

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7630426号
(P7630426)

(45)発行日 令和7年2月17日(2025.2.17)

(24)登録日 令和7年2月6日(2025.2.6)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46 Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 33 (全240頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-522945(P2021-522945)	(73)特許権者	519288755
(86)(22)出願日	令和1年10月23日(2019.10.23)		ドラゴンフライ セラピューティクス、
(65)公表番号	特表2022-505871(P2022-505871 A)		インコーポレイテッド
(43)公表日	令和4年1月14日(2022.1.14)		アメリカ合衆国0 2 4 5 1マサチューセ
(86)国際出願番号	PCT/US2019/057721		ッツ州ウォルサム、サード・アベニュー
(87)国際公開番号	WO2020/086758	(74)代理人	1 8 0、シックスス・フロア
(87)国際公開日	令和2年4月30日(2020.4.30)		100145403
審査請求日	令和4年10月19日(2022.10.19)	(74)代理人	弁理士 山尾 憲人
(31)優先権主張番号	62/788,499	(74)代理人	100122301
(32)優先日	平成31年1月4日(2019.1.4)		弁理士 富田 憲史
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100170520
(31)優先権主張番号	62/781,898		弁理士 笹倉 真奈美
(32)優先日	平成30年12月19日(2018.12.19)	(72)発明者	アン・エフ・チョン
最終頁に続く			アメリカ合衆国0 1 7 7 3マサチューセ
			ッツ州リンカーン、モーニングサイド・
			最終頁に続く
(54)【発明の名称】 ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質			

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)第一ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドおよびヒト I L - 1 2 の p 4 0 サブユニットを含む第一ポリペプチド、および

(b)第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドおよびヒト I L - 1 2 の p 3 5 サブユニットを含む第二ポリペプチド、

を含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

(i) 第一ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドは、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、変異 Y 3 4 9 C、K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含み、

(i i) 第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドは、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、変異 Q 3 4 7 R、S 3 5 4 C、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み；

(i i i) 第一および第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドの各々は E U ナンバリングシステムにより番号付けして、F c のエフェクター機能を低減させる変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A、または L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 G を含み；

(i v) 第一および第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドの各々は、配列番号 2 1 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一性を有し；そして

(v) ヒト I L - 1 2 の p 4 0 サブユニットおよび p 3 5 サブユニットが互いに結合しているものである、

ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 2】

ヒト I L-12 の p 40 サブユニットがリンカーによって第一ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドに融合されている、請求項 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 3】

リンカーがアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 239) を含む、請求項 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 4】

ヒト I L-12 の p 35 サブユニットがリンカーによって第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドに融合されている、請求項 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 5】

リンカーがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 10) を含む、請求項 4 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 6】

(a) ヒト I L-12 の p 40 サブユニットがアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 239) を含むリンカーによって第一ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドに融合されている、および

(b) ヒト I L-12 の p 35 サブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 10) を含むリンカーによって第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドに融合されている、
請求項 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 7】

第一ポリペプチドが配列番号 290 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 8】

第二ポリペプチドが配列番号 291 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 10】

エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害(A D C C)、抗体依存性細胞食作用(A D C P) および／または補体依存性細胞傷害(C D C)を誘導する F c の能力を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 11】

ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質がフコシル化されている、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【請求項 12】

ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドおよびヒト I L-12 の p 40 サブユニットを含むポリペプチドをコードする、核酸であって、ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドが：

(a) E U ナンバリングシステムにより番号付けして、変異 Y 349 C、K 360 E および K 409 W を；

(b) E U ナンバリングシステムにより番号付けして、F c のエフェクター機能を低減させる変異 L 234 A、L 235 A および P 329 A、または L 234 A、L 235 A および P 329 G を；および

(c) 配列番号 212 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一で含む、核酸。

【請求項 13】

ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドおよびヒト I L-12 の p 35 サブユニット

10

20

30

40

50

を含むポリペプチドをコードする、核酸であって、ヒト IgG1 Fcドメインポリペプチドが：

(a) EUナンバリングシステムにより番号付けして、変異 Q347R、S354C、D399V および F405T を；

(b) EUナンバリングシステムにより番号付けして、Fc のエフェクター機能を低減させる変異 L234A、L235A および P329A、または L234A、L235A および P329G を；および

(c) 配列番号 212 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一で含む、核酸。

【請求項 14】

(a) ヒト IL-12 の p40 サブユニットがアミノ酸配列 PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (配列番号 239) を含むリンカーによってヒト IgG1 Fcドメインポリペプチドに融合されている、および／または

(b) ヒト IL-12 の p35 サブユニットがアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (配列番号 10) を含むリンカーによってヒト IgG1 Fcドメインポリペプチドに融合されている、

請求項 12 または 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

核酸が、配列番号 290 または配列番号 291 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項 12 ～ 14 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 16】

配列番号 290 または配列番号 291 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸。

【請求項 17】

請求項 12 ～ 16 のいずれか一項に記載の核酸を含む、1 つ以上の発現ベクター。

【請求項 18】

配列番号 290 または配列番号 291 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む、製剤。

【請求項 20】

製剤が、静脈内、皮下、腹腔内、または腫瘍内投与に適している、請求項 19 に記載の製剤。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質をコードする 1 以上の核酸を含む、細胞。

【請求項 22】

請求項 12 ～ 16 のいずれか一項に記載の 1 以上の核酸または請求項 17 または 18 に記載の 1 以上の発現ベクターを含む、細胞。

【請求項 23】

癌または急性放射線症候群を処置するために使用される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 24】

急性放射線症候群が造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群、皮膚放射線症候群およびその何れかの組み合わせから選択される 1 以上の症候群を含む、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の医薬組成物であって、

(a) 癌が、T 細胞リンパ腫、B 細胞リンパ腫、汎発性大 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ

10

20

30

40

50

腫、乳癌、結腸直腸癌、膵臓癌、急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、膀胱癌、食道癌、ユーイング肉腫、胃癌、消化器癌、消化器間質腫瘍、神経膠芽腫、頭頸部癌、子宮頸癌、肝細胞癌腫(HCC)、メルケル細胞癌腫(MCC)、皮膚癌、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、腎臓細胞癌腫、神経芽腫、非小細胞肺癌、神経内分泌腫瘍、卵巣癌、前立腺癌、肉腫、小細胞肺癌、精巣癌、胸腺癌腫、甲状腺癌、尿路上皮癌、骨髄由来サプレッサー細胞により浸潤された癌、細胞外マトリックス沈着を伴う癌、高レベルの反応性間質を伴う癌および新血管新生を伴う癌からなる群から選択される；および／または

(b) 癌が転移性癌であり、ここで転移性癌は局所、領域性、または遠隔転移性癌である、医薬組成物。

10

【請求項 2 6】

- (a) チェックポイント阻害剤、
- (b) サイトカイン、
- (c) TLRアゴニスト、
- (d) STINGアゴニスト、
- (e) パクリタキセル、ナブパクリタキセル、ドキソルビシン、ゲムシタビン、およびシクロホスファミドからなる群から選択される、化学療法剤、
- (f) 癌標的剤、
- (g) 腫瘍溶解性ウイルス、
- (h) ワクチン、
- (i) 照射、
- (j) 養子NK治療、
- (k) 幹細胞移植(SCT)治療、
- (l) アゴニスト抗体、
- (m) キメラ抗原受容体(CAR)T細胞治療、
- (n) 多特異的結合タンパク質(Trinket)、および
- (o) 細胞老化を誘導する薬剤、

20

から選択される第二治療剤をさらに含む、請求項 2 3～2 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

30

- (a) チェックポイント阻害剤が：
 - (i) 抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗KIR抗体、抗NKG2A抗体、抗LAG3抗体および抗TIM3抗体；または
 - (ii) ニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、リリルマブおよびモナリズマブ、から選択される；
 - (b) サイトカインがIL-2、IL-15、CXCL9およびCXCL10から選択される；
 - (c) TLRアゴニストが：
 - (i) TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、TLR7/8アゴニスト、TLR9アゴニスト、TLR4アゴニストおよびTLR3アゴニスト；または
 - (ii) R848/レシキモド、VTX-2337、イミキモドおよびCpGオリゴデオキシヌクレオチド、から選択される；
 - (d) STINGアゴニストがADU-S100である；および
 - (e) アゴニスト抗体が抗4-1BB/CD137抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗GITR抗体および抗CD27抗体から選択される、
- 請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 2 8】

チェックポイント阻害剤が、抗PD1抗体である、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 29】

Trinketが：

(i) NKG2Dに結合する第一抗原結合部位；

(ii) 腫瘍関連抗原に結合する第二抗原結合部位；および

(iii) CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメインもしくはその一部またはCD16に結合する第三抗原結合部位、を含む、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

腫瘍関連抗原がEpCAM、CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4およびPD-L1からなる群から選択される、請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

患者に静脈内、皮下、腹腔内または腫瘍内投与されるために調製された、請求項23～30のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

癌または急性放射線症候群の患者を処置するために使用される医薬組成物の製造のための、請求項1～11のいずれか一項に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

【請求項 33】

(a) 請求項1～11のいずれか一項に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを細胞に導入するステップ；および

(b) ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現させるのに十分な期間、細胞を培養するステップ、を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質、または請求項19または20に記載の製剤を製造する方法。

【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、2018年10月23日出願の米国仮特許出願62/749,489、2018年12月19日出願の米国仮特許出願62/781,898、2019年1月04日出願の米国仮特許出願62/788,499、2019年4月01日出願の米国仮特許出願62/827,347および2019年9月04日出願の米国仮特許出願62/895,889に対する利益および優先権を主張し、これらの開示は、全体としてすべての目的のために引用により本明細書に包含させる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提供され、全体として引用により本明細書に包含させる配列表を含む。該ASCIIコピーは2019年10月22日に作成し、DFY-063WO_SL.txtなる名称であり、サイズは946,355バイトである。

【0003】

発明の分野

本発明は、一般にヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびこのようなタンパク質を含む医薬組成物およびヒト患者における疾患または障害の処置における使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

生理学的に活性なタンパク質は、大部分はインビボ半減期が短いとの欠点を有する。この欠点を解決するために、PEG(ポリエチレングリコール)などとコンジュゲートさせる

10

20

30

40

50

または抗体Fc(結晶性フラグメント)領域と融合させることが試みられている。2以上の異なるサブユニットからなり、該2以上の異なるサブユニットが生理学的活性を発揮するためにタンパク質複合体を形成するタンパク質を、Fcのホモ二量体性によりホモ二量体を形成する、Fc融合タンパク質形態を調製するために野生型Fcドメインと融合させ得る。2以上の異なるサブユニットからなり、該2以上の異なるサブユニットが生理学的活性を発揮するためにタンパク質複合体を形成するタンパク質を、また、IgG1だけでなく、IgG2、IgG3およびIgG4などの他のアイソタイプ抗体にも由来するヘテロ二量体Fc領域と融合させて、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を形成させ得る。故に、2以上の異なるサブユニットからなり、2以上のサブユニットがタンパク質複合体を形成することにより生理学的活性を発揮するタンパク質の1以上のサブユニットを、ヘテロ二量体Fcバリエーション領域の末端に融合させて、改善されたFc融合タンパク質形態を形成し得る。

10

【0005】

Fcヘテロ二量体化は、2つのFcフラグメントが、天然に存在する抗体と極めて類似する三次(tertiary)構造を有しながら、配列変動が最小のヘテロ二量体を形成するように、遺伝子操作により2つの異なるCH3ドメインのFcに変異を導入する技術である(例えば、米国特許7,695,936参照)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

20

本明細書に記載する本発明は、種々の長さのリンカーの導入またはFcのCH2およびCH3ドメインにおける変異により、ヘテロ二量体タンパク質の2つのサブユニットが異なるヘテロ二量体化ドメインを有する2つのFcドメインに結合されている、Fc融合タンパク質形態を改善するための設計を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

概要

本発明は、一般にヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびこのようなタンパク質を含む医薬組成物に関する。

【0008】

30

ある態様において、本発明は、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを含む第一ポリペプチド；および第二抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質であって、ここで、第一および第二抗体Fcドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、ここで、第一および／または第二抗体FcドメインポリペプチドはFcのエフェクター機能を低減させる1以上の変異を含み、そして、ここで多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットは互いに結合している、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供する。

【0009】

40

ある実施態様において、エフェクター機能は、Fcドメインポリペプチドが抗体依存性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)および／または補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導する能力を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体Fcドメインポリペプチドは、ヒト抗体Fcドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体Fcドメインポリペプチドは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgDまたはIgE Fcドメインポリペプチド(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgDまたはIgE Fcドメインポリペプチド)である。ある実施態様において、第一および／または第二抗体Fcドメインポリペプチドは、EUナンバリング下、233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330および／または331の位置に1

50

以上の変異を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質はフコシル化されている。

【0010】

ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、ヒト Ig G 1 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、EUナンバリング下、234、235、237、329、330および／または331の位置に1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドはL234A、L235A、L235E、G237A、P329A、A330SおよびP331Sから選択される1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異L234AおよびL235Aを含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異L234A、L235AおよびP329Aを含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331Sを含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異C220Sを含む。

【0011】

ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、ヒト Ig G 4 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、EUナンバリング下、235および／または329の位置に1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドはL235EおよびP329Aから選択される1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異L235Eを含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異L235EおよびP329Aを含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々変異S228Pを含む。

【0012】

他の態様において、本発明は、配列番号290のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号291のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を提供する。

【0013】

さらに他の態様において、本発明は多サブユニットサイトカインのサブユニットおよび免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、F c ドメインポリペプチドは、異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する変異および F c のエフェクター機能を低減させる1以上の変異を含む。例えば、変異を含む F c ドメインポリペプチドは、ヒト Ig G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドであり得る。

【0014】

ある実施態様において、F c のエフェクター機能を低減させる1以上の変異は、EUナンバリングシステムにより番号付けして、L234A、L235AまたはL235E、G237A、P329A、A330SおよびP331Sから選択される。例えば、ある実施態様において、F c のエフェクター機能を低減させる変異は、EUナンバリングシステムにより番号付けして、L234A、L235AおよびP329Aである。

【0015】

ある実施態様において、ヘテロ二量体化を促進する変異は、EUナンバリングシステムにより番号付けして、K360EおよびK409Wである。ある他の実施態様において、ヘテロ二量体化を促進する変異は、EUナンバリングシステムにより番号付けして、Q347R、D399VおよびF405Tである。

【0016】

ある実施態様において、F c ドメインポリペプチドは、さらに異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのジスルフィド結合形成を促進する変異を含む。例えば、ヘテ

ロニ量体化変異がK 3 6 0 EおよびK 4 0 9 Wであるとき、ある実施態様において、ジスルフィド結合形成を促進する変異は、E Uナンバリングシステムにより番号付けして、Y 3 4 9 Cである。ヘテロニ量体化変異がQ 3 4 7 R、D 3 9 9 VおよびF 4 0 5 Tであるとき、ある実施態様において、ジスルフィド結合形成を促進する変異は、E Uナンバリングシステムにより番号付けして、S 3 5 4 Cである。

【0017】

例えば、ある実施態様において、多サブユニットサイトカインのサブユニットおよび免疫グロブリンFcドメインポリペプチドを含むポリペプチドは、配列番号290または配列番号291のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。

【0018】

他の態様において、本発明は、配列番号290または配列番号291のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。さらに他の態様において、本発明は、配列番号290または配列番号291のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む発現ベクターを提供する。ある態様において、本発明は、配列番号290または配列番号291のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸または配列番号290または配列番号291のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む発現ベクターを含む細胞を提供する。

【0019】

他の態様において、本発明は、免疫グロブリンFcの第一Fcドメインポリペプチドおよび第二の異なるFcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットを含むヘテロニ量体Fc融合タンパク質であって、ここで、第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合しており、第一Fcドメインポリペプチドおよび／または第二の異なるFcドメインポリペプチドのN末端またはC末端の1以上の末端に結合しており；ここで、第一Fcドメインポリペプチドおよび第二Fcドメインポリペプチドがヘテロニ量体Fc形成を促進し、かつFcのエフェクター機能を低減するように変異されているものを提供する。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質はIL-12(例えば、ヒトIL-12)であり、ヘテロニ量体Fc融合タンパク質において、IL-12のp35およびp40サブユニットが互いに結合しており、第一Fcドメインポリペプチドおよび／または第二FcドメインポリペプチドのN末端またはC末端の1以上の末端に結合しており；ここで、第一Fcドメインポリペプチドおよび第二Fcドメインポリペプチドがヘテロニ量体Fc形成を促進し、かつFcのエフェクター機能を低減するように変異されている。

【0020】

ある態様において、本発明は、第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合した第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含み、ここで、第一ポリペプチドは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)を含むリンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをさらに含み(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)；多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、多サブユニットタンパク質のサブユニットは互いに結合しており；X₁がLであるおよび／またはX₂がLであるとき、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドの少なくとも一方はヘテロニ量体化を促進するQ347R変異を含む、ヘテロニ量体Fc融合タンパク質を提供する。

【0021】

ある実施態様において、ヘテロニ量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEAAAGG(配列番号239)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAAAGG(配列番号9)を含む。ある実施態様において、

10

20

30

40

50

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号239)またはEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号9)からなる。

【0022】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号244)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号244)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

10

【0023】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号238)またはEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号7)を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号238)またはEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号7)からなる。

20

【0024】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号8)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号241)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号8)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号241)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

30

【0025】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号15)またはGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号242)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号15)またはGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号242)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

40

【0026】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号16)またはGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号243)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタン

50

パク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 3) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0027】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 5) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 5) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

10

【0028】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 6) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 6) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

20

【0029】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列 E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 1 1) または P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 2 4 0) を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体 F c ドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列 E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 1 1) または P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 2 4 0) からなる。

30

【0030】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 1 2) または G G G G S G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 2 4 7) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 1 2) または G G G G S G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 2 4 7) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

40

【0031】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 6 7) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 2 4 8) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なる

50

サブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 67) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 248) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0032】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 68) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 249) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタン

10

【0033】

他の態様において、本発明は、免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドにアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 239) を含むリンカーにより結合された多サブユニットサイトカインのサブユニットを含み；F c ドメインポリペプチドが異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する変異および F c のエフェクター機能を低減するための L 234A、L 235A および P 329A 置換を含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を提供する。

20

【0034】

ある実施態様において、本発明は、アミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 239) を含むまたはそれからなるリンカーにより第一ヒト I g G 1 (h F c ドメインポリペプチド I g G 1) F c ドメインポリペプチドに結合したヒト I L - 12 の p 40 サブユニットおよびアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 10) を含むまたはそれからなるリンカーにより第二ヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドに結合したヒト I L - 12 の p 35 サブユニットを含み、第一および第二 F c ドメインポリペプチドがヘテロ二量体化を促進する変異および h I g G 1 F c のエフェクター機能を低減するための L 234A、L 235A および P 329A 置換を含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を提供する。

30

【0035】

ある態様において、本発明は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、ここで、第一ポリペプチドは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをさらに含み、ここで、タンパク質配列は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドにアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F X G G (配列番号 1) (ここで、X は L または E である) を含むリンカーにより融合しており；多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合され、多サブユニットタンパク質のサブユニットは互いに結合しており、第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは互いに結合しているものを提供する。

40

【0036】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含み、ここで、第一ポリペプチドは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをさらに含み、ここで、タンパク質配列は第一抗体 F c ドメインポリペプチドにリンカーにより融合しており；そして第二ポリペプチドは多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットをさらに含み、ここで、タンパク質配列は第二抗体 F c ド

