

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-537515

(P2022-537515A)

(43)公表日 令和4年8月26日(2022.8.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z 4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-573591(P2021-573591)	(71)出願人	521530174
(86)(22)出願日	令和2年6月10日(2020.6.10)		アポロミクス インコーポレイテッド (
(85)翻訳文提出日	令和4年2月10日(2022.2.10)		ハンジョウ)
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/095354		中華人民共和国 3 1 1 2 0 0 チョウチ
(87)国際公開番号	WO2020/249003		ャン, ハンジョウ, シャオシャン ディ
(87)国際公開日	令和2年12月17日(2020.12.17)		ストリクト, エアポート エコノミック
(31)優先権主張番号	PCT/CN2019/090494		ゾーン, ウェスト オブ ボンデッド ア
(32)優先日	令和1年6月10日(2019.6.10)		ヴェニュー, ボンデッド ビルディング
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100149076
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 梅田 慎介
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(74)代理人	100119183
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 松任谷 優子
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100173185
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 森田 裕
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体－インターロイキン融合タンパク質および使用方法

(57)【要約】

抗体または抗原結合性断片と、抗体または抗原結合性断片に作動可能に連結したインターロイキン分子とを含むタンパク質が提供される。抗体または抗原結合性断片は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する。インターロイキン分子は、I L - 1 0である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片であって、

(1) 重鎖可変ドメイン、および

(2) 軽鎖可変ドメイン

を含む抗体または抗原結合性断片と、

(b) 抗体または抗原結合性断片に作動可能に連結されたインターロイキン-10 (IL-10) 分子と

を含むタンパク質。

10

【請求項 2】

免疫チェックポイントタンパク質が、PD-1 または PD-L1 である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

抗体が、Fc 領域を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

抗原結合性断片が、F(ab')₂ 断片または単鎖可変断片 (scFv) である、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

抗体または抗原結合性断片が、(1) 重鎖可変ドメインを含む重鎖と、(2) 軽鎖可変ドメインを含む軽鎖とを含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

20

【請求項 6】

IL-10 分子が、重鎖に連結されている、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

IL-10 分子が、重鎖の C 末端に連結されている、請求項 6 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

IL-10 分子が、軽鎖に連結されている、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 9】

IL-10 分子が、軽鎖の C 末端に連結されている、請求項 8 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

抗体またはその抗原結合性断片とインターロイキン分子とを連結するリンカーをさらに含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

30

【請求項 11】

リンカーが、アミノ酸配列 (GGGGS)_n (n = 2 ~ 5) を含む、請求項 10 に記載のタンパク質。

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、タンパク質を発現可能なベクター。

40

【請求項 14】

請求項 13 に記載のベクターを含む、タンパク質を産生するのに適した組換え宿主細胞。

【請求項 15】

哺乳動物細胞株である、請求項 14 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 16】

CHO 細胞株である、請求項 15 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 17】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のタンパク質と、薬学的に許容される担体とを

50

含む医薬組成物。

【請求項 18】

それを必要とする対象において疾患を処置するための方法であって、対象に治療的な量の請求項 17 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 19】

疾患が腫瘍である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

腫瘍が、肺がん、黒色腫、腎がん、肝臓がん、骨髄腫、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、血液がん、白血病および非ホジキンリンパ腫からなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

疾患が免疫関連障害である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

免疫関連障害が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシス、移植片対宿主病 (GVHD)、全身性エリテマトーデス、白斑、慢性予防的急性移植片対宿主病 (pGVHD)、HIV 誘導性血管炎、円形脱毛症、全身性硬化症 モルフェア および原発性抗リン脂質症候群からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 6 月 10 日に出願された PCT/CN2019/090494 の優先権を主張し、その開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、全体的に、生物学、治療学および診断学の分野に関する。特に、本開示は、抗体-インターロイキン融合タンパク質およびその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

がん処置は、根底にある生物学的プロセスの理解が増大するにつれて近年大きな進歩を遂げた。例えば、患者自身の免疫系が腫瘍と闘うことを誘導する免疫療法の開発は、がん関連の遺伝的な変更によって発現される腫瘍抗原に対する免疫寛容を促進する機序の重要性を浮き彫りにする。PD-1、PD-L1 または CTLA4 に対するモノクローナル抗体によって代表されるこれらの免疫チェックポイント阻害剤は、ますます幅広い種類のがんを有する一部の患者に、顕著な持続的反応をもたらした。しかし、現在の免疫療法、例えば、PD-1 または PD-L1 遮断は、がん患者において限定的な応答しか示さず（例えば、P Sharma and J P Allison, Cell (2015) 161:205-214 を参照されたい）、化学療法抵抗性は、依然としてがん療法における最も差し迫った主要なジレンマの 1 つである。したがって、腫瘍免疫寛容および化学療法抵抗性に対処するために免疫系を調節し、腫瘍免疫抑制効果を排除する新規組成物および方法を開発する継続的な必要性がある。

【発明の概要】

【0004】

一態様では、本開示は、融合タンパク質を提供する。一実施形態では、タンパク質は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む抗体または抗原結合性断片と、抗体または抗原結合性断片に作動可能に連結されたインターロイキン分子とを含む。

【0005】

ある特定の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質は、A2AR、B7.1、B7.2、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、

10

20

30

40

50

B T L A、C D 4 8、C D 1 2 0 b、C D 1 6 0、C D 2 4 4、C T L A-4、I C O S、L A G-3、L I L R B 1、L I L R B 2、L I L R B 4、O X 4 0、P D-1、P D-L 1、P D-L 2、S I R P a l p h a (C D 4 7)、T I G I T、T I M-3、T I M-1、T I M-4 および V I S T A からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントは、P D-1 または P D-L 1 である。

【0006】

ある特定の実施形態では、抗体は、F c 領域を含む。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片は、F (a b ') 2 断片である。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片は、単鎖可変断片 (s c F v) である。

【0007】

ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、I L-1、I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-I L-9、I L-10、I L-11、I L-12、I L-13、I L-14、I L-15、I L-16、I L-17、I L-18、I L-19、I L 20、I L-21、I L-22、I L-23、I L-24、I L-25、I L-26、I L-27、I L-28、I L-29、I L-30、I L-31、I L-32、I L-33、I L-35 および I L-36 からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、I L-10 である。

【0008】

ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、重鎖可変ドメインに連結されている。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、重鎖可変ドメインの N 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、重鎖可変ドメインの C 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、軽鎖可変ドメインに連結されている。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、軽鎖可変ドメインの N 末端に連結されている。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、軽鎖可変ドメインの C 末端に連結されている。

【0009】

ある特定の実施形態では、記載されるタンパク質は、抗体またはその抗原結合性断片とインターロイキン分子とを連結するリンカーをさらに含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 (G G G G S) n (n = 2 ~ 5) を含む。

【0010】

別の態様では、本開示は、本明細書において記載されるタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

別の態様では、本開示は、本明細書において記載される単離されたポリヌクレオチドを含むタンパク質を発現可能なベクターを提供する。

【0012】

別の態様では、本開示は、本明細書において記載されるベクターを含む、タンパク質を産生するのに適した組換え宿主細胞を提供する。ある特定の実施形態では、組換え宿主細胞は、哺乳動物細胞株である。ある特定の実施形態では、哺乳動物細胞株は、C H O 細胞株である。

【0013】

別の態様では、本開示は、本明細書において記載されるタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0014】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象において疾患を処置するための方法であって、対象に治療的な量の本明細書において記載される医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、疾患は腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、肺がん、黒色腫、腎がん、肝臓がん、骨髄腫、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、血液がん、白血病および非ホジキンリンパ腫からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0015】

ある特定の実施形態では、疾患は、免疫関連障害である。ある特定の実施形態では、免疫関連障害は、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシス、移植片対宿主病（GVHD）、全身性エリテマトーデス（System Lupus Erythematosus）、白斑、慢性予防的急性移植片対宿主病（chronic prophylactic acute graft versus host disease）（pGVHD）、HIV誘導性血管炎、円形脱毛症、全身性硬化症 モルフェア（Systemic sclerosis morphea）および原発性抗リン脂質症候群からなる群から選択される。

【0016】

単語「1つの〔a〕」または「1つの〔an〕」の使用は、特許請求の範囲および／または明細書において「含む〔comprising〕」という用語とともに使用される場合、「1つの〔one〕」を意味する場合があるが、「1つまたは複数の〔one or more〕」、「少なくとも1つの〔at least one〕」および「1つまたは1つより多い〔one or more than one〕」の意味とも一致する。

【0017】

本明細書において記載される任意の方法または組成物は、本明細書において記載される任意の他の方法または組成物に関して実行できるということが企図される。本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかし、本開示の趣旨および範囲内の種々の変法および改変は、この詳細な説明から当業者に明らかとなるので、詳細な説明および具体例は、本発明の特定の実施形態を示しながら単に例示として与えられるということは理解されなければならない。

【0018】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本開示は、これらの図面のうち1つまたは複数を本明細書において提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することによってより良好に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図2】図2は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図3】図3は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図4】図4は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図5】図5は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図6】図6は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図7】図7は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図8】図8は、本発明の融合タンパク質の例示的实施形態を例示する図である。

【図9】図9（AおよびB）は、抗PD-1（7A4D）、抗PD-L1（5G11）モノクローナル抗体および由来する抗体-I L-10融合タンパク質によって誘発された混合リンパ球反応（MLR）におけるサイトカイン産生の誘導を例示する図である。LC、Ig軽鎖C末端で連結されたIL-10；HC、Ig重鎖C末端で連結されたIL-10。

【図10】図10は、抗PD-1（7A4D）および抗PD-L1（5G11）モノクローナル抗体をベースとする抗体-I L-10融合タンパク質によって誘発されたMC/9細胞増殖を例示する図である。

【図11】図11は、抗PD-L1（10F.9G2）抗体および抗PD-L1（10F.9G2）抗体-HC-mIL-10融合タンパク質のPD-L1発現性マウス腫瘍細胞への結合の特性決定を例示する図である。マウス腫瘍細胞株A20およびCT26は、それぞれ、極めて高いおよび低いレベルで表面上にPD-L1を発現する。抗PD-L1（10F.9G2）抗体および抗PD-L1（10F.9G2）抗体-HC-mIL-10

10

20

30

40

50

融合タンパク質は各々、R-フィコエリトリンコンジュゲーションキット (Abcam) を使用してPEで標識した。染色の前に、A20およびCT26細胞を、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウスBD Fc Block (BD Biosciences) を用いて 4°C で5分間処理した。明記されたような種々の量のPE標識タンパク質を使用して、 $100\mu\text{L}$ の総容量で処理された細胞を染色した。染色された細胞をLSRFortessa X-20フローサイトメーターで分析した。左および右パネルは、それぞれCT26およびA20細胞から得たデータを示す。

【図12】図12は、同系CT26マウス腫瘍モデルに対する抗PD-L1抗体-HC-mIL-10融合タンパク質の効果を例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本開示をより詳細に説明する前に、本開示は、記載される特定の実施形態に制限されず、そのようなものとして、当然、変わり得るということは理解されるべきである。また、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるので、本明細書において使用される技術用語は、単に特定の実施形態を説明する目的のものであって、制限であるとは意図されないということも理解されるべきである。

