A(配列番号267、272、277、282、287、292、297)は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって：キメラまたはヒト化Cris-7重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、キメラまたはヒト化Cris-7軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、V234、G236およびN297位に3つ

10

20

30

40

50

のアラニン置換を有するヒトIgG2のC_H2領域、ならびにヒトIgG2のC_H3領域を含む。

【0175】

キメラおよびヒト化Cris7 IgG4-AA-N297A(配列番号268、273、278、283、288、293、298)は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって：キメラまたはヒト化Cris-7重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、キメラまたはヒト化Cris-7軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、F234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG4のC_H2領域(すなわち、FLGG(234-237)AAA)、ならびにヒトIgG4のC_H3領域を含む。

10

【0176】

キメラおよびヒト化Cris-7 HM1(配列番号269、274、279、284、289、294、299)は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって：キメラまたはヒト化Cris-7重鎖可変領域、タンデムに連結された少なくとも3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、Cris-7軽鎖可変領域、野生型ヒトIgG1ヒンジ領域、ヒトIgM由来のC_H3領域およびヒトIgG1由来のC_H3領域、ならびに3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含むテイル配列を含む。

【0177】

BC3(BC3mAまたはBC3 FLとも呼ばれる)は、分裂促進的でない(non-mitogenic)マウス抗ヒトCD3 IgG2b mAbである(Anasettiら、J. Exp. Med. 172:1691-1700, 1990)。

20

【0178】

BC3-HM1(「BC3 HM1」とも呼ばれる)(配列番号84)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された少なくとも3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、野生型ヒトIgG1ヒンジ領域、ヒトIgM由来のC_H3領域およびヒトIgG1由来のC_H3領域、ならびに3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含むテイル配列を含む。

30

【0179】

BC3-C_H2(「BC3 C_H2」とも呼ばれる)(配列番号85)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された少なくとも3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、野生型IgG1ヒンジ領域、ヒトIgG1のC_H3領域ならびに3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含むテイル配列を含む。

【0180】

BC3-G1 N297A(「BC3 N297A」とも呼ばれる)(配列番号80)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、297位のアスパラギンにおいてアラニン置換を有するヒトIgG1のC_H2領域、およびヒトIgG1のC_H3領域を含む。

40

【0181】

BC3-G1 AA N297A(「BC3 IgG1AA」とも呼ばれる)(配列番号81)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、L234、L235、237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG1のC_H2領域(すなわち、LLGG(234-237)AAA)、ならびにヒトIgG1のC_H3領域を含む。

50

【0182】

BC3 - G2 AA N297A (「BC3 IgG2AA」とも呼ばれる) (配列番号82) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC - P)、V234、G236およびN297位に3つのアラニン置換を有するヒトIgG2のC_{H2}領域、ならびにヒトIgG2のC_{H3}領域を含む。

【0183】

BC3 - G4 AA N297A (「BC3 IgG4AA」とも呼ばれる) (配列番号83) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: BC3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、BC3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC - P)、F234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG4のC_{H2}領域(すなわち、FLGG(234 - 237)AAA)、ならびにヒトIgG4のC_{H3}領域を含む。

10

【0184】

OKT3 (OKT3mAbまたはOKT3 FLとも呼ばれる) は、分裂促進的なマウス抗ヒトCD3 IgG2a mAbである(Ortho Multicancer Transplant Study Group, N. Engl. J. Med. 313: 337, 1985)。

20

【0185】

OKT3 - HM1 (「OKT3 HM1」とも呼ばれる) (配列番号92) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: OKT3重鎖可変領域、タンデムに連結された少なくとも3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、野生型ヒトIgG1ヒンジ領域、ヒトIgM由来のC_{H3}領域およびヒトIgG1由来のC_{H3}領域、ならびに3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含むテイル配列を含む。

【0186】

OKT3 - C_{H2} (「OKT C_{H2}」とも呼ばれる) (配列番号93) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: OKT3重鎖可変領域、タンデムに連結された少なくとも3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、野生型IgG1ヒンジ領域、ヒトIgG1のC_{H3}領域、ならびに3コピーのFLAGエピトープ、1コピーのAVIタグおよび6つのヒスチジンを含む追加のテイル配列を含む。

30

【0187】

OKT3 - G1 N297A (「OKT N297A」とも呼ばれる) (配列番号88) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: OKT3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC - P)、297位にアラニン置換を有するヒトIgG1のC_{H2}領域、およびヒトIgG1のC_{H3}領域を含む。

【0188】

OKT3 - G1 AA N297A (「OKT3 IgG1AA」とも呼ばれる) (配列番号89) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: ヒト2H7リーダー配列に由来するリーダー配列、OKT3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄ - Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC - P)、L234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG1のC_{H2}領域(すなわち、LLGG(234 - 237)AAA)、ならびにヒトIgG1のC_{H3}領域を含む。

40

【0189】

OKT3 - G2 AA N297A (「OKT3 IgG2AA」とも呼ばれる) (配列番号90) は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって: OKT3重鎖可変領

50

域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、V234、G236およびN297位に3つのアラニン置換を有するヒトIgG2のC_{H2}領域、ならびにヒトIgG2のC_{H3}領域を含む。

【0190】

OKT3-G4 AA N297A(「OKT3 IgG4AA」とも呼ばれる)(配列番号91)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって:OKT3重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、OKT3軽鎖可変領域、変異IgG1ヒンジ領域(SCC-P)、F234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換ならびにG236に欠失を有するヒトIgG4のC_{H2}領域(すなわち、FLGG(234-237)AAA)、ならびにヒトIgG4のC_{H3}領域を含む。

10

【0191】

OKT3 IgG4-N297A(すなわち、OKT3 IgG4-WT-N297AまたはOKT3 IgG4-FLGG-N297Aとしても知られる、N297A置換だけを有するヒトIgG4のC_{H2}領域;配列番号232(この配列は、成熟融合タンパク質の一部ではない22アミノ酸のリーダー配列を含む))もまた、作製され、試験された。また、N297A置換とともに、4つの位置(F234、L235、G236およびG237)の各々における単一のアラニン置換変異が作製された(すなわち、それぞれ配列番号234、236、238および240に対応する、OKT3 IgG4-ALGG-N297A、OKT3 IgG4-FAGG-N297A、OKT3 IgG4-FLAG-N297AおよびOKT3 IgG4-FLGA-N297A(これらは、成熟融合タンパク質の一部ではない22アミノ酸のリーダー配列も含む))。

20

【0192】

OKT3 ala-ala(OKT3 AA-FLまたはOKT3 FLとも呼ばれる)は、234および235位にアラニン置換を含む、ヒト化Fc変異抗CD3mAbである(Heroldら(2003)J.Clin.Invest.11(3):409-18)。

【0193】

ビジリズマブ(「Nuvi on FL」とも呼ばれる)は、TCRのCD3鎖に対するヒト化Fc変異抗CD3mAbである。ビジリズマブは、ヒトIgG2アイソタイプであり、234および237位に変異を含む(Carpenterら、Blood 99:2712-9,2002)。

30

【0194】

H57-457mAbは、ハムスター抗TCRモノクローナル抗体である。H57-457mAbは、分裂促進的であり、OKT3モノクローナル抗体と同じように機能する(Lavasanira(2007)Scandinavian Journal of Immunology 65:39)。H57-457mAbのV_HおよびV_L領域の配列は、配列番号49および51に示されている。

【0195】

H57 half null(配列番号304)は、H57結合ドメインを有し、N297A置換に加えて、ADCC活性の喪失を引き起こす変異をC_{H2}に有する、マウスIgG2a一本鎖融合タンパク質である。H57 half nullは、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって:H57重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、H57軽鎖可変領域、野生型マウスIGHG2cヒンジ領域、L234、L235、G237およびN297位に4つのアラニン置換を有するマウスIGHG2cのC_{H2}領域、ならびにマウスIGHG2cのC_{H3}領域を含む。

40

【0196】

H57 HM2(配列番号306)は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって:H57重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカ

50

一、H57軽鎖可変領域、野生型マウスIGHG2cヒンジ領域、マウスC_{H3}_μ領域およびマウスC_{H3}領域を含むマウス一本鎖融合タンパク質である。

【0197】

H57 Nul12 (配列番号96)は、H57結合ドメインを有し、ADCC活性およびCDC活性の喪失を引き起こす変異をC_{H2}に有する、マウスIgG2a一本鎖融合タンパク質である。H57 Nul12は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：H57重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、H57軽鎖可変領域、野生型マウスIGHG2cヒンジ領域、L234、L235、G237、E318、K320およびK322位に6つのアラニン置換を有するマウスIGHG2cのC_{H2}領域、ならびにマウスIGHG2cのC_{H3}領域を含む。

10

【0198】

145-2C11mAb (2C11mAbとも呼ばれる)は、マウスTCR複合体のCD3鎖に対するハムスターモノクローナル抗体である(Hirschら、J. Immunol. 140:3766, 1988)。また、145-2C11mAbは、分裂促進的であり、OKT3モノクローナル抗体と同じように機能する。145-2C11mAbのV_HおよびV_L領域の配列は、配列番号58および60に示されている。

【0199】

2C11 Nul12 (配列番号56)は、2C11結合ドメインを有し、ADCC活性およびCDC活性の喪失を引き起こす変異をC_{H2}に有する、マウスIgG2a一本鎖融合タンパク質である。2C11 Nul12は、そのアミノ末端からカルボキシル末端に向かって：2C11重鎖可変領域、タンデムに連結された3つの(Gly)₄-Serを含むリンカー、2C11軽鎖可変領域、野生型マウスIGHG2cヒンジ領域、L234、L235、G237、E318、K320およびK322位に6つのアラニン置換を有するマウスIGHG2cのC_{H2}領域、ならびにマウスIGHG2cのC_{H3}領域を含む。

20

【0200】

(実施例1)

(融合タンパク質は、刺激されたT細胞を活性化しないか、または刺激されたT細胞もしくはアクセサリ細胞によるサイトカイン放出を誘導しない)

(ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の単離)

30

新鮮なヒト全血を、ヘパリンを含む30mL注射器内に入手し(注射器1本あたり最大25mLの血液)、室温に最大2時間置いた後、処理した。その血液を、50mLコニカルチューブにおいて、等容積の室温のRPMI-1640(補充物を含まない)で希釈した。希釈された血液を2~3回静かに逆位にして混合した。25mLピペットを用いて、20~25mLの希釈された血液を、50mLコニカルチューブに入った15mLのLymphocyte Separation Media(MP Biomedicals)の上に慎重に層として重ねた。そのチューブを室温において30分間、400gで遠心分離した。密度勾配の中間面から細胞を収集し、50mLコニカルチューブ内で併せた(チューブ1本あたり30mLを超えない細胞懸濁物)。その細胞懸濁物が入ったチューブを、10%FBS、100U/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンおよび2mM L-グルタミンを含むRPMI-1640(Complete RPMI-1640)で満たした。そのチューブを室温において5分間、1500rpmで遠心分離し、上清を吸引した。細胞を20mLのComplete RPMIに再懸濁し、室温において5分間、1500rpmで遠心分離し、そして上清を吸引することによって、2回洗浄した。洗浄した細胞を血球計算板によって計数し、使用したアッセイプロトコルに従って再懸濁した。

40

【0201】

(カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)によるヒトPBMCの標識)

マウス脾細胞の密度を滅菌PBS中において1×10⁶/mLに調整した。その細胞を

50

、チューブ1本あたり25 mL (25×10^6 細胞)を超えないように50 mL コニカルチューブに分配した。その細胞を、使用するために条件を最適化した後のCELLTRACE™ CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes)を用いてCFSEで標識した。18 μ Lの高品質DMSO (キットのComponent B)を、50 μ gの凍結乾燥CFSE (キットのComponent A)が入ったバイアルに加えることによって、組織培養グレードのDMSO中のCFSEの5 mM溶液を使用直前に調製した。そのCFSE溶液を、50 nM CFSEという最終濃度となるようにPBMC細胞懸濁物に加え、次いで、その細胞懸濁物を5% O_2 中、37 °Cにおいて15分間インキュベートした。そのチューブをRPMI Complete (10% FBS、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640)で満たすことによって、細胞標識反応をクエンチした (quench)。その細胞を室温において7分間、1500 rpmで遠心分離した。上清を各チューブから吸引し、細胞をRPMI Completeに再懸濁した。細胞を計数し、アッセイにおいて使用するための所望の密度になるようにRPMI Complete中で調整した。

【0202】

(PHAで刺激されたT細胞を用いた分裂促進性およびサイトカイン放出の分析)

ヒトPBMCを 2×10^6 細胞/mLの濃度でコンプリーTRPMI培地 (10%ヒトAB血清、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640)に懸濁し、37 °Cにおいて3日間、2.5 μ g/mLのPHA (Sigma)で刺激した。インキュベート後、細胞をコンプリーTRPMIで2回洗浄し、新しいフラスコにおいて約 2×10^6 細胞/mLの濃度で、刺激なしで再度プレATINGした。次いで、細胞をさらに4日間37 °Cに置くことにより、2回目の刺激への曝露前にT細胞を静置させた。この4日間の静置期間の終わりに、細胞を集め、PBSで洗浄し、前に記載したようにCFSEで標識した。標識した後、細胞を、コンプリー (ヒト血清) RPMI (10%ヒトAB血清、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640)中に 2×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁した。この時点で、新たにPBMCを同じドナーから単離し、再刺激のためのアクセサリ細胞として使用した。アクセサリ細胞を調製するために、EasySep技術 (Stem Cell Technologies Cat 18051)を用いて、T細胞をPBMC集団から磁気的に分離した。製造者のプロトコルに従って、磁性ナノ粒子を、デキストランおよびCD3に対する抗体のカクテルとともに、新たに単離されたPBMCとインキュベートした。次いで、その細胞とビーズとの混合物を、EasySep Purple磁石を含む1本目のチューブ中で5分間放置し、次いで、その細胞懸濁物を2本目の5 mLのFACSチューブに注ぎ込んだ。CD3⁺細胞 (T細胞)は、1本目のチューブに保持されるが、アクセサリ細胞は、2本目のチューブに移動した。ネガティブ選択されたアクセサリ細胞をマイトマイシンC (MMC、以下に記載されるようなもの)で処理することにより、増殖を阻害した。CFSEで標識されたPHA芽細胞とMMCで処理されたアクセサリ細胞の両方を、コンプリー (ヒトAB血清) RPMIに 2×10^6 細胞/mLで懸濁した。各細胞集団を、記載の処理物とともに48ウェル組織培養プレートに加えた (0.5 mL/ウェル)。細胞を37 °Cにおいてさらに4日間インキュベートし、刺激の24時間後に50 μ Lの上清を集めた。再刺激後の4日目に、細胞および残りの上清を集めた。集めた細胞を、CD5 (340697, BD Biosciences)、CD25 (557741, BD Biosciences)および7AAD (559925, BD Biosciences)に対する蛍光タグ化抗体で染色し、フローサイトメーター (LSRII, Becton Dickinson)に通した。FlowJoフローサイトメトリソフトウェア (TreeStar)を用いて、データを分析した。ゲーティングストラテジーは、以下のとおりだった: 前方散乱 (FSC): 側方散乱 (SSC)リンパ球ゲート内に入った細胞を7AAD発現について分析した。次いで、7AADネガティブゲートに入った細胞

をCD5発現について分析し、次いで、CD5+ゲート内の細胞をCFSE希釈およびCD25上方調節(upregulation)について分析した。CD5+、CFSE^低かつCD25^高である細胞を活性化されたT細胞とみなした。上清サンプルを、Millipore製のカスタム11-plex Luminesxベース検出キット(Milliplex series)を製造者のプロトコル(protocol)に従って使用してサイトカインおよびケモカインの存在について分析した。このキットによって検出された11種の分析物は：IL-、IL-1RA、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IP-10、MCP1、IFN およびTNF だった。

【0203】

図1は、OKT3 IgG2AA、OKT3 IgG4AAおよびOKT3 HM1融合タンパク質が、公知の抗体ビジリズマブおよびOKT3 ala-alaと比べて、PHAで刺激されたT細胞を活性化させなかったことを示している。BC3結合ドメインを含む分子を用いたときに同様のデータが生成された。

10

【0204】

表1は、OKT3 IgG2AA、OKT3 IgG4AAおよびOKT3 HM1融合タンパク質が、公知の抗体ビジリズマブおよびOKT3 ala-alaとは対照的に、刺激されたT細胞またはアクセサリ細胞によるサイトカイン放出を誘導しなかったことを示している。

【0205】

【表 1】

表 1. サイトカインデータ

	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	IFN-g	TNF-a	MCP-1	IP-10	IL-1RA
無処理	20.0	2.1	7.4	1580.4	469.6	27.1	13.6	195.2	1393.9	234.1	4227.5
PHA	22.9	7.7	53.6	2293.6	1498.1	59.4	41.9	159.7	1467.2	625.0	5760.6
OKT3 mAb	77.6	101.0	168.0	3300.2	8196.0	203.0	971.6	877.9	2310.7	1010.7	9097.7
BC3 mAb	14.7	0.2	1.1	1440.0	332.5	3.2	1.8	222.7	1899.4	73.9	4330.3
IgG2a	46.1	3.5	6.4	3926.0	980.7	36.7	31.4	281.9	1566.5	368.8	5503.0
	44.5	1.5	6.2	1677.8	401.8	17.8	17.7	341.9	1702.5	272.9	8803.2
OKT3 N297A	31.5	3.2	14.6	1625.5	649.9	35.7	35.9	365.0	1508.5	433.3	8523.6
	26.8	6.5	31.7	1784.8	1642.0	67.2	74.8	358.3	1637.3	775.6	8072.2
	474.4	0.8	5.0	21297.4	9133.1	6.6	142.5	2082.9	2973.3	111.4	10077.3
OKT3 IgG1AA	109.8	0.3	3.7	14723.7	2088.2	5.8	17.3	375.2	1777.4	145.5	5081.0
	24.6	0.6	3.9	1805.7	454.6	13.0	13.2	180.7	1401.7	352.3	4188.9
	19.8	0.4	4.1	1345.3	280.2	4.0	1.5	144.8	1675.2	106.6	3884.5
OKT3 IgG2AA	19.6	0.4	3.2	1701.8	278.9	5.1	3.2	126.9	1518.3	143.7	3152.2
	17.9	0.7	2.8	1659.4	305.3	11.4	6.9	160.7	1517.7	282.3	3586.4
	20.3	0.3	2.6	1632.4	265.0	4.1	2.1	140.4	1081.2	76.8	3020.9
OKT3 IgG4AA	17.6	0.4	0.5	1532.5	249.8	6.2	4.9	155.3	1281.8	231.8	3639.6
	24.5	0.4	0.0	1470.7	294.7	9.2	5.9	163.7	1307.5	167.1	3346.4
	9.2	0.2	3.2	862.1	185.6	1.2	0.8	122.4	1128.9	34.8	3118.8
OKT3 HM1	13.7	0.2	1.1	1045.2	233.8	1.6	0.8	131.1	986.7	40.2	3284.7
	17.3	0.6	0.0	1743.4	274.3	8.2	2.4	149.1	1216.2	107.4	3280.2
	12.8	7.9	63.0	2149.0	2132.3	65.9	92.6	245.9	1732.0	972.5	7923.9
Nuvion FL	18.7	10.0	57.1	1936.9	2129.4	78.1	100.6	245.8	1791.8	1207.6	6553.7
	19.8	7.6	43.8	2204.3	2076.4	73.5	99.0	274.9	1273.0	1386.4	7469.3
	38.2	6.9	44.4	2033.5	2052.8	82.1	105.6	373.7	2309.6	720.8	7791.7
OKT3 ala-ala FL	32.3	6.8	43.2	2958.7	1999.5	82.7	102.6	392.7	2812.7	841.2	8950.2
	28.0	7.3	32.0	2710.9	1595.1	74.0	66.4	268.7	2692.8	631.8	6825.3

(実施例 2)

(融合タンパク質は、同種抗原に対する T 細胞応答を阻止する)

10

20

30

40

50

(ヒト混合リンパ球反応 (MLR))

2人のドナーからヒトPBMCを前に記載したように単離し、別々に維持した。以前の研究に基づいて、1人のドナー由来のPBMCを刺激物集団に選出し、第2のドナーのPBMCを応答物集団として使用した。両方のドナー由来の細胞を前に記載したようにCFSEで標識した。刺激物として使用するドナー由来のPBMCを、マイトマイシンC (MMC) で処理することにより、細胞分裂を防いだ。MMC (Sigma) を0.5 mg/mLの濃度でコンブリート (HS) RPMI培地 (10%ヒトAB血清、100 U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640) に再懸濁した。PBMCを約 1×10^6 / mLの濃度で再懸濁し、MMCを25 µg/mLの最終濃度になるように加えた。次いで、その細胞とMMCとの混合物を37 °Cで30分間インキュベートした後、細胞をコンブリート (HS) RPMI培地で3回洗浄した。調製された刺激物細胞および応答物細胞を、コンブリート (ヒトAB血清) RPMI (10%ヒトAB血清、100 U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640) に約 2×10^6 / mLの濃度で懸濁し、48ウェルプレートの1ウェルあたり0.25 mLの各細胞集団を加えた。すべての処理物を細胞と同時にプレートに加え (図2、3および17に示される濃度で; 与えられる濃度は、抗体に対する濃度であり、相当するモル濃度が、図17に示されるような融合タンパク質に対して使用されたことに注意されたい)、次いで、サンプルをこの実験の時間にわたって37 °Cでインキュベートした。準備した7~8日後に実験したものを集めた。集めた細胞をCD5 (340697, BD Biosciences)、CD25 (555433, BD Biosciences) および7AAD (559925, BD Biosciences) に対する蛍光タグ化抗体で染色し、フローサイトメーター (LSRII, Becton Dickinson) にかけた。FlowJoフローサイトメトリソフトウェア (TreeStar) を用いてデータを分析した。ゲーティングストラテジーは、以下のとおりだった: FSC: SSCリンパ球ゲート内に入った細胞を7AAD発現について分析した。次いで、ネガティブ7AADゲート内に入った細胞をCD5+発現について分析し、次いで、CD5+だった細胞をCFSE希釈およびCD25上方調節について分析した。CD5+、CFSE^低かつCD25^高である細胞を活性化されたT細胞とみなした。

【0206】

図2は、BC3 IgG2AAおよびBC3 IgG4AA融合タンパク質が、公知のBC3 mA Bよりも良好に、OKT3 a1a-a1a抗体とは対照的に、同種抗原に対するT細胞応答を阻止したことを示している。OKT3結合ドメインを発現している分子を用いたとき、同様のデータが生成された。

【0207】

図3は、BC3 HM1およびBC3 C_H2融合タンパク質もまた、同種抗原に対するT細胞応答を阻止したことを示している。OKT3結合ドメインを発現している分子を用いたとき、同様のデータが生成された。

【0208】

図17は、部分的に精製されたCris-7 IgG1-N297A (50%が目的のピークである) が、同種抗原に対するT細胞応答を効率的に阻止したことを示している。

【0209】

(実施例3)

(融合タンパク質は、リコール抗原に対するメモリーT細胞の応答を阻止する)

破傷風トキソイドに対する反応性についての以前のスクリーニングで陽性とスコア付けされたドナーからヒトPBMCを単離した。前に記載したようにPBMCをCFSEで標識し、次いで、コンブリート (ヒトAB血清) RPMI (10%ヒトAB血清、100 U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシンおよび2 mM L-グルタミンを含むRPMI-1640) に 2×10^6 / mLの濃度で再懸濁した。0.5 mLのCFSE標識細胞および1 µg/mLの破傷風トキソイド (EMD) を、実験処理物とともに

10

20

30

40

50

48ウェルプレートに加えた。その細胞を実験の時間にわたって5%CO₂、37°Cにおいてインキュベートした。準備した8日後に実験したものを集めた。集めた細胞をCD5 (340697, BD Biosciences) およびCD25 (555433, BD Biosciences) に対する蛍光タグ化抗体で染色し、フローサイトメーター (LSRII, Becton Dickinson) にかけて。FlowJoフローサイトメトリソフトウェア (TreeStar) を用いてデータを分析した。ゲーティングストラテジーは、以下のとおりだった: FSC:SSCリンパ球ゲート内に入った細胞をCD5発現について分析し、続いてCD5+ゲート内に入った細胞をCFSE希釈およびCD25上方調節について分析した。CD5+、CFSE^低かつCD25^高である細胞を活性化されたT細胞とみなした。

10

【0210】

図4は、BC3 IgG2AA、BC3 IgG4AAおよびBC3 HM1融合タンパク質が、リコール抗原である破傷風トキソイドに対するメモリーT細胞の応答を阻止し得ることを示している。OKT3結合ドメインを含む融合タンパク質を用いたとき、同様のデータが生成された。

【0211】

(実施例4)

(融合タンパク質は細胞表面TCRおよびCD3の下方調節を誘導する)

実施例1に記載されているようにヒトPBMC単離し、約 2×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁した。そのPBMCの一部を即時の細胞表面染色のために取っておき、残りのPBMCを様々な抗CD3試薬とともに4日間インキュベートした後、分析した。即時染色されるPBMCを氷上で30分間冷却した後、4°Cにおいて10分間、1500rpmで遠心分離し、得られた上清を除去した。細胞を 1×10^6 /mLの濃度で氷冷FACS緩衝液(dPBS, 2.5%FBS)に懸濁した。分析される各試薬に対して1mLの細胞を5mLのFACSチューブ(BD Falcon)に移した。さらに1mLの氷冷FACS緩衝液をその1mLの細胞アリコートに加え、その細胞を4°Cにおいて5分間1500rpmで遠心分離した。チューブを反転させ、約0.1mLのFACS緩衝液が細胞ペレットとともにチューブに残るように上清をデカントし、次いで、そのチューブを氷上に置いた。単離の直後にサンプルを分析するために、染色抗体のマスターストック(90μLの氷冷FACS緩衝液、5μLの抗CD5抗体(eBioscience)および5μLの抗TCR抗体(BD Biosciences))を調製した。1μg/mL、0.5μg/mLまたは0.1μg/mLの、CD3に対する融合タンパク質またはモノクローナル抗体とともに(与えられる濃度は、抗体に対する濃度であり、相当するモル濃度が、融合タンパク質に対して使用されたことに注意されたい)、マスターストック(100μL)を各FACSチューブに加えた。次いで、そのサンプルを暗黒下の氷上で30分間インキュベートした。インキュベート時間の後、サンプルを2mLの氷冷FACS緩衝液で2回洗浄し、CD3に対する試薬に特異的なPE標識2次抗体を1:400の最終希釈で加えた。次いで、そのサンプルを暗黒下の氷上で30分間インキュベートし、次いで、2mLの氷冷FACS緩衝液で2回洗浄した。染色レベルをLSRIIフローサイトメーター(Becton Dickinson)において測定した。

20

30

40

【0212】

4日間処理され、次いで細胞表面を染色されるPBMCを、48ウェルプレートに1ウェルあたり0.5mLアリコートでプレATINGした(細胞濃度は、コンプリート(ヒトAB血清)RPMI培地中、約 2×10^6 細胞/mLだった)。CD3に対する試薬をその細胞に1、0.5および0.1μg/mLで加え(与えられる濃度は、抗体に対する濃度であり、相当するモル濃度が、融合タンパク質に対して使用されたことに注意されたい)、その細胞を37°Cにおいて2~4日間インキュベートした。インキュベートした後、細胞を集め、上に記載したように染色した。

【0213】

結果(図5A、5B、6Aおよび6B)は、OKT3結合ドメインを含む融合タンパク

50

質が、T細胞の表面からのTCRとCD3の両方の下方調節を誘導し、OKT3モノクローナル抗体は、TCRだけを下方調節し、CD3を下方調節しなかったことを示している。同様の結果が、BC3結合ドメインを含む融合タンパク質を用いたとき観察された。

【0214】

図18は、Cris-7 IgG1-N297A融合タンパク質が、T細胞表面からのTCRとCD3の両方の下方調節を誘導し、Cris-7モノクローナル抗体は、TCRだけを下方調節することを示している。同様の結果が、Cris-7 IgG2-AA-N297A、Cris-7 IgG4-AA-N297AおよびCris-7 HM1を用いたときに得られる。

【0215】

(実施例5)