50

メインポリペプチドにリンカーにより融合している。多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットのタンパク質配列を第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、G4S(配列番号110)、(G4S)₂(配列番号109)または(G4S)₃(配列番号108)を含み得る。

【0037】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)を含む。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)からなる。

10

【0038】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号3)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号3)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0039】

20

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号13)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号13)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0040】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号14)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号14)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

30

【0041】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号4)を含む。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号4)からなる。

40

【0042】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号5)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号5)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0043】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、ア

50

ミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0044】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0045】

ここに記載するヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドを含み、各々互いにヘテロ二量体化を促進するように変異されている。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは K 370 E および R 409 W から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは E 357 N、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは E 357 N、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは K 370 E および R 409 W から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 K 370 E および R 409 W を含み、第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 E 357 N、D 399 V および F 405 T を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 E 357 N、D 399 V および F 405 T を含み、第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 K 370 E および R 409 W を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは K 360 E および R 409 W から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 4 F c ドメインポリペプチドは Q 347 R、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは Q 347 R、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 4 F c ドメインポリペプチドは K 360 E および R 409 W から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 360 E および R 409 W を含み、第二の異なる I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 347 R、D 399 V および F 405 T を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 347 R、D 399 V および F 405 T を含み、第二の異なる I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 360 E および R 409 W を含む。

【0046】

ここに開示するヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドを含み、各々互いにヘテロ二量体化を促進するように変異されている。ある実施態様において、第一 I g G 1 F c ドメインポリペプチドは K 360 E および K 409 W から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 1 F c ドメインポリペプチドは Q 347 R、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 1 F c ドメインポリペプチドは Q 347 R、D 399 V および F 405 T から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる I g G 1 F c ドメインポリペプチドは K 360 E および K 409 W から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 K 360 E および K 409 W を含み、第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 347 R、D 399 V およ

び F 4 0 5 T を含む。ある実施態様において、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドは変異 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含む。

【 0 0 4 7 】

ある実施態様において、ここに記載するヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、エフェクター機能を低減するようにさらに変異された I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドを含む。ある実施態様において、第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチド各々変異 P 3 2 9 G または P 3 2 9 A を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチド各々変異 P 3 2 9 G または P 3 2 9 A を含む。ある実施態様において、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチド各々変異 P 3 2 9 G または P 3 2 9 A を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチド各々変異 P 3 2 9 A を含む。ある実施態様において、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチド各々変異 P 3 2 9 A を含む。

10

【 0 0 4 8 】

ある実施態様において、ここに記載するヘテロ二量体 F c ベースの融合は、各々 A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される変異を含む、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドを取り込む。ある実施態様において、ここに記載するヘテロ二量体 F c ベースの融合は、各々変異 A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される変異を含む、第一 I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二の異なる I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドを取り込む。

20

【 0 0 4 9 】

ある実施態様において、ここに記載するヘテロ二量体 F c ベースのタンパク質は、鎖間ジスルフィド結合を導入するようにさらに変異された I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドを組み込む。ある実施態様において、第一 I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドは変異 Y 3 4 9 C を含み、第二の異なる I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドは変異 S 3 5 4 C を含む。ある実施態様において、第一 I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドは変異 S 3 5 4 C を含み、第二の異なる I g G 4 または I g G 1 F c ドメインポリペプチドは変異 Y 3 4 9 C を含む。

30

【 0 0 5 0 】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に天然ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的实施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、I L - 1 2 の p 3 5 と p 4 0 サブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、p 3 5 の C 7 4 と p 4 0 の C 1 7 7 の間に天然ジスルフィド結合を含む。

【 0 0 5 1 】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的实施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、I L - 1 2 の p 3 5 と p 4 0 サブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、P 3 5 の V 1 8 5 C と P 4 0 の Y 2 9 2 C の間に人工のまたは操作されたジスルフィド結合を含む。

40

【 0 0 5 2 】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に天然ジスルフィド結合および多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと多サブユニットタンパ

50

ク質の第二の異なるサブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的实施態様において、I L-12のp 35とp 40サブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合およびI L-12のp 35とp 40サブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、p 35のC 74とp 40のC 177の間に天然ジスルフィド結合およびP 35のV 185 CとP 40のY 292 Cの間に人工のまたは操作されたジスルフィド結合を含む。

【0053】

本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質の一部は、天然ジスルフィド結合が除かれ、次いで非天然の人工のまたは操作されたジスルフィド結合で置換されるよう操作される。例えば、例示的实施態様において、本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質は、天然C 74がセリンに変異されているI L-12のp 35および天然C 177がセリンに変異されているI L-12のp 40を含み、それにより、I L-12のp 35とp 40サブユニットの間の天然ジスルフィド結合が除かれる。この変異I L-12に、P 35のV 185 CおよびP 40のY 292 Cの、2つの新規変異が導入され、それにより、非天然の人工のまたは操作されたジスルフィド結合が導入される。

【0054】

本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質内で、第一ポリペプチドおよび第二の異なるポリペプチドは、それぞれ第一サブユニットおよび第二の異なる多サブユニットサイトカインのサブユニットを含む。本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質内で、第一ポリペプチドおよび第二の異なるポリペプチドは、それぞれ第二の異なるサブユニットおよび第一多サブユニットサイトカインのサブユニットを含む。例示的实施態様において、サイトカインはI L-12(例えば、ヒトI L-12)である。ここに記載するヘテロ二量体F c融合タンパク質の何れかを含む製剤、ヘテロ二量体F c融合タンパク質を発現する1以上の核酸を含む細胞またはヘテロ二量体F c融合タンパク質を発現するベクターおよびヘテロ二量体F c融合タンパク質を使用して腫瘍細胞死を増強する方法も提供される。ある実施態様において、本発明は、ここに記載するヘテロ二量体F c融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤を提供する。

【0055】

他の態様において、本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質は、少なくとも1つの抗体可変ドメイン(例えば、抗体重鎖可変ドメイン)をさらに含む。ある実施態様において、少なくとも1つの抗体重鎖可変ドメインは抗体軽鎖可変領域に結合してF a bを形成し、F a bの重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインは第一抗体F cドメインポリペプチドおよび／または第二抗体F cドメインポリペプチドのN末端に融合する。

【0056】

ある実施態様において、本発明の少なくとも1つの抗体可変ドメインを含むヘテロ二量体F c融合タンパク質は、それぞれ、第一抗体F cドメインポリペプチドおよび第二抗体F cドメインポリペプチドのC末端に結合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを有する。

【0057】

ある実施態様において、本発明の少なくとも1つの抗体可変ドメインを含むヘテロ二量体F c融合タンパク質は、それぞれ、第二抗体F cドメインポリペプチドおよび第一抗体F cドメインポリペプチドのC末端に結合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを有する。

【0058】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質は、第一ポリペプチドの第一抗体F cドメインポリペプチドに対してC末端に位置した抗体重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体F c融合タンパク質は、第二ポリペプチドの第二抗体F cドメインポリペプチドに対してC末端に位置した抗体重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、抗体重鎖可変領域は、s c F vを形成するように

抗体軽鎖可変領域に結合する。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、それぞれ第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体FcドメインポリペプチドのN末端に結合される。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、それぞれ第二抗体Fcドメインポリペプチドおよび第一抗体FcドメインポリペプチドのN末端に結合される。

【0059】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、抗体可変ドメインを含まない。例えば、ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニット(例えば、IL-12タンパク質)、所望によりスパーサーペプチドを含むリンカーおよび第一抗体Fcドメインポリペプチド；および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニット(例えば、IL-12タンパク質)、所望によりスパーサーペプチドを含むリンカーおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドからなるまたはそれから本質的になる。

【0060】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、プロテオグリカン結合ドメインをさらに含む。ある実施態様において、プロテオグリカン結合ドメインは、腫瘍で特異的に発現される1以上のプロテオグリカンに結合する。ある実施態様において、プロテオグリカン結合ドメインは、シンデカン、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン、ペルレカン、ベルシカン、プレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)から選択される1以上のプロテオグリカンに結合する。ある実施態様において、SLRPは、デコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される。ある実施態様において、プロテオグリカン結合ドメインは、第一抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。ある実施態様において、プロテオグリカン結合ドメインは、第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。

【0061】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、コラーゲン結合ドメインをさらに含む。ある実施態様において、コラーゲン結合ドメインは、腫瘍で特異的に発現される1以上のコラーゲンに結合する。ある実施態様において、コラーゲン結合ドメインは、第一抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。ある実施態様において、コラーゲン結合ドメインは、第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。

【0062】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む。ある実施態様において、ヒアルロン酸結合ドメインは、第一抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。ある実施態様において、ヒアルロン酸結合ドメインは、第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合する。

【0063】

本発明の他の態様は、患者における癌を処置する方法を提供する。方法は、患者、例えば、それを必要とする患者に有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質または有効量のここに記載する多特異的結合タンパク質を含む製剤を投与することを含む。例えば、ある実施態様において、癌を処置する方法は、患者、例えば、それを必要とする患者に、有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤を投与することを含む。

【0064】

ある実施態様において、本発明は、癌を処置する方法であって、患者に単回用量のみのヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。ある実施態様において、単回用量は、癌に対する完全応答の誘導に十分な量である。ある実施態様において、単回用量は、癌の再発遅延または予防に十分な量である。

【0065】

ある実施態様において、本発明は、癌を処置する方法であって、患者に単回用量のみの配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質またはヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤を投与することを含む、方法を提供する。ある実施態様において、単回用量の配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質またはヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤は、癌に対する完全応答の誘導に十分な量である。ある実施態様において、単回用量は、癌の再発遅延または予防に十分な量である。

10

【0066】

本発明の他の態様は、急性放射線症候群を処置する方法であって、患者にここに開示するヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質または製剤を投与することを含む、方法を提供する。ある実施態様において、急性放射線症候群は造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群および皮膚放射線症候群から選択される 1 以上の症候群を含む。ある実施態様において、急性放射線症候群は造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群および皮膚放射線症候群からなる群から選択される症候群を含む。

【0067】

要約すると、本発明は、多サブユニットタンパク質のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質構築物を提供する。これらの融合タンパク質構築物は、天然／自然多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期、製造中の収率改善、保存中の安定性増強および／または治療として使用するとき有効性改善を示し得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図 1 A】図 1 A は、第一抗体 Fc ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二抗体 Fc ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む例示的ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を記載する。第一抗体 Fc ドメインポリペプチドおよび第二抗体 Fc ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、Fc ドメインポリペプチド間のジスルフィド結合はヘテロ二量体を安定化する。さらなるサブユニットを第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに結合するリンカーは、(G4S)₃ 配列(配列番号 108)を含み得る。

30

【0069】

【図 1 B】図 1 B は、図 1 A に記載するタンパク質に類似するが、また Fc γ R 結合を低減するために Fc ドメインポリペプチドに変異も含む例示的ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を記載する。

【0070】

【図 1 C】図 1 C は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットがリンカーにより第一抗体 Fc ドメインに結合されているおよび多サブユニットタンパク質の他のサブユニットが他のリンカーリンカーにより第二抗体 Fc ドメインに結合されている例示的タンパク質を記載する。

40

【0071】

【図 1 D】図 1 D は、図 1 C に記載するタンパク質に類似するが、Fc γ R 結合を低減するために Fc ドメインポリペプチドに変異も含む例示的ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を記載する。

【0072】

【図 1 E】図 1 E は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二ポリペプチドにおける第二抗体 Fc ドメインポリペプチドの C 末端に位置する以外、図 1 B に記載するタンパク質に類似する例示的ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を記載する。

【0073】

50

【図 1 F】図 1 F は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第一ポリペプチドにおける第一抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端に位置する以外、図 1 E に記載するタンパク質に類似する例示的ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を記載する。

【0074】

【図 2 A】図 2 A は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドに他のリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含み、サブユニットが 2 ジスルフィド結合により結合される、例示的ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を記載する。第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、F c ドメインポリペプチド間のジスルフィド結合はヘテロ二量体を安定化する。記載されるタンパク質は F c γ R 結合を低減するために F c ドメインポリペプチドにおける変異も含む。

10

【0075】

【図 2 B】図 2 B は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドに他のリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含み、サブユニットが 1 つの非天然ジスルフィド結合により結合される、例示的ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を記載する。示す例示的タンパク質において、天然ジスルフィド結合は除去され、人工ジスルフィド結合に置き換えられている。例えば、I L-12 構築物は変異 p 35-V 185 C / C 74 S および p 40-Y 292 C / C 177 S を取り込み得る。第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、F c ドメインポリペプチド間のジスルフィド結合はヘテロ二量体を安定化する。タンパク質は F c γ R 結合を低減するために F c ドメインポリペプチドにおける変異も含む。

20

【0076】

【図 3 A】図 3 A は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび同じアミノ酸配列を有する他のリンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに結合された多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む例示的ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を記載する。第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、F c ドメインポリペプチド間のジスルフィド結合はヘテロ二量体を安定化する。

30

【0077】

【図 3 B】図 3 B は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドにリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドに他のリンカーにより結合された多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む例示的ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を記載する。第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、F c ドメインポリペプチド間のジスルフィド結合はヘテロ二量体を安定化する。多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーは、(G 4 S)₂ (配列番号 109) または G 4 S (配列番号 110) 配列を含み得る。

40

【0078】

【図 4】図 4 A ~ 4 L は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットがリンカーにより第一抗体 F c ドメインポリペプチドに結合しているおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが他のリンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに結合している、例示的 s c F v 融合ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質構築物 (図 4 A ~ 4 H) および m A b 融合ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質構築物 (図 4 I ~ 4 L) を記載する。

【0079】

図 4 A ~ 4 D は、第一抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端に結合した第一 s c F v

50

および第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合した第二scFvを含む例示的Fc融合タンパク質を記載する。第一scFvおよび第二scFvは同一でも異なってもよい(例えば、異なる抗原にまたは単一抗原の異なるエピトープに結合する)。図4Aおよび図4Cに記載される例示的Fc融合タンパク質は、ヘテロ二量体化Fcバリエーションの異なる対を含む。図4Bおよび図4Dに記載される例示的Fc融合タンパク質は、ヘテロ二量体化Fcバリエーションの異なる対を含む。例えば、ヘテロ二量体化変異が「ノブ・イントゥー・ホール(knobs-into-holes)」変異を含むとき、図4Aおよび図4Dは、第一ポリペプチドが「ホール」変異を含み、第二ポリペプチドが「ノブ」変異を含む例示的Fc融合タンパク質を記載する；図4Bおよび図4Cは、第一ポリペプチドが「ノブ」変異を含み、第二ポリペプチドが「ホール」変異を含む例示的Fc融合タンパク質を記載する。図4Aおよび図4Bは、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットのタンパク質配列が第一ポリペプチドに結合される、例示的Fc融合タンパク質を記載する；図4Cおよび図4Dは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第一ポリペプチドに結合される、例示的Fc融合タンパク質を記載する。他のタイプのヘテロ二量体化変異を有するヘテロ二量体Fc融合タンパク質も同様に考慮される。

【0080】

図4Eおよび4Gは、第一抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合したscFvを含む、例示的Fc融合タンパク質を記載する。

【0081】

図4Fおよび4Hは、第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に結合したscFvを含む、例示的Fc融合タンパク質を記載する。

【0082】

図4I~4Lは、第一抗体FcドメインポリペプチドのN末端に結合した第一Fabおよび第二抗体FcドメインポリペプチドのN末端に結合した第二Fabを含む例示的Fc融合タンパク質を記載する。図4Iおよび図4Kは、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットが第一ポリペプチドに結合される、例示的Fc融合タンパク質を記載する；図4Jおよび図4Lは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第一ポリペプチドに結合される、例示的Fc融合タンパク質を記載する。図4Kは、図4Iと、抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを結合する長いアミノ酸配列(例えば、ここに開示するスペーサーペプチド)を有する点で異なる；図4Jは、図4Lと、抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを結合する長いアミノ酸配列(例えば、ここに開示するスペーサーペプチド)を有する点で異なる。

【0083】

【図5】図5A~5Cは、CT26腫瘍細胞を接種され、組み換えマウスIL-12(rmIL-12)(図5A)、DF-mIL-12-Fc wt(図5B)、DF-mIL-12-Fc si(図5C)またはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0084】

【図6】図6は、CT26腫瘍細胞を接種され、rmIL-12、DF-mIL-12-Fc wt、DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置されたマウスの Kaplan-Meier 生存曲線を示すグラフである。

【0085】

【図7】図7A~7Dは、CT26腫瘍細胞を接種され、1μg rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt(図7A)、1μg rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si(図7B)、0.1μg rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt(図7C)、0.1μg rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si(図7D)またはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0086】

【図8】図8は、CT26腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt、 $1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置されたマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【0087】

【図9】図9A～9Cは、B16F10黒色腫細胞を接種され、rmIL-12(図9A)、DF-mIL-12-Fc wt(図9B)、DF-mIL-12-Fc si(図9C)またはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

10

【0088】

【図10】図10は、B16F10黒色腫細胞を接種され、rmIL-12、DF-mIL-12-Fc wt、DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置されたマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【0089】

【図11】図11A～11Dは、B16F10黒色腫細胞を接種され、 $0.5\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt(図11A)、 $0.5\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si(図11B)、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt(図11C)、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si(図11D)またはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

20

【0090】

【図12】図12は、B16F10黒色腫細胞を接種され、 $0.5\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt、 $0.5\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc si、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc wt、 $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12のモル等量のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプ対照で週1回処置されたマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【0091】

30

【図13】図13Aは、HEK-Blue IL-12レポーターアッセイを使用する、DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)または組み換えヒトIL-12(rhIL-12)での処理に対するIL-12応答を示すグラフである。

【0092】

図13Bは、DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)およびrhIL-12での処理に応答した末梢血単核細胞(PBMC)によるIFN γ 産生を示すグラフである。

【0093】

【図14】図14は、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ で等モル量のDF-hIL-12-Fc siまたは野生型rhIL-12単回静脈内投与後、カニクイザルK2 EDTA血漿におけるDF-hIL-12-Fc si、rhIL-12およびIFN γ の相対的血漿濃度を示すグラフである。

40

【0094】

【図15】図15A～15Bは、ナイーブBalb/cマウスにおけるrmIL-12(図15A)およびDF-mIL-12-Fc si(図15B)のPK/PDプロファイルを示すグラフである。図15AはナイーブBalb/cマウスにおけるrmIL-12のPK/PDプロファイルを示し、図15BはナイーブBalb/cマウスIL-12におけるDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示す。血清のIL-12およびIFN γ レベルはELISAにより分析した。図15Cは、ナイーブBalb/cマウスに静脈内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示す

50

グラフである。図15Dは、ナイーブBalb/cマウスに腹腔内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図15Eは、ナイーブBalb/cマウスに皮下投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。平均血清レベルは平均±SEMを表す。

【0095】

【図16】図16A～16Cは、DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1またはそれらの組み合わせで処置したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。マウスを、0.5 µgアイソタイプ対照または0.5 µg DF-mIL-12-Fc si (図16A)、アイソタイプ対照または抗PD-1 (図16B) およびアイソタイプ対照またはDF-mIL-12-Fc si / 抗PD-1 (図16C) で腹腔内処置した。動物に、上記のとおりDF-mIL-12-Fc siを週1回および抗PD-1を週2回注射した。腫瘍増殖を60日間評価した。グラフは個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示す。