【0021】

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書において記載されるものと同様または同等の任意の方法および材料も本開示の実施または試験において使用できるが、好ましい方法および材料をここで記載する。

【0022】

本明細書において引用されたすべての刊行物および特許は、各個々の刊行物または特許が、参照により組み込まれることが具体的に、個々に示されるかのように参照により本明細書に組み込まれ、刊行物が引用されることに関連する方法および／または材料を開示および説明するために参照によって本明細書に組み込まれる。任意の刊行物の引用は、出願日の前のその開示のためであり、本開示が事前の開示によりこのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものと解釈されてはならない。さらに、提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、これは独立して確認する必要がある。

【0023】

本開示を読むと当業者には明らかとなろうが、本明細書において記載され、例示される個々の実施形態の各々は、本開示の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴と容易にわけることができる、または組み合わせることができる別個の構成成分および特徴を有する。任意の列挙された方法を、列挙された事象の順序で、または論理的に可能な任意の他の順序で実施できる。

【0024】

I. 定義

前記の全体的な説明および以下の詳細な説明の両方が、単に例示的および説明的なものであって、特許請求される本発明を制限するものではないということは理解されるべきである。本出願では、単数形の使用は、別に明記されない限り、複数形を含む。本開示では、「または」という用語は、代替物のみを指すように明確に示されない限り、または代替物が相互に排他的ではない限り、「および／または」を意味するように使用される。本明細書において、「別の」は、少なくとも第2のものまたはそれより多くを意味する場合がある。さらに、「含む〔including〕」という用語ならびに「含む〔includes〕」および「含まれる〔included〕」などの他の形態の使用は、限定的ではない。また、別に明記されない限り、「要素」または「構成成分」などの用語は、1つのユニットを含む要素および構成成分ならびに1つより多いサブユニットを含む要素および構成成分を包含する。また、「部分」という用語の使用は、部分の一部を含む場合も、部分全体を含む場合もある。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書において、単数形「1つの〔a〕」、「1つの〔an〕」および「その〔the〕」は、文脈が明確に別に示さない限り、複数への言及を含む。

【0026】

本明細書において、「投与すること〔administering〕」という用語は、医薬品または組成物を対象に提供することを意味し、それだけには限らないが、医療従事者による投与および自己投与を含む。

【0027】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価抗体、二価抗体、一価抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体ならびに特異的抗原に結合するそれらの抗原結合性断片を含む。天然の無傷の抗体は、2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む。哺乳動物重鎖は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューとして分類され、各重鎖は、可変ドメイン（V_H）と、第1、第2および第3の定常ドメイン（それぞれ、C_H1、C_H2、C_H3）を含む定常領域とからなり、哺乳動物軽鎖は、λまたはκとして分類され、各軽鎖は、可変ドメイン（V_L）と定常ドメイン（C_L）とからなる。抗体は、「Y」型を有し、Yのステムは、ジスルフィド結合によって一緒に結合された2つの重鎖の第2および第3の定常ドメインからなる。Yの各アームは、単一軽鎖の可変および定常ドメインに結合された、単一重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメインを含む。軽鎖および重鎖の可変ドメインは、抗原結合に関与している。重鎖および軽鎖両方の各可変ドメインは、一般に、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる3つの高度に可変のループを含有する（軽鎖CDRは、LC_{DR}1、LC_{DR}2およびLC_{DR}3を含み、重鎖CDRは、HC_{DR}1、HC_{DR}2、HC_{DR}3を含む）。本明細書において開示される抗体のCDR境界は、Kabat、IMGT、ChothiaまたはAl-Lazikaniの慣習によって定義または同定され得る（Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273 (4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. Dec 5; 186 (3): 651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 196, 901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28; 342 (6252): 877-83 (1989); Kabat E. A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al., Immunome Research, 1 (3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)）。重鎖または軽鎖可変ドメインの3つのCDRは、CDRよりも高度に保存され、超可変ループを支持する足場を形成するフレームワーク領域（FR）として知られる隣接するストレッチの間に挿入される。重鎖および軽鎖の定常ドメインは、抗原結合に関与しないが、種々のエフェクター機能を示す。抗体は、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づいてクラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラスまたはアイソタイプとして、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらはそれぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミュー重鎖の存在を特徴とする。主要な抗体クラスのうちいくつかは、IgG1（ガンマ1重鎖）、IgG2（ガンマ2重鎖）、IgG3（ガンマ3重鎖）、IgG4（ガンマ4重鎖）、IgA1（アルファ1重鎖）またはIgA2（アルファ2重鎖）などのサブクラスにわけられる。

【0028】

「抗原」という用語は、適応免疫応答を誘導可能な物質を指す。具体的には、抗原は、抗体またはTリンパ球抗原受容体によって特異的に結合される物質である。抗原は、普通、タンパク質および多糖であり、脂質はそれほど頻繁ではない。適した抗原として、限定

10

20

30

40

50

されないが、細菌の一部（コート、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛〔fimbriae〕および毒素）、ウイルスおよび他の微生物が挙げられる。抗原にはまた、腫瘍抗原、例えば、腫瘍における変異によって生成した抗原が含まれる。本明細書で使用される場合、抗原はまた、免疫原およびハプテンを含む。

【0029】

「抗原結合性断片」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合可能なタンパク質の部分を指す。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片は、1つまたは複数のCDRを含む抗体に由来するが、抗原に結合する任意の他の抗体断片は、無傷の天然の抗体構造を含まない。抗原結合性断片の例として、限定されないが、ダイアボディー、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィドによって安定化されたFv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二重特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィドによって安定化されたダイアボディー(dsダイアボディー)、単鎖抗体分子(scFv)、scFv二量体(二価ダイアボディー)、多重特異性抗体、単ドメイン抗体(sdAb)、ラクダ化抗体またはナノボディ、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体が挙げられる。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片は、親抗体が結合する同一抗原に結合可能である。

10

【0030】

「Fab断片」は、軽鎖ならびに1つの重鎖のCH1および可変ドメインを含む。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

20

【0031】

「Fab'断片」は、1つの軽鎖と、VHドメインおよびCH1ドメインおよびまたCH1とCH2ドメインの間の領域も含有する1つの重鎖の部分を含み、その結果、鎖間ジスルフィド結合が2つのFab'断片の2つの重鎖の間に形成されて、F(ab')₂分子を形成し得る。

【0032】

「F(ab')₂断片」は、2つの軽鎖およびCH1とCH2ドメインの間の定常領域の部分を含む2つの重鎖を含有し、その結果、2つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')₂断片は、2つの重鎖の間のジスルフィド結合によって一緒に保持される2つのFab'断片から構成される。

30

【0033】

「Fc」領域は、抗体のCH2およびCH3ドメインを含む2つの重鎖断片を含む。2つの重鎖断片は、2つまたはそれより多いジスルフィド結合によって、CH3ドメインの疎水性相互作用によって一緒に保持される。抗体のFc領域は、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)に関与するが、抗原結合では機能しない。

【0034】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖両方に由来する可変ドメインを含むが、定常ドメインを欠く。

【0035】

「単鎖抗体」または「単鎖Fv」または「scFv」は、重鎖および軽鎖可変ドメインが可動性リンカーによって接続されており、単一ポリペプチド鎖を形成し、これが抗原結合領域を形成するFv分子である。単鎖抗体は、国際特許出願公開番号WO88/01649および米国特許第4,946,778号および同5,260,203号に詳細に論じられており、それらの開示内容は参照により組み込まれる。

40

【0036】

「単鎖Fv-Fc抗体」または「scFv-Fc」とは、抗体のFc領域に接続されたscFvからなる操作された抗体を指す。

【0037】

「dsFv」とは、単一の軽鎖の可変ドメインと、単一の重鎖の可変ドメインの間の連結が、ジスルフィド結合であるジスルフィドによって安定化されたFv断片を指す。一部

50

の実施形態では、「 $(dsFv)_2$ 」または「 $(dsFv-dsFv')$ 」は、3つのペプチド鎖：ペプチドリンカー（例えば、長い可動性リンカー）によって連結され、それぞれ、ジスルフィド橋を介して2つのVLドメインに結合された2つのVHドメインを含む。一部の実施形態では、 $dsFv-dsFv'$ は、各々ジスルフィド対形成された重鎖および軽鎖が異なる抗原特異性を有する二重特異性である。

【0038】

「ラクダ化単ドメイン抗体」、「重鎖抗体」または「HCAb」とは、2つのVHドメインを含有し、軽鎖を含有しない抗体を指す（Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10; 231 (1-2): 25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun; 74 (4): 277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 米国特許第6,005,079号）。重鎖抗体は元々、Camelidae（ラクダ、ヒトコブラクダおよびラマ）に由来するものであった。軽鎖を欠くが、ラクダ科抗体は、確証的な抗原結合レパートリーを有する（Hamers-Casterman C. et al., Nature. Jun 3; 363 (6428): 446-8 (1993); Nguyen VK. et al., "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr; 54 (1): 39-47 (2002); Nguyen VK. et al., Immunology. May; 109 (1): 93-101 (2003)）。重鎖抗体の可変ドメイン（「VHHドメイン」）は、適応免疫応答によって生成される最小の公知の抗原結合性ユニットを表す（Koch-Nolte F. et al., FASEB J. Nov; 21 (13): 3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)）。

【0039】

「ナノボディ」とは、従来のIgGの重鎖抗体に由来する1つのVHドメインおよび2つの重鎖定常ドメイン、例えば、CH2およびCH3からなる抗体断片を指す。

【0040】

「ダイアボディー」または「dAb」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を含み、断片は、同一ポリペプチド鎖中のVLドメインに接続されたVHドメインを含む（VH-VLまたはVL-VH）（例えば、Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15; 90 (14): 6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161を参照されたい）。同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対形成することを強いられ、それによって、2つの抗原結合部位が作出される。抗原結合部位は、同一抗原（またはエピトープ）を標的とする場合も、異なる抗原（またはエピトープ）を標的とする場合もある。ある特定の実施形態では、「二重特異性dsダイアボディー」は、2つの異なる抗原（またはエピトープ）を標的とするダイアボディーである。

【0041】

ある特定の実施形態では、「scFv二量体」は、別のVH-VL部分と二量体化されたVH-VL（ペプチドリンカーによって連結された）を含み、その結果、一方の部分のVHが、もう一方の部分のVLと協調して、同一抗原（またはエピトープ）または異なる抗原（またはエピトープ）を標的とすることができる2つの結合部位を形成する、二価ダイアボディーまたは二価ScFv（BsFv）である。他の実施形態では、「scFv二量体」は、VL1-VH2（同様にペプチドリンカーによって連結された）と会合されたVH1-VL2（ペプチドリンカーによって連結された）を含み、その結果、VH1およびVL1が協調し、VH2およびVL2が協調し、各協調された対が異なる抗原特異性を有する二重特異性ダイアボディーである。

【0042】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変ドメインまたは軽鎖の可変ドメインのみを含有する免

10

20

30

40

50

疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である。一部の例では、2つまたはそれより多いVHドメインが、ペプチドリンカーと共有結合によってつながられて、二価ドメイン抗体が作出される。二価ドメイン抗体の2つのVHドメインは、同一抗原を標的とする場合も、異なる抗原を標的とする場合もある。