(融合タンパク質は、T細胞において堅調なカルシウム流動を誘導する)

前に記載したようにヒトPBMCを単離した。MiltenyiのMACS技術を用いて、非T細胞をT細胞から磁気的に分離した。接触しなかったT細胞を、The Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi)を用いて単離した。製造者のプロトコルに従って、T細胞以外のPBMCのすべての細胞サブセットに対する抗体のパネルでコーティングされた超磁性ビーズを、新しく単離されたPBMCとともにインキュベートした。次いで、その細胞とビーズとの混合物を、強力な永久磁石であるMACS Separator (Miltenyi)に置かれたときに磁場を形成するマトリックスが入ったカラムに適用した。T細胞は、そのカラムを通過するが、他のすべての細胞は、そのカラムに保持される。T細胞の純度は、概して87~93%だった。精製されたT細胞を、約 2×10^6 細胞/mLの濃度でコンプリートRPMI (RPMI-1640、10%ヒトAB血清、2mM L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、ペニシリン/ストレプトマイシン)に懸濁し、適切なサイズのフラスコ内において37°Cで一晩インキュベートした。翌朝、100 μ lの細胞(200,000細胞)を96ウェルの黒色ポリ-Dリジンプレートのウェルに移し、37°Cで3時間インキュベートした。このインキュベーション時間中に、カルシウム流動の指示色素を製造者の指示書(Molecular Devices FLIPR Calcium 4アッセイ)に従って調製した。さらに、実験処理物をU底プレート内で調製した。細胞処理物を、75 μ Lの容積の処理プレート内で5 \times 濃度で調製した。すべての処理物(融合タンパク質および架橋剤)を3連で試験した。そのプレートの読み取りの1時間前に、100 μ Lの指示色素をその細胞に加えた。指示色素を加えた後、さらに45分間、そのプレートをインキュベーターに戻した。次いで、プレートを室温において5分間、1200rpmで遠心分離し、次いで、さらに15分間、インキュベーターに戻した。このインキュベーション時間の終わりに、処理プレートおよび細胞プレートを、流体移送が一体化した卓上プレートリーダーであるFlexStation3 (Molecular Devices)にロードした。FlexStationは、その細胞プレートに50 μ Lの処理物をロボット制御で加え、次いで、750秒間にわたって7秒ごとにカルシウム指示色素から得られた蛍光を記録した。次いで、捕捉されたデータを分析のためにExcel (Microsoft Office)にエクスポートした。

【0216】

結果(図7)は、同じ結合ドメインを有する抗体とは対照的に、本開示の一本鎖融合タンパク質は、架橋剤の非存在下で(すなわち、2つ以上のSMIP分子に結合する分子、例えば、抗IgG抗体)、T細胞において堅調なカルシウム流動を誘導することを示している。同様の結果が、BC3結合ドメインを発現している分子の形式を用いたとき、ならびに刺激されたT細胞を使用したときに得られた。

【0217】

図19は、BC3結合ドメインを有する一本鎖融合タンパク質によって引き起こされるカルシウム流動のレベルに対する、様々なヒンジの作用を示している。この場合、融合タンパク質およびコントロールを、20秒後に加え、架橋剤を600秒後に加えた。最も短

10

20

30

40

50

いヒンジ（リンカー 1 2 2 , I g A 2 ヒンジ由来）を有する融合タンパク質が、最大のカルシウム流動を引き起こし、より長いヒンジ（リンカー 1 1 5 および 1 1 6 , それぞれ I g E C_{H2} および U B A 由来）を有する融合タンパク質が、より低レベルのカルシウム流動を誘導した。しかし、すべての場合において、B C 3 結合ドメインを有する一本鎖融合タンパク質は、抗体よりも大きいカルシウム流動の増加を引き起こした。ゆえに、そのヒンジを調整することにより、必要に応じてカルシウム流動が調節され得る。

【 0 2 1 8 】

（実施例 6）

（抗マウス T C R / C D 3 分子のインビトロにおける評価）

（マウス脾細胞の単離）

無菌条件下において、脾臓を切除し、大きな脂肪および組織の断片を除去した。組織培養フード内において、脾臓を 5 m L の滅菌 1 × P B S が入った小皿に置き、次いで、片面すりガラスの 2 枚のスライドガラスの間ですりつぶした。このプロセス中、スライドガラスは、そのペトリ皿の上で、細胞および流体がその皿に戻るような角度で保持された。この工程は、脾被膜（s p l e n i c c a p s u l e）が赤色でなくなったときに完了した。ペトリ皿内の細胞懸濁物を 1 5 m L コニカルチューブに移し、ボルテックスすることにより、細胞の凝集塊を分散させた。次いで、そのチューブをさらなる 1 2 m L の滅菌 1 × P B S で満たし、直立に置き、内容物を 5 分間沈ませた。第 1 のチューブにおいて沈んだ残屑を乱さないようにして、上清を第 2 の 1 5 m L コニカルチューブに移した。次いで、その細胞を室温において 5 分間、1 5 0 0 r p m で集めた。上清を除去し、細胞ペレットを 4 m L の A C K R e d B l o o d C e l l L y s i n g B u f f e r (Q u a l i t y B i o l o g i c s , カタログ No . 1 1 8 - 1 5 6 - 1 0 1) に懸濁し、室温において 5 分間インキュベートした。次いで、そのコニカルチューブを R P M I C o m p l e t e 培地（1 0 % F B S , 1 0 0 U / m L ペニシリン、1 0 0 μ g / m L ストレプトマイシンおよび 2 m M L - グルタミンを含む R P M I - 1 6 4 0）で満たした。その細胞懸濁物をセルストレーナーで濾過し、別の 1 5 m L コニカルチューブに移した。細胞をコンプリート R P M I で 3 回洗浄し、次いで、血球計算板を用いて計数した。

【 0 2 1 9 】

（カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（C F S E）によるマウス脾細胞の標識）

マウス脾細胞の密度を滅菌 P B S 中で $1 \times 10^6 / m L$ に調整した。その細胞を、チューブ 1 本あたり 2 5 m L (25×10^6 細胞) を超えないように 5 0 m L コニカルチューブに分配した。その細胞を、ヒト P B M C およびマウス脾細胞とともに使用するための条件を最適化した後の M o l e c u l a r P r o b e s 製の C E L L T R A C E ^{T M} C F S E C e l l P r o l i f e r a t i o n K i t (カタログ No . C 3 4 5 5 4) を用いて C F S E で標識した。組織培養グレードの D M S O 中の C F S E の 5 m M 溶液を、1 8 μ L の高品質の D M S O (キットの C o m p o n e n t B) を 5 0 μ g の凍結乾燥 C F S E (キットの C o m p o n e n t A) が入ったバイアルに加えることによって、使用直前に調製した。C F S E は、感光性であるので、この試薬が光から保護されるようにこの試薬の調製中およびその後の細胞標識手順中に注意を払った。C F S E 溶液を 5 0 n M C F S E の最終濃度で P B M C 細胞懸濁物に加えた。ガス交換を可能にするために、そのチューブのキャップを、細胞懸濁物を含むチューブの上で緩く締め、そのチューブを 3 7 ° C , 5 % C O ₂ のインキュベーターに 1 5 分間置いた。血清が標識反応をクエンチするので、そのチューブを R P M I C o m p l e t e (1 0 % F B S , 1 0 0 U / m L ペニシリン、1 0 0 μ g / m L ストレプトマイシンおよび 2 m M L - グルタミンを含む R P M I - 1 6 4 0) で満たすことによって、細胞標識反応をクエンチした。その細胞を室温において 7 分間、1 5 0 0 r p m で遠心分離した。上清を各チューブから吸引し、細胞を R P M I C o m p l e t e に再懸濁した。その細胞を計数し（投入量の最大 2 5 % の損失が通常）、アッセイで使用するための所望の密度になるように R P M I C o m p l e t e 中で調整した。

10

20

30

40

50

【0220】

(ConA芽細胞)

脾細胞を、前に記載したようにBALB/cマウスから単離し、 2×10^6 細胞/mLの濃度でコンプリートRPMI培地(RPMI、10%FBS、2mM L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、pen/strepおよび1%BME)に懸濁し、 $1 \mu\text{g/mL}$ のコンカナバリンA(Sigma)で3日間刺激した。3日後、細胞をコンプリートRPMIで2回洗浄し、刺激なしで4日間、新しいフラスコに再プレーティングした。この4日間の静止期間の終わりに、細胞を集め、前に記載したようにCFSEで標識した。

【0221】

この時点において、BALB/cマウスから第2の脾臓を採取し、脾細胞を単離した。これらの新しく単離した脾細胞を、本実験の再刺激の段階においてアクセサリ細胞として使用した。アクセサリ細胞集団を調製するために、MiltenyiのMACS技術を用いてその新鮮な脾細胞からT細胞(CD5⁺細胞)を磁気的に分離した。抗CD5抗体でコーティングされた超磁性ビーズ(Miltenyi, カタログNo. 130-049-301)を、製造者のプロトコルに従ってその新しく単離された脾細胞とともにインキュベートした。次いで、その細胞とビーズとの混合物を、強力な永久磁石であるMACS Separator(Miltenyi, カタログNo. 130-042-301)に置かれたときに磁場を形成するマトリックスが入ったカラム(Miltenyi, カタログNo. 130-042-401)に適用した。CD5⁺細胞(T細胞)がそのカラムに保持され、結合しなかったアクセサリ細胞は、貫流した。そのネガティブ選択されたアクセサリ細胞をマイトマイシンCで処理することにより(前に記載したように)、増殖を阻害した。

【0222】

CFSE標識ConA芽細胞とMMC処理アクセサリ細胞の両方を 2×10^6 /mLでコンプリート培地に再懸濁した。0.5mLの各細胞集団を、記載の処理物とともに48ウェル組織培養プレートに加えた。刺激の24時間後に50 μL の上清を集め、細胞および残りの上清を再刺激後の4日目に集めた。細胞をCD5(45-0051, eBioscience)およびCD25(25-0251, eBioscience)に対する蛍光タグ化抗体で染色し、フローサイトメーター(LSR II, Becton Dickinson)にかけ、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて分析した。ゲーティングストラテジーは、以下のとおりだった: FSC:SSCリンパ球ゲート内に入った細胞をCD5発現について分析し、続いてCD5⁺ゲート内に入った細胞をCFSE希釈およびCD25上方調節について分析した。CD5⁺、CFSE^低かつCD25^高である細胞を活性化されたT細胞とみなした。22種の分析物用のLinco-plex, LumineXベース検出キット(Linco Research)を、以下の改変を加えて: 分析物ビーズ、検出抗体およびストレプトアビジン-PEストック溶液をアッセイにおいて使用する前に1:2希釈して、製造者のプロトコルに従って使用して、サイトカインおよびケモカインの存在について上清サンプルを分析した。そのキットによって検出された22種の分析物は: MIP-1a、GMCSF、MCP-1、KC、RANTES、IFN、IL-1B、IL-1a、G-CSF、IP-10、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、TNF、IL-9、IL-13、IL-15およびIL-17だった。

【0223】

H57-457と145-2C11の両方のモノクローナル抗体は、ConAで刺激されたT細胞のサイトカイン放出を誘導したが、H57 Null2または2C11 Null2 SMIPは、サイトカイン放出を誘導しなかった。ConAで刺激されたT細胞の処理後の、例示的なサイトカインであるIFNおよびIP-10の放出の結果は、図8Aおよび8Bに示されている。さらに、H57 Null2(図9中の「H57 Mu Null」と同じ)と2C11 Null2 SMIP(図9中の「2C11 Mu

10

20

30

40

50

Null SMIP」と同じ)の両方が、抗原に対するT細胞応答を阻止したが、H57-457および145-2C11モノクローナル抗体は、阻止しなかった(図9を参照のこと)。他のサイトカインの放出を測定したときも、同様の結果が得られた。

【0224】

(実施例7)

(例示的な抗TCR SMIPのインビボ研究)

12週齢の雌性BALB/cマウス(Harlan)を6つの群に分け、外側尾静脈を介して、7.3µg、37µg、75µgまたは185µgのH57 Null2 SMIP、5µg(最大耐用量)のH57mAb、250µgのIgG2aアイソタイプコントロール(最大SMIP用量に相当するモル濃度)または200µLのPBSを注射した。すべての注射容積は、200µLであり、注射したすべての材料は、0.5EU/mg未満のエンドトキシンレベルを有した。ランダムに選択された1群あたり3匹のマウスを24時間後に屠殺し、残りの1群あたり3匹のマウスを注射の3日後の本実験の終わりに屠殺した。体重減少および臨床スコア上昇の形態において、薬物関連毒性の臨床症状についてマウスをモニターした。臨床スコアを評価する科学者は、各群に投与された処置物について知らされていなかった。スコアは、以下のキーに基づいて割り当てられた: 0 = 正常; 1 = 軽度の立毛; 2 = 中程度の立毛および/または眼球の炎症もしくは刺激作用; 3 = 猫背の姿勢/けん怠; 4 = 瀕死。注射の2時間後および屠殺時点において、すべてのマウスから採血した。屠殺時点において、脾臓および単径部リンパ節を採取した。Millipore製のカスタム14-plex Luminescenceベース検出キット(Milliplex series)を、以下の改変を加えて: 分析物ビーズ、検出抗体およびストレプトアビジン-PEストック溶液をアッセイにおいて使用する前に1:2希釈して、製造者のプロトコルに従って使用して、サイトカインおよびケモカインの存在について血清サンプルを分析した。さらに、血清サンプルを希釈せずに用いた(推奨される1:2希釈と比較)。このキットによって検出された14種の分析物は: G-CSF、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP1、IFN およびTNF だった。脾臓およびリンパ節におけるSMIPでコーティングされたT細胞のパーセンテージを測定するために、これらの2つの臓器由来の細胞懸濁物を、CD5(eBioscience, カタログNo. 45-0051)およびマウスIgG2a(BD Biosciences, カタログNo. 553390)に対する抗体で染色した。

【0225】

図10Aは、H57 Null2 SMIPの静脈内投与によって、体重が減少しなかったことを示している。さらに、図10Bは、そのような処置が臨床スコアを上昇させなかったことも示している。これらの結果から、このNull2 SMIPが、所望の安全性プロファイルを有することが証明される。

【0226】

図11は、親抗体とは対照的に、H57 Null2 SMIPの静脈内投与が、正常なBALB/cマウスではサイトカインストームを誘導しなかったことを示している。上記の14種の分析物パネルからの2つの代表的なサイトカインであるIL-6およびIL-4が示されている。

【0227】

図12は、H57 Null2 SMIPでコーティングされたT細胞が、H57 Null2 SMIPの静脈内投与後に脾臓において検出されたことを示している。

【0228】

(実施例8)

(融合タンパク質は、インビボにおいて急性移植片対宿主病を阻害する)

代用分子が急性移植片対宿主病(aGVHD)マウスモデルにおいて有効であるか否かを判定するために、マウスを例示的な融合タンパク質で処置し、次いで、体重減少、ドナー: 宿主リンパ球比、ならびにサイトカインおよびケモカインの産生についてモニターし

た。

【0229】

雌性C57BL/6×DBA2 F1マウス(Taconic)において、ドナー雌性C57BL/6マウス(Taconic)由来の脾細胞を移入することによってaGVHDを誘導した。ドナーマウスから脾臓を集め、10%FBSを含む冷RPMIに浸漬した。集めた脾臓を、滅菌されたすりガラスのスライドガラスを用いて解離させた。前に記載したように、上清を集め、遠心分離し、細胞を洗浄した。次いで、洗浄した脾細胞を、 $6.5 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$ の濃度で滅菌PBSに再懸濁した。注射の直前に、脾細胞混合物を100 μm セルストレーナー(BD Falcon)に通すことにより、残屑および細胞の大きな凝集塊を除去した。200 μl のドナー脾細胞の細胞懸濁物を、F1レシピエントマウスの外側尾静脈に静脈内(IV)注射した。外側尾静脈を介したIV注射を行うために、マウスを熱ランプに短時間曝露し、プラスチックのマウス拘束器(restrainer)内に拘束した。27.5ゲージ針を用いて注射を行った。レシピエントマウスは、ドナー細胞移入後14日目までに明白な疾患を有し、この時点で実験を終了し、評価した。疾患の進行は、移入された動物の脾臓内で宿主細胞が、ドナー細胞に媒介される攻撃に起因して減少すると同時に生じる、体重減少およびドナー細胞の増大と関連した。IFNなどの血清バイオマーカーもまた、疾患の進行と相関していた。

10

【0230】

有効性研究のために、ドナー細胞を、本研究の0日目(D0)に上に記載したようにF1レシピエントに移入した。上記SMIP、IgG2aコントロールおよびPBSによる処置を、D0、D1、D3、D5、D7、D9およびD11に行い、実験したものをD14に集めた。ドナー細胞の移入の前に後方眼窩洞を介して投与したD0注射を除いて、すべての処置注射をIVに施した。注射1回あたり100 μl の容積中の100 μg のH57 Null2 SMIPもしくはIgG2a、または100 μl のPBSを投与する。インビボ研究において使用したすべてのタンパク質が、0.5EU/mg未満のエンドトキシンを有した。免疫抑制剤のデキサメタゾン(DEX; Sigma)で処置されたマウスは、腹腔内注射(IP)を介して10mg/kg/日を投与された。

20

【0231】

本実験中、マウスの体重が減少し始めるまで1日おきにマウスを秤量し、減少し始めた時点から毎日秤量した。レシピエントマウスで減少した開始体重に対するパーセンテージが、図13に示されている。H57 Null2 SMIPの投与は、PBSまたはIgG2aによるコントロール処置を受けたマウスとは対照的に、aGVHD病の進行に関連する体重減少を妨げた。

30

【0232】

血清バイオマーカー分析のために7日目にマウスから採血した。屠殺する14日目に、脾臓および血液サンプルを各動物から集めた。各脾臓の重量および全細胞数を測定した。血清サンプルを、Millipore製のカスタム14-plex Luminesxベース検出キット(Milliplex series)を製造者のプロトコルに従って使用してサイトカインおよびケモカインの存在について分析した。このキットによって検出された14種の分析物は：G-CSF、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP1、IFNおよびTNFだった。G-CSF(図14A)、KC(図14B)およびIFN(図14C)を含むサイトカインおよびケモカインの産生は、SMIPで処置されたマウスにおいて阻害された。これらの結果は、SMIPの投与が、aGVHDに関連するサイトカインおよびケモカインの産生、特に、IFNの産生(代表的には、aGVHDに罹患したマウスの7日目に大きく増加している)を阻害したことを示した。14日目に、脾細胞を前に記載したように単離し、LSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)を用いた分析のために、H-2b(ドナー細胞)およびH2-d(H2b+, H2-d+細胞は、宿主起源だった)に対する抗体で染色した。H57 Null2融合タンパク質を投与されたマウスは、DEXを投与されたマウスおよびドナー細胞を投与さ

40

50

れなかったネガティブコントロールマウスと類似のドナーリンパ球：宿主リンパ球比を有した（図15）。これらの結果は、本開示の融合タンパク質が、PBSおよびIgG2aでのコントロール処置を受けたマウスに見られたaGVHDに関連する宿主リンパ球の減少と同時に生じるドナーリンパ球の増大を阻害することを示している。

【0233】

これらのインビボ研究は、本開示の融合タンパク質が、aGVHDの進行を阻害すること（ドナーリンパ球が増大しないことによって証明される）、炎症性サイトカインおよびケモカインの産生ならびに体重減少を阻害することを示している。同様の有効性は、慢性GVHDマウスモデルを用いたときの予備段階の結果においても見られている。

【0234】

aGVHDの実験モデルは、H57 half null、H57 null2および2C11 null2を評価するためにも企図されている。バイオマーカー研究においていくつかのサイトカインが初期に放出されたが、H57 half nullおよびH57 null2は、調べられたパラメータにおける同様の結果によって効果的であると見出された。2C11 null2融合タンパク質もまた効果的であり、aGVHDモデルにおいてドナー細胞の増大を妨げることが見出された。

【0235】

（実施例9）

（N297AおよびIgG4 C_H2領域内に追加の単一アラニン置換を有する融合タンパク質は、同種抗原に対するT細胞応答を阻止する）

以下の融合タンパク質：

【0236】

【化2】

OKT3 IgG4-WT-N297A (配列番号 232),

OKT3 IgG4-ALGG-N297A (配列番号 234), OKT3 IgG4-FAGG-N297A (配列

番号 236), OKT3 IgG4-FLAG-N297A (配列番号 238), OKT3 IgG4-FLGA-

N297A (配列番号 240), OKT3 IgG4-AA-N297 (配列番号 91), OKT3 FL

および OKT3 mAb.

を用いて、実施例2に記載したように、ヒトMLRアッセイを行った。

【0237】

図20は、(a) N297における唯一のアラニン置換、または(b) N297におけるアラニン置換と、F234、L235、G236またはF237位における追加のアラニン置換との両方を含むOKT3 IgG4融合タンパク質が、公知のOKT3 mAbおよびOKT3 ala-ala抗体よりも良好に同種抗原に対するT細胞応答を阻止したことを示している。

【0238】

（実施例10）

（MLR反応は、ヒンジ領域の選択に影響され得る）

BC3 IgG1-N297A (配列番号 80) に由来し、かつ様々な長さおよび配列のヒンジ：UBA由来のリンカー125 (配列番号 329)、IgE C_H2由来のリンカー126 (配列番号 330)、IgDヒンジ由来のリンカー127 (配列番号 331)、IgA2ヒンジ由来のリンカー128 (配列番号 332) およびIgG1ヒンジ由来のリンカー129 (配列番号 333) を含む融合タンパク質を用いて、実施例2に記載したようにヒトMLRアッセイを行った。上で述べたリンカーを含むBC3 IgG2-N297A SMIPのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号325、323、319、315および311に示されている。これらのBC3 IgG2-N297A SMIPをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号324、322、318、314および

10

20

30

40

50

310に示されている。

【0239】

図21は、同種抗原に対するT細胞応答を阻止する際のBC3 IgG1-N297A融合タンパク質の能力に対する様々なヒンジの作用を示している。より短いヒンジを有する融合タンパク質が、T細胞応答を阻止する際により有効であったとみられる。しかしながら、すべての場合において、BC3結合ドメインを有する一本鎖融合タンパク質が、HuIg1 BC3 (BC3 mAbの可変領域およびヒトIgG1定常領域を含む抗体分子)よりも、同種抗原に対するT細胞応答を阻止する際に有効だった。

【0240】

(実施例11)

(ヒト化Cris7融合タンパク質のインビトロ分析)

様々なヒト化Cris7融合タンパク質：ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG1-N297A (配列番号290)、ヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG1-N297A (配列番号295)、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG2-AA-N297A (配列番号292)、ヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG2-AA-N297A (配列番号297)、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG4-AA-N297A (配列番号293)、ヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG4-AA-N297A (配列番号298)、キメラCris7 IgG1-N297A (配列番号265)、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) HM1 (配列番号294)、ヒト化Cris7 (VH3-VL2) HM1 (配列番号299)およびキメラCris7 HM1 (配列番号269)を用いて実施例2に記載したようにヒトMLRアッセイを行った。

10

20

【0241】

図22は、ヒト化Cris7 IgG1-N297A、IgG2-AA-N297AおよびIgG4-AA-N297A融合タンパク質ならびにキメラCris7 IgG1-N297A融合タンパク質が、公知のCris7 mAbよりも良好に同種抗原に対するT細胞応答を阻止したことを示している。

【0242】

図23は、ヒト化Cris7 IgG1-N297A、IgG2-AA-N297AおよびIgG4-AA-N297A融合タンパク質ならびにキメラCris7 IgG1-N297A融合タンパク質が、公知のCris7 mAbよりも良好に同種抗原に対するT細胞応答を阻止したことも示している。さらに、ヒト化およびキメラCris7 HM1融合タンパク質もまた、Cris7 mAbよりも良好に同種抗原に対するT細胞応答を阻止した。

30

【0243】

PHAで刺激され、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG1-N297Aおよびヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG1-N297A融合タンパク質によって再度刺激されたT細胞の分裂促進性およびサイトカイン放出を、実施例1に記載した方法を用いて分析した。以下のサイトカインを試験した：IL-1b、IL-10、IL-17、IFN、TNF、IL6、MCP-1、IP-10、IL-2およびIL4。

【0244】

図24は、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG1-N297Aおよびヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG1-N297A融合タンパク質が、PHAで刺激された(PHA-primer) T細胞を活性化しなかったことを示している。ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG2-AA-N297A、ヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG2-AA-N297A、ヒト化Cris7 (VH3-VL1) IgG4-AA-N297Aおよびヒト化Cris7 (VH3-VL2) IgG4-AA-N297A融合タンパク質を用いたとき、同様のデータが生成された。

40

【0245】

サイトカイン放出の結果は、(1)ヒト化Cris7 IgG1-N297A、ヒト化Cris7-IgG2-AA-N297A、ヒト化Cris7-IgG4-AA-N29

50

7AおよびキメラCris7 IgG1-N297A融合タンパク質が、T細胞に結合しないコントロールSMIPタンパク質と異ならなかったこと、(2)親Cris7mAbが、IL-17を除いて、ヒト化Cris7 IgG1-N297A、ヒト化Cris7-IgG2-AA-N297Aおよびヒト化Cris7-IgG4-AA-N297A融合タンパク質に似ていたこと(親Cris7mAbは、ヒト化Cris7融合タンパク質よりも多くIL-17放出を誘導した)、(3)NuVion FLは、IL-10、IFN、IL-17、TNF およびIL-6を産生するように細胞を活性化したこと、および(4)試験されたすべての分子(T細胞に結合しないコントロールSMIPを含む)が、PHA再刺激と同程度のレベルでMCP-1の分泌を引き起こしたことを示している。IFN およびIL-17放出の結果は、それぞれ図25Aおよび25Bに示されている。

10

【0246】

インビトロでのカニクイザルPBMCにおける初期の分裂促進性アッセイにおけるサイトカインレベルを、以下のとおり測定した: 1xPBS中90%のLymphocyte Separation Media (CMF)を使用し、15mlコニカルチューブ内で密度勾配を調製したことを除いて、実施例1に記載したように、カニクイザルから非ヒト霊長類PBMCを単離した。細胞を、 4×10^6 細胞/mlの濃度でRPMIコンブリート培地(10%ヒトAB血清、100U/mlペニシリン、100µg/mlストレプトマイシンおよび2mM L-グルタミンを含むRPMI-1640)に再懸濁し、記載の処理物とともに、96ウェル平底プレートに100µl/ウェルで等分した。細胞を37でインキュベートした。各ウェルから上清を1日目、2日目および3日目にサンプリングし、Millipore製のカスタム9-plex LumineXベース検出キットを製造者のプロトコルに従って使用して非ヒト霊長類サイトカインの存在について分析した。そのキットによって検出された9つの分析物は: IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、MCP1、IFN およびTNF だった。

20

【0247】

結果(図26A~H)は、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297Aおよびヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A融合タンパク質が、Cris7mAbよりも少ないIFN、IL-17、IL-4、TNF、IL-6およびIL-10の放出を誘導するのに対し、IL-1BおよびIL-2のレベルは、ヒト化Cris7 IgG4-AA-N297A融合タンパク質での処理後とCris7mAbでの処理後で似ていたことを示している。

30

【0248】

(実施例12)

(H57結合ドメインを含む例示的な融合タンパク質のバイオマーカー研究)

10週齢の雌性C57BL/6xDBA2 F1マウスの体重を対応させ、1群あたり8匹の動物で5群に分けた。IgG2aアイソタイプコントロール、H57 Null2 SMIP(配列番号96)、H57 1/2 Null SMIP(配列番号304)、H57 HM2 SMIP(配列番号306)または5µgのH57mAbを、後方眼窩洞を介して動物にIV注射した(300µgのH57 Null2 SMIPに相当するモル濃度の200µL)。各群から4匹のマウスを24時間後に安楽死させ、残りの1群あたり4匹のマウスは、注射の3日後の実験の終わりに安楽死させた。前に記載したように薬物関連毒性の臨床症状についてマウスをモニターした。すべてのマウスから、注射の2時間後およびそのマウスの最期の時点において採血した。前に記載したようにMillipore製のカスタム14-plex LumineXベース検出キットを用いて、血清サンプルをサイトカインおよびケモカインの存在について分析した。血清分析のための血液採取に加えて、白血球の末梢血染色のために、血液のアリコート成全血用マイクロテイナー(microtainer)チューブ(EDTA含有)に集めた。簡潔には、5µLの全血を96ウェルU底プレートのウェルに加えた。5µLのラット抗10µg/mlマウスCD16/CD32Fc Block(BD Pharmingen)を加え、プレートを室