10

【0096】

【図17】図17A～17Bは、DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1またはそれらの組み合わせで処置したB16F10腫瘍担持マウスの生存および体重を示すグラフである。マウスを、アイソタイプ、DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1またはDF-mIL-12-Fc siと抗PD-1の組み合わせで処置した。動物に、0.5 µg DF-mIL-12-Fc siを週1回および200 µg抗PD-1またはアイソタイプを週2回注射した。図17Aはカプラン・マイヤー生存曲線を示す。図17Bは平均±標準偏差としてマウス体重を示す。

20

【0097】

【図18】図18A～18Cは、DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99 Tr iNKETまたはそれらの組み合わせで処置したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。マウスを、150 µgアイソタイプ対照または0.5 µg DF-mIL-12-Fc si (図18A)、アイソタイプ対照または150 µg Tr iNKET (図18B) およびアイソタイプ対照またはDF-mIL-12-Fc si / Tr iNKET (図18C) で腹腔内処置した。動物に、上記のとおりDF-mIL-12-Fc siを週1回およびTr iNKETを週3回注射した。腫瘍増殖を72日間評価した。グラフは個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示す。

30

【0098】

【図19】図19A～19Bは、DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99 Tr iNKETまたはそれらの組み合わせで処置したB16F10腫瘍担持マウスの生存および体重を示すグラフである。マウスを、アイソタイプ、DF-mIL-12-Fc si、Tr iNKETまたはDF-mIL-12-Fc siとTr iNKETの組み合わせで処置した。動物に0.5 µg DF-mIL-12-Fc siを週1回および150 µg Tr iNKETまたはアイソタイプを週3回注射した。図19Aはカプラン・マイヤー生存曲線を示す。図19Bは平均±標準偏差としてマウス体重を示す。

【0099】

【図20】図20は、DF-mIL-12-Fc si / Tr iNKET組み合わせ治療(n=3)で処置し、 2×10^5 B16F10黒色腫細胞移植で再負荷した図18のB16F10腫瘍モデル実験からの完全応答者(CR)マウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

40

【0100】

【図21A】図21Aは、CT26腫瘍細胞を接種され、DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを単回投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0101】

【図21B】図21Bは、CT26腫瘍細胞を接種され、DF-mIL-12-Fc si、mIgG2aアイソタイプまたはrmIL-12を毎週投与されたマウスの体重±標準偏差を示すグラフである。

【0102】

50

【図21C】図21Cは、ナイーブまたはCT26腫瘍モデルにおいてDF-mIL-12-Fc siを先に単回投与されたときに完全応答者(CR)であった再負荷した個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0103】

【図22】図22A～22Bは、CT26腫瘍細胞を接種され、毎週DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを腹腔内(IP)(図22A)または皮下(SC)(図22B)投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0104】

【図23】図23は、B16F10黒色腫細胞を接種され、DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを単回投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

10

【0105】

【図24】図24A～24Bは、B16F10黒色腫細胞を接種され、毎週DF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを腹腔内(IP)(図24A)または皮下(SC)(図24B)投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0106】

【図25】図25A～25Bは、CT26腫瘍細胞を接種され、1 μ gのrmIL-12のモル当量でDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを単回(図25A)または週1回投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0107】

20

【図26】図26A～26Bは、CT26腫瘍細胞を接種され、DF-mIL-12-Fc siを週1回皮下投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図26Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照または1 μ g DF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図26Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照または2 μ g DF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0108】

【図27】図27A～27Cは、DF-mIL-12-Fc siの単回投与72時間後、B16F10腫瘍担持C57BL/6マウスにおける血液(左)および腫瘍(右)サンプルのIFN γ (図27A)、CXCL9(図27B)およびCXCL10(図27C)レベルを示すグラフである。

30

【0109】

【図28】図28A～28Cは、1 μ g/kg(図28A)、2 μ g/kg(図28B)または4 μ g/kg(図28C)のDF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置されたカニクイザルにおけるDF-hIL-12-Fc siの薬物動態を示す線グラフであり。2240、2241、2740、2741は個々のカニクイザル対象を意味する。

【0110】

【図29】図29A～29Fは、DF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置されたカニクイザルにおけるIFN γ およびIP10/CXCL10の濃度を示す線グラフである。図29A、29Cおよび29Eは、それぞれ1 μ g/kg、2 μ g/kgおよび4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで処置したカニクイザルにおけるIFN γ 濃度/発現レベルを示す。図29B、29Dおよび29Fは、それぞれ1 μ g/kg、2 μ g/kgおよび4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで処置したカニクイザルにおけるIP10/CXCL10濃度/発現レベルを示す。3240、3241、3740、3741は個々のカニクイザル対象を意味する。

40

【0111】

【図30】図30は、乳癌細胞を接種され、単剤療法(アイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc si、ドキシル(登録商標)(化学療法)または10Gy照射)または組み合わせ治療(ドキシル(登録商標)または照射と組み合わせたDF-mIL-12-Fc si)を毎週

50

投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0112】

【図31】図31Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、アイソタイプ対照または抗PD-1抗体で処置(週2回)された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図31Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、アイソタイプ対照または抗PD-1抗体で処置(週2回)されたBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図31Bはまた、1μgのDF-mIL-12-Fc siの毎週処置と共に投与された抗PD-1抗体で先に処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線も示す。

【0113】

【図32】図32Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、アイソタイプ対照またはDF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)腫瘍内処置された個々のマウスにおける処置(Tr)腫瘍の腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図32Bは、図32Aに記載する個々のマウスの非処置(NT)CT26-Tyrp1腫瘍の腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0114】

【図33】図33Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、2μg mIgG2aアイソタイプ対照または2μg DF-mIL-12-Fc siで1回処置された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図33Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、2μg mIgG2aアイソタイプ対照、1μg DF-mIL-12-Fc si(毎週投与)、2μg DF-mIL-12-Fc si(毎週投与)または2μg DF-mIL-12-Fc si(1回)で処置された個々のマウスの平均腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0115】

【図34】図34Aは、L234A、L235AおよびP329A変異(LALAPA)またはL234A、L235A、P329G変異(LALAPG)を有するDF hIL-12-Fc-siで処置したPHA刺激PBMCのIFNγ産生を示すグラフである。図34Bは、LALAPA変異またはLALAPG変異を有するDF hIL-12-Fc-si存在下または非存在下のTHP-1細胞に対するフルオロフォアコンジュゲートhIgG1結合のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0116】

詳細な記載

本発明は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の改善、このようなタンパク質を含む医薬組成物および癌の処置を含むこのようなタンパク質および医薬組成物を使用する治療方法を提供する。

【0117】

本発明の理解を用意するために、いくつかの用語および表現を下に定義する。

【0118】

ここで使用する単数表現は、文脈に反しない限り、「1以上」を意味し、複数を含む。

【0119】

ここで使用する用語「対象」および「患者」は、ここに記載する方法および組成物で処置される生物をいう。このような生物は、好ましくは、哺乳動物(例えば、マウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど)を含む、より好ましくはヒトを含むが、これらに限定されない。

【0120】

ここで使用する用語「有効量」は、化合物(例えば、本発明の化合物)の有益なまたは所望の結果(例えば、所望の予防または治療効果)を発揮するのに十分な量をいう。有効量を1回以上の投与、適用または用量により投与でき、特定の製剤または投与経路への限定は意図されない。ここで使用する用語「処置する」は、状態、疾患、障害などの改善またはその症状の改善をもたらす、あらゆる効果、例えば、軽減、低減、調節、改善または除去を含む。

10

20

30

40

50

【0121】

ここで使用する用語「医薬組成物」は、原薬物をインビボまたはエキスビボでの診断または治療に特に適するものとするための、活性もしくは不活性な担体との組み合わせ物をいう。

【0122】

ここで使用する用語「薬学的に許容される担体」は、リン酸緩衝化食塩水溶液、水、エマルジョン(例えば、油／水または水／油エマルジョンなど)および種々のタイプの湿潤剤などの標準医薬担体の何れかをいう。組成物はまた安定化剤および防腐剤も含み得る。担体、安定化剤およびアジュバントの例について、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975]参照。

10

【0123】

ここで使用する用語「薬学的に許容される塩」は、対象への投与により、本発明の化合物またはその活性代謝物もしくは残基を提供できる、本発明の化合物のあらゆる薬学的に許容される塩(例えば、酸または塩基との)をいう。当業者には知られるとおり、本発明の化合物の「塩」は、無機または有機酸および塩基に由来し得る。例示的酸は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などを含むが、これらに限定されない。シュウ酸などの他の酸は、それ自体薬学的に許容されないが、本発明の化合物およびその薬学的に許容される酸付加塩を得る中間体として有用な塩の製造において用いられ得る。

20

【0124】

例示的塩基は、アルカリ金属(例えば、ナトリウム)水酸化物、アルカリ土類金属(例えば、マグネシウム)水酸化物、アンモニアおよび式 NW_4^+ (式中、Wは C_{1-4} アルキルなどである)の化合物を含むが、これらに限定されない。

【0125】

例示的塩は、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ニグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピルビン酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などを含むが、これらに限定されない。塩の他の例は、 Na^+ 、 NH_4^+ および NW_4^+ (式中、Wは C_{1-4} アルキル基である)などの適当なカチオンと会合する本発明の化合物のアニオンなどを含む。

30

【0126】

治療使用のため、本発明の化合物の塩は薬学的に許容されることが意図される。しかしながら、薬学的に許容されない酸および塩基の塩も、例えば、薬学的に許容される化合物の製造または精製に有用であり得る。

40

【0127】

明細書をとおして、組成物が特定の成分を有する、含むまたは包含すると記載されているときまたは過程および方法が特定の工程を有する、含むまたは包含すると記載されているとき、さらに、記載の成分から本質的になるまたはそれからなる本発明の組成物が存在するおよび記載する処理工程から本質的になるまたはそれからなる本発明の過程および方法があることが意図される。

【0128】

一般的事項として、パーセンテージで特定する組成は、特に断らない限り重量による。さらに、可変要素に定義が付随しないならば、その可変要素の先の定義が支配する。

50

【0129】

I. タンパク質

本発明は、多サブユニットタンパク質のアミノ酸配列を含むFc融合タンパク質構築物を提供する。これらの融合タンパク質構築物は、天然／自然の多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期、製造中の収率改善、保存中の安定性増強および／または治療として使用するとき有効性改善を示し得る。

【0130】

IgG1 Fc融合タンパク質

ある態様において、本発明は、第一抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第一抗体Fcドメインに結合した第二抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体IgG1 Fc融合タンパク質であって、ここで、第一ポリペプチドは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)を含むリンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合された多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをさらに含み；多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、多サブユニットタンパク質のサブユニットは互いに結合しており；X₁がLであるおよび／またはX₂がLであるとき、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドの少なくとも一方はヘテロ二量体化を促進するQ347R変異を含むものを提供する。

【0131】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)からなる。

【0132】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、さらにスペーサーペプチドを含む。ある実施態様において、リンカーは、配列番号237または配列番号6の配列およびスペーサーペプチドを含む。

【0133】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)およびスペーサーペプチドを含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)またはEPKSSDKTHTCPCPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーのアミノ酸配列は、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーのアミノ酸配列と同一である。

【0134】

「スペーサーペプチド」の表題下に記載するあらゆるスペーサーペプチドが用いられ得る。例えば、ある実施態様において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120の何れかに示すアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、スペーサーペプチドは、配列

番号107～120の何れかに示すアミノ酸配列からなる。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、ここに開示するスペーサーペプチドおよび配列番号237または配列番号6の配列を有するペプチドからなるまたは本質的にそれからなる。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、ここに開示するスペーサーペプチドおよび配列番号237または配列番号6の配列を有するペプチドからなるまたは本質的にそれからなる。ある実施態様において、スペーサーペプチドは、リンカーの一方または両方のN末端である。

【0135】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号239)またはEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号9)を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号239)またはEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号9)からなる。

【0136】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号239)を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号239)からなる。

【0137】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGSGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号244)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGSGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号244)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0138】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0139】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号238)またはEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号7)を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列PKSSDKTHT

C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 3 8) または E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 7) からなる。

【0140】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 8) または G G G G S G G G G S G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 1) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 8) または G G G G S G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 1) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

10

【0141】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 2) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 2) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

20

【0142】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 3) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 4 3) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

30

【0143】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 5) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 5) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 5) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

40

【0144】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 6) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 4 6) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 6 6) または G G G G S G G G G S P K S S

50

DKTHTCPCPCPAPEAAGG(配列番号246)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0145】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列EPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号11)またはPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号240)を含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列EPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号11)またはPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号240)からなる。

10

【0146】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号12)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号247)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号12)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号247)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

20

【0147】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号67)またはGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号248)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号67)またはGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号248)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

30

【0148】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号68)またはGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号249)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号68)またはGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPCPAPEAEGA(配列番号249)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

40

【0149】

ある実施態様において、FcドメインポリペプチドはIgG1Fcのものである。ある実施態様において、本発明のタンパク質は第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含み、両者とも互いにヘテロ二量体化を促進する変異IgG1Fcドメインポリペプチドである。例えば、FcドメインがヒトIgG1のFc由来であるならば、FcドメインはヒトIgG1抗体のアミノ酸234~332と少なくとも90%同一であり、Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K39

50

2、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411およびK439からなる群から選択される1か所以上で異なるアミノ酸配列を含み得る。

【0150】

ある実施態様において、抗体定常ドメインは、ヒトIgG1抗体のアミノ酸234～332と少なくとも90%同一であり、Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439DおよびK439Eからなる群から選択される1以上の置換により異なるアミノ酸配列を含み得る。ここに開示するFcドメインまたはヒンジ領域における全アミノ酸位置は、EUナンバリングに従い番号付けされる。

10

【0151】

ある実施態様において、第一抗体IgG1 FcドメインポリペプチドはK360EおよびK409Wから選択される1以上の変異を含み、第二抗体IgG1 FcドメインポリペプチドはQ347R、D399VおよびF405Tから選択される1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一抗体IgG1 FcドメインポリペプチドはQ347R、D399VおよびF405Tから選択される1以上の変異を含み、第二抗体IgG1 FcドメインポリペプチドはK360EおよびK409Wから選択される1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは変異K360EおよびK409Wを含み、第二抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは変異Q347R、D399VおよびF405Tを含む。ある実施態様において、第一抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは変異Q347R、D399VおよびF405Tを含み、第二抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは変異K360EおよびK409Wを含む。

20

【0152】

ある実施態様において、IgG1 Fcを有する本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドにFcγR(例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIAまたはFcγRIIIB)または補体成分(例えば、C1q)への結合を低減する1以上の変異を含む。このような変異は、エフェクター機能の低減に有用である。例えば、本開示のタンパク質は、LALA(L234AおよびL235A)変異、LALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異、LALAPG(L234A、L235AおよびP329G)変異またはLALEGAASPS(L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S)変異を含む。

30

【0153】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々変異P329GまたはP329Aを含む第一抗体IgG4またはIgG1 Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体IgG4またはIgG1 Fcドメインポリペプチドを含む。特定の実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々変異P329Aを含む第一抗体IgG4またはIgG1 Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体IgG4またはIgG1 Fcドメインポリペプチドを含む。

40

【0154】

ある実施態様において、第一IgG1抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドは、各々A330SおよびP331Sから選択される変異を含む。ある実施態様において、第一IgG1抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチド各々変異A330SおよびP331Sを含む。

50

【0155】

ある実施態様において、ヘテロ二量体の安定性を改善するIgG1Fcモノマー間のさらなるジスルフィド結合が導入される。例示的实施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットに融合した第一抗体FcドメインポリペプチドはCH3ドメインにY349C置換を含み、これは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに融合した第二抗体FcドメインポリペプチドのS354C置換とジスルフィド結合を形成する。あるいは、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットに融合した第一抗体FcドメインポリペプチドはCH3ドメインにS354C置換を含み、これは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに融合した第二抗体FcドメインポリペプチドのY349C置換とジスルフィド結合を形成する。

10

【0156】

下表2に提供するIgG1抗体Fcドメインポリペプチドの何れも、下表1に提供するIgG1ヒンジ配列(これは、本発明においては、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットのタンパク質配列を第一IgG1抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーまたはさらなるサブユニットを第二の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーの一部または全体である)の何れと組み合わせて用いてもよい。例示的IgG1ヒンジFcドメインポリペプチドは下表3に提供する。ある実施態様において、Fc融合タンパク質の第一および第二ポリペプチドは、それぞれ配列番号212および212; 213および214; 215および216; 217および218; 214および213; 216および215; または218および217のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、Fc融合タンパク質の第一および第二ポリペプチドは、それぞれ配列番号228および228; 229および230; 231および232; 233および234; 235および236; 230および229; 232および231; 234および233; 236および235; 228および250; 250および228; 250および250; 229および252; 252および229; 251および230; 230および251; 253および232; 232および253; 231および254; 254および231; 255および234; 234および255; 233および256; 256および233; 257および236; 236および257; 258および235; または235および258のアミノ酸配列を含む。

20

【0157】

IgG4Fc融合タンパク質

ある態様において、本発明は、多サブユニットタンパク質を改善する。ある態様において、本発明は、第一抗体IgG4Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合した第二の異なる抗体IgG4Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体IgG4Fc融合タンパク質であって、ここで、第一ポリペプチドは第一抗体IgG4Fcドメインポリペプチドにアミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(配列番号1)を含むリンカーにより融合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをさらに含み(ここで、XはLまたはEである); 多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは第二抗体IgG4Fcドメインポリペプチドに融合しており、多サブユニットタンパク質のサブユニットは互いに結合しており; 第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体IgG4Fcドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含むものを提供する。

30

40

【0158】

ある実施態様において、ヘテロ二量体IgG4Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(ここで、XはLまたはEである)(配列番号1)からなる。

【0159】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットのタンパク質配

50

列を第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、さらにスペーサーペプチドを含む。ある実施態様において、リンカーは、配列番号1の配列およびスペーサーペプチドを含む。

【0160】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、配列RVESKYGPPCPPCPAPEF X GG(ここで、 X はLまたはEである)(配列番号1)およびスペーサーペプチドを含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEF X GG(ここで、 X はLまたはEである)(配列番号1)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーのアミノ酸配列は、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーのアミノ酸配列と同一である。

【0161】

「スペーサーペプチド」なる表題下に記載されるあらゆるスペーサーペプチドが用いられ得る。例えば、ある実施態様において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120の何れかに示すアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120の何れかに示すアミノ酸配列からなる。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、ここに開示するスペーサーペプチドおよび配列番号1からなるまたは本質的にそれからなる。ある実施態様において、リンカーは、ここに開示するスペーサーペプチドおよび配列番号1からなるまたは本質的にそれからなる。ある実施態様において、スペーサーペプチドは第一リンカーおよび／または第二リンカーに対してN末端である。

【0162】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)を含む。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体Fcドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)からなる。

【0163】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGSGRVEKSYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号3)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGSGRVEKSYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号3)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0164】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGRVEKSYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号13)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGRVEKSYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号13)からなるリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。

【0165】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGSGRVEKSYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号14)を含むリンカーにより、第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある

実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 14) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0166】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーは、アミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) を含む。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと第一抗体 F c ドメインポリペプチドを融合するリンカーは、アミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) からなる。

【0167】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0168】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0169】

ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) を含むリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノ酸配列 G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) からなるリンカーにより、第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合されている。

【0170】

ある実施態様において、F c ドメインポリペプチドは I g G 4 F c のものである。I g G 4 は、体内で F a b アーム交換および他の I g G 4 抗体との対形成を受け得る不安定二量体である。ある実施態様において、S 228P 変異はヒンジ(これは、本発明においては、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーまたはさらなるサブユニットを第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーの一部または全体である)内に導入され、これはヒンジ領域の安定性を高め、F a b アーム交換の確率を下げる。ある実施態様において、F c ドメインポリペプチドモノマー間のさらなるジスルフィド結合が導入され、これはヘテロ二量体の安定性を改善する。例示的实施態様において、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットに結合した第一抗体 F c ドメインポリペプチドは C H 3 ドメインに Y 349C 置換を含み、これは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに結合した第二抗体 F c ドメインポリペプチドの S 354C 置換とジスルフィド結合を形成する。あるいは、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットに結合した第一抗体 F c ドメインポリペプチドは C H 3 ドメインに S 354C 置換を含み、これは、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに結合した第二抗体 F c ドメインポリペプチドの Y 349C 置換とジスルフィド結合を形成する。

【0171】

ある実施態様において、本発明のタンパク質は第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含み、これは互いにヘテロ二量体化を促進する変異 I g G 4 F c ドメインポリペプチドである。

【0172】

ある実施態様において、第一抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは K 3 6 0 E、K 3 7 0 E および R 4 0 9 W から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは E 3 5 7 N、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T から選択される 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、第一抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む。ある実施態様において、第一抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含む。ある実施態様において、第一抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む。ある実施態様において、第一抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二抗体 I g G 4 F c ドメインポリペプチドは変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含む。

【0173】

ある実施態様において、I g G 4 F c を有する本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドに F c γ R (例えば、F c γ R I、F c γ R I I A、F c γ R I I B、F c γ R I I I A または F c γ R I I I B) または補体成分(例えば、C 1 q) への結合を低減する 1 以上の変異を含む。このような変異は、エフェクター機能の低減に有用である。例えば、本開示のタンパク質は、S P L E (S 2 2 8 P および L 2 3 5 E) 変異、S P L E P A (S 2 2 8 P、L 2 3 5 E および P 3 2 9 A) 変異または S P L E P G (S 2 2 8 P、L 2 3 5 E および P 3 2 9 G) 変異を含む。

【0174】

表 2 に提供する I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドの何れも、表 1 に提供する I g G 4 ヒンジ配列(これは、本発明においては、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一 I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーまたは多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二の異なる I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するリンカーの一部または全体である)の何れと組み合わせて用いてもよい。例示的 I g G 4 ヒンジ F c ドメインポリペプチドは表 3 に提供される。ある実施態様において、F c 融合タンパク質の第一および第二ポリペプチドは、それぞれ配列番号 2 0 5 および 2 0 5 ; 2 0 6 および 2 0 7 ; 2 0 8 および 2 0 9 ; 2 1 0 および 2 1 1 ; 2 0 7 および 2 0 6 ; 2 0 9 および 2 0 8 ; または 2 1 1 および 2 1 0 のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、F c 融合タンパク質の第一および第二ポリペプチドは、それぞれ配列番号 2 1 9 および 2 1 9 ; 2 2 0 および 2 2 1 ; 2 2 2 および 2 2 3 ; 2 2 4 および 2 2 5 ; 2 2 6 および 2 2 7 ; 2 2 1 および 2 2 0 ; 2 2 3 および 2 2 2 ; 2 2 5 および 2 2 4 ; または 2 2 7 および 2 2 6 のアミノ酸配列を含む。

【0175】

ジスルフィド結合

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、I L - 1 2 の p 3 5 と p 4 0 サブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、p 3 5 の C 7 4 と p 4 0 の C 1 7 7 の間に天然ジスルフィド結合を含む。

【0176】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一

サブユニットと多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的实施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、IL-12のp35とp40サブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、p35のV185Cとp40のY292Cの間に人工のまたは操作されたジスルフィド結合を含む。

【0177】

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合および多サブユニットタンパク質の第一サブユニットと多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的实施態様において、IL-12のp35とp40サブユニットの間に天然ヘテロ二量体ジスルフィド結合を含み、IL-12のp35とp40サブユニットの間に人工のまたは操作されたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。このようなタンパク質は、p35のC74とp40のC177の間に天然ジスルフィド結合およびp35のV185Cとp40のY292Cの間に人工のまたは操作されたジスルフィド結合を含む。

【0178】

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は、天然ジスルフィド結合を除き、非天然の人工のまたは操作されたジスルフィド結合に置き換えるよう操作される。例えば、例示的实施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は天然C74がセリンに変異されているIL-12のp35および天然C177がセリンに変異されているIL-12のp40を含み、それにより、IL-12のp35とp40サブユニットの間の天然ジスルフィド結合が除かれる。この変異IL-12に、2つの新規変異が導入され、p35のV185Cおよびp40のY292C、それにより、非天然の人工のまたは操作されたジスルフィド結合が導入される。

【0179】

Fc融合ポリペプチドの成分の配列

本発明の例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、下表1～2に記載のIgG1またはIgG4Fcバリエーション配列の何れかおよび対応するリンカー配列の何れかを用いて構築される。本発明の融合タンパク質構築物は、天然／自然の多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期、製造中のタンパク質収率改善、保存中の安定性増強および／または治療剤として使用したときの有効性改善を提供し得る。

【0180】

表4および5は、本発明の例示的タンパク質構築物のアミノ酸配列を列記する。Fcドメインポリペプチドにおける全ての変異／置換は、EUナンバリングシステムに従い番号付けされる。p35およびp40サブユニットにおける変異は、これらサブユニットの各N末端アミノ酸から開始して番号付けされる。

【0181】

下表2に提供するIgG4抗体Fcバリエーションドメインポリペプチドの何れも、下表1に提供するIgG4ヒンジ配列の何れと組み合わせて用いてもよい。同様に、下表2に提供するIgG1抗体Fcバリエーションドメインポリペプチドの何れも、下表1に提供するIgG1ヒンジ配列の何れと組み合わせて用いてもよい。例示的IgG1ヒンジ-Fcドメインポリペプチドは、下表3に提供される。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1: リンカーバリエーション

ヒンジ	アミノ酸配列
IgG4 ヒンジコンセンサス	RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG ここで、X は L または E である (配列番号 1)
IgG4 ヒンジ S228P	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (配列番号 2)
IgG4 ヒンジ S228P/ L235E	RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG (配列番号 4)
IgG1 ヒンジコンセンサス	EPKSSDKTHTCPPCPAPEX ₁ X ₂ GX ₃ ここで、X ₁ は L または A であり; X ₂ は L, E, または A であり; そして X ₃ は A または G である (配列番号 6)
IgG1 ヒンジ C220S	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (配列番号 7)
IgG1 ヒンジ C220S/ L234A/ L235A	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (配列番号 9)
IgG1 ヒンジ C220S/ L234A/ L235E/ G237A	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (配列番号 11)
IgG1 ヒンジ ΔE216	PKSSDKTHTCPPCPAPEX ₁ X ₂ GX ₃ ここで、X ₁ は L または A であり; X ₂ は L, E, または A であり; そして X ₃ は A または G である (配列番号 237)
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S	PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (配列番号 238)
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S/ L234A/ L235A	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (配列番号 239)
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S/ L234A/ L235E/ G237A	PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (配列番号 240)

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2: IgG4 Fc および IgG1 Fc 野生型配列; および例示的 IgG4 抗体 Fc バリエーション
 および IgG1 抗体 Fc バリエーション配列 (アミノ酸置換は太字で示す)

Fc ドメイン	アミノ酸配列*
IgG4 Fc 野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 205)
IgG4 Fc Y349C/ K370E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 206)
IgG4 Fc S354C/ E357N/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 207)
IgG4 Fc Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTENQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 208)
IgG4 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCQEEMTKNQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 209)
IgG4 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTENQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 210)

【表 2 - 2】

Fc ドメイン	アミノ酸配列*
IgG4 Fc P329A/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLASSIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 211)
IgG1 Fc 野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 212)
IgG1 Fc Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 213)
IgG1 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 214)
IgG1 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 215)
IgG1 Fc P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 216)
IgG1 Fc A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTV KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 217)

10

20

30

40

50

【表 2－3】

Fc ドメイン	アミノ酸配列*
IgG1 Fc A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 218)

*アミノ酸配列はC末端でリシン(K)をさらに含み得る。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3: S228P 変異 IgG4 ヒンジ-Fc (野生型); 例示的 S228P 変異 IgG4 ヒンジ-Fc バリア

ントまたはヒンジ部分-Fc バリエーション; C220S 変異 IgG1 ヒンジ-Fc (野生型); 例示的

C220S 変異 IgG1 ヒンジ-Fc バリエーションまたはヒンジ部分-Fc バリエーション

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG4 ヒンジ-Fc S228P	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (配列番号 219)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ Y349C/ K370E/ R409W	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (配列番号 220)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ S354C/ E357N/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQENMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (配列番号 221)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSQEEMTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (配列番号 222)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPRV YTLPPCQEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (配列番号 223)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ L235E/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSQEEMTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (配列番号 224)

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ L235E/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPRV YTLPPCQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGLG (配列番号 225)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ L235E/ P329A/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPQEEMTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFTLYSWLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGLG (配列番号 226)
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/ L235E/ P329A/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLVSDGSFTLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLGLG (配列番号 227)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 228)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S	PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 250)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFTLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 229)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFTLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 251)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 230)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 252)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 231)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 253)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 232)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 254)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号 233)

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSPRDELLENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号 255)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP RVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号 234)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP RVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号 256)
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELLENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 235)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELLENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (配列番号 257)

10

20

30

【表 3 - 5】

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPR VYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (配列番号 236)
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (配列番号 258)

40

*アミノ酸配列はC末端でリシン(K)をさらに含み得る。

50

【表 4 - 1】

表 4: 例示的ヘテロ二量体 Fc 融合ポリペプチド構築物

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
構築物 101		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 129) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 130) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP CPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 102		

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 131) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 132) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP CPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 103		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE	(配列番号 133)	IgG4 (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GG (配列番号 4)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 134) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 104		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 135) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 136) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 106		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7) または	(配列番号 137) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C

10

20

30

40

【表 4 - 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 259) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WFLTITDLDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8)	(配列番号 138) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS EPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 107		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (配列番 号 239)	(配列番号 139) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPTDW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 260) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1Fc サイレント (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 140) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc サイレント (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 108		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPPCPAPEA	(配列番号 141) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1Fc サイレント (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
AGG (配列番号 239)	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 261) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 142) RNLVPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF	IgG1Fc サイレント (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

【表 4 - 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKTPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 110		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA EGA (配列番 号 11) または PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (配列番号 240)	(配列番号 143) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 262) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

10

20

30

40

50

【表 4 - 10】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 144) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
構築物 111		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 145) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG4 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 146) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 112		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 147) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED	IgG4 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGSRVES KYGPPCPPCP APEFLGG (配 列番号 13)	(配列番号 148) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 113		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 149) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK	IgG4Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
GGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCAPE FLGG (配列番 号 14)	(配列番号 150) RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTTPVLV SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 114		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7) または PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	(配列番号 151) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPN	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 263) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7)	(配列番号 152) RNLVPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
構築物 115		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7) または PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	(配列番号 153) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSPRDELT ENQVSLTCLV KGFYPVDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 264) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSPRDELT ENQVSLTCLV KGFYPVDIAV EWESNGQPEN	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 154) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 116		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7) または PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	(配列番号 155) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 17】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	または (配列番号 265) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	10 20
GGGSGGG GSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGG (配列 番号 16)	(配列番号 156) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異 30
構築物 117		

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8) または GGGGSGGG GSGGGGSPK SSDKTHTCPP CPAPELLGG (配列番号 241)	(配列番号 157) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELLENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG または (配列番号 266) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS PKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELLENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7)	(配列番号 158) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW	IgG1 Fc (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

【表 4 - 19】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVVLV SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 118		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15) または GGGGSPKSS DKTHTCPPC PAPELLGG (配列番号 242)	(配列番号 159) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELLENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG または (配列番号 267)	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 0】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGGS PKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV VDVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 160) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS GGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 119		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP	(配列番号 161) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF	IgG1 (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPE LLGG (配列番号 15) または GGGGSPKSS DKTHTCPPC PAPELLGG (配列番号 242)	GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERV RG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPSS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PG または (配列番号 268) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERV RG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPSS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PG	ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる)

40

【表 4 - 2 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSEPKS SDKTHTCP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 162) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる)
構築物 119-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 163) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGSRV ESKYGPPCPP	(配列番号 164)	IgG4 (IL-12 p35)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPEFLGG (配列番号 3)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 119-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 165) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD SDFSFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(配列番号 166) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPEFLGG (配列番号 3)	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDKFKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG LG	p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 119-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 167) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPC APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 168) RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 119-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 169) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVVG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 170) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 119-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7) または PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	(配列番号 171) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPTDW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 269) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8)	(配列番号 172) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 119-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTH CPPCPAPEA	(配列番号 173) IWELKKDVYV VELDWPDPAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
AGG (配列番号 239)	KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 270) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITISDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	(サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 174) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNM LAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 119-7		
EPKSSDKTH TCPPCAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPPCAPEA AGG (配列番 号 239)	(配列番号 175) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 271) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 0】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 176) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKTPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S, V185C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 119-8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (配列番号 11) または PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (配列番号 240)	(配列番号 177) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPTDW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 272) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 178) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S, V185C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A,

10

20

30

40

50

【表 4-32】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 120		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 179) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFRLCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 180) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する)

10

20

30

40

50

【表 4-33】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 120-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 181) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 182) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 120-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 183) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTF LRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 184) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 120-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 185) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGSGGG GSGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 186) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP CPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 120-4		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7) または PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (配列番号 238)	(配列番号 187) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 273) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブ ユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8)	(配列番号 188) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 120-5		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPPCPAPEA	(配列番号 189) IWELKKDVYV VELDWPDP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する)

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
AGG (配列番号 239)	ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGPKS または (配列番号 274) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 190) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然

10

20

30

40

50

【表 4 - 3 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKTPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	ジスルフィド結合は 保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 120-6		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (配列番 号 239)	(配列番号 191) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELLENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFS CS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 275) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 0】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELLENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCSS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 192) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFTNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 120-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (配列番 号 11) または PKSSDKTHT CPPCPAPEAE	(配列番号 193) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GA (配列番号 240)	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 276) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	ジスルフィド結合は保持する) FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 194) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サブユニット間の天然

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	ジスルフィド結合は 保持する) FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 121		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9) または PKSSDKTHT CPCPAPEA AGG (配列番 号 239)	(配列番号 195) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 277) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A p40 におけるさらな る変異: IL-12 安定化 ジスルフィド結合を 導入するため Y292C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

【表 4 - 4 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCVSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 196) RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A p35 におけるさらな る変異: IL-12 安定化 ジスルフィド結合を 導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 122		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA	(配列番号 197) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF	IgG1 (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
AGG (配列番号 9) または PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (配列番号 239)	GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEWASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 278) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPEVKFNW YVDGVEVHN AKTKPREEQ YNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため Y292C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 4 - 4 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 198) RNLVPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 123		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (配列番 号 11) または PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (配列番号 240)	(配列番号 199) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG S SDPQGVTCGA ATLSAERV RG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド

10

20

30

40

【表 4 - 4 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG または (配列番号 279) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	結合を導入するため Y292C 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 200) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド

10

20

30

40

50

【表 4－47】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
		結合を導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異

*アミノ酸配列は C 末端でリシン(K)をさらに含み得る.

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5: 例示的二量体 Fc 融合タンパク質

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
構築物 1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 17) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHLL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 18) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 2		

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 19) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERV RG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 20) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNM LAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE	(配列番号 21)	IgG4 (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GG (配列番号 4)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 22) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 23) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 24) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 5		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 25) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C

10

20

30

40

【表 5 - 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG	Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 26) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
構築物 6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番 号 7)	(配列番号 27) IWELKKDVYV VELDWPDPAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHC PPCPAELLG G (配列番号 8)	(配列番号 28) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 7		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9)	(配列番号 29) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE	IgG1Fc サイレント (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 30) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc サイレント (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 8		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番 号 9)	(配列番号 31) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL	IgG1Fc サイレント (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 32) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc サイレント (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番 号 9)	(配列番号 33) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD	IgG1Fc サイレント (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A/L235A/P329G 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 34) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc サイレント (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329G 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 10		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (配列番 号 11)	(配列番号 35) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

10

20

30

40

50

【表 5 - 10】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 36) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGSGGGG GSEPKSSDKT HTPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTV D KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
構築物 11		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 37) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
RVESKYGPP CPPCPAPEFL	(配列番号 38)	IgG4 Fc

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GG (配列番号 2)	RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLG	(IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P
構築物 12		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 39) IWELKKDVYV VELDWPDP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LLSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P
GGGSRVES KYGPPCPPCP APEFLGG (配列番号 13)	(配列番号 40) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG4 Fc (IL-12 p35)

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 13		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 41) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCAPE FLGG (配列番 号 14)	(配列番号 42) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF	IgG4 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	RIRAVTIDRV MSYLNASGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLV SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	ジスルフィド結合安定化用置換: S354C Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P
構築物 14		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 43) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPKLNQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 44) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安定化用置換: S354C

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 15		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 45) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYSSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSPRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 46) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	
構築物 16		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 47) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGSGGG GSEPKSSDK THTCPPCAP ELLGG (配列番号 16)	(配列番号 48) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	
構築物 17		
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8)	(配列番号 49) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNM LAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPSPRDEL TENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
EPKSSDKTH TCPPCAPEL LGG (配列番 号 7)	(配列番号 50) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDEL T KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVLV SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 5 - 17】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
構築物 18		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 51) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFRLCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 52) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS GGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 19		

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSEPKS SDKTHTCP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 53) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITISD TL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTEENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる)
GGGGSEPKS SDKTHTCP CPAPE LLGG (配列番号 15)	(配列番号 54) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KENWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる)
構築物 19-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL	(配列番号 69)	IgG4 (IL-12 p40)

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GG (配列番号 2)	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 70) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 19-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 71) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W

10

20

30

40

50

【表 5 - 20】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 72) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 19-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 73) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLG	(サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 74) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 19-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 75) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	(サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 76) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGlassIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 19-5		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 77) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: C177S, Y292C

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	(サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 78) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
構築物 19-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 79) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	(サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる) 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (配列番号 8)	(配列番号 80) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTV D KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 19-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 81) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITISDL TFSVKSSRG S DPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPTDW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は欠失させる)

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 82) RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNACTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 19-8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番 号 9)	(配列番号 83) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる)

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 84) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S, V185C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 19-9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 85) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) FcγR 結合低減用置換: L234A/L235A/P329G

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 86) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTV D KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S V185C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329G 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 19-10		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA EGA (配列番 号 11)	(配列番号 87) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: C177S, Y292C (サブユニット間の天 然ジスルフィド結合 は欠失させる) FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 88) RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: C74S, V185C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 20		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 55) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTITSTDL TFSVKSSRGs SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K370E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (配列番号 3)	(配列番号 56) RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: E357N/D399V/F405T p35 置換: V185C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 20-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (配列番号 2)	(配列番号 89) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERV RG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サ ブユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(配列番号 90)	IgG4 (IL-12 p35)