【0043】

「キメラ」という用語は、本明細書で使用される場合、ある種に由来する重鎖および／または軽鎖の部分と、異なる種に由来する重鎖および／または軽鎖の残部とを有する抗体または抗原結合性断片を意味する。例示的例では、キメラ抗体は、ヒト由来の定常領域と、非ヒト動物、例えば、マウス由来の可変領域を含み得る。一部の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモットまたはハムスターである。

【0044】

「ヒト化」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体または抗原結合性断片が、非ヒト動物に由来するCDRおよびヒトに由来するFR領域を含み、適用可能である場合に、定常領域は、ヒトに由来するということを意味する。

【0045】

「結合親和性」とは、一般に、分子の単一結合部位（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）の間の非共有結合的相互作用の合計の強さを指す。別に示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する内因的結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(K_d)によって表すことができる。親和性は、本明細書において記載されるものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定できる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に、抗原により迅速に結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定するさまざまな方法が当技術分野で公知であり、そのいずれも、本発明の目的のために使用できる。結合親和性を測定するための特定の例示的および代表的な実施形態を以下に記載する。

【0046】

特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープ「に特異的に結合する」または「に特異的な」タンパク質または抗体とは、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、その特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合するものである。例えば、本明細書において記載される抗体は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合できる。一部の実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質に結合する抗体は、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）の解離定数(K_d)を有する。

【0047】

本明細書で使用される場合、「がん」および「腫瘍」という用語は、同義的に使用され、異常な細胞増殖を伴い、身体中の任意の組織、臓器または細胞に影響を及ぼすすべてのステージおよびすべての形態の疾患を含む任意の疾患を指す。この用語は、悪性、良性、軟性組織または固形と特性決定されるかに関わらず、すべての既知腫瘍および新生物状態ならびに転移前および転移後がんを含むすべてのステージおよびグレードのがんを含む。一般に、腫瘍は、腫瘍が位置するまたは起源とする組織または臓器およびがん性組織および細胞の形態に従って分類できる。本明細書で使用される場合、腫瘍の種類として、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄球性白血病、副腎皮質癌腫、肛門がん、星状細胞腫、小児小脳または大脳、基底細胞癌腫、胆管がん、膀胱がん、骨腫瘍、脳がん、乳がん、バーキットリンパ腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、子宮頸がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸がん、肺気腫、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイングファミリー腫瘍、ユーイング肉腫、胃(gastric)（胃(stomach)

10

20

30

40

50

）がん、神経膠腫、頭頸部がん、心臓がん、ホジキンリンパ腫、膵島細胞癌腫（内分泌膵臓）、カボジ肉腫、腎臓がん（腎細胞がん）、喉頭がん、白血病、肝臓がん、肺がん、髄芽細胞腫、黒色腫、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎細胞がん（腎臓がん）、網膜芽細胞腫、皮膚がん、胃〔stomach〕がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣がん、咽喉がん、甲状腺がん、膣がん、視覚路および視床下部神経膠腫が挙げられる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「有効量」または「治療上有効量」という用語は、任意の障害もしくは疾患の症状および／もしくは根底にある原因を予防、処置、低減および／もしくは改善するのに十分である薬剤の量または細胞に対して所望の効果をもたらすのに十分な薬剤の量を意味する。一実施形態では、「治療上有効量」とは、疾患の症状を低減または排除するのに十分な量である。別の実施形態では、治療上有効量とは、疾患自体を克服するのに十分な量である。

10

【0049】

「エピトープ」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合性ポリペプチドが結合する抗原上の原子またはアミノ酸の特定の群を指す。エピトープは、線状エピトープまたは立体配座エピトープのいずれかであり得る。線状エピトープは、抗原因由来のアミノ酸の連続配列によって形成され、その一次構造に基づいて抗体と相互作用する。他方、立体配座エピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続のセクションから構成され、抗原の3D構造に基づいて抗体と相互作用する。一般に、エピトープは、およそ5個または6個のアミノ酸の長さである。2つの抗体は、それらが抗原に対して競合的結合を示す場合には、抗原内の同一エピトープに結合し得る。

20

【0050】

「宿主細胞」という用語は、核酸配列を用いて形質転換されている、または核酸配列を用いて形質転換されることが可能であり、それによって、目的の遺伝子を発現する細胞を意味する。この用語は、親細胞の後代を、目的の遺伝子が存在する限り、後代が、形態学において、または遺伝子構造において元の親細胞と同一であるか否かに関わらず含む。

【0051】

本明細書において、「単離された」生物学的構成成分（例えば、核酸、ペプチドまたは細胞）は、構成成分が天然に生じる生物の、他の生物学的構成成分または細胞、すなわち、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、細胞およびタンパク質から実質的に分離され、それらから離れて生成され、またはそれらから精製されている。したがって、「単離」されている核酸、ペプチドおよびタンパク質は、標準精製法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。この用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸、ペプチドおよびタンパク質ならびに化学合成された核酸を包含する。

30

【0052】

「連結する」という用語は、本明細書で使用される場合、分子内相互作用、例えば、共有結合、金属結合および／またはイオン結合または分子間相互作用、例えば、水素結合または非共有結合的結合を介する会合を指す。

【0053】

「作動可能に連結された」という用語は、そのように記載された構成成分がその普通の機能を果たすように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、ポリペプチドに作動可能に連結されている所与のシグナルペプチドは、細胞からのポリペプチドの分泌を指示する。プロモーターの場合には、コード配列に作動可能に連結されているプロモーターは、コード配列の発現を指示する。プロモーターまたは他の制御エレメントは、それらがその発現を指示するように機能する限りコード配列と連続している必要はない。例えば、プロモーター配列とコード配列の間に、介在する翻訳されないが、転写される配列が存在する場合があります、プロモーター配列は依然として、コード配列に「作動可能に連結されている」と考えられ得る。

40

【0054】

50

「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、一本鎖および二本鎖ヌクレオチドポリマーの両方を含む。ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドまたはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾形態であり得る。前記修飾として、塩基修飾、例えば、プロモウリジンおよびイノシン誘導体、リボース修飾、例えば、2', 3'-ジデオキシリボースおよびヌクレオチド間連結修飾、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート (phosphoraniladate) およびホスホロアミデートが挙げられる。

【0055】

「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、天然タンパク質、すなわち、天然に生じるおよび非組換え細胞によって産生されたタンパク質のアミノ酸配列を有する高分子を意味するか、または遺伝子操作されたもしくは組換え細胞によって産生され、天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子もしくは天然配列の1つもしくは複数のアミノ酸からの欠失、付加および／または置換を有する分子を含む。この用語はまた、1つまたは複数のアミノ酸が、対応する天然に生じるアミノ酸およびポリマーの化学的類似体であるアミノ酸ポリマーを含む。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、具体的には、抗原結合性タンパク質からの1個または複数のアミノ酸の欠失、付加および／または置換を有する、LAIR1抗原結合性タンパク質、抗体または配列を包含する。「ポリペプチド断片」という用語は、全長天然タンパク質と比較してアミノ末端欠失、カルボキシル末端欠失および／または内部欠失を有するポリペプチドを指す。このような断片はまた、天然タンパク質と比較して修飾されたアミノ酸も含有し得る。ある特定の実施形態では、断片は、約5～500個のアミノ酸長である。例えば、断片は、少なくとも5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400または450個のアミノ酸長であり得る。有用なポリペプチド断片として、結合ドメインを含む、抗体の免疫学的に機能的な断片が挙げられる。抗体の場合には、有用な断片として、それだけには限らないが、CDR領域、重鎖および／または軽鎖の可変ドメイン、抗体鎖の一部または2つのCDRを含むその可変領域のみなどが挙げられる。

【0056】

「薬学的に許容される担体」という語句は、本明細書で使用される場合、対象化合物を身体のある臓器または部分から、身体別の臓器または部分へと運ぶことまたは輸送することに関する薬学的に許容される材料、組成物または媒体、例えば、液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤もしくは溶媒カプセル化剤を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合し、かつ患者にとって傷害性ではないという意味で「許容され」なくてはならない。薬学的に許容される担体として役立ち得る材料のいくつかの例として、糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース；デンプン、例えば、コーンスターチおよびジャガイモデンプン；セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；粉末トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えば、ココアバターおよび坐剤ワックス；オイル、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油；グリコール、例えば、プロピレングリコール；ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギン酸；発熱物質不含水；等張性生理食塩水、リンゲル溶液；エチルアルコール；pH緩衝溶液；ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物；および医薬製剤において使用される他の非毒性適合性物質が挙げられる。

【0057】

本明細書において、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類）を指す。ヒトは、出生前および出生後形態を含む。多数の実施形態では、対象はヒトである。対象

10

20

30

40

50

は、疾患の診断または処置のために医療提供者を訪れるヒトを指す患者であり得る。「対象」という用語は、本明細書において「個体」または「患者」と同義的に使用される。対象は、疾患または障害に苦しんでいるか、それに感受性である可能性があるが、疾患または障害の症状を示す場合も、示さない場合もある。

【0058】

本明細書で使用される場合、状態を「処置すること〔treating〕」または「処置する〔treat〕」は、状態を防ぐまたは軽減すること、状態の発症または発生の速度を減速すること、状態を発生するリスクを低減すること、状態に関連する症状の発生を防ぐまたは遅延すること、状態に関連する症状を低減するまたは終結させること、状態の完全もしくは部分的退縮をもたらすこと、状態を治癒することまたはそれらのいくつかの組合せを含む。

10

【0059】

本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、宿主細胞中に導入され、それによって、形質転換された宿主細胞を生成するような核酸分子を指す。ベクターは、宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。ベクターはまた、1つまたは複数の治療用遺伝子および／または選択マーカー遺伝子および当技術分野で公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。ベクターは、細胞に形質導入、形質転換または感染でき、それによって、細胞に、細胞にとって天然のもの以外の核酸および／またはタンパク質を発現させることができる。ベクターは、任意選択で、核酸の細胞への侵入を達成することを補助する材料、例えば、ウイルス粒子、リポソーム、タンパク質コーティングなどを含む。

20

【0060】

II. 融合タンパク質およびその生成

A. 融合タンパク質

本開示は、一態様では、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む抗体または抗原結合性断片と、抗体または抗原結合性断片に作動可能に連結されたインターロイキン分子とを含む融合タンパク質を提供する。本開示の融合タンパク質は、種々の形態および構造を有し得るということは理解される。本開示の融合タンパク質は、図1～8において例示されるような代表的な実施形態によって理解され得る。

【0061】

図1を参照すると、本発明の例示的实施形態では、融合タンパク質は、重鎖および軽鎖の2つの対を含む従来のY型抗体を含む。各重鎖は、可変ドメイン(V_H)ならびに第1、第2および第3の定常ドメイン(それぞれ、C_H1、C_H2、C_H3)を含む定常領域からなる。各軽鎖は、可変ドメイン(V_L)および定常ドメイン(C_L)からなる。ジスルフィド結合を介して一緒に結合された2つの重鎖の第2および第3の定常ドメインからなるY型抗体のステム。Y型抗体の各アームは、単一軽鎖の可変および定常ドメインに結合された、単一重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメインを含む。インターロイキン(IL)分子は、各重鎖のC末端でリンカーを介して重鎖の第3の定常ドメインに連結されている。