40

50

温において15分間、プレート振盪機上において中速でインキュベートした。CD5 (PE - Cy5)、CD19 (FITC, eBioscience) およびCD45 (PE, eBioscience) に対する10 μ Lの抗体カクテル(または適切な単一染色コントロール)を、1:4000の最終希釈となるように加えた。プレートを、中速のプレート振盪機上に光から保護して置いて、室温でさらに20分間インキュベートした。180 μ Lの1 \times BD Pharm Lyse緩衝液を加え、ウェルを十分に混合し、室温において30分間静置させた。次いで、BD LSRII High Throughput Sampler (HTS) において50 μ Lの各サンプルを分析した。ゲーティングストラテジーは、以下のとおりだった: FSC: SSCリンパ球ゲート内に入った細胞をCD45発現について分析し、続いて、CD45+ゲートに入った細胞をCD5およびCD19発現について分析した。各細胞型の1mlあたりの細胞を、集めた50 μ Lのサンプルおよび40という希釈係数に基づいて逆算した。

【0249】

図27は、H57 Null2、half nullおよびHM2 SMIPタンパク質の静脈内投与は、体重喪失を引き起こさなかったが、H57mAbの静脈内投与は、体重喪失を引き起こしたことを示している。すべてのマウスが、0日目~3日目において苦痛の明らかな徴候はなく、正常であるとみられた。

【0250】

図28は、H57 Null2、H57 half Null、H57 HM2またはH57mAbの静脈内投与が、IgG2aアイソタイプコントロールと比べて、循環CD5+T細胞(細胞/ml)の一過性の減少をもたらすことを示している。循環CD5+T細胞のレベル(細胞/ml)は、注射の72時間後に群間で有意に異ならなかった(図29)。

【0251】

図30A~38Cは、(1)H57 Null2およびH57 HM2が、IgG2aと比べてサイトカイン産生を増加させなかったこと、および(2)H57 half null処置が、注射の2時間後にIL-2、IL-10、IP-10、TNF およびIL-17のレベルを上昇させたが、IL-5以外のすべてのレベルが、注射後24時間までに正常レベルに戻ったことを示している。

【0252】

(実施例13)

(H57結合ドメインを含む例示的な融合タンパク質の薬物動態学的研究)

雌性BALB/cマウスに、200 μ gのH57 Null2(配列番号96)、H57-HM2(配列番号306)またはH57 half null SMIPタンパク質(配列番号304)を含む200 μ LのPBSを時間0において静脈内(IV)注射した。各時点について、1群あたり3匹のマウスに注射した: H57-HM2 SMIPタンパク質については、15分後、2時間後、6時間後、8時間後、24時間後、30時間後、48時間後、72時間後、168時間後および336時間後に血清サンプルを得て、H57 Null2およびH57 half nullについては、さらに96時間後および504時間後にも採取したが、8時間後および30時間後のサンプリングは省略した。注射後の記載の時点において、麻酔されたマウスから腕神経叢または心臓の穿刺によって放血させ、以下に記載されるように血清を集めた。

【0253】

捕捉試薬としてヤギ抗ヒトIgG Fc特異的抗体、および結合したBC3 IgG4-AA-N297AまたはBC3-IgG2-AA-N297A SMIPを検出するためのそれぞれヒトIgG4またはIgG2に対する抗体のHRP結合体を使用するサンドイッチELISAを用いて、BC3 IgG4-AA-N297AおよびBC3 IgG2-AA-N297Aの血清濃度を測定した。OKT3 IgG4-AA-N297AおよびBC3-HM1についての血清濃度を、CD3+Jurkat細胞株を用いるFACSベースの結合アッセイにおいて測定した。Jurkat細胞を、OKT3 IgG4-

10

20

30

40

50

AA - N297AまたはBC3 HM1を注射されたマウス由来の血清サンプルとともに96ウェル平底プレート内でインキュベートした。1つの希釈において各血清サンプルを3連で試験した。サンプルに対して使用した希釈は、異なる時点について様々であったが、OKT3 IgG4 - AA - N297Aについては1:20から1:15,000、およびBC3 - HM1については1:20から1:1000の範囲だった(OKT3 IgG2 - AA - N297AまたはBC3 - HM1を注射されたマウス由来のプールされたサンプルを予備アッセイにおいて試験していたので、各サンプルに対する適切な希釈が判明していた)。希釈された血清サンプルまたは標準物質(下記を参照のこと)の存在下において、細胞を1時間インキュベートし、洗浄した後、検出試薬を加えた。Jurkat細胞へのOKT3 Ig4 - AA - N297Aの結合は、PE結合体化ヤギ抗ヒトIgG Fc フラグメント特異的抗体を使用して検出されたのに対し、Jurkat細胞へのBC3 - HM1の結合は、PE結合体化抗His抗体を使用して検出された。H57 Null2、H57 - HM2およびH57 half nullについての血清濃度を、マウスT細胞株であるEL4細胞を使用するFACSベースの結合アッセイにおいて測定した。EL4細胞を、抗マウスCD16/CD32でブロッキングし、次いで、H57 - null2を注射されたマウス由来の血清サンプルとともに96ウェル平底プレート中でインキュベートした。1つの希釈において各血清サンプルを3連で試験した。サンプルに対して使用した希釈は、異なる時点について様々であったが、1:500から1:10,000の範囲だった(H57 - null2を注射されたマウス由来のプールされたサンプルを予備アッセイにおいて試験していたので、各サンプルに対する適切な希釈が判明していた)。FACS緩衝液に加えられたH57 Null2の様々な既知濃度からなる標準曲線を3連で作成した。発展的研究により、1:50より高い希釈の血清は標準曲線に対して影響しなかったこと、およびさらに高い希釈(最低1:500)の血清がPKサンプルについて必要だったことが示されたので、血清を標準曲線に加えなかった。

10

20

30

40

【0254】

EL4細胞を、希釈された血清サンプルまたは標準物質の存在下において1時間インキュベートし、洗浄した後、検出試薬を加えた。EL4細胞に対するH57 Null2およびH57 half nullの結合を、PE結合体化ロバ抗マウスIgG(H+L)抗体を用いて検出したのに対し、EL4細胞に対するH57 - HM2の結合を、PE結合体化抗His抗体を用いて検出した。これらのサンプルは、フローサイトメトリーによって分析された。平均蛍光強度(MFI)をSoftmax Proソフトウェアにインポートすることにより、血清濃度を計算し、標準曲線の精度および正確度を判定した。

【0255】

血清サンプルを、前に記載したようなMillipore製のカスタム14-plex LumineXベース検出キットを用いてサイトカインおよびケモカインの存在について分析した。WinNonlinTM Professionalソフトウェア(v5.0.1)を使用し、IVボラス投与および低頻度のサンプリングに対してコンパイル済みモデル201を適用した非コンパートメント分析によって、各タンパク質に対する薬物動態学的性質のパラメータを推定した。PK結果を図40に提供し、計算された半減期を下記の表2に提供し、サイトカインの結果を図40~49に提供する。

【0256】

【表 2】

表2. PK結果

試験化合物	血清半減期(時間)
H57 Null2 (配列番号 96)	83.5
H57 half null (配列番号 304)	40.7
H57-HM2 (配列番号 306)	6.6
BC3-HM1 (配列番号 84)	3.2
BC3 IgG2-AA-N297A (配列番号 82)	87.5
BC3IgG4-AA-N297A (配列番号 83)	99.7
OKT3 IgG2-AA-N297A (配列番号 90)	42.4

10

このPK研究の結果は、CH2CH3テイルを含むSMIPタンパク質が、CH3だけのテイルを含むものよりもかなり長い半減期を有することを示している。

【0257】

図39～48は、H57-HM2 SMIPタンパク質が、測定されたすべての時点において、ほとんどのサイトカイン(IFN-、IL-2、IL-5、IL-6またはIL-17)のレベルを概して上昇させなかったことを示している。これは、この分子のより短い半減期に一部起因しているかもしれない。さらに、観察されたサイトカインのいくつかのレベル上昇が、概して周期的であり、H57 half null SMIP融合タンパク質で見られたレベルよりも常に低かった。

20

【0258】

(実施例14)

(H57結合ドメインを含む例示的な融合タンパク質のインビトロ研究)

MLRアッセイおよびConA芽細胞再刺激アッセイを、実施例6における方法に従って行った。

30

【0259】

結果は、H57 Null2、H57 half nullおよびH57-HM2融合タンパク質(それぞれ配列番号96、304および306)は、抗原に対する初期のT細胞応答を阻止したが、H57mAbは阻止しなかったことを示している(図50および51)。さらに、H57 Null2、H57 half nullおよびH57-HM2融合タンパク質ならびにIgG2aは、ConAで刺激されたT細胞の活性化を誘導せず、H57mAbは、ConAで刺激されたT細胞の活性化をわずかに誘導し、2C11mAbは、ConAで刺激されたT細胞の活性化を誘導した(図52)。H57 Null2およびH57-HM2融合タンパク質は、ConA芽細胞再刺激アッセイにおいてサイトカイン放出を誘導せず、H57 half null融合タンパク質は、H57 Null2およびH57-HM2融合タンパク質と比べて、試験されたいくつかのサイトカイン(例えば、GM-CSF、IFN-、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IP-10およびTNF-)のレベルを上昇させた(データ示さず)。

40

【0260】

上に記載した様々な実施形態は、組み合わせられることにより、さらなる実施形態を提供し得る。本明細書中で参照されたおよび/またはApplication Data Sheetに列挙された、米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献のすべての全体が、本明細書中で参考として援用される。

【0261】

上で詳述された記載に鑑みて、これらおよび他の変更がそれらの実施形態に対して行われ得る。概して、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を

50

本明細書および特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に限定すると解釈されるべきでなく、権利付与されるそのような特許請求の範囲の等価物の全範囲とともに、起こりうるすべての実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

【 図 1 】

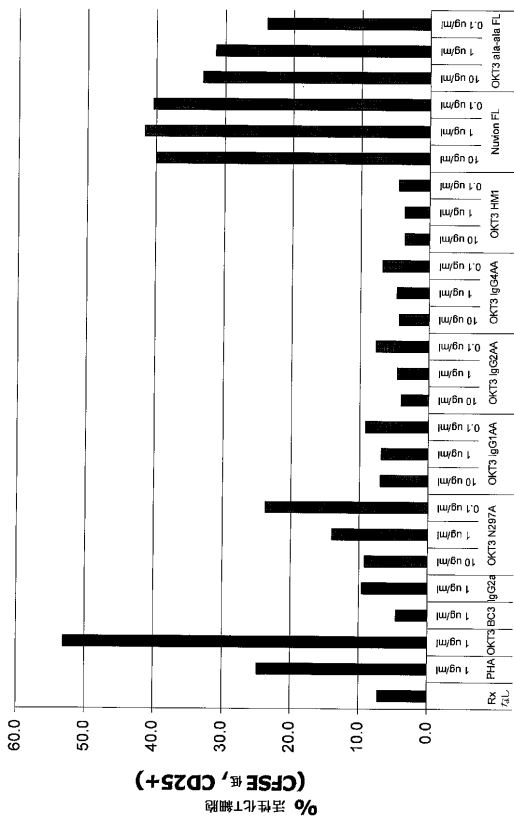
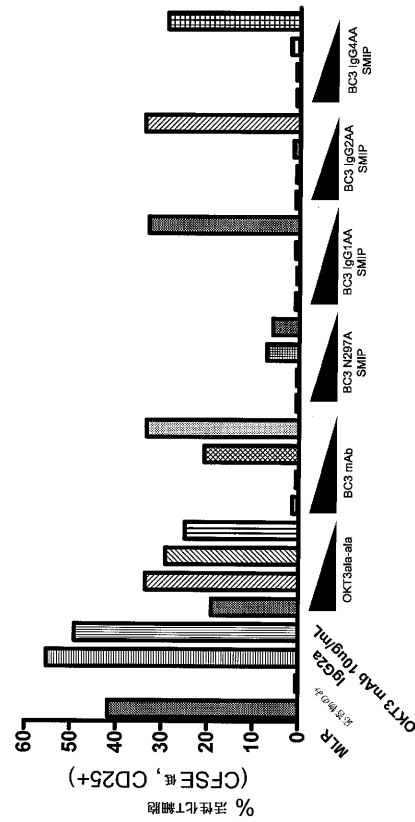


Fig. 1

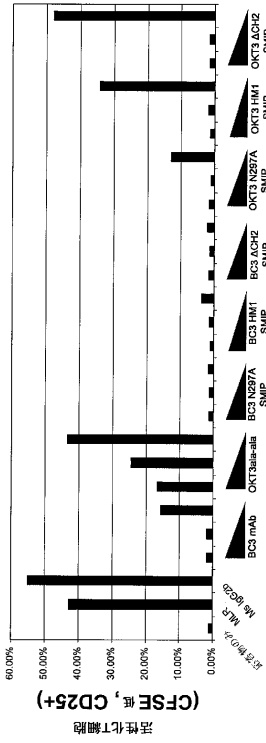
【 図 2 】



mAbの10 µg/mL, 1 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.01 µg/mLに相当するモル濃度を試験した

Fig. 2

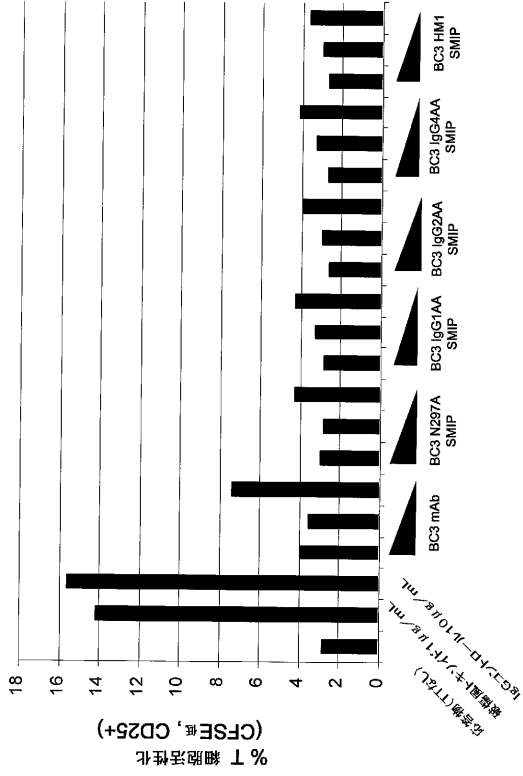
【 図 3 】



mAbの10 μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mLに相当するモル濃度を試験した

Fig. 3

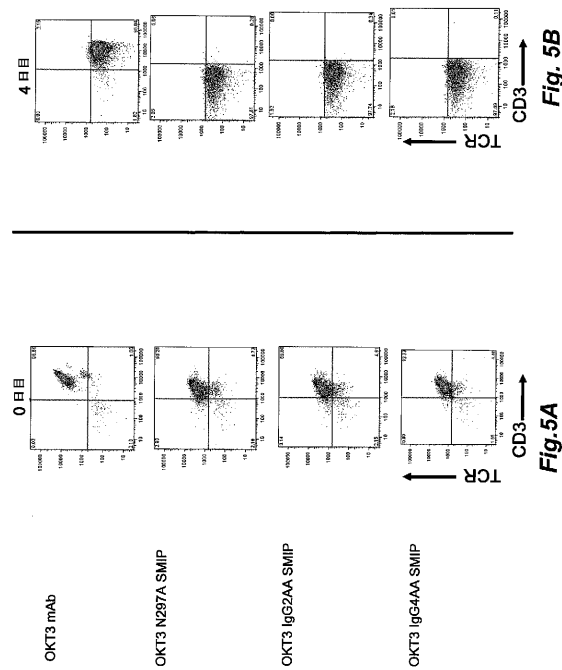
【 図 4 】



mAbの10 μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mLに相当するモル濃度を試験した

Fig. 4

【 図 5 】



【 図 6 】

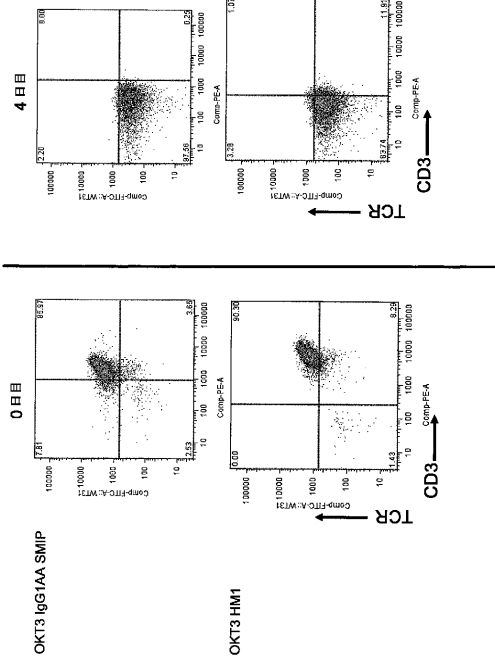


Fig. 6A

Fig. 6B

【 図 7 】

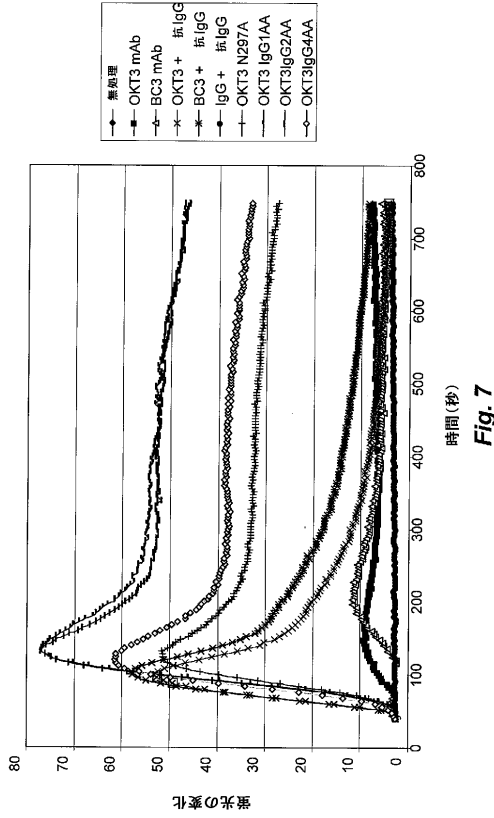
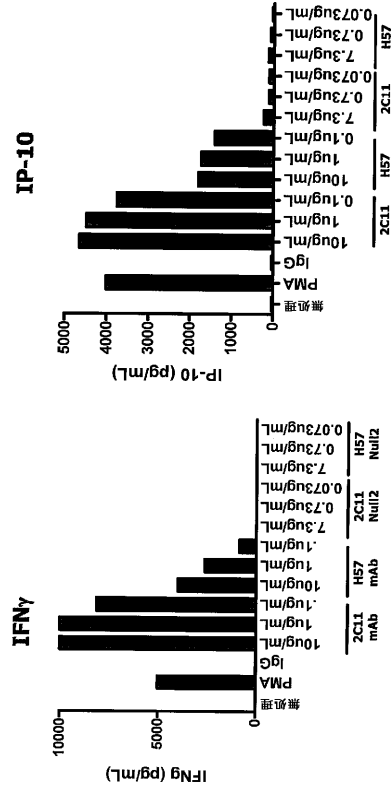


Fig. 7

【 図 8 】



14種の分析物が分析された

Fig. 8B

Fig. 8A

【 図 9 】

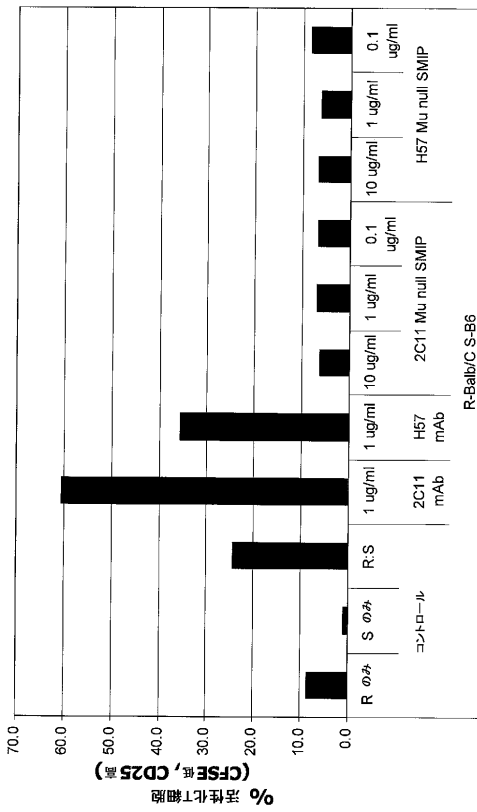


Fig. 9

【 図 10 】

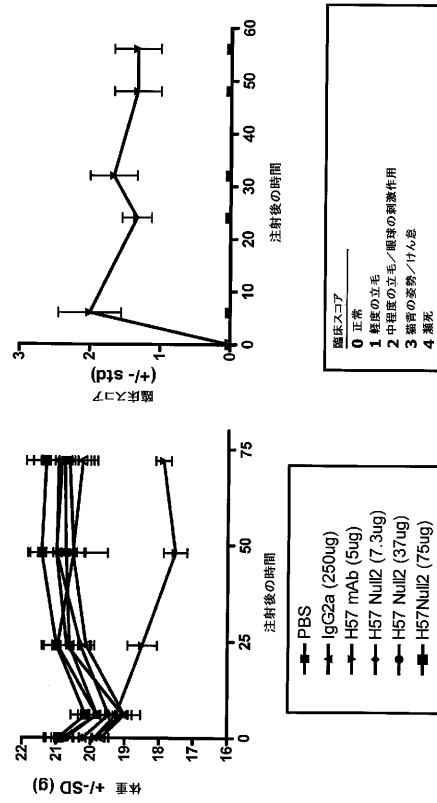


Fig. 10B

Fig. 10A

- 0 正常
- 1 軽度の立ち毛
- 2 中度の立ち毛/眼珠の刺激作用
- 3 猫背の姿勢/けん怠
- 4 瀕死

【 図 1 1 A 】

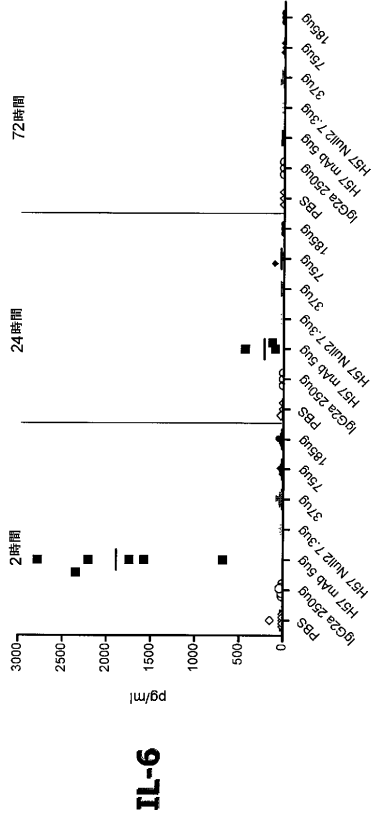


Fig. 11A

【 図 1 1 B 】

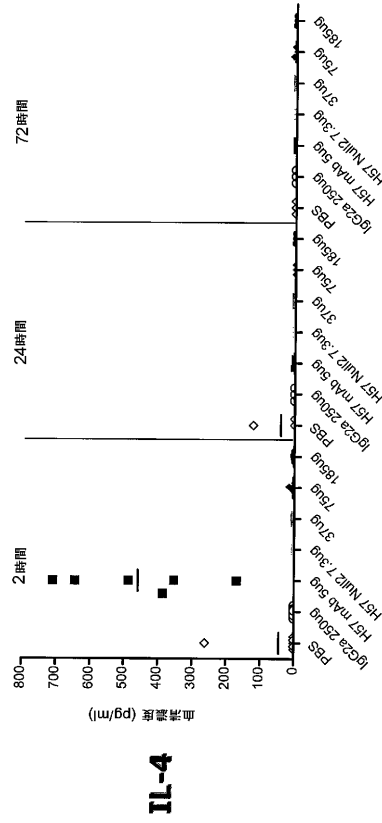


Fig. 11B

【 図 1 2 】

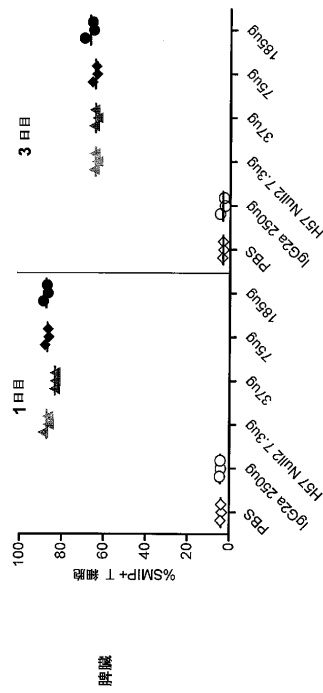


Fig. 12

【 図 1 3 】

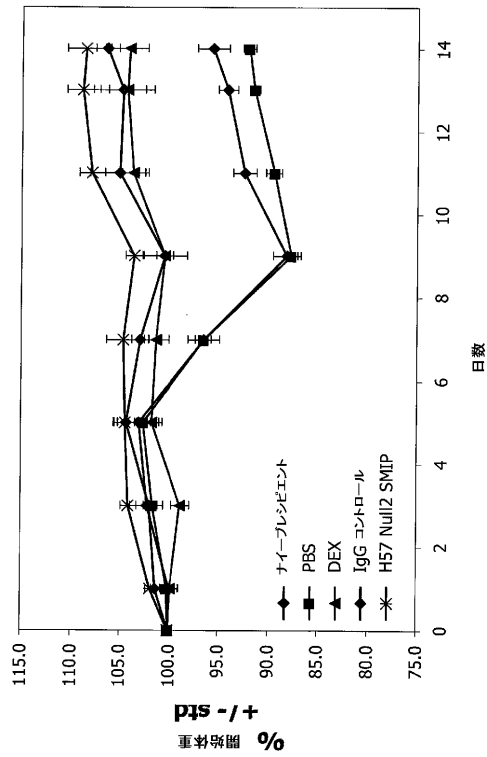


Fig. 13

【 14 】

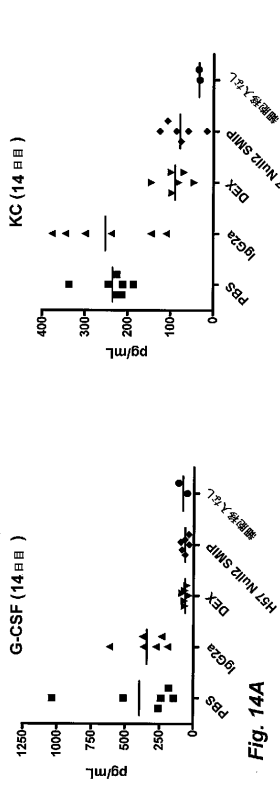


Fig. 14B

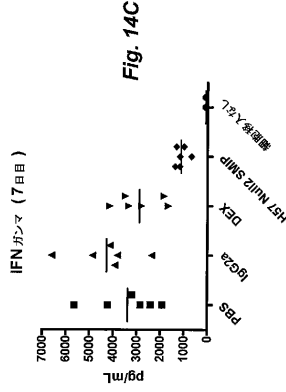


Fig. 14C

【 15 】

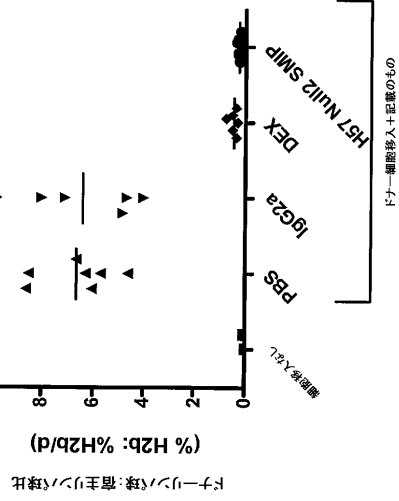


Fig. 15

【 16 】

231	A P E L L G G P P S V F L F P P P K P K D T	IgG1 CH2
231	A P P V A G - P S V F L F P P P K P K D T	IgG2 CH2
231	A P E F L G G P P S V F L F P P K P K D T	IgG4 CH2
231	A P D L L G G P P S V F I F P P K I K D V	IGHG2c CH2
251	L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D	IgG1 CH2
251	L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D	IgG2 CH2
251	L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D	IgG4 CH2
251	L M I S L S P M V T C V V V D V S E D D	IGHG2c CH2
271	P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K	IgG1 CH2
271	P E V Q F N W Y V D G M E V H N A K T K	IgG2 CH2
271	P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K	IgG4 CH2
271	P D V Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q	IGHG2c CH2
291	P R E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H	IgG1 CH2
291	P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H	IgG2 CH2
291	P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H	IgG4 CH2
291	T H R E D Y N S T L R V V S A L P I Q H	IGHG2c CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A	IgG1 CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A	IgG2 CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S	IgG4 CH2
311	Q D W M S G K E F K C K V N N R A L P S	IGHG2c CH2
331	P I E K T I S K A K	IgG1 CH2
331	P I E K T I S K T K	IgG2 CH2
331	P I E K T I S K A K	IgG4 CH2
331	P I E K T I S K P R	IGHG2c CH2