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 0】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPEFLGG (配列番号 3)	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T p35 置換: V185C (サブ ユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P
構築物 20-2		
RVESKYGPP CPPCAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 91) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD SDFSFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サブ ユニット間の天然 ジスルフィド結合は 保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(配列番号 92) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPEFEGG (配列番号 5)	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P および L235E
構築物 20-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 93) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP	(配列番号 94) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
CPAPEFEGG (配列番号 5)	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP CPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329A
構築物 20-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (配列番号 4)	(配列番号 95) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD SDFSFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LLSLSLG	IgG4 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/R409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) Fab アーム交換阻止 および熱安定性改善 用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (配列番号 5)	(配列番号 96) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	IgG4 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) Fab アーム交換阻止および熱安定性改善用置換: S228P FcγR 結合低減用置換: S228P, L235E, P329G
構築物 20-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (配列番号 7)	(配列番号 97) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG	(配列番号 98) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
G (配列番号 8)	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	ジスルフィド結合安定化用置換: S354C p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 20-6		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 99) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEGDIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 100) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 20-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 101) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELLENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFS CS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 102) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGSGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 20-8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 103) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329G 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCAPEAA	(配列番号 104) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GG (配列番号 10)	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPEAAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329G 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 20-9		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA EGA (配列番号 11)	(配列番号 105) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR および C1q 結合低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 106) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	p35 置換: V185C (サブユニット間の天然ジスルフィド結合は保持する) FcγR および C1q 結合低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 21		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番号 9)	(配列番号 57) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A p40 におけるさらなる変異: IL-12 安定化ジスルフィド結合を導入するため Y292C 上部ヒンジの C220 は S に変異

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 58) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A p35 におけるさらな る変異: IL-12 安定化 ジスルフィド結合を 導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 22		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (配列番 号 9)	(配列番号 59) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEWASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELLENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLT	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため Y292C

10

20

30

40

【表 5 - 4 0】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (配列番号 10)	(配列番号 60) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR 結合低減用置換: L234A, L235A, P329A さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異
構築物 23		
EPKSSDKTH TCPCPAPEA EGA (配列番 号 11)	(配列番号 61) IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSSHLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVGR DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST	IgG1 (IL-12 p40) ヘテロ二量体化変異: K360E/K409W ジスルフィド結合安 定化用置換: Y349C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG のタイプ (IL-12 サブユニット); 変異/ 置換
	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDEL ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため Y292C 上部ヒンジの C220 は S に変異
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (配列番号 12)	(配列番号 62) RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 (IL-12 p35) ヘテロ二量体化変異: Q347R/D399V/F405T ジスルフィド結合安 定化用置換: S354C FcγR および C1q 結合 低減用置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S さらなる変異 IL-12 安定化ジスルフィド 結合を導入するため V185C 上部ヒンジの C220 は S に変異

*アミノ酸配列はC末端でリシン(K)をさらに含み得る。

【0182】

IL-12サブユニット

IL-12は、p40サブユニットおよびp35サブユニットを含む多サブユニットタンパク質である。成熟野生型IL-12 p40のアミノ酸配列は、下に示す配列番号127のGenBank Accession No. NP_002178.2のアミノ酸23～328である。成熟野生型IL-12 p35のアミノ酸配列は、下に示す配列番号128のGenBank Accession No. NP_000873.2のアミノ酸57～253である。ここで使用するp40およびp35のアミノ酸残基のナンバリングは、成熟野生型タンパク質配列に対応する。ここで使用するIL-12 p40サブユニットは、配列番号127と少なくとも90%(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%)同一であるアミノ酸配列を含む。ここで使用するIL-12 p35サブユニットは、配列番号128と少なくとも90%(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94

10

20

30

40

50

%、95%、96%、97%、98%または99%)同一であるアミノ酸配列を含む。

【0183】

前記態様の何れかのある実施態様において、IL-12のp40およびp35サブユニットは、それぞれ配列番号121および122；127および128；201および202；203および204；123および124；または125および126のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、第一ポリペプチドはIL-12のp40サブユニットのアミノ酸配列を含み、第二ポリペプチドはIL-12のp35サブユニットのアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、第一ポリペプチドはIL-12のp35サブユニットのアミノ酸配列を含み、第二ポリペプチドはIL-12のp40サブユニットのアミノ酸配列を含む。

10

【0184】

ある実施態様において、本発明は、第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質であって、ここで、第一ポリペプチドはリンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合したIL-12の第一サブユニット；および第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合したIL-12の第二の異なるサブユニットをさらに含み、ここで、IL-12の第一および第二の異なるサブユニットは互いに結合しており、ここで、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含む、ここで、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドは互いに結合しており、そして、ここでIL-12の第一サブユニットはY292C置換を有するp40サブユニットであり、IL-12の第二の異なるサブユニットはV185C置換を有するp35サブユニットであるものを含む。ある実施態様において、IL-12の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットは、それぞれ配列番号125および126のアミノ酸配列を含む。

20

【0185】

IL-12の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットは、表4に記載の構築物120、120-1、120-2、120-3、120-4、120-5、120-6および120-7および表5に記載の構築物20、20-1、20-2、20-3、20-4、20-5、20-6、20-7、20-8および20-9を含むが、これらに限定されない配列を有するFc融合タンパク質を形成するように、ここに開示する何れかのリンカーを介して、抗体Fcドメインポリペプチドの何れかに融合され得る。

30

【0186】

ある実施態様において、IL-12のp40サブユニットはC177の置換をさらに含み、IL-12のp35サブユニットはC74の置換をさらに含む。ある実施態様において、IL-12のp40サブユニットにおけるC177はSに置換され、IL-12のp35サブユニットにおけるC74はSに置換される。ある実施態様において、IL-12のp40およびp35サブユニットは、それぞれ配列番号123および124のアミノ酸配列を含む。

【0187】

IL-12の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットは、表4に記載の構築物119、119-1、119-2、119-3、119-4、119-5、119-6、119-7および119-8および表5に記載の構築物19、19-1、19-2、19-3、19-4、19-5、19-6、19-7、19-8、19-9および19-10を含むが、これらに限定されない配列を有するFc融合タンパク質を形成するように、ここに開示する何れかのリンカーを介して、抗体Fcドメインポリペプチドの何れかに融合され得る。

40

50

【表 6 - 1】

表 6: ヒト IL-12 p40 および p35 アミノ酸配列 s

IL-12 p40	IL-12 p35
ヒト IL-12 p40 野生型 IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (配列番号 127)	ヒト IL-12 p35 野生型 RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列番号 128)
ヒト IL-12 p40 C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWPDPAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (配列番号 201)	ヒト IL-12 p35 C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (配列番号 202)
ヒト IL-12 p40 Y292C IWELKKDVYV VELDWPDPAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGSS	ヒト IL-12 p35 V185C RNLPVATPDP GMFPCLLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (配列番号 203)	IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (配列番号 204)
ヒト IL-12 p40 Q56R IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS (配列番号 121)	ヒト IL-12 p35 E50V RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS (配列番号 122)
ヒト IL-12 p40 Q56R C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS	ヒト IL-12 p35 E50V C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (配列番号 124)

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

(配列番号 123)	
ヒト IL-12 p40 Q56R Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRG SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS (配列番号 125)	ヒト IL-12 p35 E50V V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMALV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS (配列番号 126)

10

20

【0188】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、配列番号290のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号291のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む。ある実施態様において、配列番号290および配列番号291を含む本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第一抗体FcドメインポリペプチドのCH3ドメインにY349C変異および第二抗体FcドメインポリペプチドのCH3ドメインにS354C変異を含む。ある実施態様において、配列番号290および配列番号291を含む本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、Fcドメイン間のヘテロ二量体化を促進するため各Fcドメインポリペプチド配列に異なる変異を含む。

30

【0189】

ある実施態様において、第一ポリペプチド配列は、K360EおよびK409W置換を含む第一抗体Fcドメインポリペプチド(ヒトIgG1)配列を含む。ある実施態様において、第二ポリペプチド配列は、Q347R、D399VおよびF405T置換を含む第二抗体Fcドメインポリペプチド(ヒトIgG1)配列を含む。ある実施態様において、第一ポリペプチドおよび第二ポリペプチドアミノ酸配列は、エフェクター機能を低減するための1以上の変異を含む。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、LALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異を含む。

【0190】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第一ポリペプチド(配列番号290)において、ヒトIL-12のp40サブユニットは第一アミノ酸配列を含む第一リンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合し、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第二ポリペプチド(配列番号291)において、ヒトIL-12のp35サブユニットは第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合する。

40

【0191】

配列番号290は、ヒトIgG1 Fcドメインポリペプチドに融合したヒトIL-12のp40サブユニット(下線アミノ酸)の配列である。変異は太字で示す。

50

【化 1】

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTLRCEAK
NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQVGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYYSSSWSEWASVPCSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTENQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 290)

10

【0192】

配列番号 291 は、ヒト IgG1 Fc ドメインポリペプチドに融合したヒト IL-12 の p35 サブユニット(下線アミノ酸)の配列である。変異は太字で示す。

【化 2】

RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIK
LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE
PRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 291)

20

【0193】

それぞれ配列番号 290 および配列番号 291 のアミノ酸配列により表される第一および第二ポリペプチドは、配列番号 290 における第一抗体 Fc ドメインポリペプチド配列(ヒト IgG1)の CH3 ドメインの Y349C 変異(太字および下線)および配列番号 291 における第二抗体 Fc ドメインポリペプチド配列(ヒト IgG1)の CH3 ドメインの S354C 変異(太字および下線)によりジスルフィド結合を形成し、これは、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質に安定性を付与する(EU システムによる Fc ナンバリング)。

30

【0194】

ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の 2 つの Fc ドメインポリペプチド間のヘテロ二量体化を促進するために、配列番号 290 の第一抗体 Fc ドメインポリペプチド配列(ヒト IgG1)は CH3 ドメインにおける K360E および K409W 置換を含み、配列番号 291 の第二の異なる Fc ドメインポリペプチド配列(ヒト IgG1)は CH3 ドメインにおける Q347R、D399V および F405T 置換を含む(EU システムによる Fc ナンバリング)。

40

【0195】

配列番号 290 および配列番号 291 の第一抗体 Fc ドメインポリペプチド配列および第二の異なる Fc ドメインポリペプチド配列(ヒト IgG1)は、エフェクター機能を低減するための L234A、L235A および P329A(LALAPA)変異を含む。

スペーサーペプチド

【0196】

例示的スペーサーペプチド配列を表 7 に提供し、例示的完全長リンカー配列を表 4 および

50

5 に提供する。

【0197】

本発明の第一ポリペプチド内で、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットは、アミノからカルボキシル方向でリンカーを経て第一抗体Fcドメインポリペプチド(例えば、表2に開示するIgG4抗体Fcバリエーション配列またはIgG1抗体Fcバリエーション配列)に融合されている。そして本発明の第二ポリペプチド内で、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、アミノからカルボキシル方向でリンカーを経て第二抗体Fcドメインポリペプチド(例えば、表2に開示するIgG4抗体Fcバリエーション配列またはIgG1抗体Fcバリエーション配列)に融合されている。

【0198】

ある実施態様において、本発明の多サブユニットタンパク質の第一サブユニットはリンカーを経て第一抗体Fcドメイン配列に融合され、ここで、リンカーはスペーサーペプチドL₁および配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239または240のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。ある実施態様において、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットはリンカーを経て第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合され、ここで、リンカーはスペーサーペプチドL₂および配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239または240のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【0199】

ある実施態様において、L₁およびL₂はペプチドリンカーであり、例えば、L₁および／またはL₂は4～50アミノ酸残基を含む。ある実施態様において、L₁は4～50アミノ酸残基からなる。ある実施態様において、L₁は4～20アミノ酸残基からなる。ある実施態様において、L₂は4～50アミノ酸残基からなる。ある実施態様において、L₂は約4～20アミノ酸残基からなる。ある実施態様において、L₁およびL₂は各々独立して約4～50アミノ酸残基からなる。ある実施態様において、L₁およびL₂は各々独立して4～20アミノ酸残基からなる。

【0200】

ある実施態様において、L₁およびL₂は最適化長および／またはアミノ酸組成を有する。ある実施態様において、L₁およびL₂は同じ長さであり、同じアミノ酸組成を有する。他の実施態様において、L₁およびL₂は異なる。

【0201】

ある実施態様において、L₁とL₂は同じアミノ酸数である；ある実施態様において、L₁はL₂より長い(すなわち、アミノ酸数が多い)；ある実施態様において、L₁はL₂より短い(すなわち、アミノ酸数が少ない)。

【0202】

ある実施態様において、L₁および／またはL₂は、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12アミノ酸残基からなる「短」である。故に、ある場合、スペーサーペプチドは、約12以下のアミノ酸残基からなる。0アミノ酸残基の場合、スペーサーペプチドはペプチド結合である。ある実施態様において、L₁および／またはL₂は、例えば15、20または25アミノ酸残基からなる「長」である。ある実施態様において、スペーサーペプチドは、約3～約15、例えば8、9または10連続アミノ酸残基からなる。L₁およびL₂のアミノ酸組成に関して、ペプチドは、本発明のタンパク質の第一および第二ポリペプチドに柔軟性を付与する、第一および第二の異なるサブユニットの互いの結合を妨害しないならびにプロテアーゼからの開裂に抵抗する性質から選択される。例えば、グリシンおよびセリン残基は、一般にプロテアーゼ抵抗性を提供する。多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239または240のアミノ酸配列に結合するのに適するおよび／または多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239または240のアミノ酸配列に結合するのに適するスペーサーペプチドは、リンカーの一部として、(GS)_n、(GGS)_n、(GGG

10

20

30

40

50

号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9 または配列番号 1 2 0 に示す配列を含まない。

【 0 2 0 5 】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドを含み、ここで、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体 F c ドメインポリペプチド、例えば、I g G 4 抗体の F c ドメインポリペプチドまたは I g G 1 抗体の F c ドメインポリペプチドに結合する。本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含み、ここで、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体 F c ドメインポリペプチド、例えば、I g G 4 抗体の F c ドメインポリペプチドまたは I g G 1 抗体の F c ドメインポリペプチドに結合する。

10

【 0 2 0 6 】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含むリンカーは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを F c ドメインポリペプチドに結合するもの、および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここでさらなるサブユニットは、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含まないリンカーで第二抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するものを含む。

20

【 0 2 0 7 】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを F c ドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに結合するもの、および第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチド、ここで、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 1 1 8 ; (G 4 S)₃) を含むリンカーで第二抗体 F c ドメインポリペプチドに結合するものを含む。

30

【 0 2 0 8 】

本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドを含み、ここで、(G G G G S)_{n = 2} (配列番号 1 0 9) を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体 F c ドメインポリペプチド、例えば、I g G 4 抗体の F c ドメインポリペプチドまたは I g G 1 抗体の F c ドメインポリペプチドに結合する。本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含み、ここで、(G G G G S)_{n = 2} (配列番号 1 0 9) を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体 F c ドメインポリペプチド、例えば、I g G 4 抗体の F c ドメインポリペプチドまたは I g G 1 抗体の F c ドメインポリペプチドに結合する。

40

【 0 2 0 9 】

本開示のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の一部は (G G G G S)_{n = 2} (配列番号 1 0 9) を含むリンカーを含み、これは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体 F c ドメインポリペプチド、例えば I g G 4 抗体の F c ドメインポリペプチドまたは I g G 1 抗体の F c ドメインポリペプチドに結合しており、多サブユニットタンパク質の第二

50

の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチドまたはIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結合する。

【0210】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含むリンカーは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドに結合するもの、および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここで、多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットが $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含まないリンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

10

【0211】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに結合するもの、および第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここで、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含むリンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

20

【0212】

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドを含み、ここで、 $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチド、例えば、IgG4抗体のFcドメインポリペプチドまたはIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結合する。本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドを含み、ここで、 $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチド、例えば、IgG4抗体のFcドメインポリペプチドまたはIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結合する。

30

【0213】

本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカーを含み、これは、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを第一抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチドまたはIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結合しており、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを第二抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチドまたはIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結合する。

【0214】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカーは多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドに結合するもの、および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここで多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含まないリンカーで第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

40

【0215】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニ

50

ットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットに結合するもの、および第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチド、ここで、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

【0216】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)配列を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドに結合するもの、および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここで、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含むリンカー配列で第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

【0217】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の一部は多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第一抗体Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドであって、ここで、 $(GGGS)_n=2$ (配列番号109)を含むリンカー配列が多サブユニットタンパク質の第一サブユニットをFcドメインポリペプチドに結合するもの、および多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドであって、ここで、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが $(GGGS)_n=1$ (配列番号110)を含むリンカー配列で第二抗体Fcドメインポリペプチドに結合するものを含む。

【0218】

ヘテロ二量体化促進のためのFcドメインおよび置換

本発明のタンパク質の集合は、第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニット配列を含む第一ポリペプチド(例えば、表2に開示するIgG4抗体Fcバリエーション配列またはIgG1抗体Fcバリエーション配列)および第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニット配列を含む第二ポリペプチド(例えば、表2に開示するIgG4抗体Fcバリエーション配列またはIgG1抗体Fcバリエーション配列)を同じ細胞で発現させることにより達成でき、これは、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の集合に至る。集合したタンパク質は、互いに結合した第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドを有するヘテロ二量体Fcドメインポリペプチドを有する。Fcのヘテロ二量体の優先的集合の促進は、US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480およびUS14/830336に示されるとおり、各抗体重鎖定常領域のCH3ドメインに種々の変異を組み込むことにより達成され得る。例えば、変異はヒトIgG1に基づきCH3ドメインになし、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチド内に、これら2鎖が互いに選択的にヘテロ二量体化することを可能とする、別個の対のアミノ酸置換取り込むことによりなし得る。下記のアミノ酸置換の位置は、KabattにおけるようなEUIンデックスに従い全て番号付けされる。

【0219】

あるシナリオでは、第一抗体Fcドメインポリペプチドにおけるアミノ酸置換は元のアミノ酸を、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)またはトリプトファン(W)から選択されるより大型のアミノ酸に置き換え、少なくとも1つの第二抗体Fcドメインポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、元のアミノ酸をアラニン(A)、セリン(S)、ス

10

20

30

40

50

レオニン(T)またはバリン(V)から選択されるより小型のアミノ酸で置き換え、大型アミノ酸置換(突起)が小型アミノ酸置換(洞)の表面に合うようにする。例えば、一方の抗体FcドメインポリペプチドはT366W置換を取り込み得て、他方はT366S、L368AおよびY407Vを含む3置換を取り込み得る。

【0220】

本発明の多サブユニットタンパク質の第一サブユニット配列を含む第一ポリペプチドまたは多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニット配列を含む第二ポリペプチドを、CH1ドメインを伴いまたは伴わずにヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含むIgG定常領域などの抗体定常領域と少なくとも90%(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%)同一であるアミノ酸配列と所望により結合させ得る。ある実施態様において、定常領域のアミノ酸配列は、ヒトIgG1定常領域、IgG2定常領域、IgG3定常領域またはIgG4定常領域などのヒト抗体定常領域と少なくとも90%(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%)同一である。ある他の実施態様において、定常領域のアミノ酸配列は、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスまたはウマなどの他の哺乳動物からの抗体定常領域と少なくとも90%(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%)同一である。ヒトIgG1定常領域と比較して、1以上の変異を定常領域に、例えばQ347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411および／またはK439に取り込み得る。例示的置換は、例えば、Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439DおよびK439Eを含む。