30

【0062】

図2を参照すると、本発明の別の例示的实施形態では、融合タンパク質は、図1に例示されるものと同じ構造を有する従来のY型抗体を含む。図1におけるものとは異なり、図2において例示される融合タンパク質では、IL分子は、重鎖に連結する代わりに、リンカーを介して軽鎖の定常ドメインに連結されている。

40

【0063】

図3を参照すると、本発明の別の例示的实施形態では、融合タンパク質は、図1に例示されるものと同じ構造を有する従来のY型抗体を含む。図3に例示される融合タンパク質では、IL分子は、リンカーを介して重鎖可変ドメインに連結されている。

【0064】

図4を参照すると、本発明の別の例示的实施形態では、融合タンパク質は、図1に例示

50

されるものと同一の構造を有する従来の Y 型抗体を含む。図 4 に例示される融合タンパク質では、I L 分子は、リンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結されている。

【0065】

ある特定の実施形態では、図 5 ～ 8 に例示されるように、融合タンパク質は、抗原結合性断片を含む。図 5 を参照すると、本発明の別の例示の実施形態では、融合タンパク質は、軽鎖および重鎖断片の 2 つ対からなる抗原結合性断片 F (a b ')₂ を含む。各重鎖断片は、C_H1 と C_H2 ドメインの間の定常領域の部分を含み、その結果、2 つの重鎖断片の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。I L 分子は、各重鎖断片の C 末端で、リンカーを介して重鎖断片に連結されている。

【0066】

図 6 を参照すると、本発明の別の例示の実施形態では、融合タンパク質は、図 5 に例示されるものと同一の構造を有する F (a b ')₂ 断片を含む。図 5 におけるものとは異なり、図 6 に例示される融合タンパク質では、I L 分子は、重鎖断片に連結される代わりに、リンカーを介して軽鎖の定常ドメインに連結されている。

【0067】

図 7 を参照すると、本発明の別の例示の実施形態では、融合タンパク質は、単鎖可変断片 (s c F v) の対を含む。s c F v は、重鎖および軽鎖可変ドメインが可動性リンカーによって接続されており、単一ポリペプチド鎖を形成し、これが抗原結合領域を形成する分子である。単鎖可変断片は、国際特許出願公開番号 W O 8 8 / 0 1 6 4 9 および米国特許第 4, 9 4 6, 7 7 8 号および同 5, 2 6 0, 2 0 3 号に詳細に論じられており、それらの開示内容は参照により組み込まれる。図 7 を参照すると、重鎖可変ドメインは、C_H1 と C_H2 ドメインの間の重鎖定常領域の部分に連結され、その結果、2 つの単鎖可変断片の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。I L 分子は、各 s c F v の C 末端でリンカーを介して s c F v に連結されている。

【0068】

図 8 を参照すると、本発明の別の例示の実施形態では、融合タンパク質は、s c F v の対を含み、各 s c F v は、ポリペプチドの N 末端から C 末端に重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、その結果、2 つの単鎖可変断片の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。I L 分子は、各 s c F v の C 末端でリンカーを介して s c F v に連結されている。

【0069】

ある特定の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質は、A 2 A R、B 7 . 1、B 7 . 2、B 7 - H 2、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B 7 - H 6、B T L A、C D 4 8、C D 1 2 0 b、C D 1 6 0、C D 2 4 4、C T L A - 4、I C O S、L A G - 3、L I L R B 1、L I L R B 2、L I L R B 4、O X 4 0、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、S I R P アルファ (C D 4 7)、T I G I T、T I M - 3、T I M - 1、T I M - 4 および V I S T A からなる群から選択される。

【0070】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、Q u i e t a l . の U S 1 0, 4 2 8, 1 4 6 において開示されるものから選択される抗 P D - 1 抗体を含み、その開示内容は、参照によりその全文が組み込まれる。ある特定の実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、U S 1 0, 4 2 8, 1 4 6 において開示される 7 A 4 D である。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、U S 1 0, 4 2 8, 1 4 6 において開示される抗 P D - 1 抗体に由来する抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、抗 P D - 1 抗体または抗原結合性断片は、(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する H C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する H C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 を有する重可変領域および (i i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する L C D R 2、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 を有する軽可

10

20

30

40

50

変領域を含む。

【0071】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、Zha et al. の US 10, 435, 470 において開示されるものから選択される抗 PD-L1 抗体を含み、その開示内容は、参照によりその全文が組み込まれる。ある特定の実施形態では、抗 PD-L1 抗体は、US 10, 435, 470 において開示される 5G11 である。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、US 10, 435, 470 において開示される抗 PD-L1 抗体に由来する抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、抗 PD-L1 抗体または抗原結合性断片は、(i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する HCDR1、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する HCDR2、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する HCDR3 を有する重可変領域および (ii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する LCDR1、配列番号 11 のアミノ酸配列を有する LCDR2、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する LCDR3 を有する軽可変領域を含む。

10

【0072】

ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35 および IL-36 からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、IL-7、IL10 または IL-23 である。ある特定の実施形態では、インターロイキン分子は、ヒトインターロイキンである。

20

【0073】

インターロイキン 7 (IL-7) は、骨髄および胸腺中の間質細胞によって分泌される造血成長因子である。また、ケラチノサイト、樹状細胞、肝細胞、ニューロンおよび上皮細胞によっても産生されるが、正常リンパ球によっては産生されない。ヒト IL-7 mRNA は、GenBank 参照番号 NM_000880、NM_001199886、NM_001199887 および NM_001199888 の配列を有する。ヒト IL-7 タンパク質は、GenBank 参照番号 NP_000871、NP_001186815、NP_001186816 および NP_001186817 の配列を有する。IL-7 は、多分化能 (多能性) 造血幹細胞のリンパ球前駆細胞への分化を刺激する。また、B 細胞、T 細胞および NK 細胞を含むリンパ系系統におけるすべての細胞の増殖も刺激する。

30

【0074】

ヒトサイトカイン合成阻害因子 (CSIF) としても知られるインターロイキン 10 (IL-10) はまた、一般に、抗炎症性サイトカインと見なされる。ヒト IL-10 タンパク質は、ホモ二量体であり、そのサブユニットの各々は、178 個のアミノ酸長である。ヒト IL-10 mRNA は、GenBank 参照番号 NM_000572 の配列を有する。ヒト IL-10 タンパク質は、GenBank 参照番号 NP_000563 の配列を有する。ある特定の実施形態では、融合タンパク質中に含まれる IL-10 分子は、配列番号 13 のアミノ酸配列またはそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% の同一性を有する配列を有する。ある特定の実施形態では、融合タンパク質中に含まれる IL-10 分子は、配列番号 14 のアミノ酸配列またはそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% の同一性を有する配列を有する。

40

【0075】

ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの関連で「同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって 2 つの最適にアラインされた配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2 つの配列の

50

最適アラインメントのための、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較した付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、両配列において同一核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定して、マッチした位置の数を得ること、マッチした位置の数を比較のウィンドウ中の位置の総数によって除することおよび結果に100を乗じて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

【0076】

IL-10は、2つのIL-10受容体-1および2つのIL-10受容体-2タンパク質からなる受容体複合体を介してシグナルを伝達する。IL-10結合は、JAK1およびTyk2によるIL-10受容体1およびIL-10受容体2の細胞質尾部のリン酸化を介してSTAT3シグナル伝達を誘導する。IL-10は、免疫調節および炎症において複数の多面的効果を有するサイトカインである。マクロファージ上のTh1サイトカイン、MHCクラスII抗原および同時刺激分子の発現を下方制御する。また、B細胞生存、増殖および抗体産生を増強する。

10

【0077】

インターロイキン23（IL-23）は、IL12BサブユニットおよびIL23Aサブユニットから構成されるヘテロ二量体サイトカインである。IL-23は、IL-17産生細胞を維持し、血管新生を増大し、CD8⁺T細胞浸潤を低減する。

【0078】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、インターロイキン分子を抗体または抗原結合性断片に連結するリンカーを含有する。ある特定の実施形態では、リンカーは、一般に、ヘリックス-およびターン-促進性アミノ酸残基、例えば、アラニン、セリンおよびグリシンから構成される。しかし、他の残基が同様に機能する場合もある。ある特定の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列（GGGGS）_n（n=2~5）を含む。

20

【0079】

B. 製造方法

本開示の融合タンパク質は、例えば、Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), at Chapter 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Farber-Schwarz)に記載されるような融合タンパク質をコードする、例えば、核酸構築物からの発現によって組換えによって調製できる。

30

【0080】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、標的抗原、例えば、免疫チェックポイントタンパク質に対するモノクローナル抗体をベースとして調製でき、これは、標準法と、それに続くスクリーニング、特性決定および機能的評価を使用して調製できる。モノクローナル抗体の可変領域を配列決定し、次いで、発現ベクター中にサブクローニングして融合タンパク質をコードする遺伝子を生成でき、次いで、これを発現させ、精製する。

【0081】

融合タンパク質は、親和性成熟のプロセスによってさらに操作でき、これでは、未修飾の親抗体または抗原結合性断片と比較して、抗原への結合の親和性の改善を有する修飾された抗体または抗原結合性断片が生成される。親和性成熟された抗体または抗原結合性断片は、当技術分野で公知の手順、例えば、Marks et al., *Technology* 10:779-783 (1992); Barbas et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-3315 (1995); および Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)によって生成できる。

40

50

【0082】

本明細書において開示されるような従来のY型抗体を含有する融合タンパク質はまた、Fc領域内に修飾を含むように、通常、抗体の1つまたは複数の機能的特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および／またはエフェクター機能（例えば、抗原依存性細胞性細胞傷害）を変更するように操作できる。さらに、本明細書において開示される抗原結合性ポリペプチドは、化学修飾できる（例えば、1つまたは複数の化学部分を抗体に結合できる）、またはそのグリコシル化を変更するように、やはり抗原結合性ポリペプチドの1つもしくは複数の機能的特性を変更するように修飾できる。本明細書において開示される抗体はまた、変更されたエフェクター機能を提供するために修飾された（またはブロックされた）Fc領域を有する抗原結合性ポリペプチドも含む。例えば、米国特許第5,624,821号、WO2003/086310、WO2005/120571、WO2006/0057702を参照されたい。このような修飾を使用して、免疫系の種々の反応を増強または抑制でき、診断および療法において有益な効果をもたらす可能性がある。

10

【0083】

ある特定の実施形態では、融合タンパク質中に含有されるscFvを、単一ペプチドとして抗原結合性ドメインを発現するために高度に都合のよいファージディスプレイによって作出できる。一般に、重鎖および軽鎖可変ドメインの遺伝子が、可変組成の18アミノ酸のポリペプチドをコードするセグメントによって連結されているランダムリンカーライブラリーを構築できる。scFvレパートリー（およそ 5×10^6 の異なるメンバー）が繊維状ファージ上にディスプレイされ、標的抗原、例えば、IL-10を用いる親和性選択に付される。