Fig. 16

【 17 】

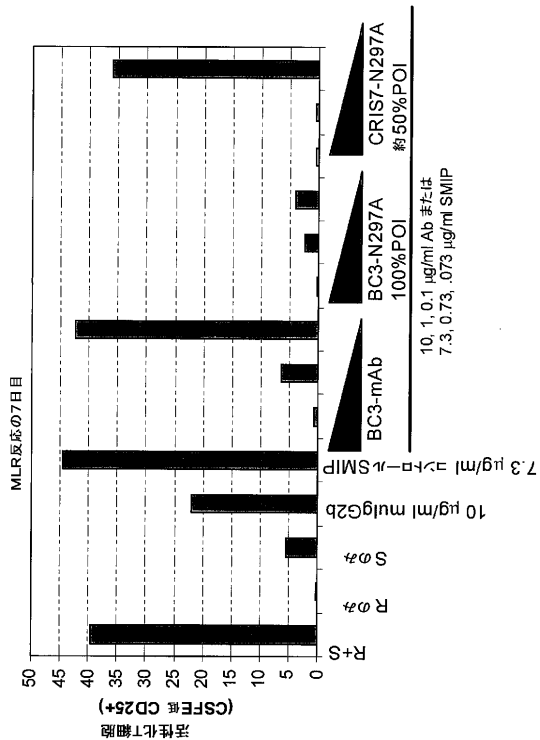


Fig. 17

【 18 】

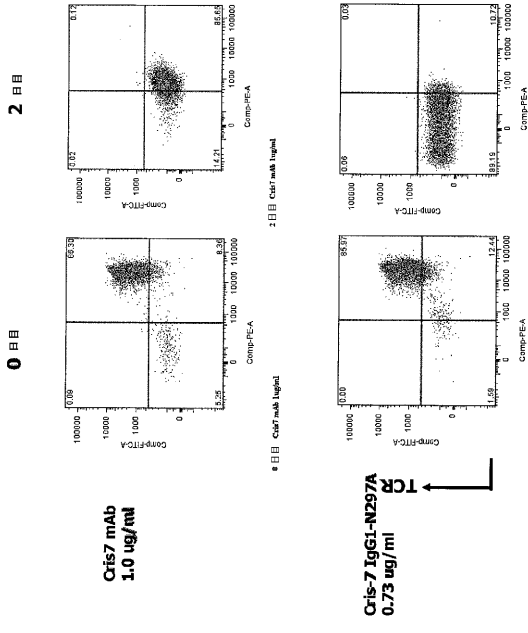


Fig. 18

【 19 】

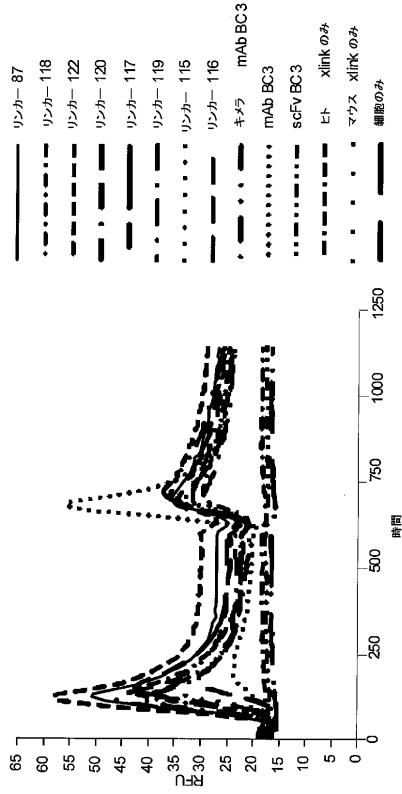


Fig. 19

【 20 】

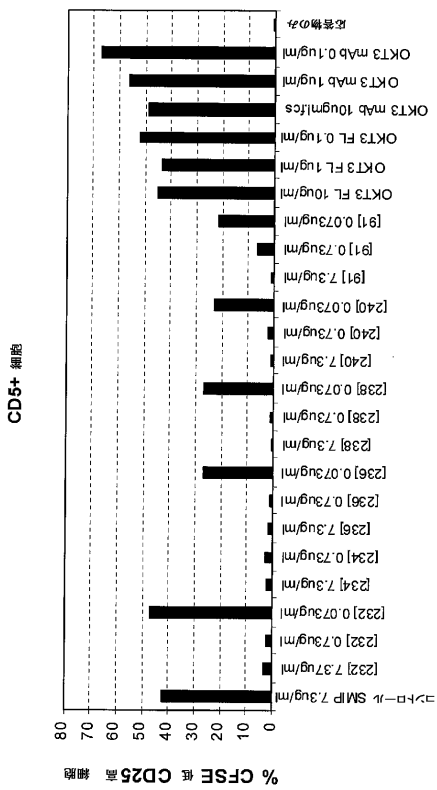


Fig. 20

【 21 】

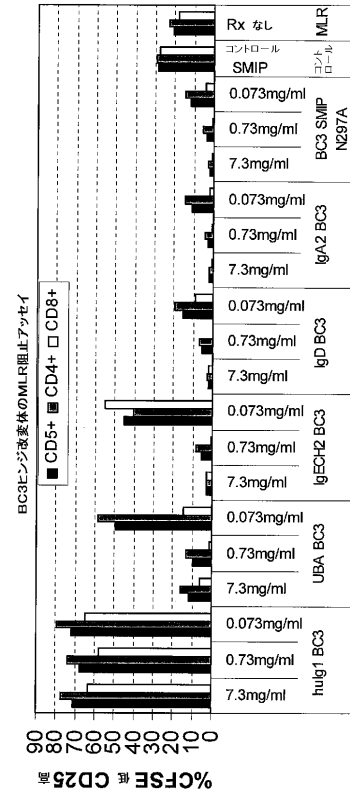


Fig. 21

【 図 2 5 B 】

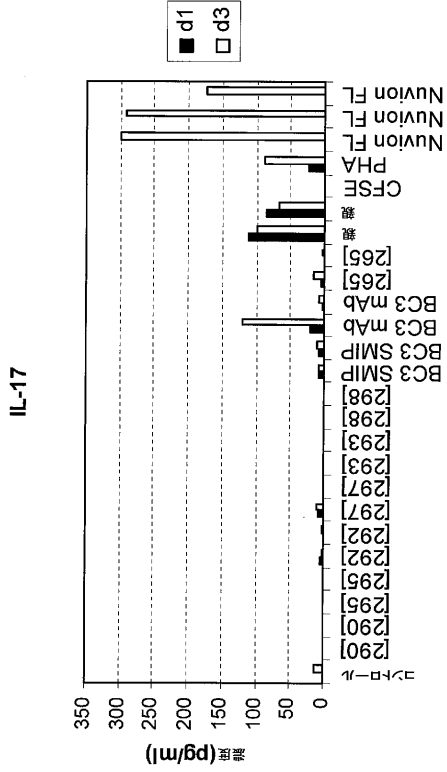


Fig. 25B

【 図 2 6 A 】

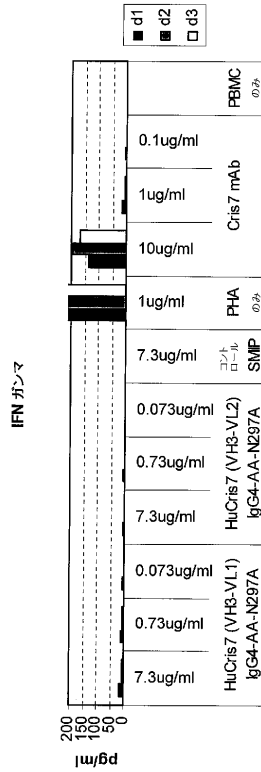


Fig. 26A

【 図 2 6 B 】

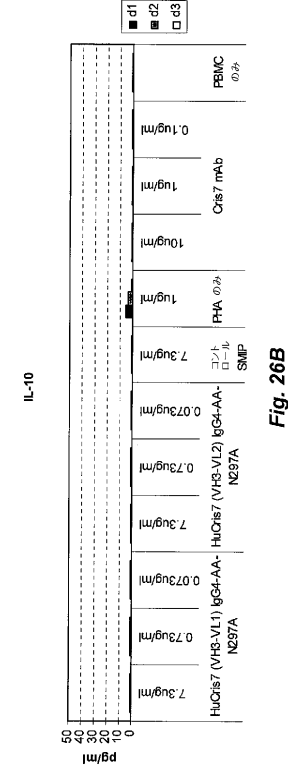


Fig. 26B

【 図 2 6 C 】

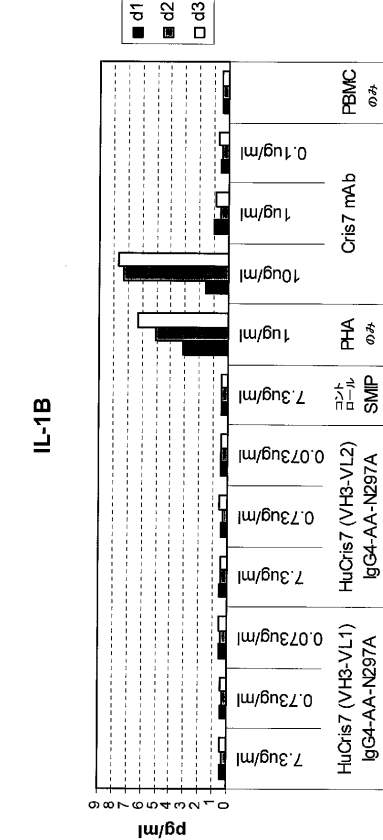


Fig. 26C

【 26 D 】

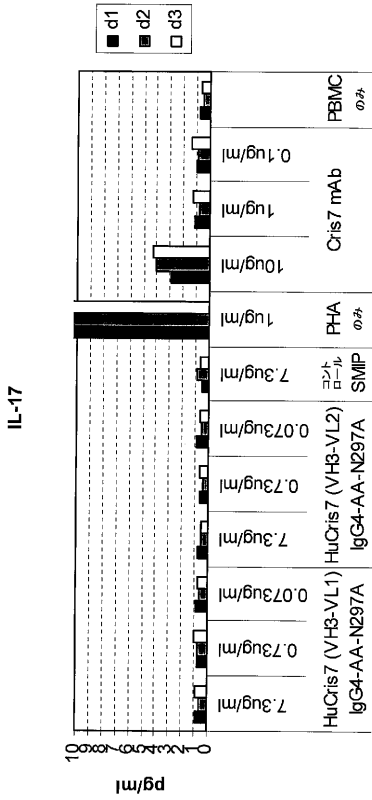


Fig. 26D

【 26 E 】

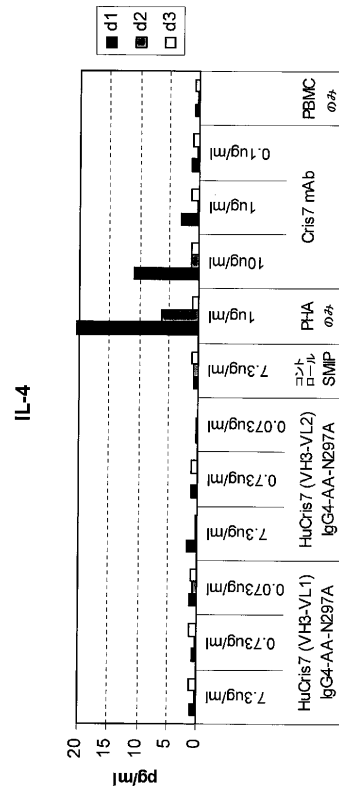


Fig. 26E

【 26 F 】

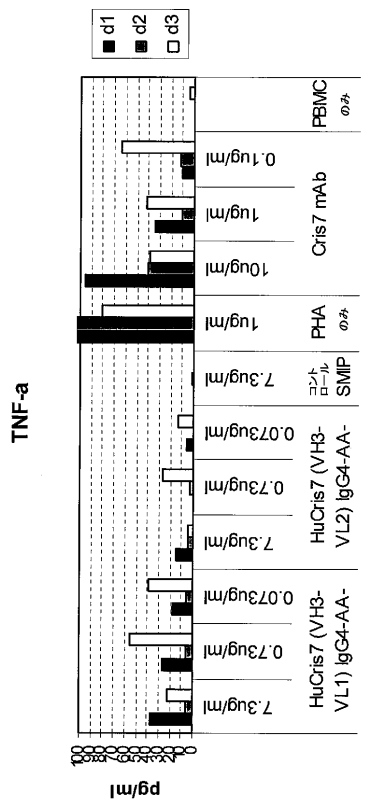


Fig. 26F

【 26 G 】

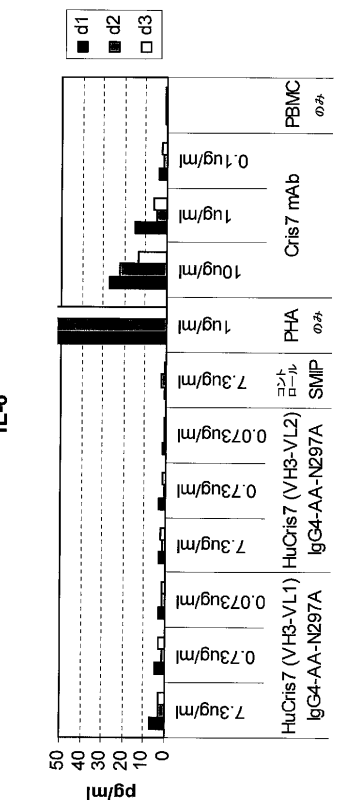


Fig. 26G

【 図 2 6 H 】

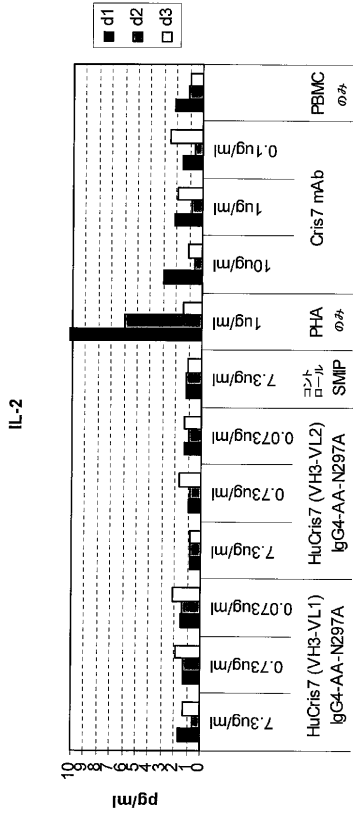


Fig. 26H

【 図 2 7 】

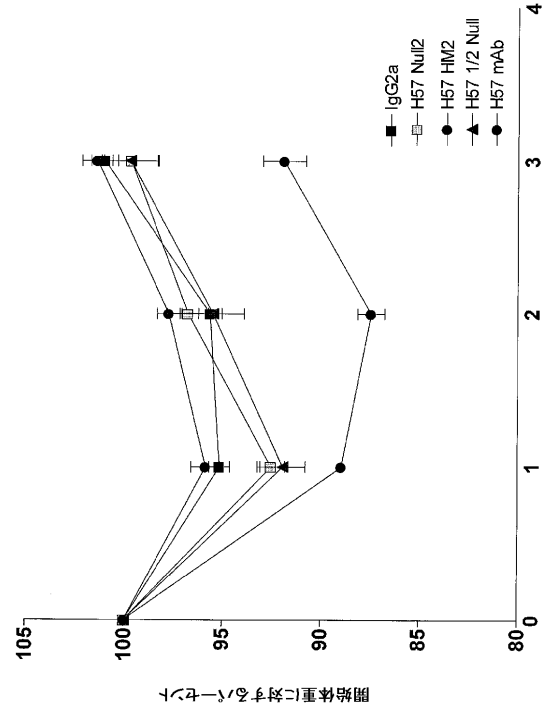


Fig. 27

【 図 2 8 】

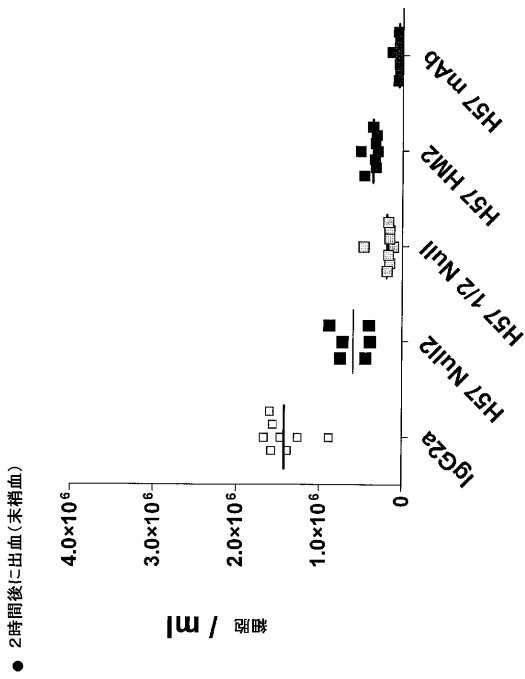


Fig. 28

【 図 2 9 】

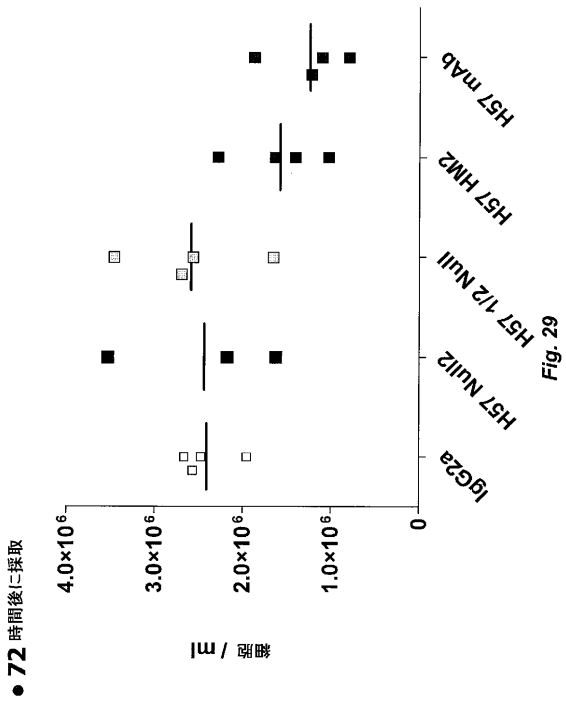
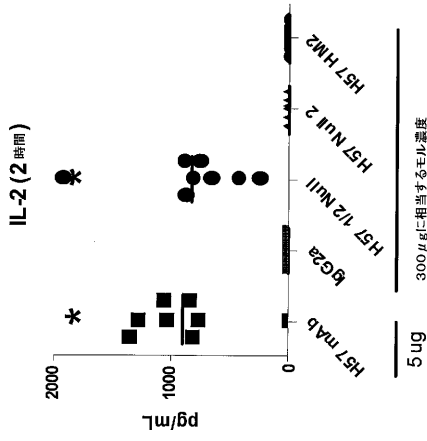


Fig. 29

【 図 3 0 A 】



* p < 0.05 対 IgG2a, H57 Null2, H57 1/2 Null および H57 HM2

Fig. 30A

【 図 3 0 B 】

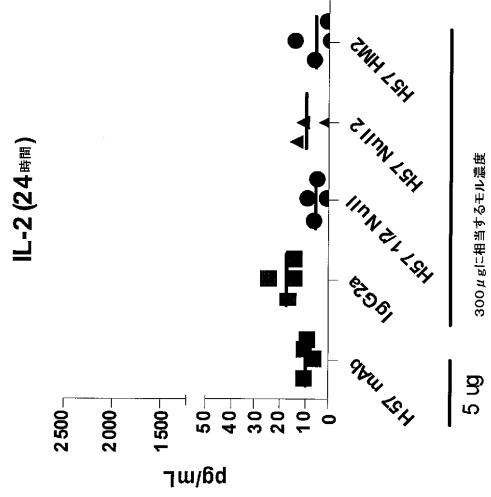


Fig. 30B

【 図 3 0 C 】

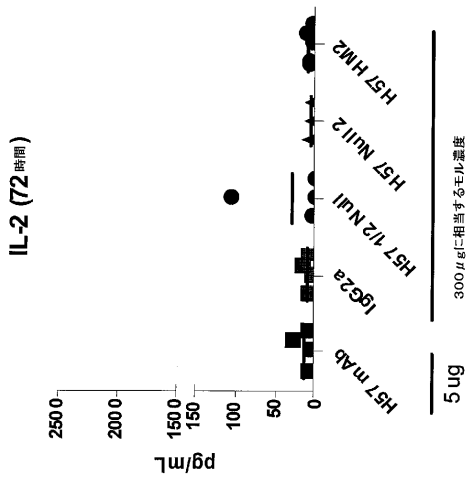
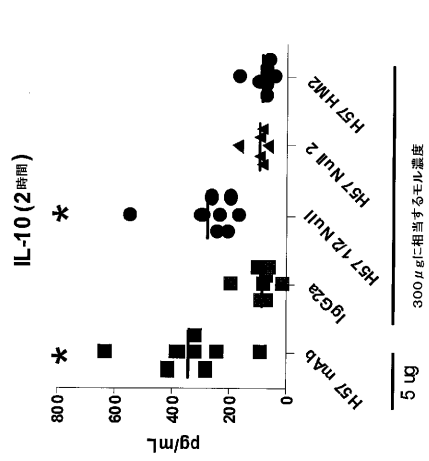


Fig. 30C

【 図 3 1 A 】



p < 0.05 対 IgG2a, H57 Null2, H57 1/2 Null および H57 HM2

Fig. 31A

【 図 3 1 B 】

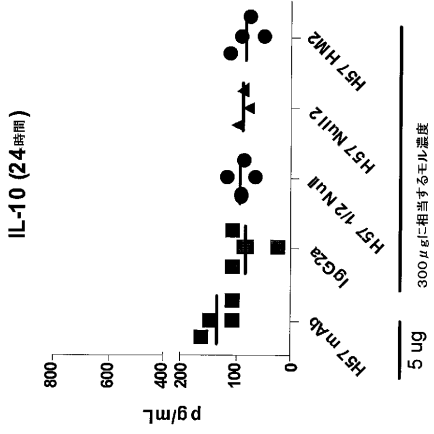


Fig. 31B

【 図 3 1 C 】

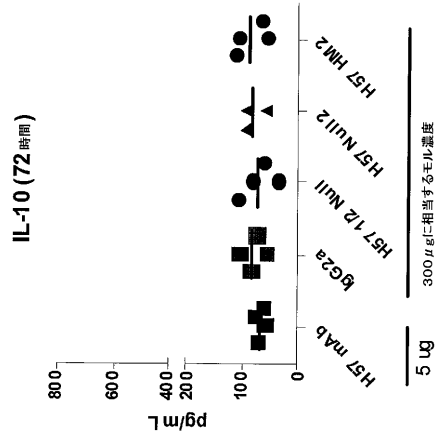
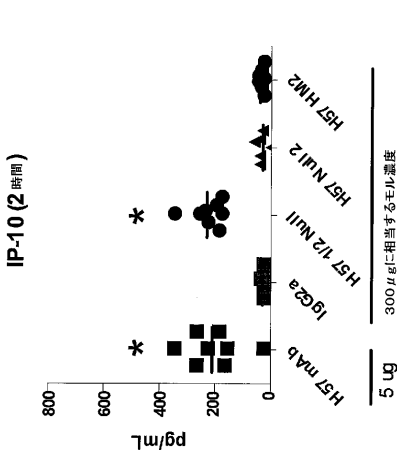


Fig. 31C

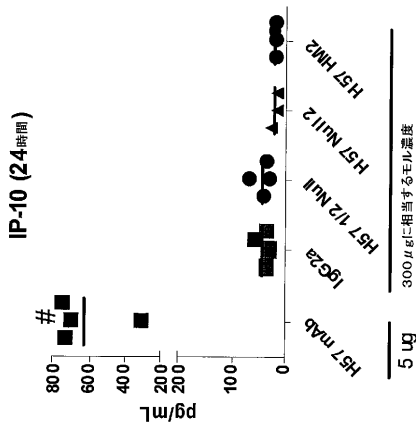
【 図 3 2 A 】



* p < 0.05 対 19G2a, H57 Null2, H57 1/2 Null および H57 HM2

Fig. 32A

【 図 3 2 B 】



p < 0.05 対 他 の すべて の 群

Fig. 32B

【 図 3 2 C 】

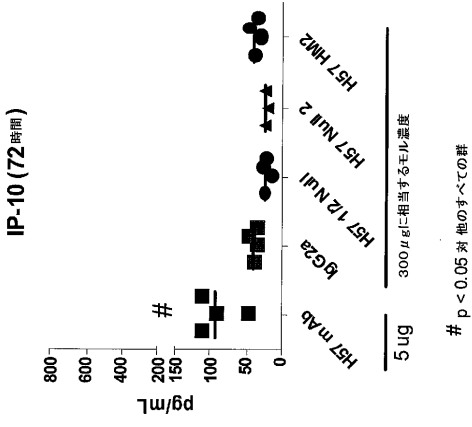


Fig. 32C

【 図 3 3 A 】

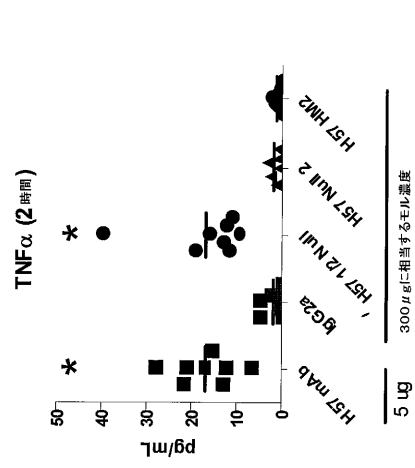


Fig. 33A

【 図 3 3 B 】

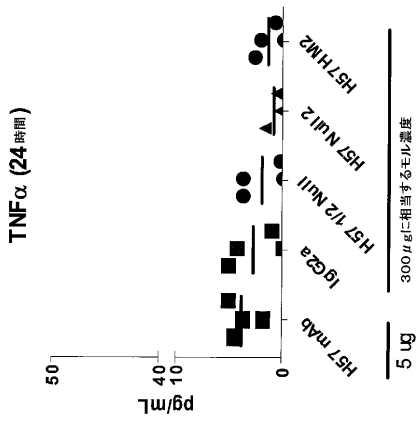


Fig. 33B

【 図 3 3 C 】

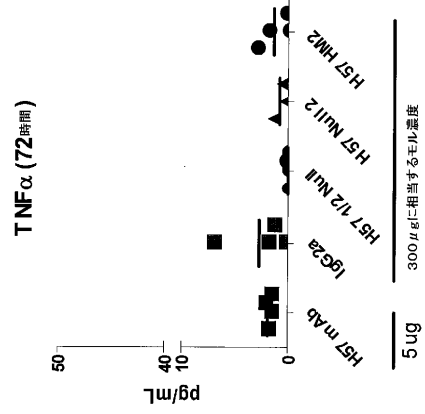
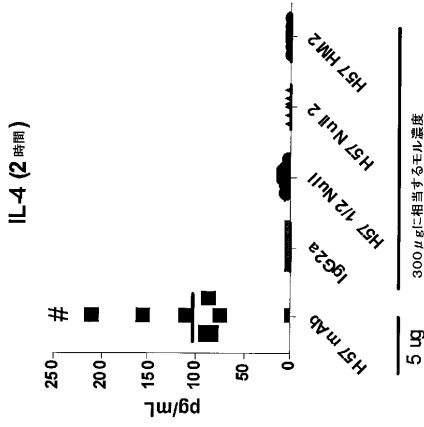