【0221】

ある実施態様において、ヒトIgG1定常領域のCH1に取り込み得る変異は、アミノ酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171および／またはV173であり得る。ある実施態様において、ヒトIgG1定常領域のCκに取り込み得る変異は、アミノ酸E123、F116、S176、V163、S174および／またはT164であり得る。

【0222】

アミノ酸置換は、表8に示す置換の次のセットから選択される。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8

	第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
セット 1	S 3 6 4 E / F 4 0 5 A	Y 3 4 9 K / T 3 9 4 F
セット 2	S 3 6 4 H / D 4 0 1 K	Y 3 4 9 T / T 4 1 1 E
セット 3	S 3 6 4 H / T 3 9 4 F	Y 3 4 9 T / F 4 0 5 A
セット 4	S 3 6 4 E / T 3 9 4 F	Y 3 4 9 K / F 4 0 5 A
セット 5	S 3 6 4 E / T 4 1 1 E	Y 3 4 9 K / D 4 0 1 K
セット 6	S 3 6 4 D / T 3 9 4 F	Y 3 4 9 K / F 4 0 5 A
セット 7	S 3 6 4 H / F 4 0 5 A	Y 3 4 9 T / T 3 9 4 F
セット 8	S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q	L 3 6 8 D / K 3 7 0 S
セット 9	L 3 6 8 D / K 3 7 0 S	S 3 6 4 K
セット 10	L 3 6 8 E / K 3 7 0 S	S 3 6 4 K
セット 11	K 3 6 0 E / Q 3 6 2 E	D 4 0 1 K
セット 12	L 3 6 8 D / K 3 7 0 S	S 3 6 4 K / E 3 5 7 L
セット 13	K 3 7 0 S	S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q
セット 14	F 4 0 5 L	K 4 0 9 R
セット 15	K 4 0 9 R	F 4 0 5 L

10

20

【0 2 2 3】

あるいは、アミノ酸置換は、表 9 に示す次の置換のセットから選択される。

【表 9】

表 9	第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
セット 1	K 4 0 9 W	D 3 9 9 V / F 4 0 5 T
セット 2	Y 3 4 9 S	E 3 5 7 W
セット 3	K 3 6 0 E	Q 3 4 7 R
セット 4	K 3 6 0 E / K 4 0 9 W	Q 3 4 7 R / D 3 9 9 V / F 4 0 5 T
セット 5	Q 3 4 7 E / K 3 6 0 E / K 4 0 9 W	Q 3 4 7 R / D 3 9 9 V / F 4 0 5 T
セット 6	Y 3 4 9 S / K 4 0 9 W	E 3 5 7 W / D 3 9 9 V / F 4 0 5 T

30

【0 2 2 4】

あるいは、アミノ酸置換は、表 10 に示す次の置換のセットから選択される。

40

50

【表 10】

表 10		
	第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
セット 1	T 3 6 6 K / L 3 5 1 K	L 3 5 1 D / L 3 6 8 E
セット 2	T 3 6 6 K / L 3 5 1 K	L 3 5 1 D / Y 3 4 9 E
セット 3	T 3 6 6 K / L 3 5 1 K	L 3 5 1 D / Y 3 4 9 D
セット 4	T 3 6 6 K / L 3 5 1 K	L 3 5 1 D / Y 3 4 9 E / L 3 6 8 E
セット 5	T 3 6 6 K / L 3 5 1 K	L 3 5 1 D / Y 3 4 9 D / L 3 6 8 E
セット 6	E 3 5 6 K / D 3 9 9 K	K 3 9 2 D / K 4 0 9 D

10

【0225】

あるいは、各ポリペプチド鎖のポリペプチド鎖は表 11 から選択される。

【表 11】

表 11

第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
L 3 5 1 Y、D 3 9 9 R、D 3 9 9 K、 S 4 0 0 K、S 4 0 0 R、Y 4 0 7 A、 Y 4 0 7 I、Y 4 0 7 V	T 3 6 6 V、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、 T 3 6 6 M、N 3 9 0 D、N 3 9 0 E、 K 3 9 2 L、K 3 9 2 M、K 3 9 2 V、 K 3 9 2 F、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、 K 4 0 9 F、K 4 0 9 W、T 4 1 1 D お よび T 4 1 1 E

20

【0226】

あるいは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を表 12 における置換の次のセットから選択でき、ここで、第一ポリペプチドカラムに示す位置が、何らかの既知負荷電アミノ酸で置換され、第二ポリペプチドカラムに示す位置が、何らかの既知正荷電アミノ酸で置換される。

30

【表 12】

表 12

第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
K 3 9 2、K 3 7 0、K 4 0 9 または K 4 3 9	D 3 9 9、E 3 5 6 または E 3 5 7

【0227】

あるいは、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を表 13 の次のセットから選択でき、ここで、第一ポリペプチドカラムに示す位置が、何らかの既知正荷電アミノ酸で置換され、第二ポリペプチドカラムに示す位置が、何らかの既知負荷電アミノ酸で置換される。

40

【表 13】

表 13

第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
D 3 9 9、E 3 5 6 または E 3 5 7	K 4 0 9、K 4 3 9、K 3 7 0 または K 3 9 2

50

【0228】

あるいは、アミノ酸置換を表14の次のセットから選択できる。

【表14】

表14

第一ポリペプチド	第二ポリペプチド
T350V、L351Y、F405AおよびY407V	T350V、T366L、K392LおよびT394W

【0229】

これとは別にまたはこれに加えて、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の構造的安定性を、2つのポリペプチド界面内に人工ジスルフィド結合を形成する第一または第二ポリペプチド鎖の何れかにS354Cおよび逆のポリペプチド鎖にY349Cを導入することにより高めることができる。

【0230】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366位で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366、L368およびY407から選択される1か所以上で異なる。

【0231】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366、L368およびY407から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366位で異なる。

【0232】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とE357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411から選択される1か所以上で異なる。

【0233】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とE357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411から選択される1か所以上で異なる。

【0234】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とL351、D399、S400およびY407から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366、N390、K392、K409およびT411から選択される1か所以上で異なる。

【0235】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とT366、N390、K392、K409およびT411から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とL351、D399、S400およびY407から選択される1か所以上で異なる。

10

20

30

40

50

【0236】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とQ347、Y349、K360およびK409から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とQ347、E357、D399およびF405から選択される1か所以上で異なる。

【0237】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とQ347、E357、D399およびF405から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349、K360、Q347およびK409から選択される1か所以上で異なる。

10

【0238】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とK370、K392、K409およびK439から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とD356、E357およびD399から選択される1か所以上で異なる。

【0239】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とD356、E357およびD399から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とK370、K392、K409およびK439から選択される1か所以上で異なる。

20

【0240】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とL351、E356、T366およびD399から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349、L351、L368、K392およびK409から選択される1か所以上で異なる。

30

【0241】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349、L351、L368、K392およびK409から選択される1か所以上で異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とL351、E356、T366およびD399から選択される1か所以上で異なる。

【0242】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とS354C置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349C置換により異なる。

40

【0243】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とY349C置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とS354C置換により異なる。

【0244】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とK360EおよびK409W置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列はIgG1定常領域のアミノ酸配列とO347R、D399VおよびF405T置換により異なる。

【0245】

50

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と O 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T 置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と K 3 6 0 E および K 4 0 9 W 置換により異なる。

【0246】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 W 置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 S、T 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 置換により異なる。

【0247】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 S、T 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 W 置換により異なる。

【0248】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V 置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L および T 3 9 4 W 置換により異なる。

【0249】

ある実施態様において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L および T 3 9 4 W 置換により異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖アミノ酸配列は I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V 置換により異なる。

【0250】

タンパク質の製造および／または保存中、N末端グルタミン酸(E)またはグルタミン(Q)が環化してラクタムを形成し得ることを、当業者は認識する(例えば、自発的にまたは製造および／または保存中存在する酵素による触媒により)。従って、ある実施態様において、ポリペプチドのアミノ酸配列のN末端残基がEまたはQであるとき、ピログルタミン酸に置換されたEまたはQに対応するアミノ酸配列もここで考慮される。

【0251】

タンパク質の製造および／または保存中、タンパク質のC末端リシン(K)が除去され得ることを、当業者は認識する(例えば、自発的にまたは製造および／または保存中存在する酵素による触媒により)。このようなKの除去は、C末端にFcドメインを含むタンパク質でしばしば観察される。従って、ある実施態様において、ポリペプチドのアミノ酸配列のC末端残基(例えば、Fcドメイン配列)がKであるとき、除去されたKに対応するアミノ酸配列もここで考慮される。

【0252】

エフェクター機能を低減するための変異

ある態様において、本発明は、(a)第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを含む第一ポリペプチド；および(b)第二抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質であって、ここで、第一および第二抗体Fcドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、ここで、第一および／または第二抗体FcドメインポリペプチドはFcのエフェクター機能を低減させる1以上の変異を含み、そして、ここで多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットは互いに結合しているものを提供する。ある実施態様において、Fcのエフェクター機能を低減させる1以上の変異を含むここに開示するヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、エフェクター機能を低減するFc変異がないその対応物より、腫瘍増殖阻害活性が高い。ここで意図される変異はアミノ酸残基の置換

10

20

30

40

50

、挿入および欠失を含む。ここに開示する F c ドメインまたはヒンジ領域における全アミノ酸位置は、E U ナンバリングに従い番号付けされる。

【0253】

ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、F c ドメインポリペプチドが抗体依存性細胞傷害(ADCC)および／または抗体依存性細胞食作用(ADCP)を誘導する能力を低減させる、1 以上の変異を含む。ADCC および ADCP は、一般に F c 受容体が介在する。例えば、ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、ヒト I g G (例えば、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3 またはヒト I g G 4) 抗体配列である。F c ガンマ受容体(F c γ R)とも称するヒト I g G の F c 受容体は、活性化 F c ガンマ受容体 F c γ R I (CD 6 4)、F c γ R I I A (CD 3 2 A)、F c γ R I I I A (CD 1 6 または CD 1 6 A) および F c γ R I I I B (CD 1 6 B) および阻害性 F c ガンマ受容体 F c γ R I I B (CD 3 2 B) を含むが、これらに限定されない。従って、ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドにおける活性化 F c γ R (例えば、F c γ R I、F c γ R I I A、F c γ R I I I A または F c γ R I I I B) への結合を低減する 1 以上の変異を含む。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドにおける阻害性 F c γ R (例えば、F c γ R I I B) への結合を増加させる 1 以上の変異を含む。

10

【0254】

活性化 F c γ R への結合を低減するおよび／または阻害性 F c γ R への結合を増加させる F c 変異は当分野で知られる。例えば、ヒンジおよび F c 領域内で、CD 1 6 結合はヒンジ領域および C H 2 ドメインが介在する。例えば、ヒト I g G 1 内で、CD 1 6 との相互作用は、主に C H 2 ドメインのアミノ酸残基 A s p 2 6 5 - G l u 2 6 9、A s n 2 9 7 - T h r 2 9 9、A l a 3 2 7 - I l e 3 3 2、L e u 2 3 4 - S e r 2 3 9 および炭水化物残基 N - アセチル - D - グルコサミンに集約される(Sondermann et al, Nature, 406 (6793):267-273参照)。既知ドメインに基づき、変異を、ファージディスプレイライブラリーまたは酵母表面提示 c D N A ライブラリーを使用するなどにより、CD 1 6 への結合親和性を増強または低減するように選択できまたは相互作用の既知三次元構造に基づき設計し得る。

20

【0255】

Want et al., Protein Cell (2018) 9(1):63-73 にレビューされるとおり、アミノ酸位置 2 3 2 ~ 2 3 9、2 6 5 ~ 2 7 0、2 9 6 ~ 2 9 9 および 3 2 5 ~ 3 3 2 を含む領域は、ヒト I g G 1 F c の結晶構造によると活性化 F c γ R 結合に関与する。Wang et al. はまたヒト I g G 4 の L 2 3 5 E および F 2 3 4 A / L 2 3 5 A 変異、ヒト I g G 1 の L 2 3 4 A / L 2 3 5 A 変異および I g G 抗体の N 2 9 7 変異(例えば、N 2 9 7 A、N 2 9 7 Q、N 2 9 7 G または N 2 9 7 D) が活性化 F c γ R 結合を低減することも開示する。米国特許 8,969,526 に開示されるとおり、3 2 9 位の変異(例えば、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G または P 3 2 9 R) も活性化 F c γ R 結合を低減する。活性化 F c γ R 結合に関与するさらなるアミノ酸位置および変異(例えば、E 2 3 3 P 変異)は、米国特許 7,943,743 および Isaacs et al., J. Immunol. (1998) 161:3862-69 に開示される。

30

【0256】

従って、ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 9 7 および 3 2 9 から選択される 1 か所以上に変異(例えば、野生型ヒト I g G 1 に比して置換)を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 E 2 3 3 P ; L 2 3 4 A (ヒト I g G 1) または F 2 3 4 A (ヒト I g G 4) ; L 2 3 5 A または L 2 3 5 E ; N 2 9 7 A、N 2 9 7 Q、N 2 9 7 G または N 2 9 7 D ; および／または P 3 2 9 A、P 3 2 9 G または P 3 2 9 R を含むヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を含むヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメ

40

50

インポリペプチドは、変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A を含む ヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 L 2 3 5 E を含む ヒト I g G 4 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 L 2 3 5 E および P 3 2 9 A を含む ヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。

【0257】

ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、F c ドメインポリペプチドが補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導する能力を低減させる1以上の変異を含む。CDCは、一般に補体成分(例えば、C1q)が介在する。従って、ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドに補体成分(例えば、C1q)への結合を低減する1以上の変異を含む。

【0258】

C1qへの結合を低減する F c 変異は当分野で知られる。例えば、米国特許 5,648,260 および 5,624,821 に開示するとおり、F c の 234 位、235 位、236 位、237 位、297 位、318 位、320 位および 322 位のアミノ酸残基は C1q 結合に関与する。Tao et al., J. Exp. Med. (1993) 178:661-667 および Brekke et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2542-47 に開示されるとおり、331 位の残基 P r o は C1q 結合に関与する。Idusogie et al., J. Immunol. (2000) 164:4178-84 に開示のとおり、F c の 270 位(例えば、D 270 A)、322 位(K 322 A)、329 位(例えば、P 329 A) および 331 位(例えば、P 331 A、P 331 S または P 331 G)の変異は C1q 結合を低減させる。

【0259】

従って、ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、234、235、236、237、270、297、318、320、322、329 および 331 から選択される1か所以上に変異(例えば、野生型ヒト I g G 1 に比して置換)を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 G 237 A、A 330 S、P 331 S および／または P 329 A を含む ヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 G 237 A、A 330 S および P 331 S を含む ヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは、変異 P 329 A を含む ヒト I g G 1 抗体 F c ドメインポリペプチドである。

【0260】

A D C C および／または A D C P を低減する変異および C D C を低減する変異を組み合わせ得る。ある実施態様において、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは F c ドメインポリペプチドが A D C C および／または A D C P を誘導する能力を低減させる1以上の変異を含み、さらに F c ドメインポリペプチドが C D C を誘導する能力を低減させる1以上の変異を含む。ある実施態様において、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々 F c ドメインポリペプチドが A D C C および／または A D C P を誘導する能力を低減させる1以上の変異を含み、さらに F c ドメインポリペプチドが C D C を誘導する能力を低減させる1以上の変異を含む。

【0261】

ある実施態様において、I g G 4 F c を有する本発明のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドに F c γ R (例えば、F c γ R I、F c γ R I I A、F c γ R I I B、F c γ R I I I A または F c γ R I I I B) または補体成分(例えば、C1q)への結合を低減する1以上の変異を含む。このような変異は、エフェクター機能の低減に有用である。例えば、本開示のタンパク質は、S P L E (S 228 P および L 235 E) 変異、S P L E P A (S 228 P、L 235 E および P 329 A) 変異または S P L E P G (S 228 P、L 235 E および P 329 G) 変異を含み得る。

【0262】

ある実施態様において、IgG1Fcを有する本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第一および／または第二ポリペプチドにFcγR(例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIAまたはFcγRIIIB)または補体成分(例えば、C1q)への結合を低減する1以上の変異を含む。このような変異は、エフェクター機能の低減に有用である。例えば、本開示のタンパク質は、LALA(L234AおよびL235A)変異、LALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異、LALAPG(L234A、L235AおよびP329G)変異またはLALEGAAASS(L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S)変異を含み得る。

【0263】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々変異P329GまたはP329Aを含む第一抗体IgG4またはIgG1Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体IgG4またはIgG1Fcドメインポリペプチドを含む。

【0264】

ある実施態様において、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチドは、各々A330SおよびP331Sから選択される変異を含む。

【0265】

ある実施態様において、第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび第二抗体Fcドメインポリペプチド各々変異A330SおよびP331Sを含む。

【0266】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第一ポリペプチドにおいて、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットは、第一リンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第二ポリペプチドにおいて、多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットは、第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合されている。このような用途に適するリンカーのアミノ酸配列は、表題「IgG4構築物」および「IgG1構築物」下に記載される。第一および／または第二ポリペプチドに使用するのに適するさらなるリンカー配列は、野生型IgG(例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3またはヒトIgG4)ヒンジ配列およびその変異体形態を含むが、これらに限定されない。例えば、ある実施態様において、第一および第二リンカーは各々アミノ酸配列ESKYGPPCPPCPAPEFXGG(ここで、XはLまたはEである)(配列番号280)またはSKYGPPCPPCPAPEFXGG(ここで、XはLまたはEである)(配列番号281)を含む。ある実施態様において、第一および第二リンカーは各々アミノ酸配列ESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号282)またはSKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号283)を含む。ある実施態様において、第一および第二リンカーは各々アミノ酸配列ESKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号284)またはSKYGPPCPPCPAPEFEGG(配列番号285)を含む。

【0267】

血清半減期

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、治療使用に適する薬物動態性質を有する。例えば、ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は少なくとも約50時間の血清半減期を有する。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は少なくとも約100時間の血清半減期を有する。

【0268】

ある実施態様において、対象への静脈内投与50時間後、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の血清濃度は、該対象に投与1時間後の本発明のタンパク質の血清濃度の少なくとも10%である。

【0269】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、Fcドメインポリペプチドに融合していない多サブユニットタンパク質より少なくとも20%、30%、

10

20

30

40

50

40%、50%、60%、70%、80%または90%長い血清半減期を有する。ある実施態様において、本発明の多サブユニットタンパク質のタンパク質配列を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、Fcドメインポリペプチドに融合していない多サブユニットタンパク質より少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍または20倍長い血清半減期を有する。