20

【0084】

あるいは、scFvを、サブクローニングされた、モノクローナル抗体に由来する重鎖および軽鎖から直接的に作出できる。

【0085】

ある特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質を精製できる。「精製された」という用語は、本明細書で使用される場合、他の構成成分から単離可能な組成物を指すように意図され、タンパク質は、その天然に得られる状態に対して任意の程度に精製される。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に生じることがある環境から解放されたタンパク質を指す。「実質的に精製された」という用語が使用される場合には、この呼称は、タンパク質またはペプチドが組成物の主要な構成成分を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれより多く（例えば、重量で）を構成する組成物を指す。

30

【0086】

III. 組成物およびコンジュゲート

A. 製剤

本開示は、本明細書において記載される融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。このような組成物は、抗原結合性ポリペプチドの予防上または治療上有効量および薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態では、「薬学的に許容される」という用語は、連邦または州政府の規制当局によって承認されているか、または動物における、より詳しくは、ヒトにおける使用のために米国薬局方または他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。このような医薬品担体は、滅菌液体、例えば、水および石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などを含む油であり得る。水は、医薬組成物が静脈内に投与される場合、特定の担体である。生理食塩水溶液ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液も、特に、注射用溶液の液体担体として使用され得る。他の適した医薬品賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、コメ、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが

40

50

挙げられる。

【0087】

組成物はまた、必要に応じて、微量の湿潤剤または乳化剤またはpH緩衝剤を含有し得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤などの形態をとり得る。経口製剤は、標準担体、例えば、医薬品等級のマニトール、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、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含み得る。適した医薬品の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences.」に記載されている。このような組成物は、患者への適切な投与の形態を提供するために、好ましくは精製された形態の、抗原結合性ポリペプチドの予防上または治療上有効量を、適した量の担体と一緒に含有する。製剤は、経口、静脈内、動脈内、頬内、鼻腔内、噴霧、気管支吸入または機械的換気による送達であり得る投与の様式に適しているべきである。

10

【0088】

本明細書において記載されるような本開示の融合タンパク質は、非経口投与のために製剤化できる、例えば、皮内、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内またはさらに腹膜内経路による注射のために製剤化できる。あるいは、抗原結合性ポリペプチドは、局所経路によって、例えば、点鼻薬、吸入によって、または噴霧器によって粘膜に直接投与できる。薬学的に許容される塩として、酸性塩および無機酸、例えば、塩酸またはリン酸など、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などといった有機酸を用いて形成されるものが挙げられる。フリーのカルボキシル基を用いて形成される塩はまた、無機塩基、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄など、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどといった有機塩基から導くことができる。

20

【0089】

一般に、本開示の組成物の成分は、例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたはサシェット(sachette)などの気密性に密閉された容器中の乾燥凍結乾燥粉末または水不含濃縮物として単位投与形で、別個に、または一緒に混合されて供給される。組成物が注入によって投与される予定である場合には、滅菌医薬品等級水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて分配できる。組成物が注射によって投与される場合には、成分を投与の前に混合できるように滅菌注射水または生理食塩水のアンプルが提供される場合がある。

30

【0090】

本開示の組成物は、中性または塩形態として製剤化できる。薬学的に許容される塩として、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどのアニオンを用いて形成されるものおよびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどのカチオンを用いて形成されるものが挙げられる。

【0091】

B. コンジュゲート

本開示の融合タンパク質は、コンジュゲートを形成するために少なくとも1つの薬剤に連結され得る。治療薬としての融合タンパク質の有効性を増大するために、少なくとも1つの所望の分子または部分に連結する、または共有結合によって結合する、または複合体形成することは従来のものである。このような分子または部分は、それだけには限らないが、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であり得る。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞傷害性活性を有する分子を含む。抗体に付着されているエフェクター分子の限定されない例として、毒素、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射性核種、抗ウイルス剤、キレート化剤、サイトカイン、増殖因子およびオリゴまたはポリヌクレオチドが挙げられる。

40

【0092】

ある特定の実施形態では、本開示のコンジュゲートは、薬物に共有結合によって連結されている融合タンパク質を含む薬物コンジュゲートを含む。ある特定の実施形態では、コ

50

ンジュゲートは、例えば、コンジュゲートを疾患を有する対象に投与することによって、疾患を処置するために使用される。適した薬物の例として、抗腫瘍薬物、抗生物質および免疫抑制薬が挙げられる。

【0093】

抗体のそのコンジュゲート部分への付着またはコンジュゲーションのためのいくつかの方法が当技術分野で公知である。一部の付着法は、例えば、抗体に付着された、ジエチレントリアミン五酢酸無水物（DTPA）、エチレントリアミン四酢酸、N-クロロ-p-トリエンシルホンアミドおよび／またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル-3のような有機キレート化剤を使用する金属キレート錯体の使用を含む（米国特許第4,472,509号および同4,938,948号）。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させることができる。これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって、フルオレセインマーカ-とのコンジュゲートが調製される。米国特許第4,938,948号では、モノクローナル抗体を使用して乳房腫瘍のイメージングが達成され、検出可能なイメージング部分は、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを使用して抗体に結合される。

【0094】

他の実施形態では、抗体結合部位を変更しない反応条件を使用して免疫グロブリンのFc領域中にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論に従って生成された抗体コンジュゲートは、改善された長寿命、特異性および感受性を示すと開示されている（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,196,066号）。エフェクター分子がFc領域中の炭水化物残基にコンジュゲートされるエフェクターまたはレポーター分子の部位特異的付着も、文献（O'Shannessy et al., 1987）に開示されている。

【0095】

IV. 融合タンパク質によって処置される疾患

一態様では、本開示は、限定されないが、腫瘍および免疫障害を含む疾患を処置するために本明細書において開示されるような融合タンパク質を使用する方法を提供する。

【0096】

A. 腫瘍

過剰増殖性疾患は、細胞に制御不能に再生を開始させる任意の疾患と関連している可能性があり、典型的な例として、腫瘍がある。腫瘍の重要な要素の1つに、細胞の正常なアポトーシスサイクルが中断されることがあり、したがって、細胞の成長を中断する薬剤が、これらの疾患を処置するための治療薬として重要である。ここで、目的の融合タンパク質を、腫瘍細胞の表面上の、特に、がん幹細胞の表面上の抗原に対して、またはこのような抗原の存在によって阻害される免疫細胞の存在下で生成できる。

【0097】

本開示に従って処置され得る腫瘍細胞として、それだけには限らないが、膀胱、血液、骨、骨髓、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、上咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、膵臓、精巣、舌、子宮頸部または子宮に由来する細胞が挙げられる。さらに、腫瘍は、具体的には、以下の組織学的種類のものであり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性；癌腫；癌腫、未分化型；巨細胞および紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮性癌；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；ガストリン産生腫瘍、悪性；胆管癌；肝細胞癌腫；複合肝細胞癌腫および胆管癌腫；小柱腺癌〔trabecular adenocarcinoma〕；アデノイド嚢胞癌；腺腫性ポリープにおける腺癌；腺癌、家族性大腸腺腫症；固形癌；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺腺癌〔branchiolo-alveolar adenocarcinoma〕；乳頭状腺癌；嫌色素性癌腫；好酸性癌腫；好酸性腺癌；好塩基性癌腫；明細胞腺癌；顆粒細胞癌腫；濾胞性腺癌；乳頭状および濾胞性腺癌；非被包性硬化性癌腫〔nonencapsulating sclerosing c

arcinoma) ; 副腎皮質癌 ; 類内膜癌 (endometroid carcinoma) ; 皮膚付属器癌 ; アポクリン腺癌 ; 皮脂腺癌 ; 耳道腺癌 ; 粘表皮癌 ; 嚢胞腺癌 ; 乳頭状嚢胞腺癌 ; 乳頭状漿液性嚢胞腺癌 ; 粘液性嚢胞腺癌 ; 粘液性腺癌 ; 印環細胞癌 ; 浸潤性乳管癌 ; 髓様癌 ; 小葉癌腫 ; 炎症性癌腫 ; パジエツト病、乳房 ; 腺房細胞癌腫 ; 腺扁平上皮癌 ; 腺癌w / 扁平上皮化生 ; 胸腺腫、悪性 ; 卵巣間質腫、悪性 ; 莢膜細胞腫、悪性 ; 顆粒膜細胞腫、悪性 ; セルトリ間質細胞腫瘍、悪性 ; セルトリ細胞癌腫 ; ライディッヒ細胞腫、悪性 ; 脂質細胞腫瘍、悪性 ; 傍神経節腫、悪性 ; 乳房外傍神経節腫 (extra-mammary paraganglioma) 、悪性 ; 褐色細胞腫 ; 血管球血管肉腫 ; 悪性黒色腫 ; 無色素性黒色腫 ; 表在拡大型黒色腫 ; 巨大色素性母斑における悪性黒色腫 ; 類上皮細胞黒色腫 ; 青色母斑、悪性 ; 肉腫 ; 線維肉腫 ; 線維性組織球腫、悪性 ; 粘液肉腫 ; 脂肪肉腫 ; 平滑筋肉腫 ; 横紋筋肉腫 ; 胚性横紋筋肉腫 ; 肺胞横紋筋肉腫 ; 間質性肉腫 ; 混合腫瘍、悪性 ; ミュラー管混合腫瘍 ; 腎芽細胞腫 ; 胆芽腫 ; 癌肉腫 ; 間葉腫、悪性 ; プレンナー腫瘍、悪性 ; 葉状腫瘍、悪性 ; 滑膜肉腫 ; 中皮腫、悪性 ; 未分化胚細胞腫 ; 胚性癌腫 ; 奇形腫、悪性 ; 卵巣甲状腺腫、悪性 ; 絨毛癌 ; 中腎腫、悪性 ; 血管肉腫 ; 血管内皮腫、悪性 ; カボジ肉腫 ; 血管外皮腫、悪性 ; リンパ管肉腫 ; 骨肉腫 ; 傍骨性骨肉腫 ; 軟骨肉腫 ; 軟骨芽細胞腫、悪性 ; 間葉性軟骨肉腫 ; 骨の巨細胞腫 ; ユーイング肉腫 ; 歯源性腫瘍、悪性 ; エナメル上皮肉腫 ; エナメル上皮腫、悪性 ; エナメル上皮線維肉腫 ; 松果体腫、悪性 ; 脊索腫 ; 神経膠腫、悪性 ; 上衣腫 ; 星状細胞腫 ; 原形質星状細胞腫 ; 線維性星状細胞腫 ; 星状芽細胞腫 ; 神経膠芽腫 ; 乏突起神経膠腫 ; 乏突起神経膠芽細胞腫 ; 原始神経外胚葉性 ; 小脳肉腫 ; 神経節芽細胞腫 ; 神経芽細胞腫 ; 網膜芽細胞腫 ; 嗅神経腫瘍 ; 髄膜腫、悪性 ; 神経線維肉腫 ; 神経鞘腫、悪性 ; 顆粒細胞腫、悪性 ; 悪性リンパ腫 ; ホジキン病 ; 側肉芽腫 ; 悪性リンパ腫、小リンパ性 ; 悪性リンパ腫、大細胞、びまん性 ; 悪性リンパ腫、濾胞性 ; 菌状息肉症 ; 他の特定の非ホジキンリンパ腫 ; 悪性組織球増殖症 ; 多発性骨髄腫 ; 肥満細胞肉腫 ; 免疫増殖性小腸疾患 ; 白血病 ; リンパ性白血病 ; 形質細胞性白血病 ; 赤白血病 ; リンパ肉腫細胞白血病 ; 骨髄球性白血病 ; 好塩基球性白血病 ; 好酸球性白血病 ; 単球性白血病 ; 肥満細胞白血病 ; 巨核芽球性白血病 ; 骨髄球性肉腫 ; およびヘアリー細胞白血病。ある特定の態様では、腫瘍は、骨肉腫、血管肉腫、横紋肉腫、平滑筋肉腫、ユーイング肉腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫または白血病を含み得る。