Fig. 33C

【 図 3 4 A 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 34A

【 図 3 4 B 】

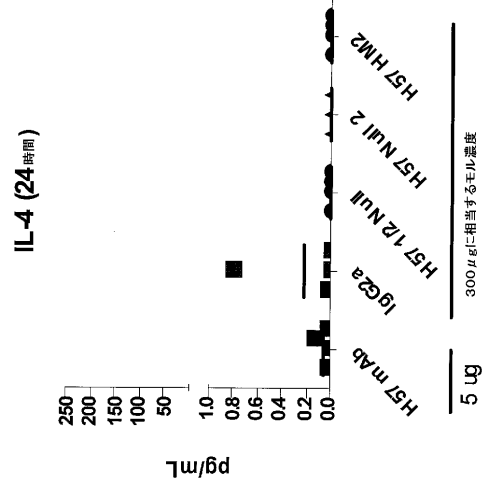


Fig. 34B

【 図 3 4 C 】

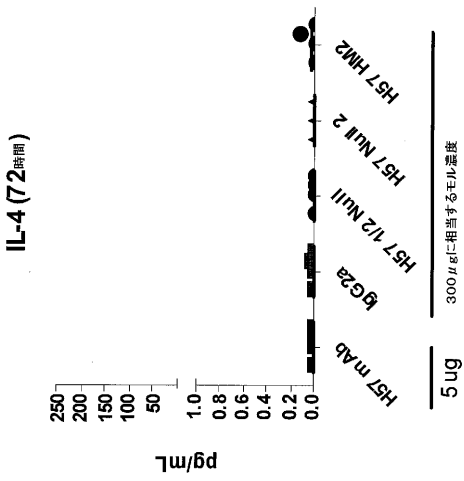
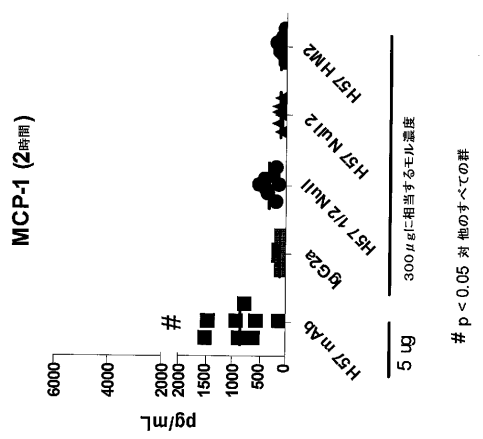


Fig. 34C

【 図 3 5 A 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 35A

【 図 3 5 B 】

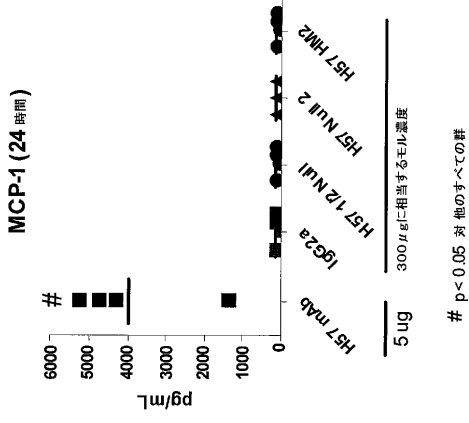


Fig. 35B

【 図 3 5 C 】

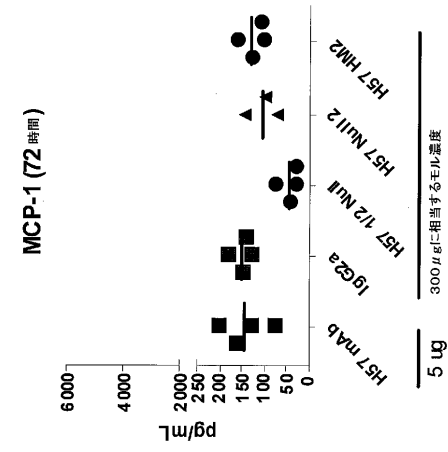


Fig. 35C

【 図 3 6 A 】

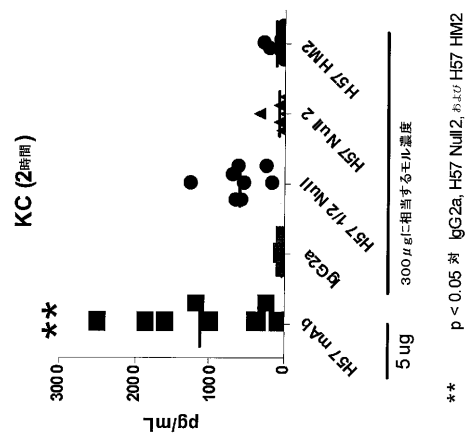


Fig. 35A

【 図 3 6 B 】

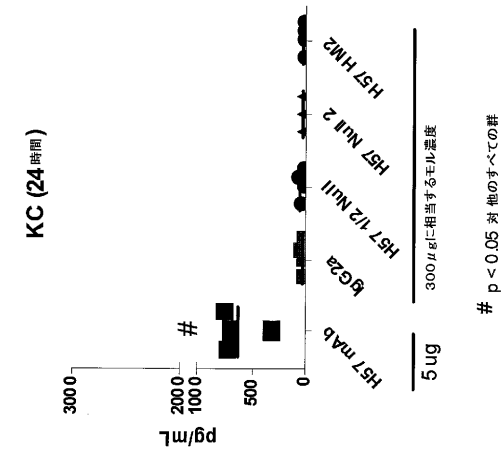


Fig. 35B

【 図 3 6 C 】

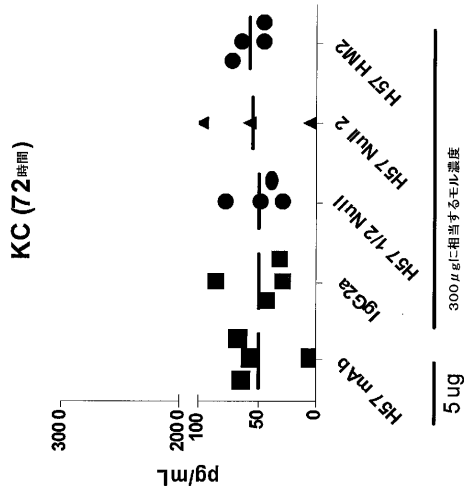
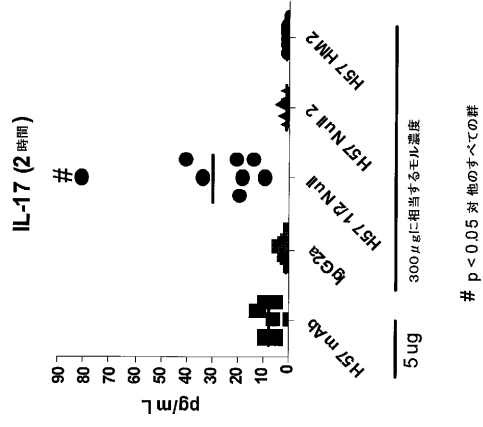


Fig. 35C

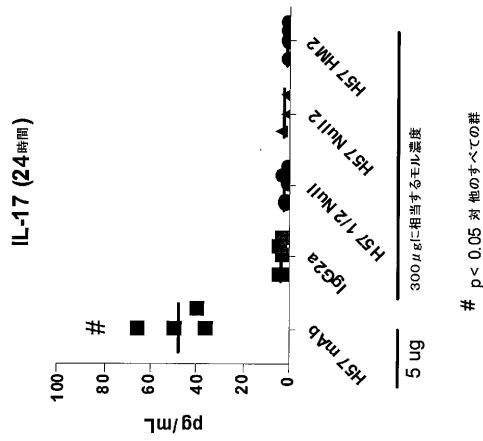
【 図 3 7 A 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 36A

【 図 3 7 B 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 36B

【 図 3 7 C 】

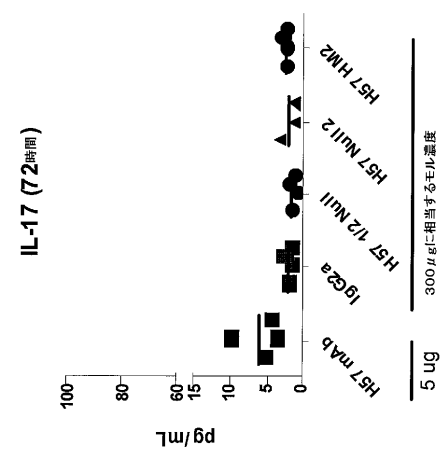


Fig. 36C

【 図 3 8 A 】

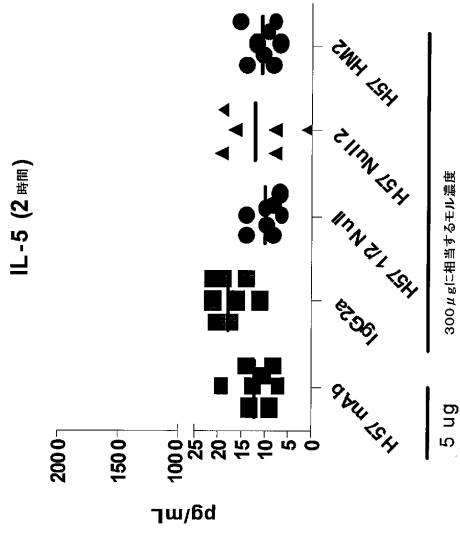
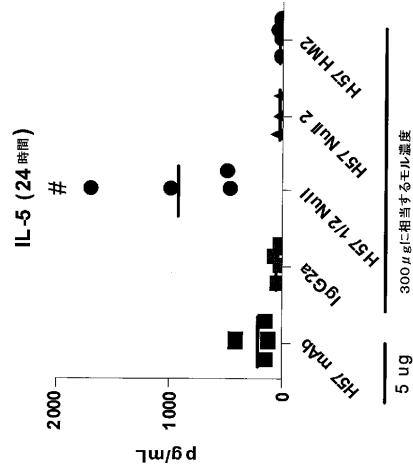


Fig. 38A

【 図 3 8 B 】



p < 0.05 対 他 の す べ て の 群

Fig. 38B

【 図 3 8 C 】

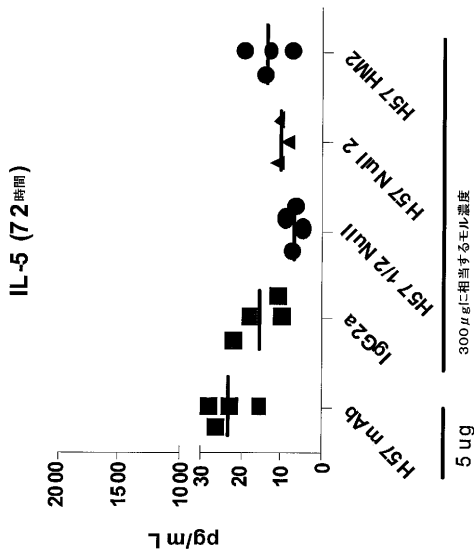


Fig. 38C

【 図 3 9 A 】

Tru.pc.0148, H57 HM2 サンプルのPK分析

Rsq=0.984 Rsc_誤差=0.988 HL_Lambda_z=6.6515 (時間)
(3点を計算に使用した)
均一の重み付け

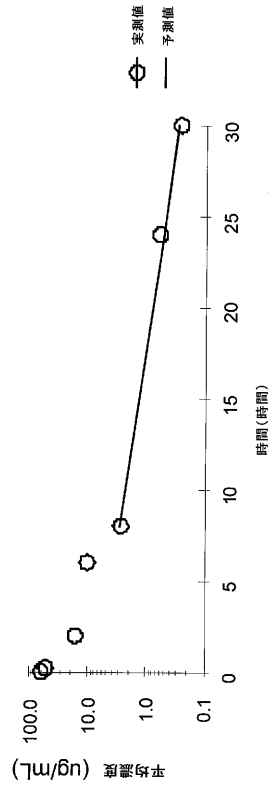


Fig. 39A

【 図 3 9 B 】

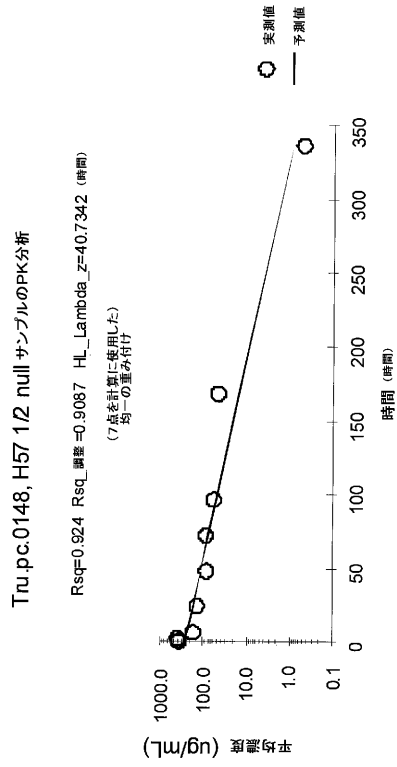


Fig. 39B

【 図 4 0 】

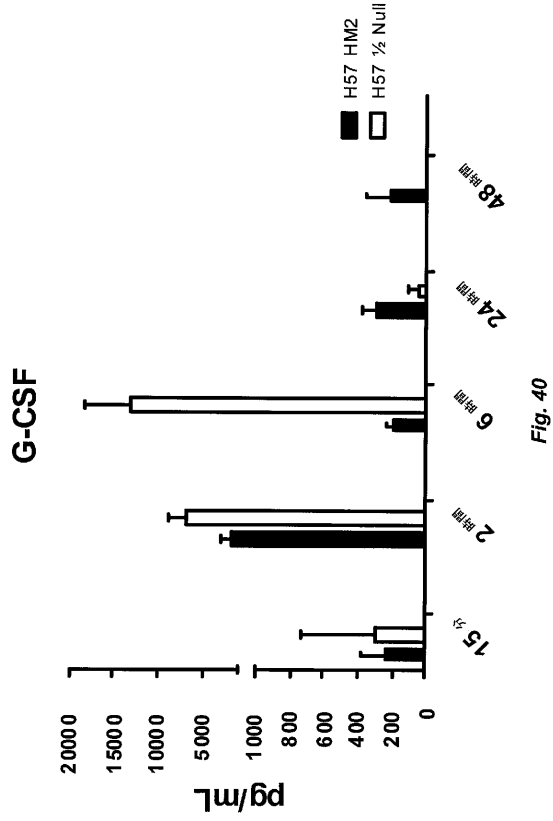


Fig. 40

【 図 4 1 】

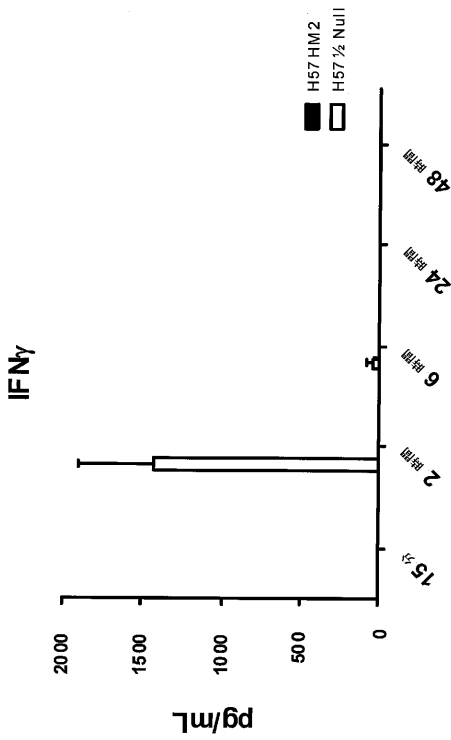


Fig. 41

【 図 4 2 】

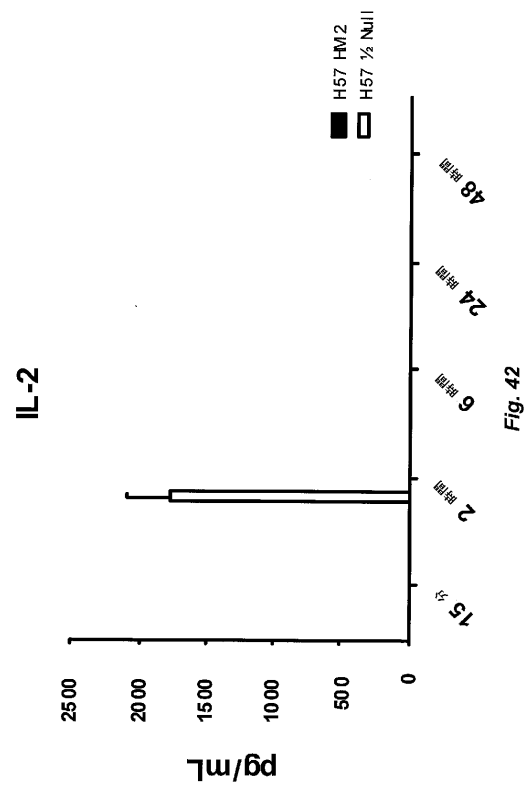


Fig. 42

【 図 4 3 】

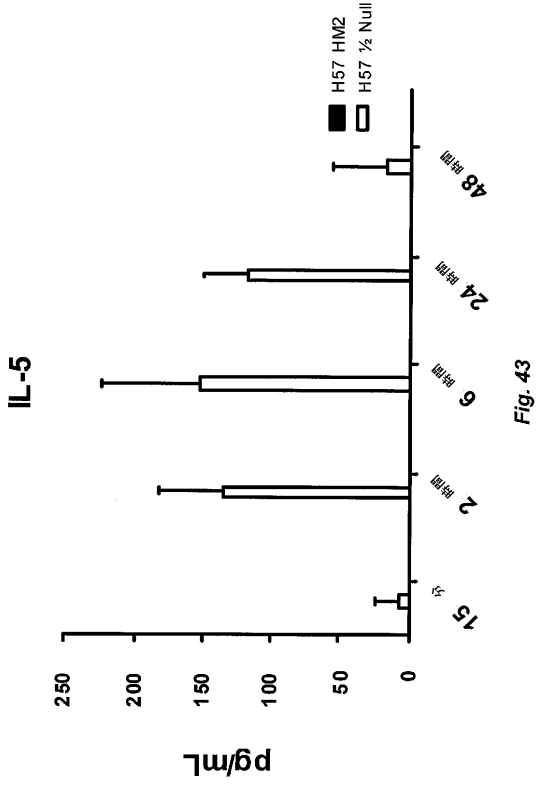


Fig. 43

【 図 4 4 】

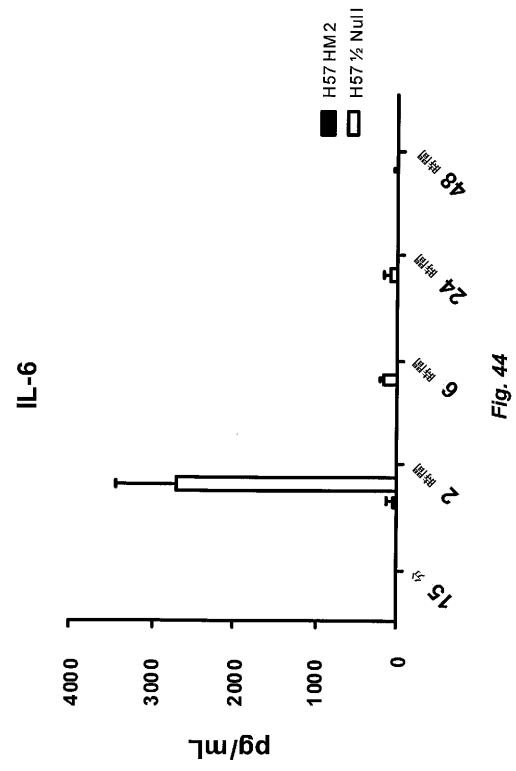


Fig. 44

【 図 4 5 】

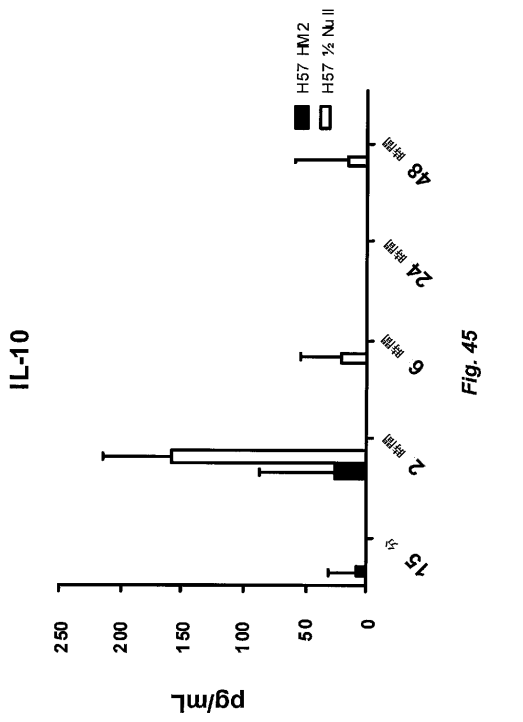


Fig. 45

【 図 4 6 】

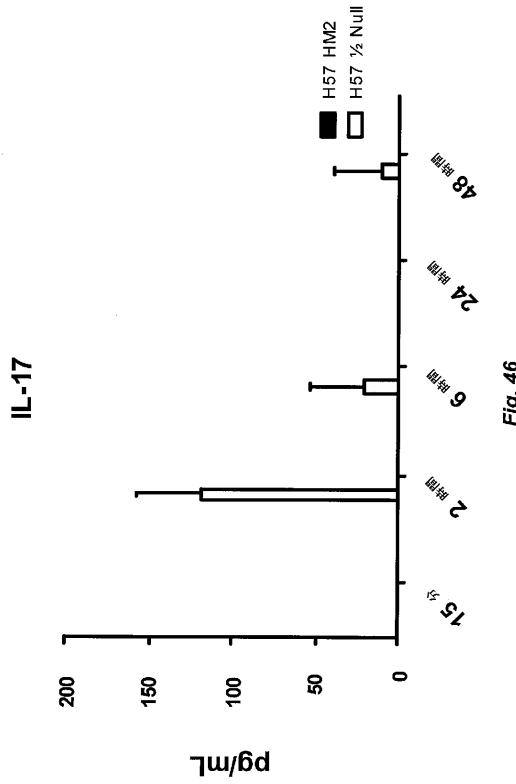


Fig. 46

【 図 4 7 】

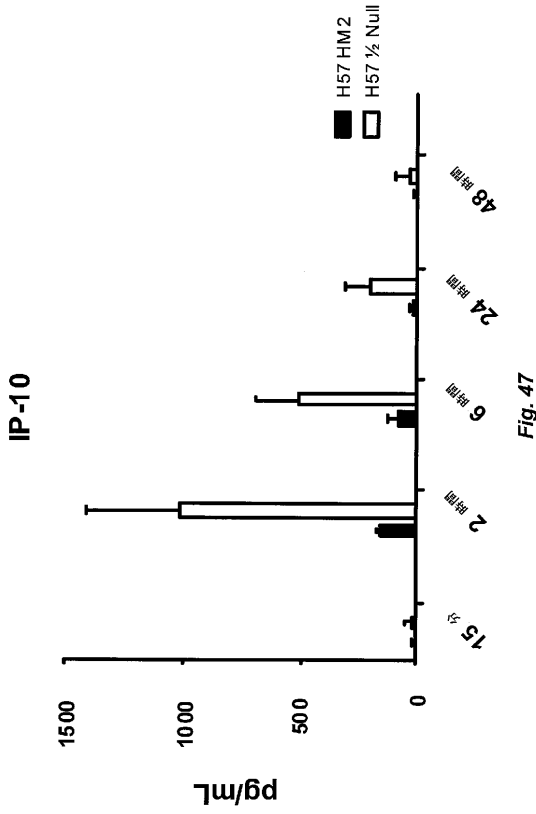


Fig. 47

【 図 4 8 】

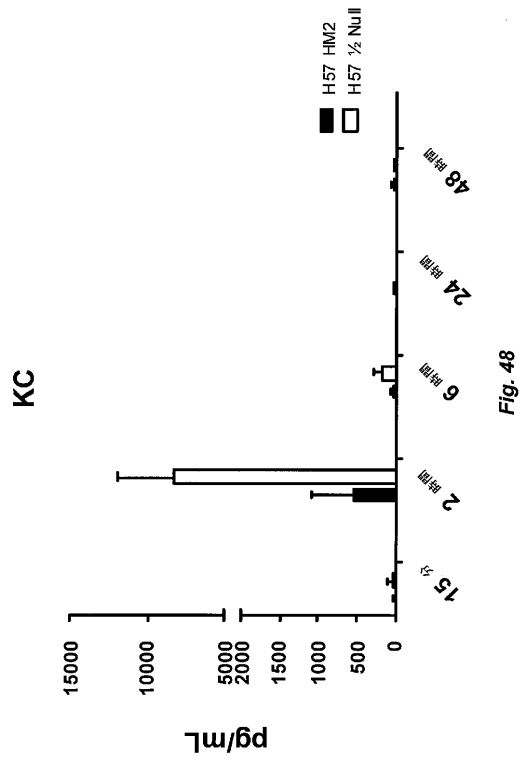


Fig. 48

【 図 4 9 】

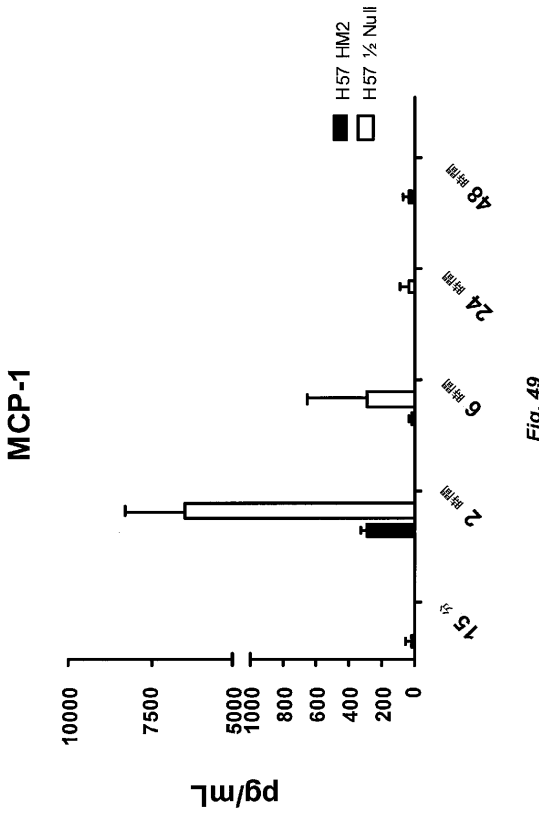


Fig. 49

【 図 5 0 】

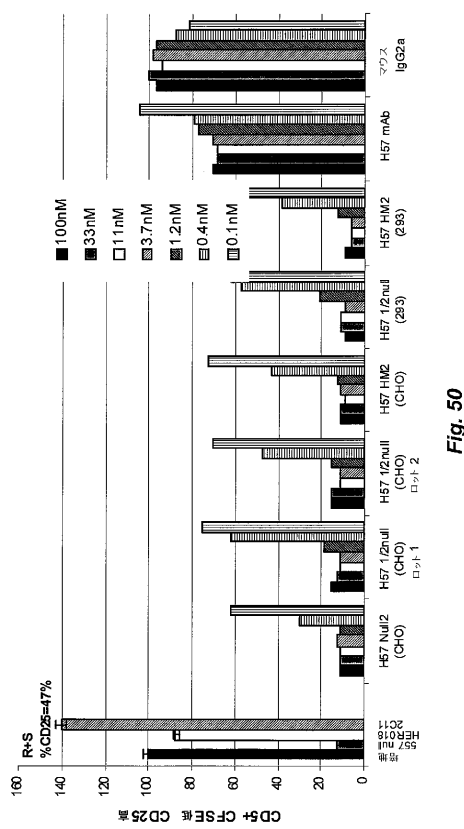


Fig. 50

【 図 5 1 】

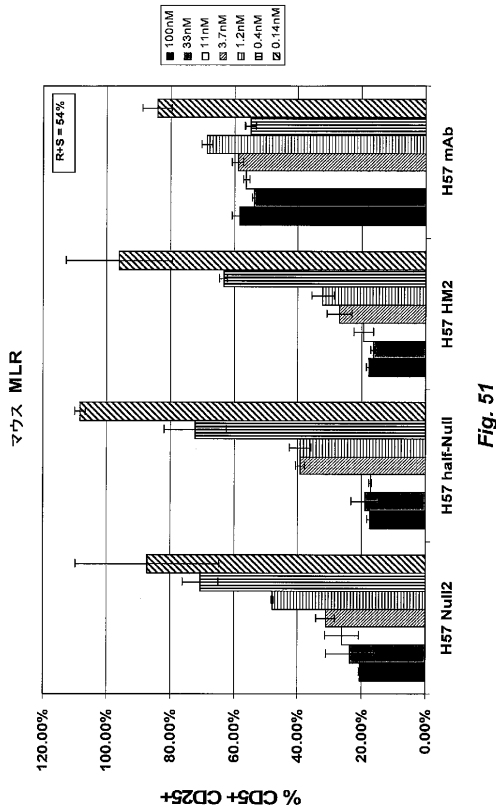


Fig. 51

【 図 5 2 】

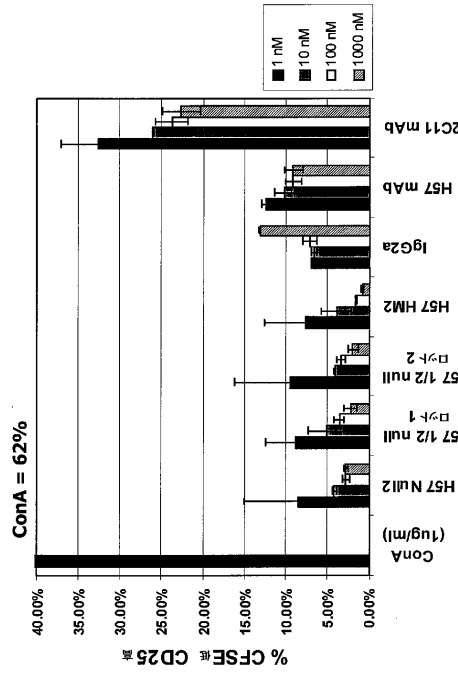


Fig. 52

【 配 列 表 】

2016145244000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 28 年 4 月 13 日 (2016.4.13)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 2 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 図 1 は、PHA で 刺 激 さ れ た ヒ ト T 細 胞 を 様 々 な 抗 体 お よ び 小 モ ジ ュ ー ル 免 疫 薬 (small modular immunopharmaceutical (SMIPTM)) 製 品 で 処 理 し た こ と に 起 因 す る、活 性 化 さ れ た T 細 胞 の パー セン テー ジ を 示 し て い る。「R x な し」と は、ネ ガ ティ ブ コ ン ト ロール と し て 使 用 さ れ た、処 理 無 し の こ と を 指 す。