【0270】

腫瘍保持

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、所望により腫瘍部位でのタンパク質保持を増強するためのさらなる特性が取り込まれ得る。例えば、本発明のある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインおよび／またはヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍(例えば、腫瘍細胞表面上、腫瘍の細胞周囲マトリクスまたは腫瘍の細胞外マトリクス)に存在する1以上のプロテオグリカン(例えば、当分野で知られるプロテオグリカン、例えば、Lozzo et al., Matrix Bio (2015) 42: 11-55; およびNikitovic et al., Frontiers in Endocrinology (2018) 9:69に開示のとおり)に結合するプロテオグリカン結合をさらに含み得る。ある実施態様において、コラーゲン結合ドメインは、腫瘍(例えば、腫瘍細胞表面上、腫瘍の細胞周囲マトリクスまたは腫瘍の細胞外マトリクス)に存在する1以上のコラーゲンに結合する。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍に存在する1以上のヒアルロン酸に結合するヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む。このようなヘテロ二量体Fc融合タンパク質は腫瘍での保持が増強され、低用量および／または頻度で対象に腫瘍内投与され得る。

【0271】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、腫瘍(例えば、腫瘍細胞表面上、腫瘍の細胞周囲マトリクスまたは腫瘍の細胞外マトリクス)に特異的に発現される1以上のプロテオグリカンに結合する。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるコラーゲン結合ドメインは、腫瘍(例えば、腫瘍細胞表面上、腫瘍の細胞周囲マトリクスまたは腫瘍の細胞外マトリクス)に特異的に発現される1以上のコラーゲンに結合する。このようなヘテロ二量体Fc融合タンパク質は投与(例えば、静脈内、皮下または肺投与)後腫瘍に濃縮され、腫瘍保持が増強され、それにより低用量および／または頻度での投与が可能となり得る。

【0272】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、シンデカン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)、ベータグリカン、ホスファカン、グリピカン、ペルレカン、アグリリン、コラーゲン(例えば、コラーゲンIX、IXI、XVまたはXVIII)、ヒアレクタン、アグリカン、ベルシカン、ニューロカン、ブレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)から選択される1以上のプロテオグリカンに結合するプロテオグリカン結合ドメインをさらに含む。癌に関与するプロテオグリカンは、コラーゲン、シンデカン(例えば、シンデカン-1またはシンデカン-2)、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン(例えば、グリピカン-1またはグリピカン-3)、ペルレカン、ベルシカン、ブレビカンおよびSLRP(例えば、デコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカン)を含むが、これらに限定されない。従って、ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、シンデカン(例えば、シンデカン-1またはシンデカン-2)、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン(例えば、グリピカン-1またはグリピカン-3)、ペルレカン、ベルシカン、ブレビカンおよびSLRPから選択される1以上のプロテオグリカンに結合する。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、デコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される1以上のSLRPに結合する。

【0273】

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、タンパ

ク質(例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント)、ペプチド(例えば、プロテオグリカン結合タンパク質の一部またはそのバリエーション)、アプタマー、小分子またはそれらの組み合わせであり得る。プロテオグリカン結合ドメインは文献においても知られる。例えば、シンデカン結合ドメインは、米国特許6,566,489、8,647,828および10,124,038；米国特許出願公開2009/0297479；およびPCT特許出願公開WO2018199176A1に開示される。CSPG4結合ドメインは、米国特許9,801,928および10,093,745；および米国特許出願公開2016/0032007、2017/0342151および2018/0072811に開示される。β-グリカン結合ドメインは、米国特許7,455,839に開示される。グリピカン結合ドメインは、米国特許7,919,086、7,776,329、8,680,247、8,388,937、9,260,492、9,394,364、9,790,267、9,522,940および9,409,994；米国特許出願公開2004/0236080、2011/0123998、2018/0244805、2018/0230230および2018/0346592；欧州特許2270509；およびPCT特許出願公開WO2017053619A1、WO2018026533A1、WO2018165344A1およびWO2018199318A1に開示される。ペルレカン結合ドメインは、米国特許10,166,304に開示される。デコリン結合ドメインは、米国特許6,517,838およびPCT特許出願公開WO2000021989A1、WO2000077041A2およびWO2000078800A2に開示される。

【0274】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、コラーゲン結合ドメインをさらに含む。コラーゲンは、脊椎動物で少なくとも28の異なるタイプが同定されている、タンパク質群である。各タイプのコラーゲンは、Fang et al., Tumor Biol. (2014) 35:2871-82およびXiong et al., J. Cancer Metasta. Treat. (2016) 2:357-64に記載のとおり、その特有の構造的特徴および分布パターンを有する。Col3A1、Col5A2、Col6、Col7A1、Col15A1 Col19A1およびCol22A1を含むが、これらに現地絵されない種々のタイプのコラーゲンが癌に関与する。コラーゲン結合ドメインはタンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント)、ペプチド(例えば、コラーゲン結合タンパク質の一部またはそのバリエーション)、アプタマー、小分子またはそれらの組み合わせであり得る。コラーゲン結合ドメインは当分野で知られ、例えば、米国特許5,788,966、5,587,360、5,851,794、5,741,670、5,849,701、6,288,214、6,387,663、6,908,994、7,169,902、7,488,792、7,820,401、8,956,612、8,642,728および8,906,649および米国特許出願公開2007/0161062、2009/0142345および2012/0100106に開示される。

【0275】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む。ヒアルロン酸結合ドメインは、タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント)、ペプチド(例えば、ヒアルロン酸結合タンパク質の一部またはそのバリエーション)、アプタマー、小分子またはそれらの組み合わせであり得る。ヒアルロン酸結合ドメインは当分野で知られ、例えば、米国特許6,864,235、8,192,744、8,044,022、8,163,498、8,034,630、9,217,016、9,795,686および9,751,919および米国特許出願公開2002/0055488および2007/0259380に開示される。

【0276】

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインおよび／またはヒアルロン酸結合ドメインは、存在するならば、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質のどの位置にでもよい。例えば、ある実施態様において、IL-12サブユニットが抗体Fcドメインポリペプチドに対してN末端に位置するとき、ここに開示するプロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインおよび／またはヒアルロン酸結合ドメインは第一抗体Fcドメイ

ンポリペプチドのC末端および／または第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に融合し得る。ある実施態様において、IL-12サブユニットが抗体Fcドメインポリペプチドに対してC末端に位置するとき、ここに開示するプロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインおよび／またはヒアルロン酸結合ドメインは第一抗体FcドメインポリペプチドのN末端および／または第二抗体FcドメインポリペプチドのN末端に融合し得る。

【0277】

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインおよび／またはヒアルロン酸結合ドメインは、存在するならば、リンカーを介してヘテロ二量体Fc融合タンパク質の残りに結合し得る。ある実施態様において、プロテオグリカン結合ドメインは、ペプチドリリンカーを介してヘテロ二量体Fc融合タンパク質の残りに融合する。ある実施態様において、ペプチドリリンカーは、ここに開示するスペーサーペプチドを含む。

【0278】

II. 製造方法

本発明のタンパク質は、当業者に周知の組み換えDNAテクノロジーを使用して製造し得る。例えば、第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニット配列を含む第一ポリペプチドをコードする第一核酸配列を第一発現ベクターにクローン化し得る；第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットの第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチドをコードする第二核酸配列を第二発現ベクターにクローン化し得る；そして第一および第二発現ベクターを、一緒に宿主細胞に安定にトランスフェクトして、多量体タンパク質を産生し得る。

【0279】

最高タンパク質収率を達成するために、種々の比の第一および第二発現ベクターを探索して、宿主細胞へのトランスフェクションのための最適比を決定し得る。トランスフェクション後、単一クローンを、限界希釈、ELISA、FACS、顕微鏡検査またはclonepixなどの当分野で知られる方法を使用する、細胞銀行作製のために単離し得る。

【0280】

クローンを、本発明のタンパク質のバイオリアクター規模拡大および発現維持に適する条件下、培養し得る。タンパク質を、遠心分離、デプス濾過、細胞溶解、均質化、凍結・解凍、親和性精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィーおよび混合モードクロマトグラフィーを含む当分野で知られる方法を使用して、単離および精製できる。

【0281】

III. 医薬組成物

本発明はまた、有効量のここに記載するタンパク質を含む医薬組成物に関する。組成物は、多様な薬物送達系で使用するために製剤化され得る。1以上の生理学的に許容される添加物または担体も適切な製剤のために組成物に包含させ得る。本発明で使用するのに適する製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見られ得る。薬物送達のための方法の総説として、例えば、Langer (Science 249:1527-1533, 1990)を参照のこと。

【0282】

本発明の静脈内薬物送達製剤は、バッグ、ペンまたはシリンジに含まれ得る。ある実施態様において、バッグを、チューブおよび／または針を含む流路に接続し得る。ある実施態様において、製剤は凍結乾燥製剤または液体製剤であり得る。ある実施態様において、製剤は、フリーズドライ(凍結乾燥)され、約12～60バイアルに含まれ得る。ある実施態様において、製剤はフリーズドライされてよく、45mgのフリーズドライ製剤が1バイアルに含まれ得る。ある実施態様において、約40mg～約100mgのフリーズドライ製剤が1バイアルに含まれ得る。ある実施態様において、12、27または45バイアルからのフリーズドライ製剤を合わせて、静脈内薬物製剤の治療用量のタンパク質を得る。ある実施態様において、製剤は液体製剤であり、約250mg／バイアル～約1000mg／

バイアルで保存し得る。ある実施態様において、製剤は液体製剤であり、約 600 mg/バイアルとして保存し得る。ある実施態様において、製剤は液体製剤であり、約 250 mg/バイアルとして保存し得る。

【0283】

本発明のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、製剤を形成する緩衝化溶液中に、有効量のタンパク質を含む液体水性医薬製剤として含まれる。

【0284】

これら組成物は慣用の滅菌技術により滅菌できまたは滅菌濾過し得る。得られた水溶液は、そのまままたは凍結乾燥して包装され得て、凍結乾燥調製物は投与前滅菌水性担体と合わせられる。調製物の pH は、一般に 3~11、より好ましくは 5~9 または 6~8 および最も好ましくは 7~8、例えば 7~7.5 である。得られた固形の組成物を、各固定量の上記 1 以上の薬剤を含む、複数単回用量単位に包装し得る。固形組成物は、量に柔軟性をもたせるための容器にも包装できる。

【0285】

ある実施態様において、本発明は、マンニトール、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム、ポリソルベート 80、水および水酸化ナトリウムと組み合わせて本開示のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、長い有効期間を有する製剤を提供する。

【0286】

ある実施態様において、pH 緩衝化溶液中に本開示のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む水性製剤が調製される。本発明の緩衝液は約 4~約 8、例えば、約 4.5~約 6.0 または約 4.8~約 5.5 の範囲の pH を有するかまた約 5.0~約 5.2 の pH を有し得る。上記 pH の範囲の中間の pH も本発明の一部であることが意図される。例えば、上限および/または下限として上に記載した何らかの値の組み合わせを使用する値の範囲が包含されることが意図される。pH をこの範囲内に制御する緩衝液の例は、酢酸(例えば、酢酸ナトリウム)、コハク酸(例えばコハク酸ナトリウム)、グルコン酸、ヒスチジン、クエン酸および他の有機酸緩衝液を含む。

【0287】

ある実施態様において、製剤は、約 4~約 8 の範囲に pH を維持するためのクエン酸およびリン酸を含む緩衝系を含む。ある実施態様において、pH 範囲は約 4.5~約 6.0 または約 pH 4.8~約 5.5 または pH 範囲約 5.0~約 5.2 であり得る。ある実施態様において、緩衝系は、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物および/またはリン酸二水素ナトリウム二水和物を含む。ある実施態様において、緩衝系は、約 1.3 mg/mL のクエン酸(例えば、1.305 mg/mL)、約 0.3 mg/mL のクエン酸ナトリウム(例えば、0.305 mg/mL)、約 1.5 mg/mL のリン酸二ナトリウム二水和物(例えば、1.53 mg/mL)、約 0.9 mg/mL のリン酸二水素ナトリウム二水和物(例えば、0.86)および約 6.2 mg/mL の塩化ナトリウム(例えば、6.165 mg/mL)を含む。ある実施態様において、緩衝系は、1~1.5 mg/mL のクエン酸、0.25~0.5 mg/mL のクエン酸ナトリウム、1.25~1.75 mg/mL のリン酸二ナトリウム二水和物、0.7~1.1 mg/mL のリン酸二水素ナトリウム二水和物および 6.0~6.4 mg/mL の塩化ナトリウムを含む。ある実施態様において、製剤の pH は水酸化ナトリウムで調節される。

【0288】

等張化剤として作用し、抗体を安定化し得るポリオールも製剤に含有され得る。ポリオールは、製剤の所望の等張性に関連して変わり得る量で製剤に加えられる。ある実施態様において、水性製剤は等張であり得る。加えられるポリオールの量は、ポリオールの分子量によっても変わり得る。例えば、二糖(例えばトレハロース)と比較して、加えられる単糖(例えば、マンニトール)の量は少なくてもよい。ある実施態様において、製剤で等張化剤として使用され得るポリオールはマンニトールである。ある実施態様において、マンニトール濃度は約 5~約 20 mg/mL であり得る。ある実施態様において、マンニトール濃度は約 7.5~15 mg/mL であり得る。ある実施態様において、マンニトール濃度は約 10

10

20

30

40

50

～14 mg/mLであり得る。ある実施態様において、マンニトール濃度は約12 mg/mLであり得る。ある実施態様において、ポリオールソルビトールが製剤に含まれ得る。

【0289】

界面活性剤または界面活性物質も製剤に加え得る。例示的界面活性剤は、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20、80など)またはポロキサマー(例えば、ポロキサマー188)などの非イオン性界面活性剤を含む。加える界面活性剤の量は、製剤化された抗体の凝集を低減するおよび／または製剤における粒子形成を最小化するおよび／または吸着を低減するものである。ある実施態様において、製剤は、ポリソルベートである界面活性物質を含み得る。ある実施態様において、製剤は、界面活性剤ポリソルベート80またはTween 80を含み得る。Tween 80は、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエートを表すために使用される名称である(Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996参照)。ある実施態様において、製剤は、約0.1 mg/mL～約10 mg/mLのポリソルベート80または約0.5 mg/mL～約5 mg/mLを含み得る。ある実施態様において、約0.1%ポリソルベート80を製剤に加え得る。

10

【0290】

ある実施態様において、本発明のタンパク質製品は液体製剤として製剤化される。液体製剤は、ゴム栓を施し、アルミニウムクリンプシールで封したUSPまたはPh EurタイプI 50Rバイアルに10 mg/mL濃度で存在し得る。栓はUSPおよびPh Eurに適合するエラストマー製である。ある実施態様において、60 mLの抽出可能体積を可能とするような、バイアルに61.2 mLのタンパク質製品溶液を入れる。ある実施態様において、液体製剤を0.9%食塩水溶液で希釈し得る。

20

【0291】

ある実施態様において、本発明の液体製剤を、安定化レベルの糖と組み合わせて、10 mg/mL濃度溶液として調製し得る。ある実施態様において、液体製剤を水性担体中に調製し得る。ある実施態様において、安定化剤を、静脈内投与に望ましくないまたは不適切な粘性をもたらす量を超えない量で加え得る。ある実施態様において、糖は二糖、例えば、スクロースであり得る。ある実施態様において、液体製剤は緩衝剤、界面活性物質および防腐剤の1以上も含み得る。

【0292】

ある実施態様において、液体製剤のpHを、薬学的に許容される酸および／または塩基の添加により調節し得る。ある実施態様において、薬学的に許容される酸は塩酸であり得る。ある実施態様において、塩基は水酸化ナトリウムであり得る。

30

【0293】

凝集に加えて、発酵、収集／細胞浄化、精製、薬物物質／薬物製品保存中およびサンプル分析中に起こり得る脱アミド化は、ペプチドおよびタンパク質の一般的製品変性である。脱アミド化は、加水分解を受けるスクシンイミド中間体を形成する、タンパク質からのNH₃の喪失である。スクシンイミド中間体は、親ペプチドから17ダルトン質量減少させる。続く加水分解は、18ダルトン質量増加させる。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下での不安定性により困難である。従って、脱アミド化は、一般に1ダルトン質量増加として検出可能である。アスパラギンの脱アミド化は、アスパラギンまたはイソアスパラギン酸をもたらす。脱アミド化の速度に影響するパラメータは、pH、温度、溶媒誘電率定数、イオン強度、一次配列、局所ポリペプチド立体構造および三次元構造を含む。ペプチド鎖でAsnに隣接するアミノ酸残基は脱アミド化速度に影響する。タンパク質配列でAsn後のGlyおよびSerは、脱アミド化に対する高い感受性をもたらす。

40

【0294】

ある実施態様において、本発明の液体製剤を、タンパク質製品の脱アミノ化を防止するpHおよび湿度条件下に保存し得る。

【0295】

ここで興味ある水性担体は、薬学的に許容され(ヒトへの投与に安全かつ非毒性)、液体

50

製剤の製造に有用なものである。例示的担体は、注射用滅菌水(SWFI)、注射用静菌水(BWFI)、pH緩衝化溶液(例えば、リン酸緩衝化食塩水)、無菌食塩水溶液、リンゲル液またはデキストロース溶液を含む。

【0296】

防腐剤を、細菌活動を低減するために、所望によりここでの製剤に加え得る。防腐剤の添加は、例えば、多回使用(多回用量)製剤の製造を容易にし得る。

【0297】

静脈内(IV)製剤は、患者が移植後入院して、全薬物をIV経路により受けるときなど、特定の場合好ましい投与経路であり得る。ある実施態様において、液体製剤を投与前0.9%塩化ナトリウム溶液で希釈する。ある実施態様において、注射用希釈済薬物製品は等張であり、静脈内点滴での投与に適する。

10

【0298】

ある実施態様において、塩または緩衝液成分を、10mM~200mMの量で加え得る。塩および／または緩衝液は薬学的に許容され、種々の既知酸(無機および有機)と「塩基形成」金属またはアミンに由来する。ある実施態様において、緩衝液はリン酸緩衝液であり得る。ある実施態様において、緩衝液は、グリシン酸、炭酸、クエン酸緩衝液であってよく、この場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンがカウンターイオンとして役立ち得る。

【0299】

防腐剤を、細菌活動を抑制するために、所望によりここでの製剤に加え得る。防腐剤の添加は、例えば、多回使用(多回用量)製剤の製造を容易にし得る。

20

【0300】

ここで興味ある水性担体は、薬学的に許容され(ヒトへの投与に安全かつ非毒性)、液体製剤の製造に有用なものである。例示的担体は、注射用滅菌水(SWFI)、注射用静菌水(BWFI)、pH緩衝化溶液(例えば、リン酸緩衝化食塩水)、無菌食塩水溶液、リンゲル液またはデキストロース溶液を含む。

【0301】

本開示のタンパク質は、タンパク質および凍結保護物質を含む凍結乾燥製剤で存在し得る。凍結保護物質は糖、例えば、二糖であり得る。ある実施態様において、凍結保護物質はスクロースまたはマルトースであり得る。凍結乾燥製剤はまた緩衝剤、界面活性物質、増量剤および／または防腐剤の1以上も含み得る。

30

【0302】

凍結乾燥薬物製品の安定に有用なスクロースまたはマルトースの量は、重量比で少なくとも1:2 タンパク質:スクロースまたはマルトースであり得る。ある実施態様において、タンパク質:スクロースまたはマルトース重量比は1:2~1:5であり得る。

【0303】

ある実施態様において、製剤のpHは、凍結乾燥前、薬学的に許容される酸および／または塩基の添加により調節され得る。ある実施態様において、薬学的に許容される酸は塩酸であり得る。ある実施態様において、薬学的に許容される塩基は水酸化ナトリウムであり得る。