【0098】

B. 免疫障害

免疫障害は、免疫系の機能障害に起因する。免疫細胞、例えば、B細胞、T細胞、NK細胞などを調節する抗原に対する融合タンパク質を使用して、免疫細胞をモジュレートし、それによって、免疫障害、例えば、炎症、自己免疫疾患および移植拒絶を処置できる。

【0099】

自己免疫疾患とは、本明細書で使用される場合、正常な身体の一部に対する異常な免疫応答から生じる状態を指す。自己免疫疾患によって引き起こされる80種を超える疾病がある。ほぼどのような身体の一部も関与する可能性がある。自己免疫疾患は、組織への損傷またはその破壊、臓器成長の変更および臓器機能の変更を含む多種多様な異なる効果を有する。米国で約2400万人(7%)が、自己免疫疾患の影響を受けている。

【0100】

自己免疫疾患と考えられるいくつかの一般的な疾患として、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫内耳疾患、自己免疫リンパ増殖性症候群(ALPS)、自己免疫血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック疾患、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素疾患、クレスト症候群、クローン病、デゴス疾患、皮膚筋炎、皮膚筋炎若年性、円板状ループス、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、グレープス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病(ITP)、IgA腎症、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病(I型)、若年性関節炎、メニエール病、混合結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力

症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイモンドの現象、ライター症候群、リウマチ性発熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、ステイフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨大細胞動脈炎、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎〔uveitis〕、白斑およびウェジナー肉芽腫症が挙げられる。

【0101】

1型糖尿病は、十分ではないインスリンが産生され、身体において高い血糖レベルをもたらす糖尿病の形態である。1型糖尿病の症状として、頻繁な排尿、口渇の増大、空腹感の増大、体重減少、霧視、疲労感および治癒不良が挙げられる。1型糖尿病の原因は未知であるが、根底にある機序は、膵臓におけるインスリン産生性ベータ細胞の自己免疫破壊を含む。

10

【0102】

ループスとしても知られる全身性エリテマトーデスは、身体の多数の部分において身体の免疫系が健常な組織を誤って攻撃する疾患である。一般的な症状として、有痛性の〔painful〕腫脹した関節、発熱、胸痛、脱毛、口腔内潰瘍、腫脹したリンパ節、疲労感および最も一般的には顔の赤い発疹が挙げられる。ループスの原因は依然として未知であるが、遺伝的および環境的因子の両方が関与している可能性がある。ループスの機序は、人自身の組織に対する自己抗体による免疫応答を含み、これは、最も一般的には、炎症をもたらす抗核抗体である。

20

【0103】

関節リウマチは、主に、関節に影響を及ぼし、通常、温かい、腫脹した、有痛性の関節をもたらす長期の自己免疫疾患である。他の症状として、赤血球数の低下、肺および心臓の周囲の炎症、発熱および低エネルギーが挙げられる。関節リウマチの原因は明確ではないが、遺伝的および環境的因子の組合せが関与すると考えられている。根底にある機序は、身体の免疫系が関節を誤って攻撃し、炎症および関節包の肥厚をもたらすことならびにまた根底にある骨および軟骨に影響を及ぼすことを含む。

【0104】

多発性硬化症は、脳および脊髄における神経細胞の絶縁カバーが、人自身の免疫系によって損傷を受ける自己免疫疾患である。損傷は、神経系の情報伝達する能力を攪乱し、複視、片方の眼の失明、筋力低下、感覚の問題または協調の問題を含むさまざまな症状を引き起こす。原因は明確ではないが、多発性硬化症の根底にある機序は、免疫系による破壊であると考えられている。提案された原因は、遺伝的および環境的因子を含む。

30

【0105】

自己免疫疾患は広がっているが、その原因は、全体的に明確ではない。T細胞およびB細胞の両方を含むヒト適応免疫系は、自己抗原と反応性であることが可能である。しかし、これらの自己反応性T細胞およびB細胞は、普通、免疫系内で活性になる前に死滅する、アネルギーの状態に入る、または制御性細胞によって免疫系内のその役割から除かれるのいずれかである。これらの機序のうちいずれか1つが失敗した場合に、いくつかの自己反応性細胞が免疫系内で機能的になることができ、自己免疫疾患を引き起こす。

40

【0106】

移植拒絶は、移植された組織が、レシピエントの免疫系によって拒絶される場合に生じ、これが移植された組織を破壊する。拒絶の根底にある機序は、キラーT細胞によって媒介される細胞性免疫および活性化されたB細胞によって媒介される体液性免疫による適応免疫応答の組合せを含む。自然免疫応答のいくつかの構成成分、例えば、貪食細胞および可溶性免疫タンパク質も関与する可能性がある。

【0107】

急性移植拒絶は、免疫抑制療法を用いて処置できる。免疫抑制薬として、副腎皮質ステロイド、例えば、プレドニゾロンおよびヒドロコルチゾン、カルシニューリン阻害剤およびmTOR阻害剤が挙げられる。

50

【0108】

C. 融合タンパク質の投与

一部の実施形態では、本開示は、対象において疾患を処置する方法であって、対象に、治療上有効量の本明細書において提供された融合タンパク質または医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0109】

本明細書において提供された融合タンパク質の治療上有効量（単独で、または他の薬剤、例えば、化学療法薬と組み合わせて使用される場合）は、例えば、処置されるべき疾患の種類、体重、年齢、過去の病歴、現在の薬物療法、対象の健康の状態、免疫状態および交差反応の可能性、アレルギー、感受性および有害な副作用ならびに投与経路および種類、疾患の重症度および発症および主治医または獣医の裁量など、当技術分野で公知の種々の因子に応じて変わる。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される融合タンパク質は、約0.001mg/kg～約100mg/kg、1日あたり1回または複数回（例えば、約0.001mg/kg、約0.3mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kg、約80mg/kg、約85mg/kg、約90mg/kg、約95mg/kgまたは約100mg/kg、1日あたり1回または複数回）の治療上有効投与量で投与され得る。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、約50mg/kg以下の投与量で投与され、ある特定の実施形態では、投与量は、20mg/kg以下、10mg/kg以下、3mg/kg以下、1mg/kg以下、0.3mg/kg以下、0.1mg/kg以下または0.01mg/kg以下または0.001mg/kg以下である。ある特定の実施形態では、投与の投与量は、処置の過程にわたって変化し得る。例えば、ある特定の実施形態では、最初の投与の投与量は、その後の投与の投与量よりも高い場合がある。ある特定の実施形態では、投与の投与量は、対象の反応次第で処置の過程にわたって変わる場合がある。

【0110】

投与計画は、最適な所望の反応（例えば、治療的反応）を提供するように調整できる。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される融合タンパク質は、一度で、または一連の処置にわたって対象に投与される。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される融合タンパク質は、1回もしくは複数回の別個の投与によって、または疾患の種類および重症度に応じて連続注入によって対象に投与される。

【0111】

本明細書において提供される融合タンパク質は、当技術分野で公知の任意の経路、例えば、非経口（例えば、皮下、腹腔内、静脈内注入を含む静脈内、筋肉内または皮内注射）または非経口ではない（例えば、経口、鼻腔内、眼球内、舌下、直腸または局所）経路などによって投与され得る。

【0112】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるその融合タンパク質は、制御放出法で投与され得る。制御放出非経口調製物は、インプラント、油性注射剤または特定の系（例えば、ミクロスフェア、微粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノスフェアおよびナノ粒子）として作製できる（Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995); Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., pp. 219-342 (1994); Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A.

K y d o n i e u s , e d . , M a r c e l D e k k e r , I n c . N e w Y o r k , N . Y . , p p . 3 1 5 - 3 3 9 , (1 9 9 2) を参照されたい)。ある特定の実施形態では、本明細書において開示される融合タンパク質は、分解可能または非分解可能ポリマーマトリックス中で投与され得る (L a n g e r , A c c o u n t s C h e m . R e s . 2 6 : 5 3 7 - 5 4 2 , 1 9 9 3 を参照されたい)。

【0113】

一部の実施形態では、本明細書において提供される融合タンパク質は、単独で、または1つもしくは複数のさらなる治療薬もしくは手段と組み合わせて投与され得る。例えば、本明細書において提供される融合タンパク質は、第2の療法、例えば、放射線療法、化学療法、標的化療法、遺伝子療法、免疫療法、ホルモン療法、血管新生阻害、緩和ケア、腫瘍の処置のための手術（例えば、腫瘍摘出）、1つもしくは複数の制吐剤または化学療法に起因する合併症のための他の処置または腫瘍もしくは任意の医学的障害の処置において使用するための第2の治療薬、例えば、別の抗体、治療用ポリヌクレオチド、化学療法薬（複数可）、抗血管新生剤、サイトカイン、他の細胞傷害性薬剤（複数可）、成長阻害剤（複数可）と組み合わせて投与され得る。これらの実施形態のある特定のものでは、本明細書において提供される融合タンパク質は、1種または複数のさらなる治療薬と同時に投与され得る、これらの実施形態のある特定のものでは、融合タンパク質およびさらなる治療薬（複数可）は、同一医薬組成物の一部として投与され得る。しかし、別の治療薬と「組み合わせて」投与される融合タンパク質は、薬剤と同時に、または同一組成物中で投与されなくてもよい。別の薬剤より前にまたは後に投与される融合タンパク質は、融合タンパク質および第2の薬剤が異なる経路によって投与される場合であっても、その語句が本明細書において使用されるようにその薬剤と「組み合わせて」投与されることが考えられる。可能であれば、本明細書において提供される融合タンパク質と組み合わせて投与されるさらなる治療薬は、さらなる治療薬の製品情報シートに列挙されたスケジュールに従って、またはPhysicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) もしくは当技術分野で周知のプロトコールに従って投与される。

【実施例】

【0114】

特許請求される本発明を良好に例示するために以下の例を提供するが、本発明の範囲を制限すると解釈されてはならない。以下に記載されるすべての特定の組成物、材料および方法は、全体でまたは一部で、本発明の範囲内にある。これらの特定の組成物、材料および方法は、本発明を制限するように意図されるものではなく、単に、本発明の範囲内の特定の実施形態を例示する。当業者ならば、発明的能力を行使することなく、本発明の範囲から逸脱することなく同等の組成物、材料および方法を開発できる。依然として本発明の境界内でありながら、本明細書に記載される手順において多数の変動を行うことができるということは理解されよう。このような変動は本発明の範囲内に含まれるということは、本発明者らの意図である。