【 図 2 】 図 2 は、混 合 リン パ 球 反 応 ア ッ セ イ に お い て、応 答 物 (responder) 細 胞 を 様 々 な 抗 体 お よ び SMIP 融 合 タン パク 質 で 処 理 し た こ と に 起 因 す る、活 性 化 さ れ た T 細 胞 の パー セン テー ジ を 示 し て い る。「MLR」と は、い か な る 追 加 の 処 理 も 行 わ な か っ た 混 合 リン パ 球 反 応 の こ と を 指 す。「応 答 物 の み」と は、応 答 物 細 胞 だ け が 存 在 し た 反 応 の こ と を 指 す。「IgG2a」と は、10 µg/ml IgG2a mAb で 処 理 さ れ た 応 答 物 細 胞 の こ と を 指 す。

【 図 3 】 図 3 は、混 合 リン パ 球 反 応 ア ッ セ イ に お い て、応 答 物 細 胞 を 様 々 な 抗 体 お よ び SMIP 融 合 タン パク 質 で 処 理 し た こ と に 起 因 す る、活 性 化 さ れ た T 細 胞 の パー セン テー ジ を 示 し て い る。「MLR」と は、い か な る 追 加 の 処 理 も 行 わ な か っ た 混 合 リン パ 球 反 応 の こ と を 指 す。「応 答 物 の み」と は、応 答 物 細 胞 だ け が 存 在 し た 反 応 の こ と を 指 す。

【図4】図4は、メモリーT細胞をモノクローナル抗体および様々なSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「応答物(TTなし)」とは、破傷風トキソイドの非存在下における反応のことを指す。

【図5】図5Aおよび5Bは、(A)単離の直後(0日目)または(b)OKT3モノクローナル抗体または様々なOKT3 SMIP融合タンパク質で処理した4日後に染色されたヒトT細胞上のTCRおよびCD3のFACS分析のドットプロットである。

【図6】図6Aおよび6Bは、(A)単離の直後(0日目)または(B)OKT3 IgG1AAまたはOKT3 HM1 SMIP融合タンパク質で処理した4日後に染色されたヒトT細胞上のTCRおよびCD3のFACS分析のドットプロットである。

【図7】図7は、精製ヒトT細胞をモノクローナル抗体、抗体の組み合わせまたは様々なOKT3 SMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、経時的なカルシウム流動指示色素の蛍光の変化を示している。

【図8】図8Aおよび8Bは、ConAで刺激されたマウスT細胞をモノクローナル抗体(2C11mAbおよびH57mAb)またはSMIP融合タンパク質(2C11 Null2およびH57 Null2)で処理した後の、(A)IFN または(B)IP-10の放出を示している。

【図9】図9は、混合リンパ球反応アッセイにおいて、応答物細胞を様々な抗体またはSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「Rのみ」とは、応答物細胞だけが存在する反応のことを指し;「Sのみ」とは、刺激物(stimulator)細胞だけが存在する反応のことを指し;「R:S」とは、応答物細胞と刺激物細胞の両方が存在する反応のことを指す。

【図10】図10Aおよび10Bは、様々な濃度の抗体(H57mAb)およびH57 Null2 SMIP融合タンパク質を静脈内投与した後の経時的な(A)体重および(B)臨床スコアの変化を示している。PBSおよびIgG2aをネガティブコントロールとして使用した。

【図11A】図11Aおよび11Bは、正常BALB/cマウスに抗TCR抗体(H57mAb)または様々な濃度の抗TCR SMIP融合タンパク質(H57 Null2)を静脈内投与した2時間後、24時間後、72時間後の血清中の(A)IL-6および(B)IL-4の濃度を示している。マウスIgG2a抗体およびPBS(希釈剤)をネガティブコントロールとして使用した。

【図11B】図11Aおよび11Bは、正常BALB/cマウスに抗TCR抗体(H57mAb)または様々な濃度の抗TCR SMIP融合タンパク質(H57 Null2)を静脈内投与した2時間後、24時間後、72時間後の血清中の(A)IL-6および(B)IL-4の濃度を示している。マウスIgG2a抗体およびPBS(希釈剤)をネガティブコントロールとして使用した。

【図12】図12は、様々な濃度の抗TCR SMIP融合タンパク質(H57 Null2)を静脈内投与した後の1日目または3日目のマウス脾臓に見られたH57 Null2 SMIPで覆われたT細胞のパーセンテージを示している。PBSおよびIgG2aをネガティブコントロールとして使用した。

【図13】図13は、急性移植片対宿主病(aGVHD)のモデルにおいてドナー細胞を移入した後の14日間にわたるレシピエントマウスの開始体重からの変化のパーセンテージを示している。「ナイーブレシピエント」は、ネガティブコントロールとしてドナー細胞移入を受けなかったマウスのことを示す。レシピエントマウスを、H57 Null2 SMIP融合タンパク質、デキサメタゾン(DEX)またはコントロール(PBSまたはIgG2a)で処置した。

【図14】図14A~14Cは、ドナー細胞移入後のそれぞれ14日目、14日目または7日目における(A)G-CSF、(B)KCまたは(C)IFN の血清濃度を示している。

【図15】図15は、ドナー細胞移入後の14日目におけるドナー:宿主リンパ球比を示している。「細胞移入なし」は、ドナー細胞を投与されなかったネガティブコントロール

マウスのことを示す。PBSおよびIgG2aをコントロール処置として使用した。

【図16】図16は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG4およびマウスIGHG2cのC_H2領域(それぞれ配列番号64、66、68および73)間の配列アラインメントを示している。これらのアラインメントは、DNASTAR5.03(DNASTAR Inc.)のMegAlignプログラムのデフォルトパラメータを使用したClustal W法を用いて行った。ヒトIgG1 C_H2のアミノ酸の位置は、Kabataに従うEUナンバリングに基づいている(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991)を参照のこと)。すなわち、ヒトIgG1の重鎖可変領域は、128アミノ酸長であると考えられるので、ヒトIgG1の定常領域における最もアミノ末端のアミノ酸残基は、129位である。他のC_H2領域のアミノ酸の位置は、それらとアラインメントされるヒトIgG1におけるアミノ酸残基の位置に基づいて示される。297位のAsn残基(N297)は、下線が引かれ、太字で示されている。

【図17】図17は、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて、応答物細胞を抗体またはSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「R」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指し、「S」とは、刺激物細胞だけが存在した反応のことを指し、「R+S」とは、いかなる追加の処理も行わなかった混合リンパ球反応のことを指し、「muIgG2b」とは、10μg/mlマウスIgG2bで処理された応答物細胞のことを指す。「コントロールSMIP」は、T細胞に結合しないscFv結合ドメインを有するSMIP融合タンパク質である。Cris-7 IgG1 N297A(配列番号265)を用いて、これらの細胞を試験した。

【図18】図18は、単離の直後に染色されたヒトT細胞上のTCRおよびCD3のFACS分析のドットプロットを示している。上の2枚のパネルは、Cris-7モノクローナル抗体で処理されたヒトT細胞を示しており、下の2枚のパネルは、Cris-7 IgG1 N297A(配列番号265)による処理を示している。左のパネルは、処理当日(0日目)の細胞の分布を示しており、右のパネルは、処理の2日後(2日目)の細胞の分布を示している。

【図19】図19は、ヒトT細胞をBC3 IgG1-N297A(配列番号80, scFvとCH2CH3ドメインとの間にヒンジとしてリンカー87を有する)で処理したことに起因する経時的なカルシウム流動指示色素の蛍光の変化を、ヒンジリンカー87を様々な長さの他のヒンジ(特に、配列番号212~218に対応する、それぞれリンカー115~120および122)と交換した同じ融合タンパク質と比較して示している。

【図20】図20は、MLRアッセイにおいて、応答物細胞を抗体またはSMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「コントロールSMIP」とは、T細胞に結合しないscFv結合ドメインを有するSMIP融合タンパク質のことを指す。「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。角括弧内の数字は、SMIP融合タンパク質の配列識別番号である。

【図21】図21は、MLRアッセイにおいて、応答物細胞を、様々なヒンジリンカーを含むBC3 IgG1-N297A SMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。

【図22】図22は、MLRアッセイにおいて、応答物細胞をモノクローナル抗体Cris7、キメラもしくはヒト化Cris7 SMIP融合タンパク質またはキメラBC3 SMIP融合タンパク質(配列番号80)で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「コントロールSMIP」とは、T細胞に結合しないscFv結合ドメインを有するSMIP融合タンパク質のことを指し、「応答物のみ」とは、応答物細胞だけが存在した反応のことを指す。角括弧内の数字は、SMIP融合タンパク質の配列識別番号である。

【図23】図23は、MLRアッセイにおいて、応答物細胞をヒト化Cris7 IgG1-N297、IgG2-AA-N297AおよびIgG4-AA-N297A、ならびにHM1-SMIP融合タンパク質またはキメラCris7 IgG1-N297AおよびHM1-SMIP融合タンパク質で処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「親mAb」とは、Cris7mAbのことを指し、「コントロールSMIP」とは、T細胞に結合しないscFv結合ドメインを有するSMIP融合タンパク質のことを指す。

【図24】図24は、PHAで刺激されたヒトT細胞をヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG1-N297Aまたはヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG1-N297A-SMIP融合タンパク質で処理した後の、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。「コントロールSMIP」は、T細胞に結合しないSMIP融合タンパク質である。

【図25A】図25Aおよび25Bは、PHAで刺激されたT細胞を様々なヒト化およびキメラCris7-SMIP融合タンパク質、BC3-SMIP融合タンパク質(配列番号80)、ならびに様々な抗体(BC3mAb、親Cris7mAbおよびNuviion-FL)で再刺激した24時間後(1日目)および72時間後(3日目)における血清中の(A)IFNおよび(B)IL-17の濃度を示している。角括弧内の数字は、SMIP融合タンパク質の配列識別番号である。

【図25B】図25Aおよび25Bは、PHAで刺激されたT細胞を様々なヒト化およびキメラCris7-SMIP融合タンパク質、BC3-SMIP融合タンパク質(配列番号80)、ならびに様々な抗体(BC3mAb、親Cris7mAbおよびNuviion-FL)で再刺激した24時間後(1日目)および72時間後(3日目)における血清中の(A)IFNおよび(B)IL-17の濃度を示している。角括弧内の数字は、SMIP融合タンパク質の配列識別番号である。

【図26A】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF-、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26B】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF-、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26C】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF-、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26D】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF-、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26E】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A-SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4

- AA - N297A SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26F】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26G】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図26H】図26A~26Hは、ヒト化Cris7(VH3-VL1)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質、ヒト化Cris7(VH3-VL2)IgG4-AA-N297A SMIP融合タンパク質またはCris7mAbで24時間(d1)、48時間(d2)または72時間(d3)処理された初期のPBMCにおける、(A)IFN、(B)IL-10、(C)IL-1B、(D)IL-17、(E)IL-4、(F)TNF、(G)IL-6および(H)IL-2のレベルを示している。

【図27】図27は、IgG2a mAb(411 μ g)、H57mAb(5 μ g)、H57 Null2 SMIP融合タンパク質(300 μ g)、H57 half null SMIP融合タンパク質(300 μ g)またはH57 HM2 SMIP融合タンパク質(300 μ g)を静脈内投与した後の経時的な体重の変化を示している。

【図28】図28は、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した2時間後の末梢血T細胞の濃度を示している。

【図29】図29は、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した72時間後の末梢T細胞の濃度を示している。

【図30A】図30A~30Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-2の濃度を示している。

【図30B】図30A~30Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-2の濃度を示している。

【図30C】図30A~30Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-2の濃度を示している。

【図31A】図31A~31Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-10の濃度を示している。

【図31B】図31A~31Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静

脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の IL - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 1 C】図 3 1 A ~ 3 1 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の IL - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 A】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 B】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 2 C】図 3 2 A ~ 3 2 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の I P - 1 0 の濃度を示している。

【図 3 3 A】図 3 3 A ~ 3 3 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の T N F の濃度を示している。

【図 3 3 B】図 3 3 A ~ 3 3 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の T N F の濃度を示している。

【図 3 3 C】図 3 3 A ~ 3 3 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の T N F の濃度を示している。

【図 3 4 A】図 3 4 A ~ 3 4 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の IL - 4 の濃度を示している。

【図 3 4 B】図 3 4 A ~ 3 4 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の IL - 4 の濃度を示している。

【図 3 4 C】図 3 4 A ~ 3 4 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の IL - 4 の濃度を示している。

【図 3 5 A】図 3 5 A ~ 3 5 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の M C P - 1 の濃度を示している。

【図 3 5 B】図 3 5 A ~ 3 5 C は、図 2 7 で投薬されたように I g G 2 a m A b、H 5 7 m A b、H 5 7 N u l l 2、H 5 7 h a l f n u l l または H 5 7 H M 2 を静脈内投与した (A) 2 時間後、(B) 2 4 時間後および (C) 7 2 時間後の血清中の M C P - 1 の濃度を示している。

【図35C】図35A～35Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

【図36A】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図36B】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図36C】図36A～36Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図37A】図37A～37Cは、IgG2a、H57 mAbおよびH57 Null2、half nullおよびHM2 SMIPを静脈内投与した2時間後(A)、24時間後(B)および72時間後(C)のIL-17の濃度を示している。

【図37B】図37A～37Cは、IgG2a、H57 mAbおよびH57 Null2、half nullおよびHM2 SMIPを静脈内投与した2時間後(A)、24時間後(B)および72時間後(C)のIL-17の濃度を示している。

【図37C】図37A～37Cは、IgG2a、H57 mAbおよびH57 Null2、half nullおよびHM2 SMIPを静脈内投与した2時間後(A)、24時間後(B)および72時間後(C)のIL-17の濃度を示している。

【図38A】図38A～38Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-5の濃度を示している。

【図38B】図38A～38Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-5の濃度を示している。

【図38C】図38A～38Cは、図27で投薬されたようにIgG2a mAb、H57 mAb、H57 Null2、H57 half nullまたはH57 HM2を静脈内投与した(A)2時間後、(B)24時間後および(C)72時間後の血清中のIL-5の濃度を示している。

【図39A】図39Aおよび39Bは、H57-HM2およびH57 half nullについての時間に対する平均血清濃度のグラフである。結果は、観察されたデータセットおよびWinNonLinTMソフトウェアによって計算された予測値として表されている。Rs q値およびRs q調整値は、HL__Lambda zの推定において使用された時点(6.6および40.7時間)の数値に対する調整の前および後の、末期排泄相(terminal elimination phase)についての適合度統計量である。

【図39B】図39Aおよび39Bは、H57-HM2およびH57 half nullについての時間に対する平均血清濃度のグラフである。結果は、観察されたデータセットおよびWinNonLinTMソフトウェアによって計算された予測値として表されている。Rs q値およびRs q調整値は、HL__Lambda zの推定において使用された時点(6.6および40.7時間)の数値に対する調整の前および後の、末期排泄相(terminal elimination phase)についての適合度統計量であ

る。

【図40】図40は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のG-CSFの濃度を示している。

【図41】図41は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIFN- γ の濃度を示している。

【図42】図42は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-2の濃度を示している。

【図43】図43は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-5の濃度を示している。

【図44】図44は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-6の濃度を示している。

【図45】図45は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-10の濃度を示している。

【図46】図46は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIL-17の濃度を示している。

【図47】図47は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のIP-10の濃度を示している。

【図48】図48は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のKCの濃度を示している。

【図49】図49は、H57-HM2またはH57 Null2（各200 μ g）を静脈内投与した15分後、2時間後、6時間後、24時間後および48時間後の血清中のMCP-1の濃度を示している。

【図50】図50は、応答物細胞をH57 Null2、H57 half null、H57-HM2、マウスIgG2a mAbまたはH57 mAbで処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージを示している。

【図51】図51は、応答物細胞をH57 Null2、H57 half null、H57-HM2またはH57 mAbで処理したことに起因する、活性化されたT細胞のパーセンテージ（（R+S）-無処理=100%に正規化されたパーセンテージ）を示している。

【図52】図52は、H57 Null2、H57 half null、H57-HM2、マウスIgG2a mAb、H57 mAbまたは2C11 mAbの処理によって活性化された、ConAで刺激されたT細胞のパーセンテージを示している。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 9 】

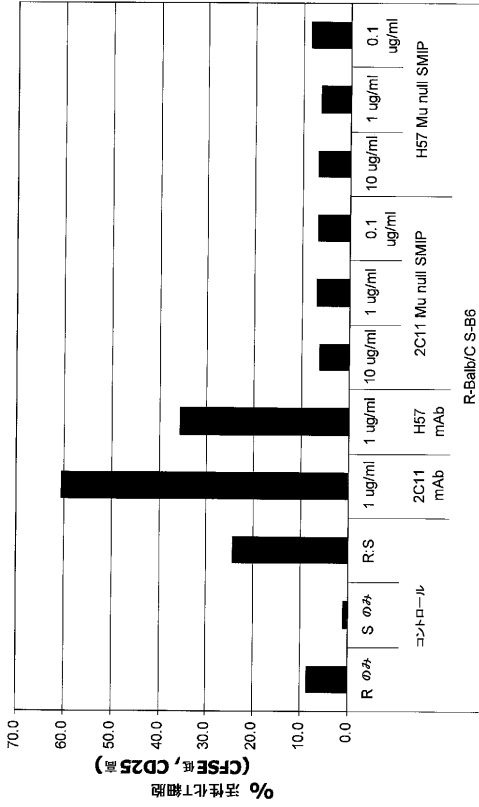


Fig. 9

【 図 10 】

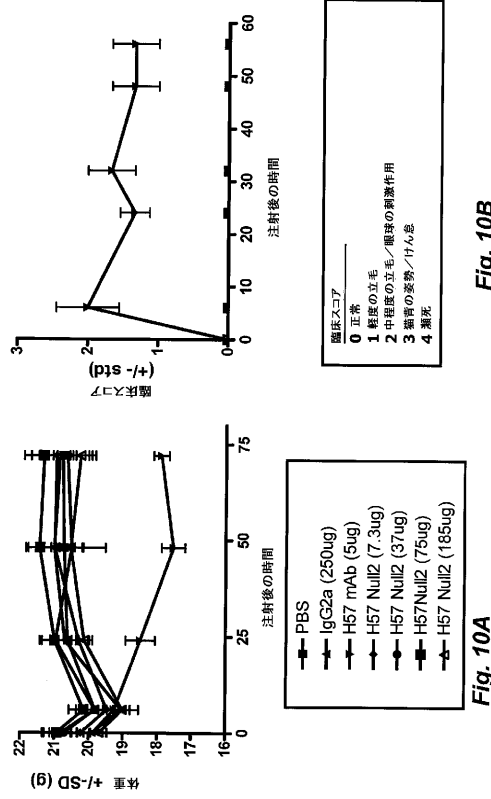


Fig. 10A

Fig. 10B

【 図 11 A 】

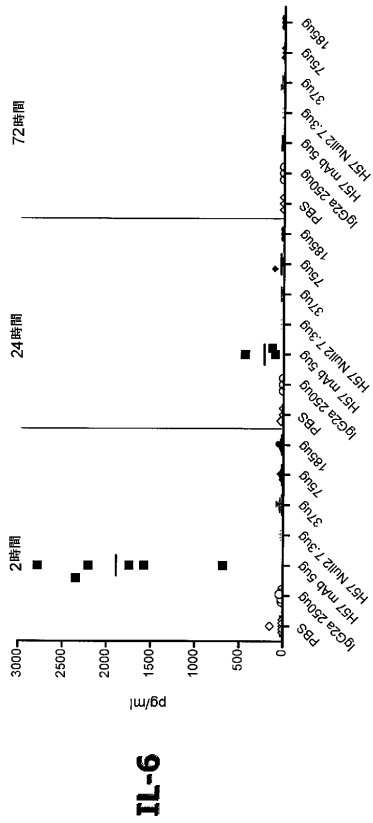


Fig. 11A

IL-6

【 図 11 B 】

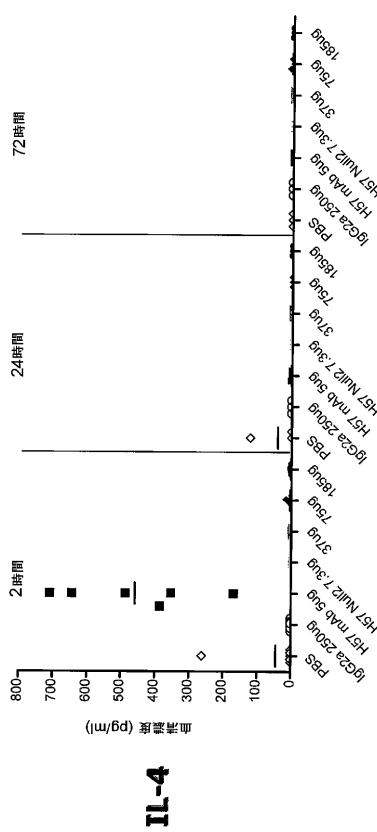


Fig. 11B

IL-4

【 図 1 2 】

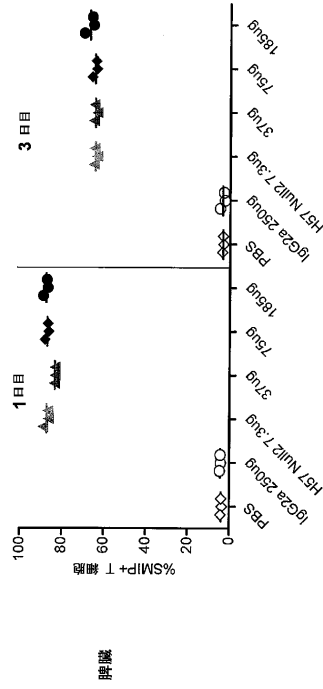


Fig. 12

【 図 1 3 】

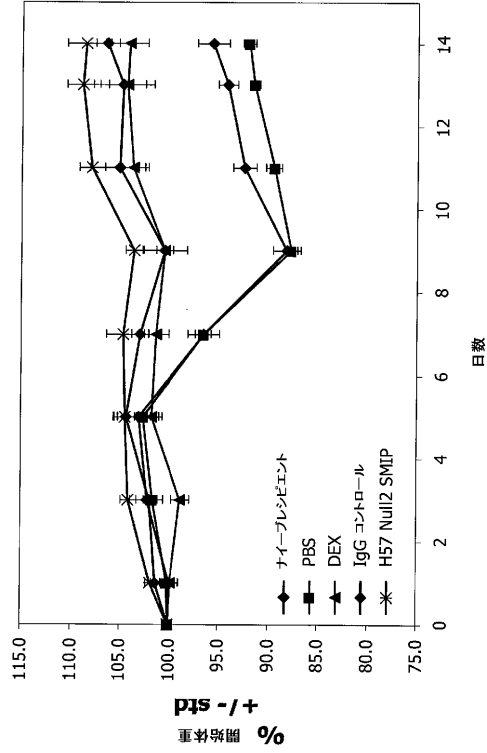


Fig. 13

【 図 1 4 】

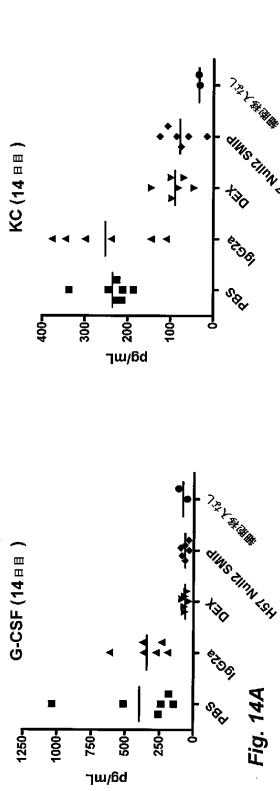


Fig. 14B

Fig. 14A

【 図 1 5 】

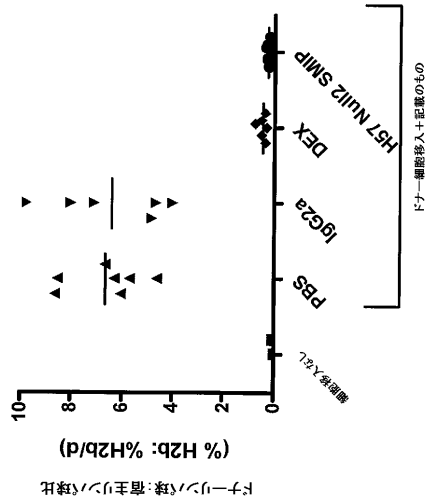
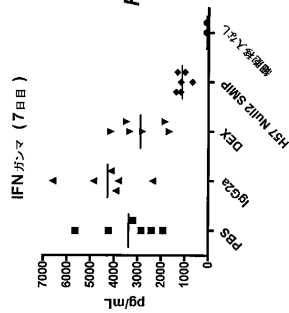