【実施例1】

【0115】

この実施例は、抗体-I L-10 融合タンパク質の生成およびin vitroでのその機能の試験を示す。

【0116】

抗体-I L-10 融合タンパク質のリストを、それぞれ、抗ヒトPD-1 7A4D (Quiet al. のUS10, 428, 146を参照されたい) および抗ヒトPD-L1抗体5G11 (Zha et al. のUS10, 435, 470を参照されたい) をベースとして設計した。抗体-I L-10 融合タンパク質を、一過性トランスフェクションによってCHO細胞において発現させ、親和性精製した。I L-10 部分を、対応す

る抗体の重鎖または軽鎖いずれかのC末端に（G G G G S G G G G S（配列番号15））のリンカーを介して連結した。表1で示されるように、各抗体-I L -10融合タンパク質の発現収量は、対応する抗体のものと同様であった。

【0117】

さらに、各抗体-I L -10融合タンパク質の対応する標的への結合動態および結合親和性を、B i a c o r e分析によって測定した。K a、K dおよびK_D値は、抗体と抗体-I L -10融合タンパク質の間で融合形式に関わらず同様であった。

【0118】

【表1】

表1. 抗ヒトPD-1抗体7A4Dおよび抗ヒトPD-L1抗体5G11をベースとする抗体-IL-10融合タンパク質の結合動態の特性決定

タンパク質 の名称	抗体の 標的	IL-10 融合形式	発現 力価 (mg/L)	標的に対する結合動態			
				Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (nM)	chi ²
7A4D	PD-1	N/A	25	9.74E+05	8.06E-04	0.83	0.234
7A4D-HC- rhIL10	PD-1	重鎖 C末端	14	8.78E+05	8.18E-04	0.93	0.442
7A4D-LC- rhIL10	PD-1	軽鎖 C末端	55	9.44E+05	8.23E-04	0.87	0.301
5G11	PD-L1	N/A	23	2.65E+06	7.79E-04	0.29	0.407
5G11-HC- rhIL10	PD-L1	重鎖 C末端	23	2.75E+06	7.60E-04	0.28	0.218
5G11-LC- rhIL10	PD-L1	軽鎖 C末端	29	2.82E+06	7.75E-04	0.27	0.163

【0119】

B i a c o r e分析のために、抗ヒトI g G F c二次抗体を、酢酸ナトリウムバッファ、pH 5.0を用いて25 μg/mLに希釈し、アミンカップリングキットを使用してCM5チップ上の参照および試験チャンネルの両方の上に固定化した。各抗体または抗体-I L -10融合タンパク質を、ランニングバッファを用いて1~3 μg/mLに希釈し、予め固定されたCM5チップの異なるチャンネル上に10 μl/分の流量で60秒間捕捉した。2倍の段階希釈で3.125から100 nMの間の濃度のHBS-EPバッファ中の組換えヒトPD-1またはPD-L1抗原を30 μl/分の流量で流すことによって結合を測定した。会合時間および解離時間は、それぞれ90秒および400秒で設定した。測定された親和性データをB i a c o r e T200評価ソフトウェア3.1を使用して1:1ラングミュア結合モデルにフィッティングした。

【0120】

図9Aおよび9Bに示されるように、7A4Dおよび5G11抗体の両方とも、PD-L1-PD-1経路を遮断し、CD4+エフェクターT細胞のIFN-γおよびIL-2分泌を誘導した。IL-10部分がI g重鎖または軽鎖C末端に連結されているいずれかの抗体をベースとする抗体-I L -10融合タンパク質は、同一効果を誘発した。各抗体および対応する抗体-I L -10融合タンパク質は、同様の方法でサイトカイン産生の用量依存的誘導を示し、これは、IL-10の抗体への連結が、7A4Dおよび5G11抗体の機能に対して最小の影響しか有さないことを示唆した。

【0121】

本発明者らは、抗体-I L -10融合タンパク質が、免疫細胞増殖を誘導するというIL-10活性を保持するか否かをさらに試験した。MC/9細胞へのIL-10投与は、

用量依存的な細胞増殖につながる。96ウェルマイクロタイタープレートで、組換えヒトIL-10 (rIL-10) または各抗体-IL-10融合タンパク質を指定された最終濃度まで補給した、100 μ lの培地中の 2.5×10^4 個MC/9細胞を各ウェルに入れた。rIL-10または融合タンパク質の最大濃度は、5,260 pmol/Lとした。37℃、5%CO₂で48時間後、各アッセイウェルにCellTiter 96 (登録商標) Aqueous One 溶液 (Promega) を添加し、490 nmの吸光度で細胞数を測定した。補給濃度対OD 490 nmのフィッティングされた曲線からEC50を算出した。

【0122】

図10に示されるように、抗PD-1抗体7A4Dの、軽鎖ではなく、Ig重鎖C末端に連結されたIL-10は、MC/9細胞増殖を強く誘導し、ヒトIL-10と同様のEC50を示した。同様に、抗PD-L1抗体5G11の重鎖または軽鎖のC末端に連結されたIL-10は、MC/9細胞増殖を強く誘導し、ヒトIL-10と同様のEC50を示した。

【実施例2】

【0123】

この実施例は、同系マウス腫瘍モデルにおける抗体-IL-10融合タンパク質のin vivo治療効力を評価する。融合タンパク質を、ラット抗マウスPD-L1モノクローナル抗体10F.9G2をベースとして設計し、一過性トランスフェクションによってCHO細胞において発現させ、親和性精製した。抗体10F.9G2は、IgG2a、 κ -アイソタイプのものであり、融合タンパク質は、Ig重鎖のC末端で融合されたマウスIL-10部分を含有する。10F.9G2抗体と比較した、抗体-IL-10融合タンパク質の発現収量が、表2に列挙されている。

【0124】

【表2】

表2.抗マウス-PD-L1抗体-IL-10融合タンパク質の発現収量

タンパク質名	培養容量(ml)	最終収量(mg)	発現力価 (mg/L)
10F.9G2 (コンジュゲート されていない)	200	27.265	136
10F.9G2-HC-mIL-10	600	32.88	55

【0125】

マウス腫瘍細胞株A20およびCT26は、PD-L1を表面上に、それぞれ極めて高レベルおよび低レベルで発現する。抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体および抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体-HC-mIL-10融合タンパク質を、R-フィコエリトリンコンジュゲーションキット (Abcam) を使用して各々PEで標識した。染色の前に、A20およびCT26細胞を、1 μ g/mLのマウスBD Fc Block (BD Biosciences) を用いて4℃で5分間処理した。指定されたとおりの種々の量のPE標識されたタンパク質を使用して、処理された細胞を100 μ lの総容量で染色した。染色された細胞をLSRFortessa X-20フローサイトメーターで分析した。

【0126】

図11に示されるように、抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体-HC-mIL-10融合タンパク質は、A20細胞の用量依存的な染色を示し、これは、抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体と同様のPD-L1の高発現を有する。PD-L1を不十分にしか発現しないCT26細胞については、抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体と抗PD-L1 (10F.9G2) 抗体-HC-mIL-10融合タンパク質の両方とも、多量の標識され

たタンパク質（ $2.5 \mu\text{g}$ ）が使用された場合に中程度の細胞染色を示した。これらのデータは、IL-10の融合が、抗マウスPD-L1抗体のその標的への結合に対してほとんど影響を有さないことを示唆する。

【0127】

いくつかの同系マウス腫瘍モデルを使用して、コンジュゲートされていない抗PD-L1（10F.9G2）抗体および媒体対照と比較して、抗PD-L1（10F.9G2）抗体-HC-mIL-10融合タンパク質の治療効力を評価できる。このようなモデルは、CT26、A20、Hepa1-6、MBT-2、B16-F10腫瘍細胞株を使用して確立されたものを含む。

【0128】

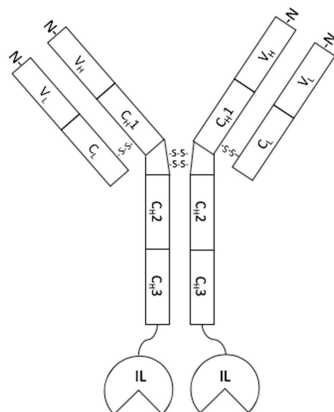
CT26同系腫瘍モデルについて、 5×10^5 個のCT26腫瘍細胞を、雌のBALB/cマウスの右後側腹部領域で皮下注射した。腫瘍を $100 \sim 250 \text{ mm}^3$ の大きさに到達させ、その後、処置を開始した。各処置群について、8個体のマウスを使用し、異なる群にわたる個々のマウスにおける腫瘍体積の変動を極めて同様に維持した。処置のために、抗PD-L1（10F.9G2）抗体（ 6 mg/kg 、 $10 \mu\text{l/g}$ ）、抗PD-L1（10F.9G2）抗体-HC-mIL-10融合タンパク質（ 7 mg/kg 、 $10 \mu\text{l/g}$ ）または媒体のみ（PBSバッファ、 $10 \mu\text{l/g}$ ）対照を、1週間に2回の頻度で2週間、腫瘍から遠位の部位で腹腔内投与した。各投与後、腫瘍成長を電子ノギスを使用して週に2～3回モニタリングした。さらに、CD45、CD4、CD8およびF4/80を含むいくつかの炎症性細胞マーカーで免疫組織化学を実施するために、指定された実験エンドポイントで腫瘍組織を回収した。

【0129】

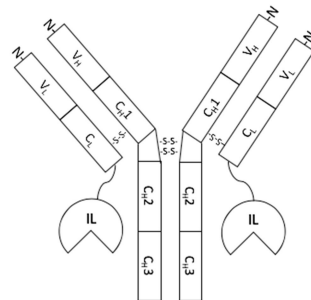
図12に示されるように、全身処置後、抗PD-L1（10F.9G2）抗体-HC-mIL-10融合タンパク質は、中程度の抗腫瘍効果しか示さなかった抗PD-L1（10F.9G2）抗体よりも、より明白な腫瘍成長阻害につながったが、媒体対照群では連続腫瘍成長が観察された。さらに、処置群のすべてのマウスにおいて明らかな体重減少は観察されなかったが、これは、抗体単独または抗体-I L-10融合タンパク質を使用することによって誘発される全身毒性がほとんどないことを示唆する。