Fig. 15

Fig. 14C



【 16 】

231	A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T	レ	IgG1 CH2
231	A P P V A G - P S V F L F P P K P K D T	レ	IgG2 CH2
231	A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T	レ	IgG4 CH2
231	A P D L L G G P S V F I F P P K I K D V	マウス	IGHG2c CH2
251	L M I S R T P E V T C V V D V S H E D	レ	IgG1 CH2
251	L M I S R T P E V T C V V D V S H E D	レ	IgG2 CH2
251	L M I S R T P E V T C V V D V S O E D	レ	IgG4 CH2
251	L M I S L S P M V T C V V D V S E D D	マウス	IGHG2c CH2
271	P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K	レ	IgG1 CH2
271	P E V Q F N W Y V D G M E V H N A K T K	レ	IgG2 CH2
271	P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K	レ	IgG4 CH2
271	P D V Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q	マウス	IGHG2c CH2
291	P R E E Q Y S T Y R R V S V L T V L L H	レ	IgG1 CH2
291	P R E E Q F S T F R V V S V L T V V H	レ	IgG2 CH2
291	P R E E Q F S T Y R V V S V L T V L H	レ	IgG4 CH2
291	T H R E D Y S T L R V V S A L P I Q H	マウス	IGHG2c CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A	レ	IgG1 CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A	レ	IgG2 CH2
311	Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S	レ	IgG4 CH2
311	Q D W M S G K E F K C K V N N R A L P S	マウス	IGHG2c CH2
331	P I E K T I S K K A K	レ	IgG1 CH2
331	P I E K T I S K T K	レ	IgG2 CH2
331	P I E K T I S K K A K	レ	IgG4 CH2
331	P I E K T I S K P R	マウス	IGHG2c CH2

Fig. 16

【 17 】

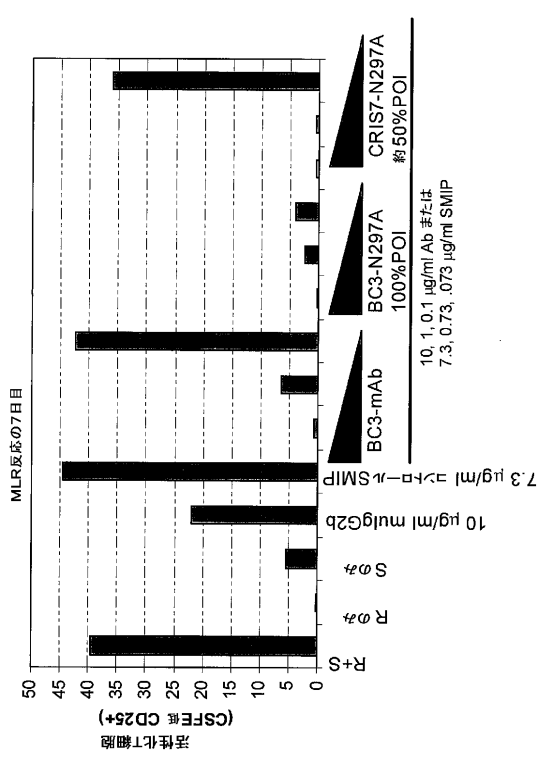


Fig. 17

【 18 】

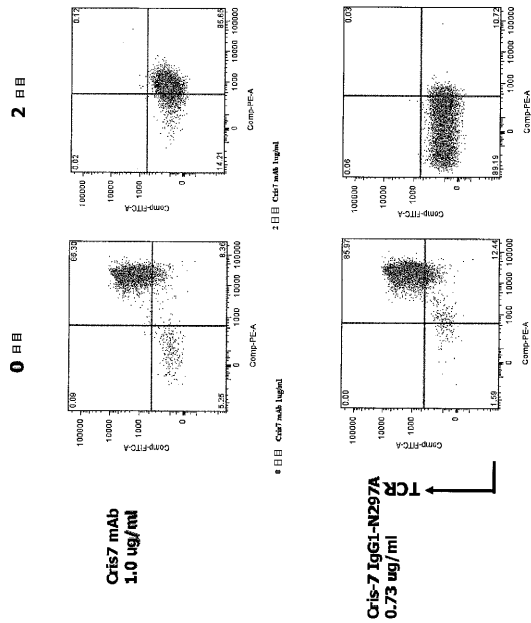


Fig. 18

【 19 】

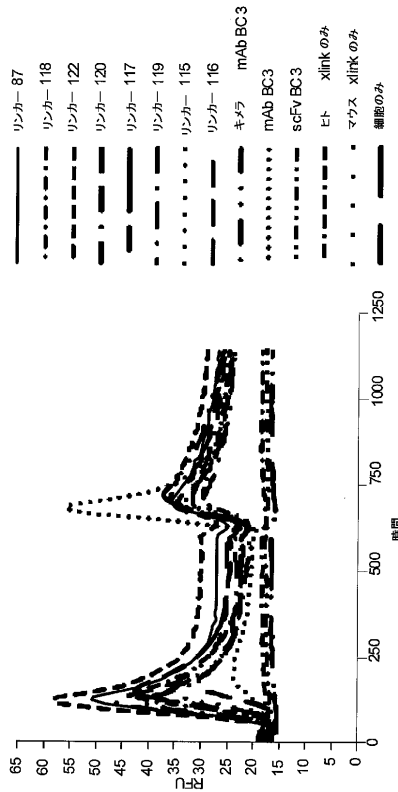
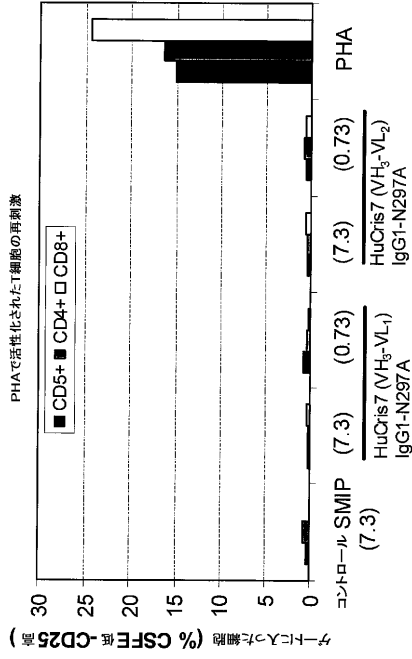


Fig. 19

【 図 2 4 】



サンプル Fig. 24

【 図 2 5 A 】

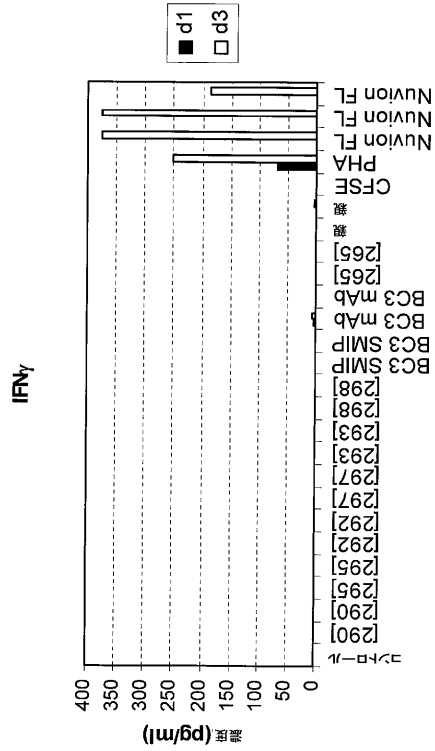


Fig. 25A

【 図 2 5 B 】

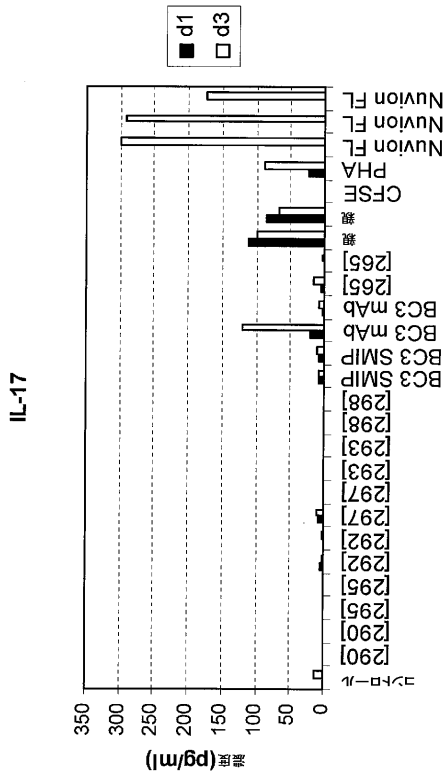


Fig. 25B

【 図 2 6 A 】

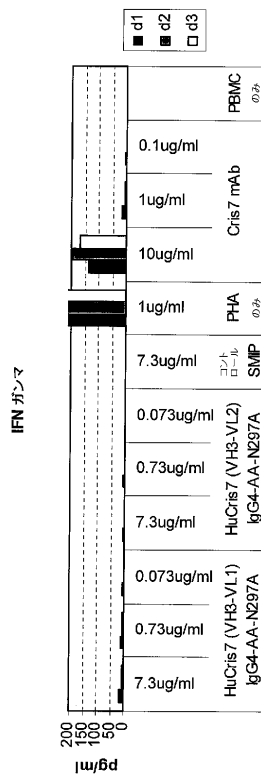


Fig. 26A

【 図 2 6 F 】

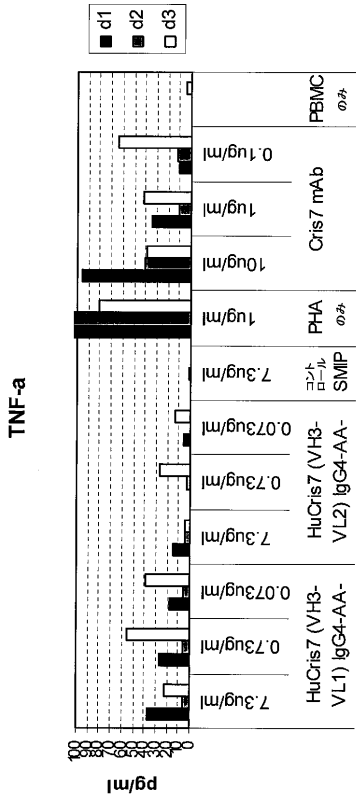


Fig. 26F

【 図 2 6 G 】

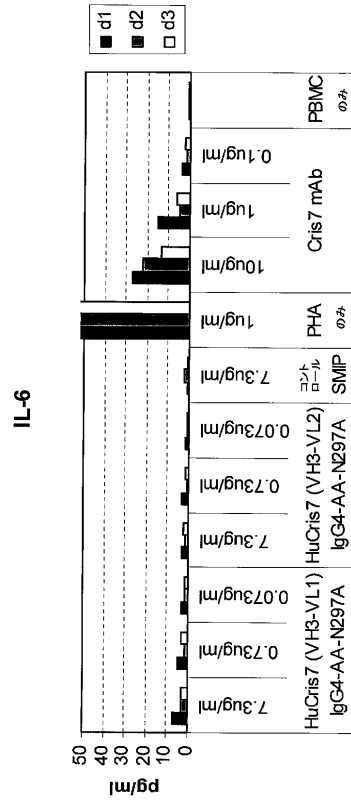


Fig. 26G

【 図 2 6 H 】

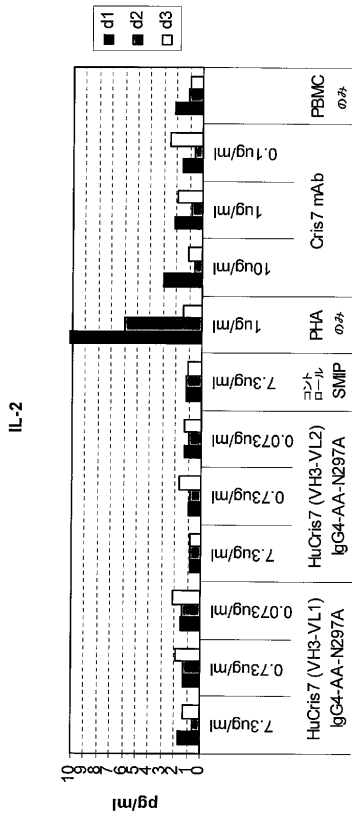


Fig. 26H

【 図 2 7 】

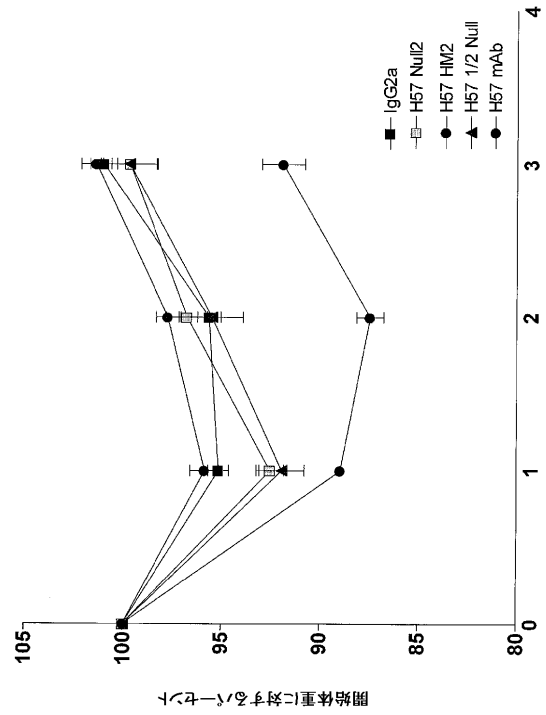


Fig. 27

【 図 2 8 】

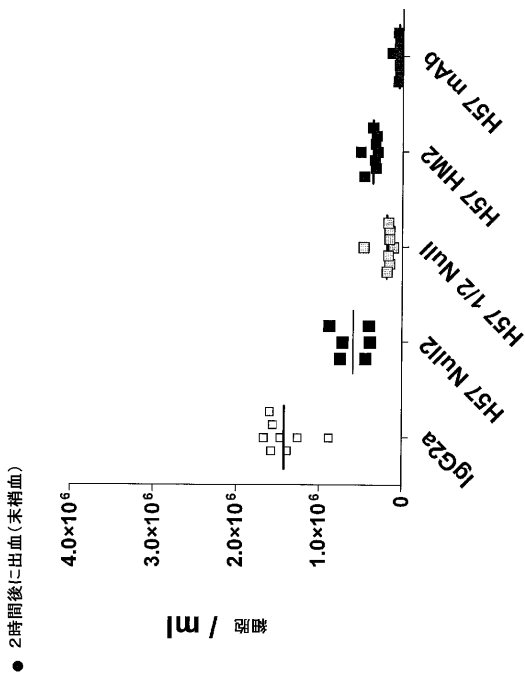


Fig. 28

【 図 2 9 】

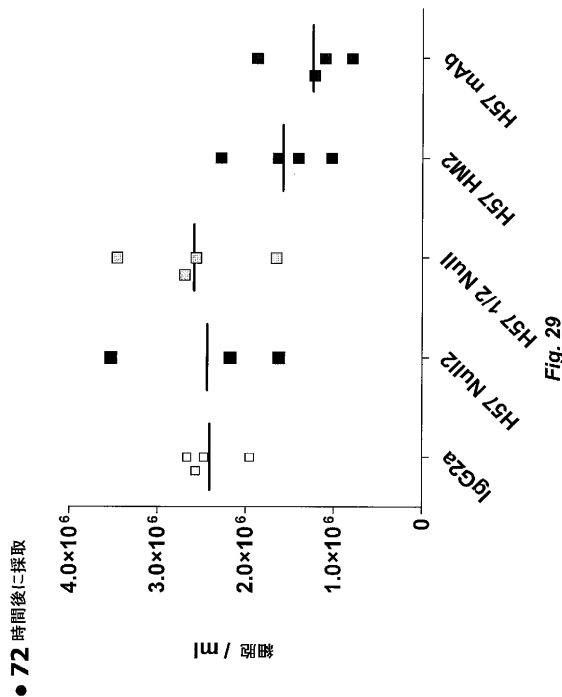
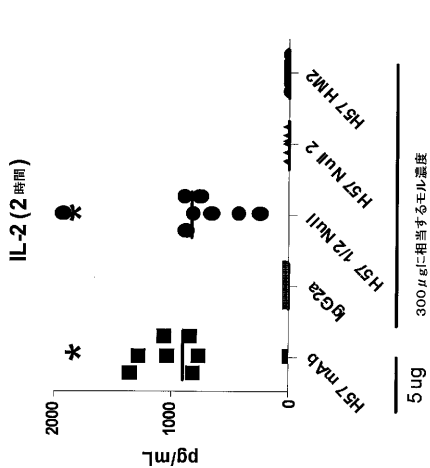


Fig. 29

【 図 3 0 A 】



* p < 0.05 対 IgG2a, H57 Null/2, H57 1/2 Null 以上の H57 HM2

Fig. 30A

【 図 3 0 B 】

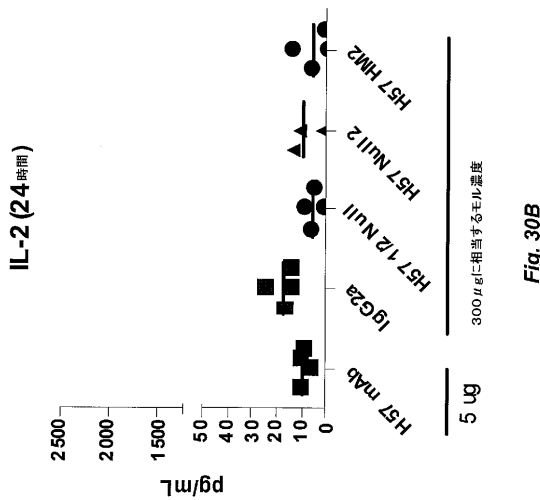


Fig. 30B

【 図 3 0 C 】

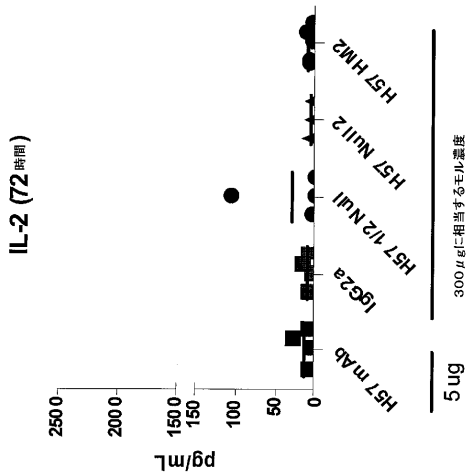
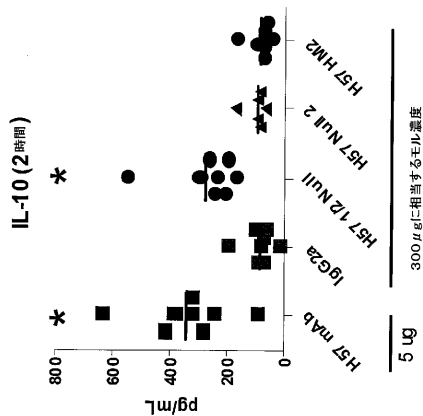


Fig. 30C

【 図 3 1 A 】



p < 0.05 対 IgG2a, H57 Null2, H57 1/2 Nullおよび H57 HM2

Fig. 31A

【 図 3 1 B 】

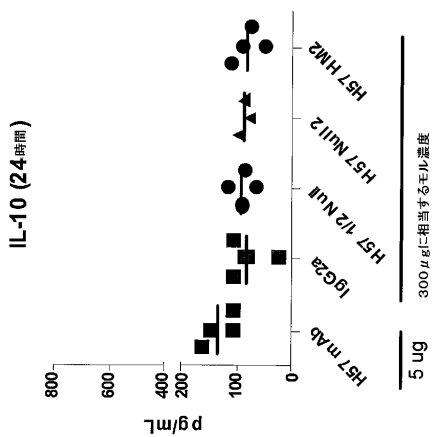


Fig. 31B

【 図 3 1 C 】

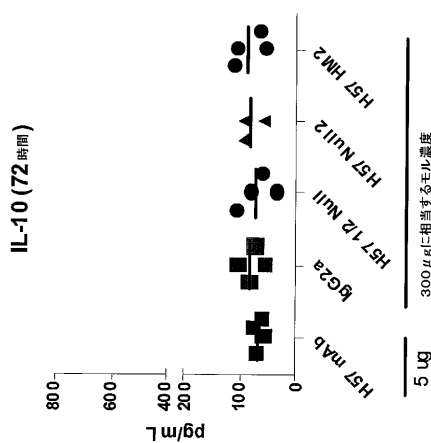
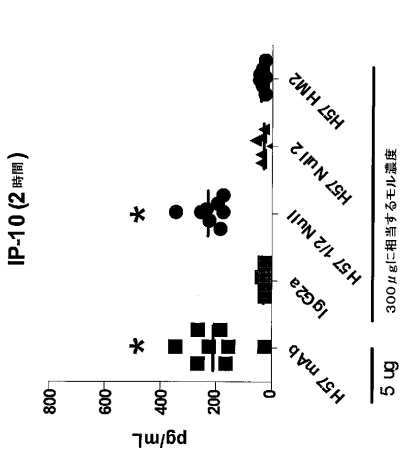


Fig. 31C

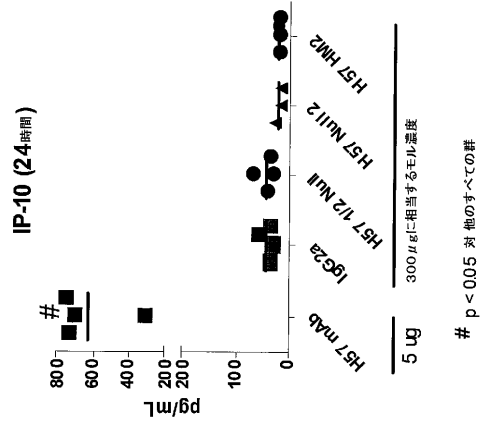
【 図 3 2 A 】



* p < 0.05 対 IgG2a, H57 Nu1/2, H57 1/2 Null および H57 HM2

Fig. 32A

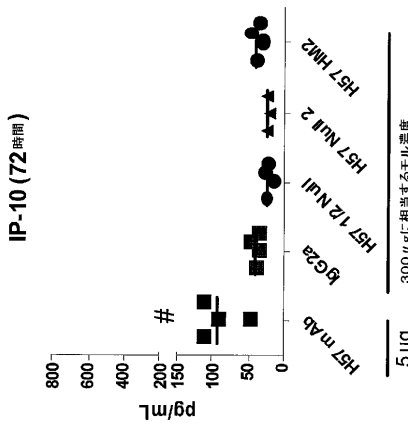
【 図 3 2 B 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 32B

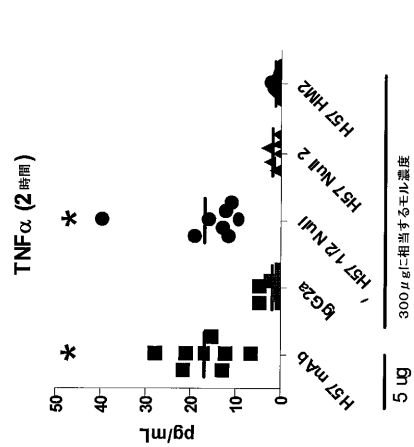
【 図 3 2 C 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 32C

【 図 3 3 A 】



* p < 0.05 対 IgG2a, H57 Nu1/2, H57 1/2 Null および H57 HM2

Fig. 33A

【 図 3 3 B 】

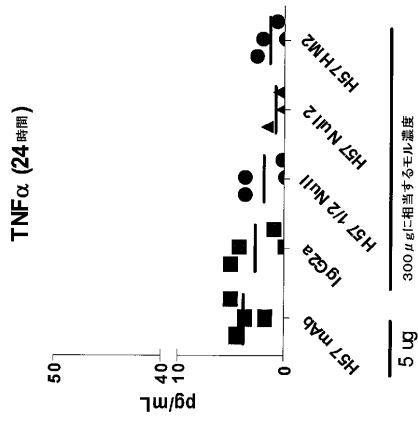


Fig. 33B

【 図 3 3 C 】

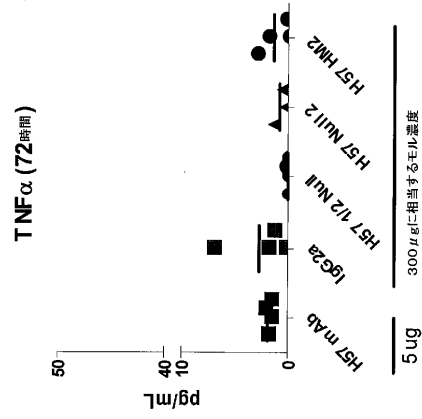
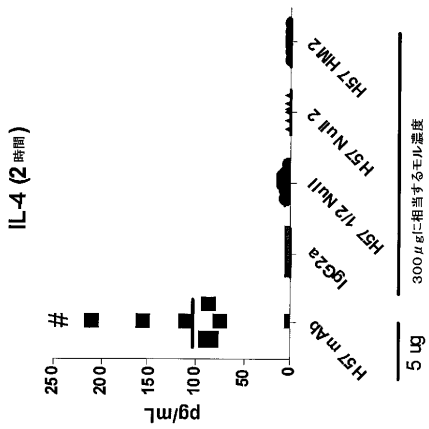


Fig. 33C

【 図 3 4 A 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 34A

【 図 3 4 B 】

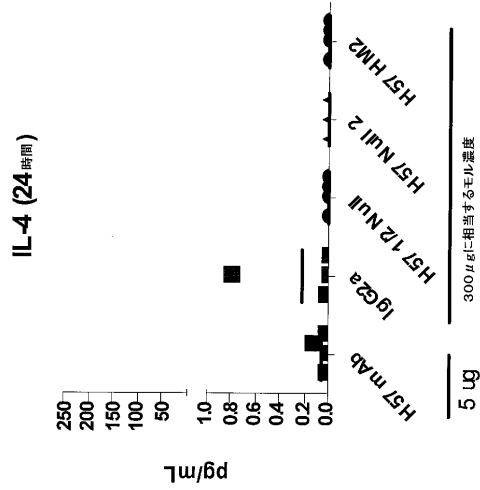


Fig. 34B

【 図 3 4 C 】

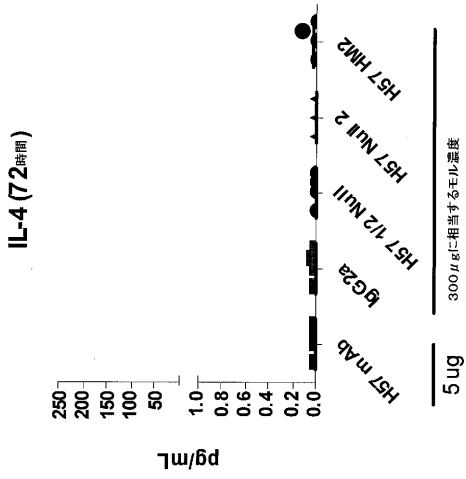


Fig. 34C

【 図 3 5 A 】

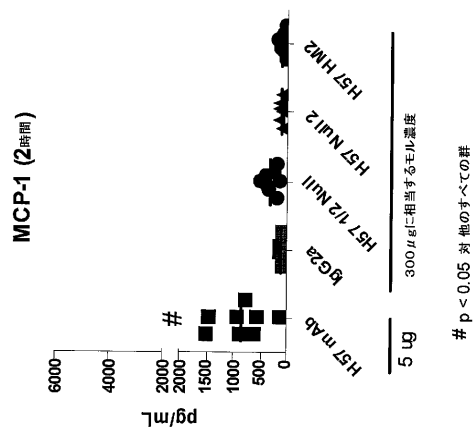


Fig. 35A

【 図 3 5 B 】

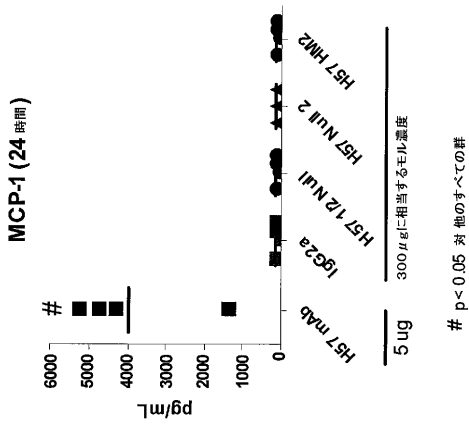


Fig. 35B

【 図 3 5 C 】

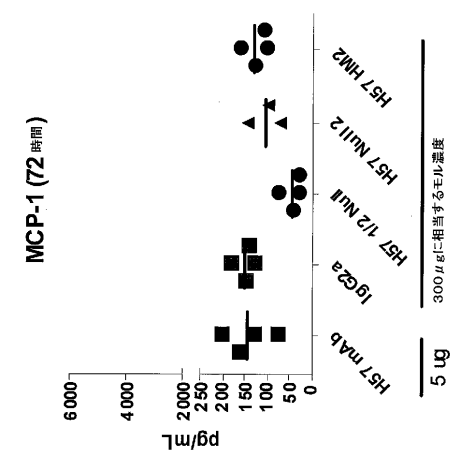


Fig. 35C

【 図 3 8 A 】

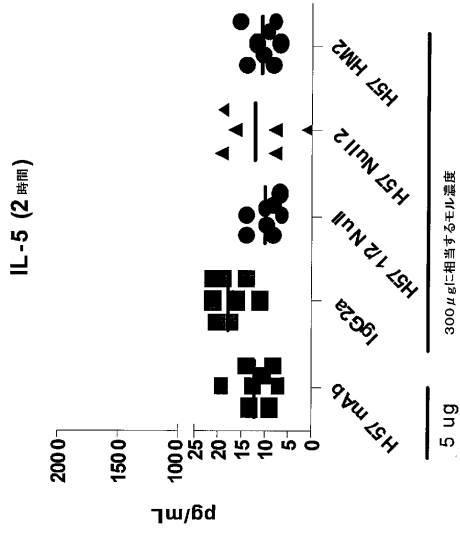
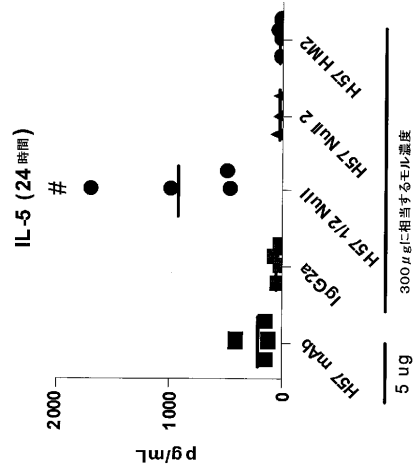


Fig. 38A

【 図 3 8 B 】



p < 0.05 対 他のすべての群

Fig. 38B

【 図 3 8 C 】

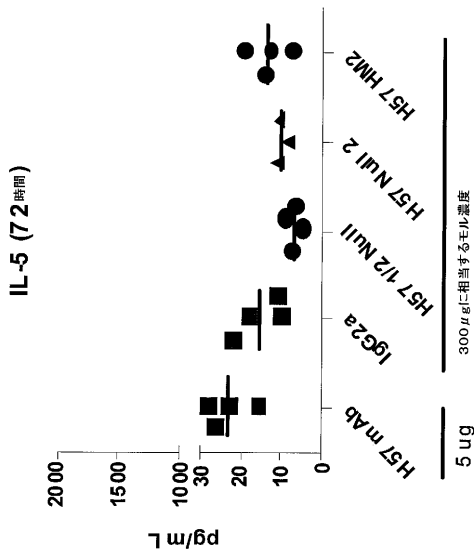


Fig. 38C

【 図 3 9 A 】

Tru.pc.0148, H57 HM2 サンプルのPK分析

Rsq=0.984 Rsc_誤差=0.988 HL_Lambda_z=6.6515 (時間)
(3点を計算に使用した)
均一の量の投与

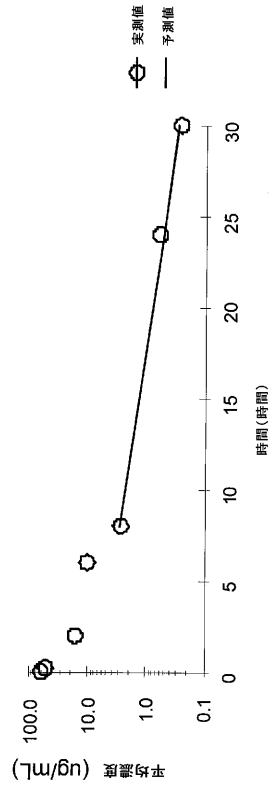


Fig. 39A

【 図 3 9 B 】

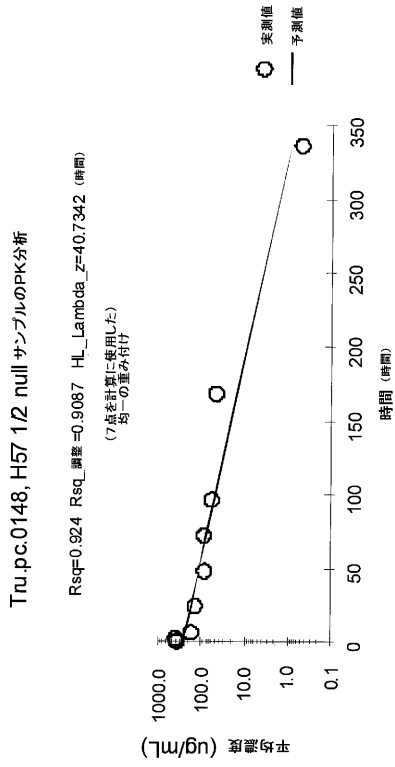


Fig. 39B

【 図 4 0 】

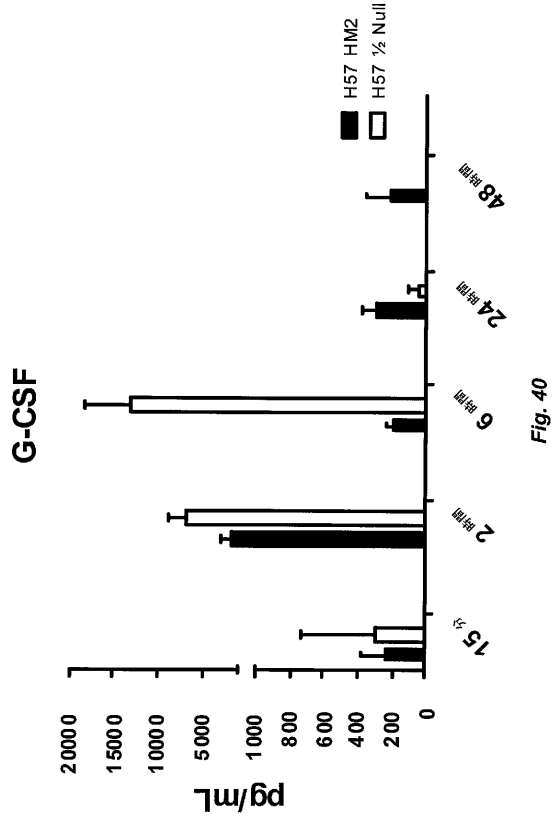


Fig. 40

【 図 4 1 】

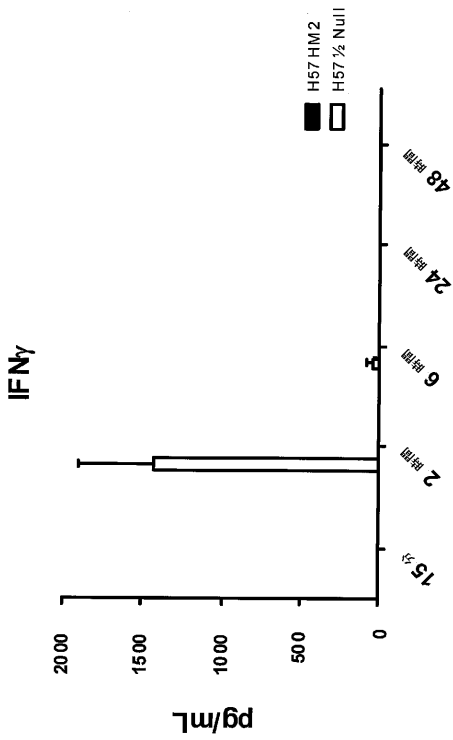


Fig. 41

【 図 4 2 】

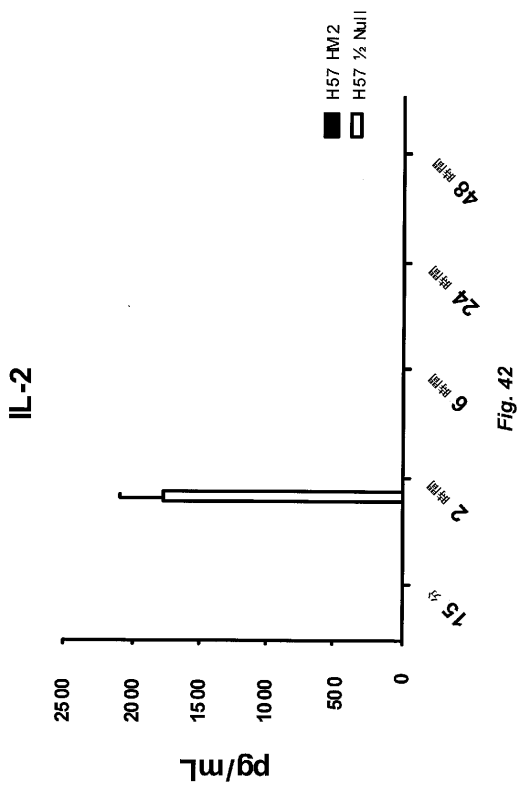
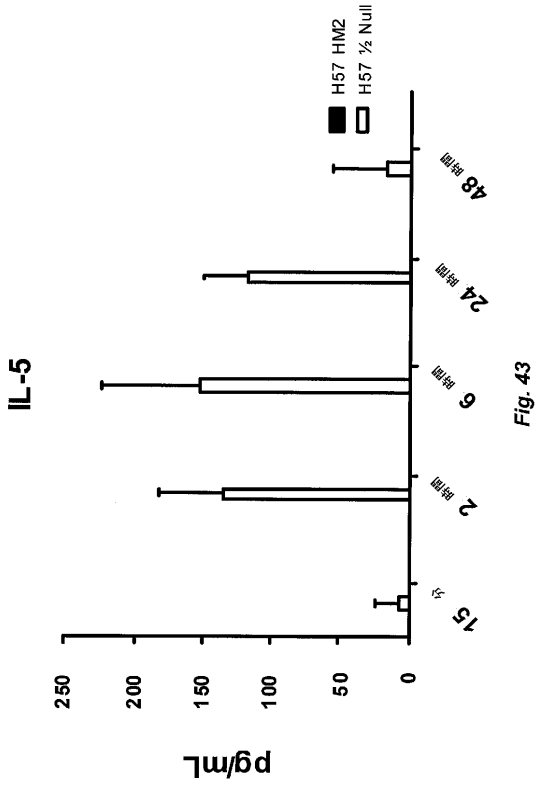
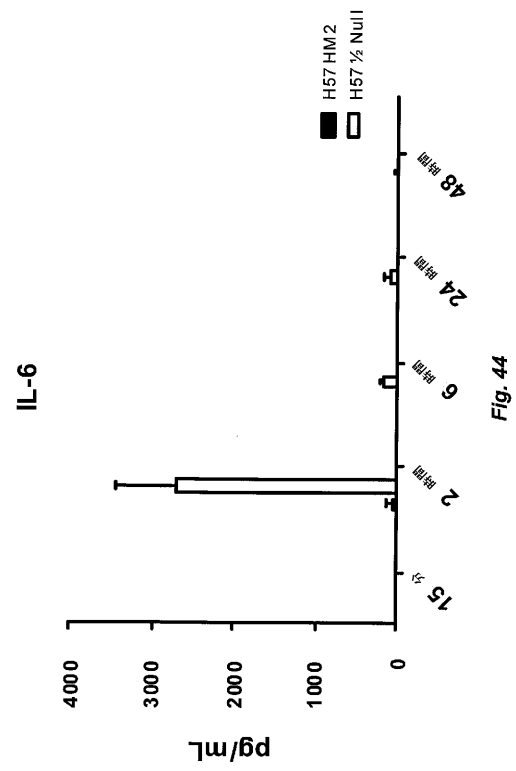


Fig. 42

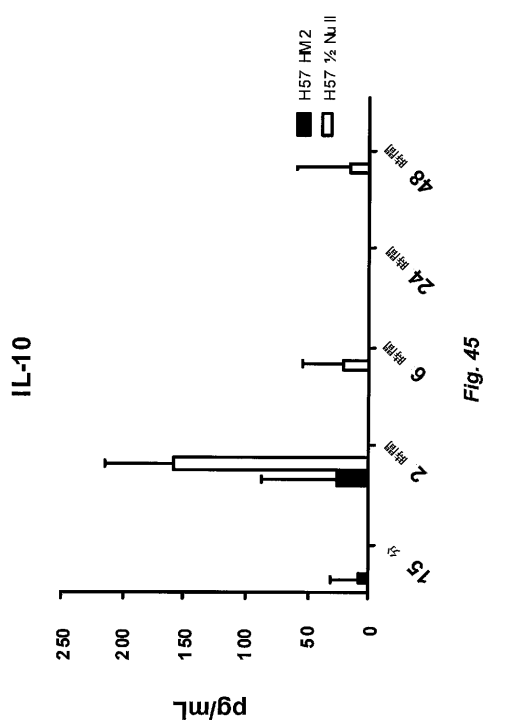
【 図 4 3 】



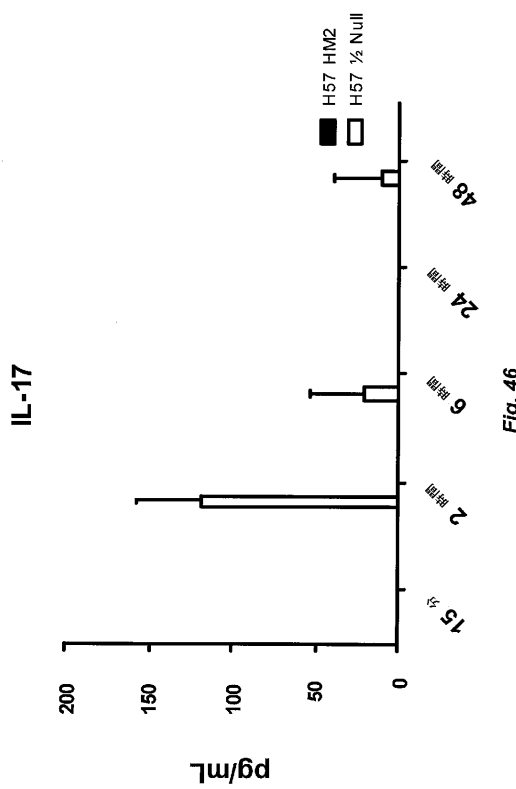
【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



【 図 4 6 】



【 5 1 】

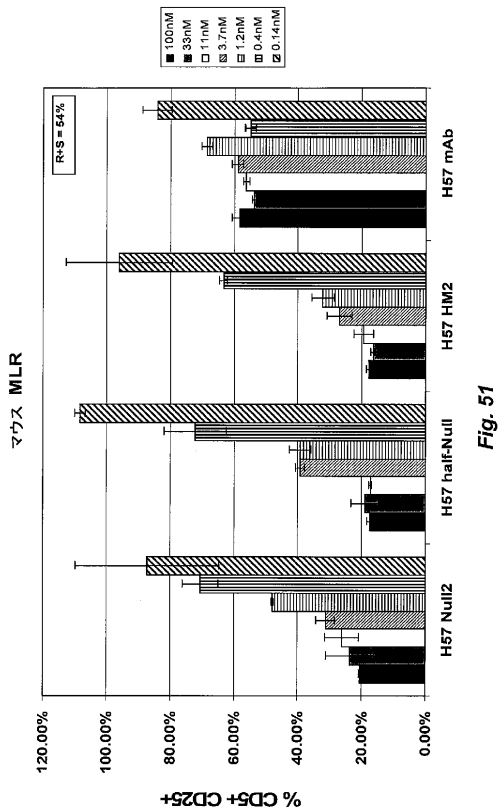


Fig. 51

【 5 2 】

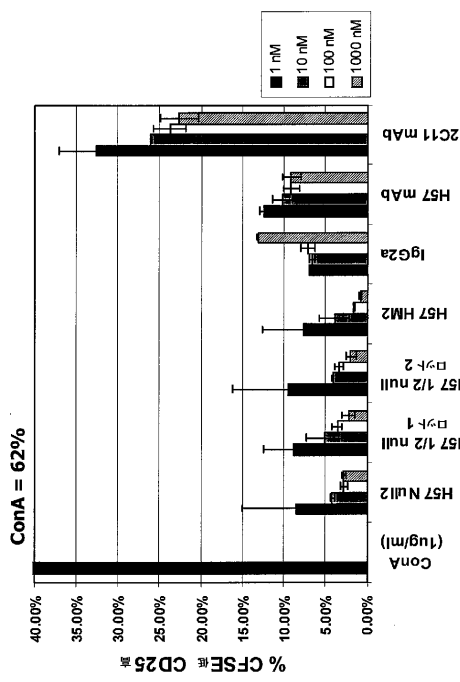


Fig. 52

【 3 6 A 】

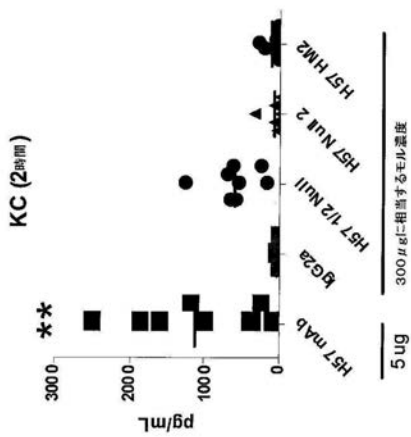


Fig. 36A

【 3 6 B 】

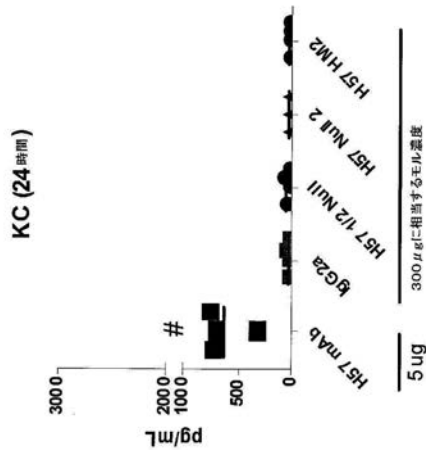


Fig. 36B

【 図 3 6 C 】

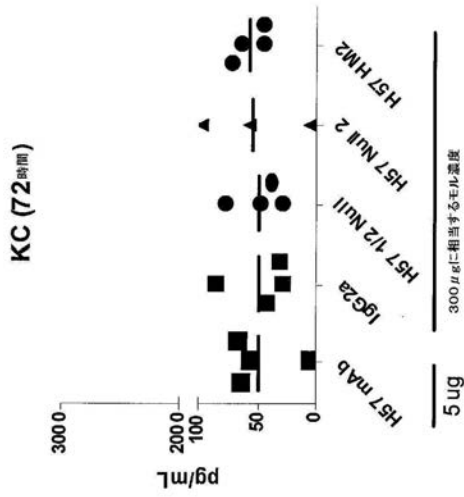


Fig. 36C

【 図 3 7 A 】

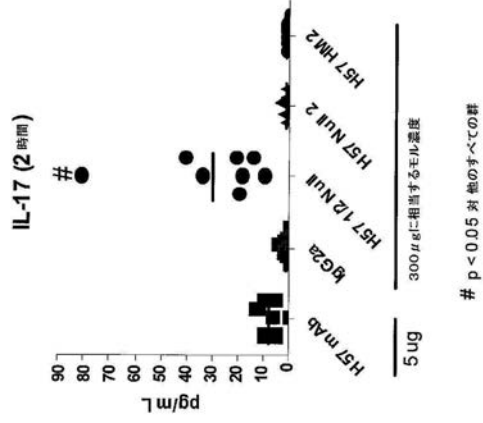


Fig. 37A

【 図 3 7 B 】

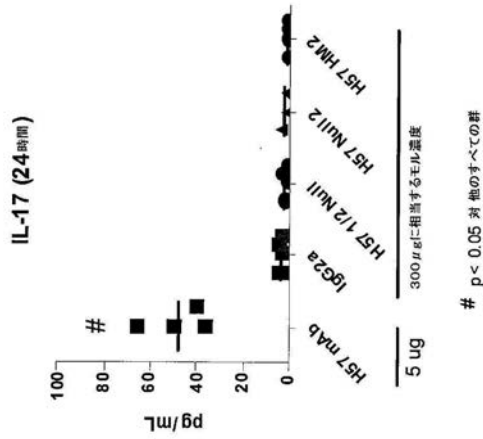


Fig. 37B

【 図 3 7 C 】

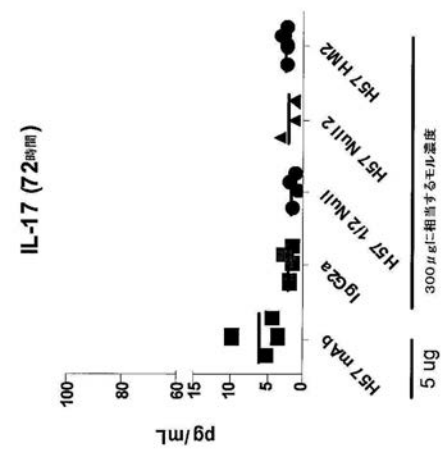


Fig. 37C

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
		G 0 1 N	33/53	K

- (72)発明者 キャサリン ジェイ. マクマハン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, エヌ.イー. 9 5 ティーエイチ ス
トリート 1 5 3 2
- (72)発明者 ピーター アール. バウム
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, 3 4 ティーエイチ アベニュー エヌ
.イー. 6 0 2 7
- (72)発明者 ピーター エー. トンプソン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 7 , ベルビュー, エヌ.イー. 3 0 ティーエイチ
プレイス 1 4 0 7 5
- (72)発明者 フィリップ タン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 3 7 , リンウッド, 5 3 アールディー プレイス ウエ
スト 1 7 4 0 9
- (72)発明者 ジョン ダブリュー. ブランケンシップ
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 7 , シアトル, 6 ティーエイチ アベニュー エヌ.
ダブリュー. 9 7 0 9
- (72)発明者 サティーシュ クマール ナタラジャン
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 5 2 , レッドモンド, 1 6 8 ティーエイチ コート エ
ヌ.イー. 4 6 2 7

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ79 QQ96 QR66 QR77 QS03 QS05 QS33 QS38
QS39 QX02
4C084 AA02 AA07 AA17 BA44 CA53 NA14 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662
ZA681 ZA682 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZC351 ZC352
4C085 AA33 BB36 DD62
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】

2016145244000001.pdf

专利名称(译)	tcr复合免疫疗法		
公开(公告)号	JP2016145244A	公开(公告)日	2016-08-12
申请号	JP2016080105	申请日	2016-04-13
申请(专利权)人(译)	新兴产品开发西雅图, LLC		
[标]发明人	バレリーオデガード キャサリンジェイマクマハン ピーターアールバウム ピーターエートンプソン フィリップタン ジョンドブリューブランケンシップ サティーシュクマールナタラジャン		
发明人	バレリー オデガード キャサリン ジェイ. マクマハン ピーター アール. バウム ピーター エー. トンプソン フィリップ タン ジョン ダブリュー. ブランケンシップ サティーシュ クマール ナタラジャン		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/28 C12N15/09 C12Q1/02 A61K38/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P37/02 A61P37/06 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/2809 C07K16/46 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/524 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2319/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/06 A61P19/02 A61K38/00 A61K39/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63		
FI分类号	C07K16/46 C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12Q1/02 A61K37/02 A61P1/04 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P37/02 A61P37/06 A61K39/00 G01N33/53.P G01N33/53.K A61K38/00 C12N15/12 C12N15/62.Z C12N15/63.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS33 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C085/AA33 4C085/BB36 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/104608 2008-10-10 US 61/148341 2009-01-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供：免疫活性的重组结合蛋白（特别是对TCR复合物或其组分特异的单链融合蛋白）；用于治疗自身免疫疾病和其他疾病或病症（例如移植排斥）的组合物和方法。解决方案：本发明提供：结合TCR复合物或其组分的融合蛋白；包含这种融合蛋白的组合物和单位剂型；多核苷酸和编码这种融合蛋白的表达载体；减少实体器官移植排斥或治疗自身免疫疾病的方法；和检测T细胞活化的方法。图示：无

	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IFNγ	IP2A	IP2A	IP2A	IL10A	
未培养	20.0	2.1	7.4	138.4	468.8	27.1	13.8	195.2	138.3	294.1	427.5
PAH	15.9pmL	22.9	7.7	53.6	228.6	148.4	50.4	41.9	458.7	467.2	376.6
OKT3+rhIL	10.9pmL	77.6	10.0	163.0	330.2	316.0	233.0	971.6	877.9	251.0	101.7
883+rhIL	10.9pmL	14.7	6.2	11.1	146.0	332.5	3.2	1.8	22.7	188.4	73.1
IL23	10.9pmL	46.7	3.5	15.4	382.0	380.1	38.7	31.4	201.9	198.8	352.0
	13.9pmL	44.5	1.5	6.2	167.8	401.8	0.7	0.7	341.9	170.5	273.1
OKT3+IL23A	13.9pmL	31.5	3.2	14.6	183.5	640.6	35.3	35.9	365.0	198.5	433.1
	10.9pmL	26.9	6.5	37.1	178.4	194.0	0.2	74.3	338.3	169.2	759.1
OKT3+IL23A	13.9pmL	41.4	0.8	5.0	212.4	913.1	6.6	142.3	282.9	293.3	111.4
	13.9pmL	19.9	0.3	3.7	147.2	282.2	5.8	0.3	373.2	177.4	145.3
OKT3+IL23A	10.9pmL	24.6	0.6	3.9	183.7	595.6	3.0	0.2	167.0	49.7	32.3
	13.9pmL	19.8	0.4	4.1	134.5	280.2	4.0	1.5	44.8	195.2	101.6
OKT3+IL23A	13.9pmL	19.9	0.4	3.2	170.0	270.9	5.7	3.2	426.9	191.3	143.1
	10.9pmL	17.9	0.7	2.0	168.4	316.3	11.4	6.9	167.0	157.7	262.1
OKT3+IL23A	13.9pmL	20.3	0.3	2.6	182.4	355.0	4.7	2.1	49.4	192.2	76.3
	13.9pmL	17.6	0.4	1.6	163.2	249.6	6.2	4.9	163.3	128.2	217.9
OKT3+IL23A	13.9pmL	24.5	0.4	3.0	140.7	284.7	3.2	5.9	163.7	130.3	167.1
	13.9pmL	9.2	0.2	3.2	88.1	166.8	1.3	0.8	42.4	112.9	34.3
OKT3+IL11	13.9pmL	13.7	0.2	1.1	104.2	233.8	1.6	0.8	111.1	396.7	47.2
	10.9pmL	17.3	0.6	0.3	174.4	274.3	8.2	2.4	149.1	176.2	107.4
Wnt1+IL	10.9pmL	12.9	7.9	63.0	214.0	212.3	16.9	92.6	245.9	172.0	972.5
	1.9pmL	16.7	10.0	57.1	198.8	278.4	70.1	107.6	245.6	179.6	1071.6
	1.9pmL	19.8	7.6	43.8	220.3	276.4	73.5	60.1	274.9	170.0	1088.1
OKT3+IL23A	1.9pmL	38.2	44.4	203.3	292.3	32.7	116.4	374.7	239.6	720.8	1791.7
	1.9pmL	32.3	6.8	43.2	238.7	198.5	82.7	102.6	362.7	212.1	841.2
	1.9pmL	28.0	7.3	32.0	271.0	158.1	74.0	68.4	282.0	61.8	1632.5