【図面】

【図1】



【図2】



10

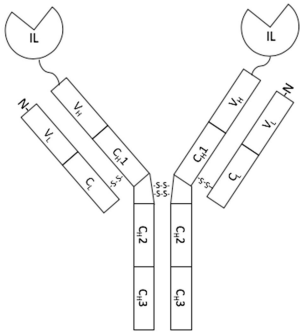
20

30

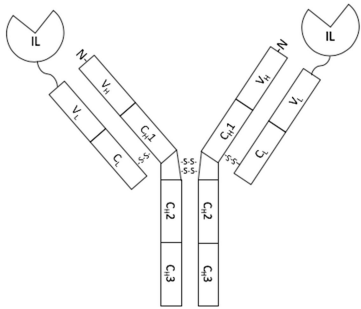
40

50

【図 3】

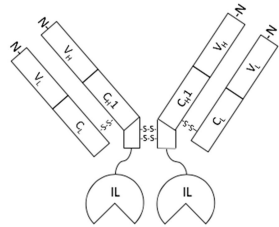


【図 4】

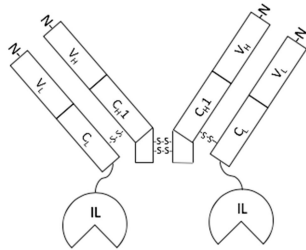


10

【図 5】

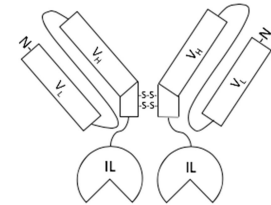


【図 6】

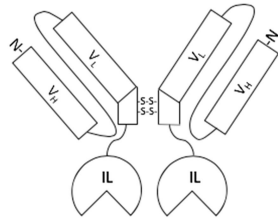


20

【図 7】



【図 8】

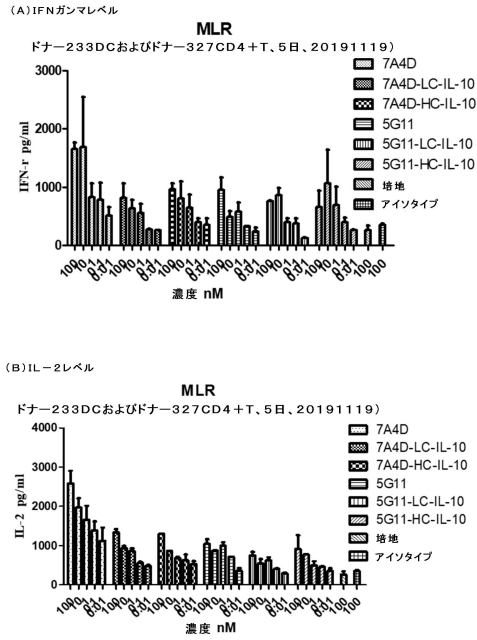


30

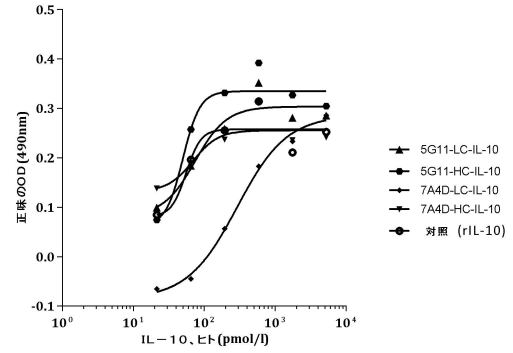
40

50

【図 9】

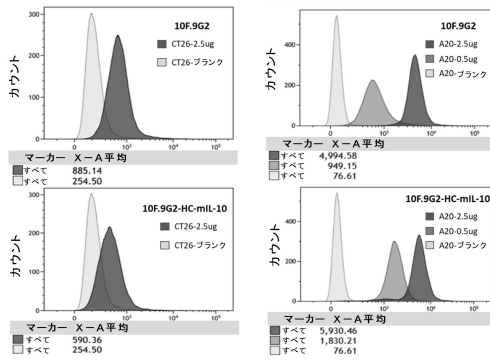


【図 10】

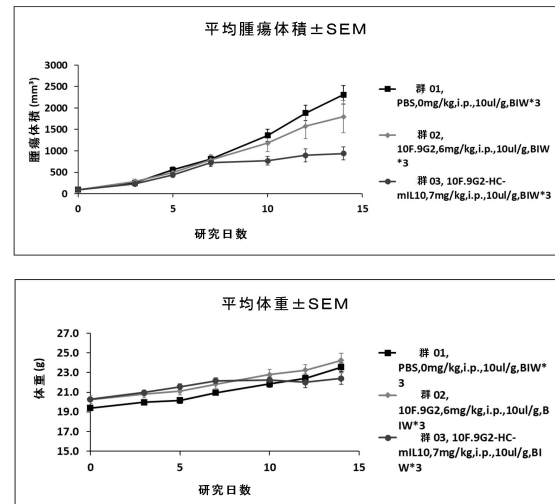


10

【図 11】



【図 12】



20

30

40

50

【配列表】

2022537515000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/095354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395(2006.01)i; C07K 14/54(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS;TWABS;SIPOABS;HKABS;MOABS;KRABS;JPABS;DWPI;EPTXT;USTXT;WOTXT;JPTXT;KRTXT;CNTXT; TWXT;CNKI;WANFANG DATABASE;BAIDU;PUBMED;ELSEVIER;ISI WEB OF KNOWLEDGE;SPRINGER; SCIEDIRECT;PD-1,PD-L1,PD1,PDL1,immune checkpoint protein,CD279,programmed cell death protein 1,antibody, heavy chain,light chain,Interleukin-10,il-10,il10,il 10,Interleukin 10,Interleukin,Fusion Protein,antibody-cytokine fusion protein, apolomics,Yang lan,Yu guoliang,Shi qian,Fei zhongwei,Ma biao		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, H. et al. "Interleukin-10: An Immune-Activating Cytokine in Cancer Immunotherapy." <i>Journal Of Clinical Oncology</i> , Vol. 34, No. 29, 10 October 2016 (2016-10-10), Figure 1, page 3577	1-22
X	WANG, Y. et al. "Autocrine Complement Inhibits IL10-Dependent T-cell-Mediated Antitumor Immunity to Promote Tumor Progression." <i>CANCER DISCOVERY</i> , Vol. 6, No. 9, 13 June 2016 (2016-06-13), Abstract	1-22
X	PELLERIN, L. et al. "APVO210: A Bispecific Anti-CD86-IL-10 Fusion Protein (ADAPTIR™) to Induce Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells." <i>Front. Immunol.</i> , Vol. 9, 25 May 2018 (2018-05-25), Abstract	1-22
X	WO 2010/040105 A2 (TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.) 08 April 2010 (2010-04-08) Claims 1-35	1-22
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 August 2020		15 September 2020
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		HAO,Jia
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-53961967

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/095354

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/070060 A1 (ARMO BIOSCIENCES, INC.) 14 May 2015 (2015-05-14) Claims 1-44	1-22
Y	WO 2015/117930 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 13 August 2015 (2015-08-13) Claims 1-52	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/095354

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18-22**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 18-22 relate to a method for treating a disease in a subject in need thereof, and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search is still carried out on basis of use of a pharmaceutical composition in manufacturing a medicament for treating a disease in a subject in need thereof.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/095354

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2010/040105	A2	08 April 2010	DK	2344540	T3	29 January 2018
				AU	2018203491	A1	07 June 2018
				KR	20190064664	A	10 June 2019
				KR	101900953	B1	21 September 2018
				AU	2016208322	A1	11 August 2016
				CY	1119874	T1	27 June 2018
				EP	2344540	B1	29 November 2017
				US	2017015747	A1	19 January 2017
				CA	2739460	A1	08 April 2010
				US	2012100139	A1	26 April 2012
				ES	2657220	T3	02 March 2018
				JP	2019014757	A	31 January 2019
				HR	P20180045	T1	23 March 2018
				SI	2344540	T1	30 April 2018
				JP	2016188249	A	04 November 2016
				CA	2739460	C	21 May 2019
				NO	2344540	T3	28 April 2018
				JP	2012504425	A	23 February 2012
				AU	2014203429	A1	10 July 2014
				MX	338825	B	03 May 2016
				LT	2344540	T	26 March 2018
				CN	107056951	A	18 August 2017
				KR	20110074895	A	04 July 2011
				AU	2009298131	B2	14 July 2016
				KR	20180105731	A	28 September 2018
				EP	2344540	A2	20 July 2011
				JP	5840494	B2	06 January 2016
				EP	3281955	A1	14 February 2018
				JP	6521915	B2	29 May 2019
				MX	2011003611	A	10 May 2011
				KR	20160120812	A	18 October 2016
				ZA	201102637	B	28 September 2016
				EA	024877	B1	31 October 2016
				CN	102227447	A	26 October 2011
				WO	2010040105	A3	03 June 2010
				US	9493564	B2	15 November 2016
				PT	2344540	T	02 February 2018
				EA	201170443	A1	30 December 2011
				NZ	592420	A	21 December 2012
				AU	2009298131	A1	08 April 2010
				PL	2344540	T3	30 May 2018
				CA	3038442	A1	08 April 2010
				KR	20170091801	A	09 August 2017
				JP	2014239700	A	25 December 2014
WO	2015/070060	A1	14 May 2015	ZA	201602839	B	27 September 2017
				MX	2016005915	A	16 December 2016
				BR	112016010166	A2	05 December 2017
				US	2016243196	A1	25 August 2016
				AU	2014346537	A1	19 May 2016
				RU	2016122957	A	19 December 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/095354

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				CA	2928710	A1		14 May 2015	
				EP	3068425	A1		21 September 2016	
				JP	2016537340	A		01 December 2016	
				IL	245303	D0		30 June 2016	
				EP	3068425	A4		17 May 2017	
				JP	6660297	B2		11 March 2020	
				CN	105848674	A		10 August 2016	
				KR	20160079114	A		05 July 2016	
				PH	12016500840	A1		11 July 2016	
WO	2015/117930	A1	13 August 2015	RU	2016135788	A3		12 October 2018	
				TW	201613954	A		16 April 2016	
				CN	106061997	A		26 October 2016	
				EP	3102594	A1		14 December 2016	
				JP	2020089371	A		11 June 2020	
				BR	112016016658	A2		23 January 2018	
				JP	2017506075	A		02 March 2017	
				MX	2016010174	A		15 November 2016	
				RU	2016135788	A		07 March 2018	
				CA	2935665	A1		13 August 2015	
				US	2015218244	A1		06 August 2015	
				KR	20160117463	A		10 October 2016	
				AR	099288	A1		13 July 2016	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	38/20	
C 1 2 N	15/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
			C 1 2 N	15/24	

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

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(74)代理人 100204582

弁理士 大栗 由美

(72)発明者 ヤン, ラン

中華人民共和国 3 1 1 2 0 0 チェーチャン, ハンジョウ, シャオシャン ディストリクト, トン
ヒジョン ロード 1 1 8

(72)発明者 ユ, グオリャン

アメリカ合衆国 8 9 4 5 1 ネバダ州, インクライン ヴィレッジ, # 7 9 3 9, アポロ ウェイ
9 9 9

(72)発明者 シ, キアン

中華人民共和国 3 1 1 2 0 0 チェーチャン, ハンジョウ, シャオシャン ディストリクト, トン
ヒジョン ロード 1 1 8

(72)発明者 フェイ, ゾンウェイ

中華人民共和国 3 1 1 2 0 0 チェーチャン, ハンジョウ, シャオシャン ディストリクト, トン
ヒジョン ロード 1 1 8

(72)発明者 マ, ビャオ

中華人民共和国 3 1 1 2 0 0 チェーチャン, ハンジョウ, シャオシャン ディストリクト, トン
ヒジョン ロード 1 1 8

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44

4C076 AA94 CC07 CC27 CC41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA07 BA41 DA12 MA66 NA05 NA14 ZA021 ZA022

ZA331 ZA332 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZA961 ZA962 ZB071
ZB072 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC351 ZC352

F ターム (参考)

4C085 AA14 AA21 AA25 BB11 BB43 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA02 DA76 EA28 FA74