40

【0304】

凍結乾燥前、本開示のタンパク質を含む溶液のpHを、6~8に調節し得る。ある実施態様において、凍結乾燥薬物製品のpH範囲は7~8であり得る。

【0305】

ある実施態様において、塩または緩衝液成分を10mM~200mMの量で加え得る。塩および／または緩衝液は薬学的に許容され、種々の既知酸(無機および有機)と「塩基形成」金属またはアミンに由来する。ある実施態様において、緩衝液はリン酸緩衝液であり得る。ある実施態様において、緩衝液は、グリシン酸、炭酸、クエン酸緩衝液であってよく、この場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンがカウンターイオンとして役立ち得る。

50

【0306】

ある実施態様において、「増量剤」を加え得る。「増量剤」は、凍結乾燥混合物の量を増やし、凍結乾燥ケーキの物理的形態維持に貢献する化合物である(例えば、開孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの製造を促進)。例示的増量剤は、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコールおよびソルビトールを含む。本発明の凍結乾燥製剤はこのような増量剤を含み得る。

【0307】

防腐剤を、細菌活動を低減するために、所望によりここでの製剤に加え得る。防腐剤の添加は、例えば、多回使用(多回用量)製剤の製造を容易にし得る。

【0308】

ある実施態様において、凍結乾燥薬物製品を水性担体で構成し得る。ここで矯味ある水性担体は、薬学的に許容され(例えば、ヒトへの投与に安全かつ非毒性)、凍結乾燥後、液体製剤の製造に有用なものである。例示的希釈剤は、SWFI、BWFI、pH緩衝化溶液(例えば、リン酸緩衝化食塩水)、無菌食塩水溶液、リンゲル液またはデキストロース溶液を含む。

【0309】

ある実施態様において、本発明の凍結乾燥薬物製品を、米国局方SWFI、または米国局方0.9%塩化ナトリウム注射で再構成される。再構成中、凍結乾燥粉末は溶液に溶解する。

【0310】

ある実施態様において、本発明の凍結乾燥タンパク質製品を、約4.5 mL注射用水で構成し、0.9%食塩水溶液(塩化ナトリウム溶液)で希釈する。

【0311】

本発明の医薬組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、患者に毒性とならずに、特定の患者、組成物および投与方法で所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るために、変わり得る。

【0312】

特定の用量は、各患者に対して均一な用量、例えば、50~5000 mgのタンパク質であり得る。あるいは、患者の用量を、患者のおおよその体重または表面積に対して適量化させ得る。適切な投与量を決定する他の因子は、処置または予防する疾患または状態、疾患重症度、投与経路および患者の年齢、性別および医学的条件を含み得る。処置のための適切な投与量の決定に必要な計算のさらなる微調整は、特にここに開示する投与量情報およびアッセイに鑑みて、当業者により容易になされる。投与量はまた適切な用量-応答データと共に使用する投与量を決定する既知アッセイの使用を介しても、決定され得る。個々の患者の投与量を、疾患進行の追跡により調節し得る。患者の標的化可能構築物または複合体の血中レベルを測定して、有効濃度に到達または維持するために投与量の調節が必要であるか確認できる。遺伝薬物学を使用して、どの標的化可能構築物および/または複合体およびその投与量が、ある個体に有効である可能性が最も高いか決定し得る(Schmitz et al., Clinica Chimica Acta 308: 43-53, 2001; Steimer et al., Clinica Chimica Acta 308: 33-41, 2001)。

【0313】

一般に、体重に基づく投与量は約0.01 μ g~約100 mg/kg体重、例えば約0.01 μ g~約100 mg/kg体重、約0.01 μ g~約50 mg/kg体重、約0.01 μ g~約10 mg/kg体重、約0.01 μ g~約1 mg/kg体重、約0.01 μ g~約100 μ g/kg体重、約0.01 μ g~約50 μ g/kg体重、約0.01 μ g~約10 μ g/kg体重、約0.01 μ g~約1 μ g/kg体重、約0.01 μ g~約0.1 μ g/kg体重、約0.1 μ g~約100 mg/kg体重、約0.1 μ g~約50 mg/kg体重、約0.1 μ g~約10 mg/kg体重、約0.1 μ g~約1 mg/kg体重、約0.1 μ g~約100 μ g/kg体重、約0.1 μ g~約10 μ g/kg体重、約0.1 μ g~約1 μ g/kg体重、約1 μ g~約100 mg/kg体重、約1 μ g~約50 mg/kg体重、約1 μ g~約10 mg/kg体重、約1 μ g~約1 mg/kg体重、約1 μ g~約100

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}$ ～約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}$ ～約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $100\mu\text{g}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $100\mu\text{g}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $100\mu\text{g}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $100\mu\text{g}$ ～約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 1mg ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 1mg ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 1mg ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 10mg ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 10mg ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 50mg ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重である。

10

【0314】

用量を、1日1回またはそれ以上、毎週、毎月または毎年または2～20年に1回投与し得る。当業者は、体液または組織における標的化可能構築物または複合体の測定された滞在時間および濃度に基づき、投与の反復割合を容易に推定できる。本発明の投与は、カテーテルを通すかん流または直接病巣内注射による、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、腔内であり得る。1日1回以上、週1回以上、月1回以上および年1回以上投与され得る。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)は腫瘍内投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍内に、全身性より少ない用量または頻度で投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、局所麻酔投与後腫瘍内投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、直接腫瘍塊触診下、腫瘍内投与される。

20

【0315】

IV. 治療適用

本発明は、ここに記載するヘテロ二量体Fc融合結合タンパク質および／またはここに記載する医薬組成物を使用する、癌の処置方法を提供する。方法を、それを必要とする患者に有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質を投与することにより、多様な癌の処置に使用し得る。ある実施態様において、ここに開示する方法により処置される癌は、局所進行悪性腫瘍である。ある実施態様において、局所進行悪性腫瘍は完全に切除され得る。ある実施態様において、局所進行悪性腫瘍は完全に切除されて、本発明の処置が切除に続いて提供される。

30

【0316】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)は単剤療法として進行悪性腫瘍処置に使用される。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)を、重度感染症の能動的免疫療法のアジュバントとして使用する。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)を、予防ワクチン接種のアジュバントとして使用する。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、放射線療法後骨髄抑制の処置に使用する。

40

【0317】

本発明はまた造血毒性を低減する方法を提供する。造血毒性は、遺伝的、感染性または放射線および化学療法を含むが、これらに限定されない環境原因に起因し得る。例えば、ある実施態様において、本発明は、照射(例えば、イオン化照射、アルファ照射、ベータ照射、ガンマ照射、X照射または中性子照射)と関連する疾患または障害を処置する方法を提供する。例えば、ある実施態様において、本発明は、放射線療法後の骨髄抑制を抑制する方法でわって、それを必要とする患者に有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質または製剤を投与することを含む、方法を提供する。ある実施態様において、放射線療法線量は少なくとも 1Gy 、 5Gy 、 10Gy 、 15Gy または 20Gy である。ある実施態様において、照射治療は、骨髄、リンパ性系、免疫系、粘膜組織、粘膜免疫系、消化器

50

系、心血管系、神経系、生殖臓器、前立腺、卵巣、肺、腎臓、皮膚および脳からなる群から選択される系、臓器または組織を損傷させる。ある実施態様において、本発明の方法は損傷を低減する。

【0318】

ここに提供される方法は、照射に起因する骨髄抑制の処置に有用である。従って、ある実施態様において、本発明は、照射への偶発的被爆の状況下で起こる骨髄抑制を処置する方法であって、それを必要とする患者に治療有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質または製剤を投与することを含む、方法を提供する。

【0319】

ある実施態様において、本発明は、急性放射線症候群(ARS)を処置する方法であって、それを必要とする患者に有効量のここに記載するヘテロ二量体Fc融合タンパク質または製剤を投与することを含む、方法を提供する。ARSは、造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群および皮膚放射線症候群を含むが、これらに限定されない。例えば、造血放射線症候群は、少なくとも一部、造血幹細胞プールの枯渇に起因し、リンパ球減少症および顆粒球減少症の徴候を示す。消化器症候群は、少なくとも一部、陰窩に位置する幹細胞および前駆細胞が損傷し、絨毛表面の細胞が置き換われないことに起因し、水様下痢、脱水、電解質喪失、消化器出血および穿孔の徴候を示す。ある実施態様において、ここに提供される処置方法は、ARSの前駆期に実施される。前駆期は、一般に照射被爆後1〜3日以内の、悪心、嘔吐、摂食障害、発熱、頭痛および／または早期皮膚紅斑の症状により特徴づけられる、急性疾病の初期相である。ある実施態様において、ここに提供される処置方法を、ARSの潜伏期に実施する。潜伏期は、症状は改善するが、リンパ球減少症および顆粒球減少症の検査値を示し、被爆線量により数時間〜数週間継続し得る相である。前駆期または潜伏期の処置は、罹患系、臓器および／または組織の症候群の発症を和らげ得る。ある実施態様において、ここに提供される処置方法を、ARSの疾病顕在期に実施する。この相における処置は、なおARSからの回復を促進し得る。

【0320】

本発明はまた免疫細胞の生存、増殖、分化および／または活性を増加させる方法であって、免疫細胞とここに開示するヘテロ二量体Fc融合タンパク質または製剤を接触させることを含む、方法も提供する。ある実施態様において、免疫細胞はT細胞(例えば、CD4⁺ T細胞)である。ある実施態様において、免疫細胞はNK細胞である。

【0321】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)は、癌と診断された対象の処置に使用される。ある実施態様において、癌は膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、肝細胞癌、白血病、肺癌、リンパ腫、中皮腫、黒色腫、骨髄腫、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓細胞癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、脳癌、肉腫、神経芽腫または頭頸部癌細胞の扁平上皮細胞癌腫を含む。ある実施態様において、癌は結腸癌である。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、単剤療法として、結腸癌と診断された対象に投与する。ある実施態様において、癌は黒色腫である。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、単剤療法として、黒色腫と診断された対象に投与する。ある実施態様において、癌は乳癌である。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、単剤療法として、乳癌と診断された対象に投与する。

【0322】

ある実施態様において、本発明は、癌を処置する方法であって、患者に単回用量のみのヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。ある実施態様において、単回用量は、癌に対する完全応答の誘導に十分な量である。ある実施態様において、単回用量は、癌の再発遅延または予防に十分な量である。

【0323】

ある実施態様において、本発明は、癌を処置する方法であって、患者に単回用量のみの

配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質またはヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤を投与することを含む、方法を提供する。

【0324】

ある実施態様において、単回用量の配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含むヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質またはヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質(例えば、配列番号 290 および配列番号 291 を含む)および薬学的に許容される担体を含む製剤は、癌に対する完全応答の誘導に十分な量である。ある実施態様において、単回用量は、癌の再発遅延または予防に十分な量である。ある実施態様において、完全に処置された癌(例えば、本発明の IL-12-Fc 融合タンパク質で処置後完全応答)の再発は、6 カ月～72 カ月またはそれ以上(例えば、6 カ月、12 カ月、24 カ月、36 カ月、48 カ月、60 カ月、72 カ月、84 カ月または96 カ月)遅延または予防される。

【0325】

ある実施態様において、1 回またはそれ以上のヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質(例えば、配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む)により処置される癌は転移癌である。ある実施態様において、転移癌は、局所、領域性または遠位転移癌である。ある実施態様において、単回または複数回のヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質(例えば、配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む)は、原発癌の起源臓器または組織ではないおよび／または処置レジメンの直接標的ではない遠位癌をアブスコパル効果により処置する。ある実施態様において、ヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質のアブスコパル効果は、照射および／または化学療法を含む処置計画の途中および／または後増強される。ある実施態様において、単回または複数回のヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質(例えば、配列番号 290 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 291 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む)は、例えば、患者の血清および／または腫瘍における IFN γ 、CXCL9 および／または CXCL10 発現増加により決定される、全身抗腫瘍応答の誘導により、患者における癌を処置する。

【0326】

V. 組み合わせ治療

本発明の他の態様は、組み合わせ治療を提供する。ここに記載する多特異的結合タンパク質を、癌を処置するためのさらなる治療剤と組み合わせで使用し得る。

【0327】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質(例えば、IL-12 サブユニットを含むヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質)を、癌を有すると診断された対象を処置するために組み合わせ治療として投与する。ある実施態様において、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、肝細胞癌、白血病、肺癌、リンパ腫、中皮腫、黒色腫、骨髄腫、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓細胞癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、脳癌、肉腫、神経芽腫または頭頸部癌細胞の扁平上皮細胞癌腫である。ある実施態様において、癌は結腸癌である。ある実施態様において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を、結腸癌を有すると診断された対象に組み合わせ治療として投与する。ある実施態様において、癌は黒色腫である。ある実施態様において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を、黒色腫を有すると診断された対象に組み合わせ治療として投与する。ある実施態様において、癌は乳癌である。ある実施態様において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を、乳癌を有すると診断された対象に組み合わせ治療として投与する。

【0328】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質(例えば、IL-12 サブユニットを含むヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質)を、細胞毒性化学療法；放射線療法

；CTLA-4、PD-1、PD-L1またはTGF- β など抗腫瘍免疫応答に関与する分子を標的とする抗体；腫瘍関連抗原でADCCにより作用する抗体；所望によりPD-1またはPD-L1を標的とする抗体と組み合わせて投与される、NKGD、CD16および腫瘍関連抗原に結合する多特異的抗体；個別化癌ワクチン；腫瘍溶解性癌ワクチン；およびPD-1またはPD-L1を標的とする抗体と組み合わせて投与される、個別化ワクチンから選択される他の治療剤と組み合わせて進行悪性腫瘍の処置に使用する。

【0329】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)を、NK標的化治療(例えば、CAR-NK治療)、抗体治療、チェックポイント阻害剤治療、さらなるサイトカイン治療、自然免疫系アゴニスト治療、化学療法、標的剤治療、放射線療法、養子NK治療、幹細胞移植(SCT)治療、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞治療、T細胞受容体(TCR)改変治療、多特異的結合タンパク質(TrinKET)、細胞老化を誘導する薬剤およびワクチンおよび／または腫瘍溶解性ウイルス治療を含むが、これらに限定されない他の治療と組み合わせて、悪性腫瘍(例えば、進行悪性腫瘍)処置に使用する。ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、NK標的化治療(例えば、CAR-NK治療)、抗体治療、チェックポイント阻害剤治療、さらなるサイトカイン治療、自然免疫系アゴニスト治療、化学療法、標的剤治療、放射線療法、養子NK治療、幹細胞移植(SCT)治療、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞治療、T細胞受容体(TCR)改変治療、多特異的結合タンパク質(TrinKET)、細胞老化を誘導する薬剤およびワクチンおよび／または腫瘍溶解性ウイルス治療から選択される2以上のさらなる治療と組み合わせて、悪性腫瘍(例えば、進行悪性腫瘍)の処置に使用する。

【0330】

ある実施態様において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)を、PD-1またはPD-L1を標的とする癌ワクチンまたは抗体と組み合わせて、完全に切除され得る局所進行悪性腫瘍の処置に使用する。

【0331】

本発明のタンパク質を、原発病変の外科的除去の補助剤としても使用し得る。

【0332】

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)およびさらなる治療剤の量および投与の相対的タイミングは、所望の組み合わせ治療効果を達成するように選択され得る。例えば、組み合わせ治療をこのような投与を必要とする患者に投与するとき、組み合わせ中の治療剤または治療剤を含む1以上の医薬組成物を、例えば、逐次的に、同時に、共に、一緒になど、どの順番で投与してもよい。さらに、例えば、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、さらなる治療剤が予防または治療効果を発揮しているときに投与してよくまたは逆も可能である。

【0333】

ここに開示するとおり、本発明の方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)およびさらなる治療剤の組み合わせの共投与を含む。ここに開示するとおり、本発明の方法は、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤の組み合わせの共投与を含む。

【0334】

共投与は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質(例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質)およびさらなる治療剤が同時に投与される、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤が逐次的に投与されるおよびヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤の一方または両方が間欠的にまたは連続的に投与されるまたは同時、逐次的、間欠的および／または連続的の何らかの組み合わせでの方法を包含する。当業者は、間欠的投与は、間欠的がある薬剤の最初の投与、次いでまさにその

薬剤のその後の投与も含むため、必ずしも連続的と同じではないことを認識する。さらに、当業者は、間欠的投与がある薬剤の最初の投与の、該第一剤が再投与される前の他剤の投与での中断を含まないため、ある実施態様において、間欠的投与は逐次的投与も含むことを理解する。さらに、当業者は、連続的投与が静脈内滴下(IV点滴)または栄養管などを含む多数の経路により達成され得ることも知っている。

【0335】

さらにおよびより一般的な意味で、用語「共投与」は、対象へのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の個々の投与とさらなる治療剤の個々の投与が何らかのタイムフレーム中に重複する任意かつ全ての方法を包含する。

【0336】

対象へのヘテロ二量体Fc融合タンパク質またはさらなる治療剤の投与頻度は、当分野でQndまたはqnd(ここで、nはその薬剤の連続的投与について日数での頻度である)として知られる。例えば、Q3dは、薬剤の3日に1回の投与である。ある実施態様において、方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の何れか一方または両方またはそれらの組み合わせの対象へのQ1d、Q2d、Q3d、Q4d、Q5d、Q6d、Q7d、Q8d、Q9d、Q10d、Q14d、Q21d、Q28d、Q30d、Q90d、Q120d、Q240dまたはQ365dでの投与を含む。

【0337】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または両方は間欠的に投与される。ある実施態様において、方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質またはさらなる治療剤の一方または両方の、対象への投与間に少なくとも10分、15分、20分、30分、40分、60分、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、18時間、24時間、36時間、48時間、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、3週間または4週間の遅延がある投与を含む。ある実施態様において、遅延がある投与は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または両方またはそれらの何らかの組み合わせを、10分～約365日の一定期間連続的に投与し、その後約10分～約30日の一定期間投与しないパターンに従う。

【0338】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または何らかの組み合わせを間欠的に投与し、他方を連続的に投与する。ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の組み合わせを、第二有効量のさらなる治療剤と逐次的に投与する。

【0339】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤は同時に投与される。ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の組み合わせが第二有効量のさらなる治療剤と逐次的に投与される。このような実施態様において、組み合わせは「共投与」ということもでき、なぜなら本用語は対象が組み合わせの両成分に曝される任意かつ全ての方法を含むからである。しかしながら、このような実施態様は、一製剤または組成物でのみ投与される組み合わせに限定されない。ある濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤が、ある間隔でより有利に送達されることがあり、従って、第一有効量および第二有効量は、投与される製剤により異なり得る。

【0340】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質およびさらなる治療剤は同時にまたは逐次的に投与される。ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は第二有効量のさらなる治療剤の後逐次的に投与される。ある実施態様において、第二有効量のさらなる治療剤は第一有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質後逐次的に投与される。

【0341】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質(例えば、I L-12 サブユニットを含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質)およびさらなる治療剤の組み合わせは 1 製剤で投与される。ある実施態様において、組み合わせは、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が第二有効量のさらなる治療剤の製剤と別の製剤で投与される、二(2)組成物で投与される。ある実施態様において、組み合わせは、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が第二有効量のさらなる治療剤の製剤と別の製剤で投与される二(2)組成物で投与される。ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第二有効量のさらなる治療剤後逐次的に投与される。ある実施態様において、第二有効量のさらなる治療剤は、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質後逐次的に投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質およびさらなる治療剤が投与され、その後ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質およびさらなる治療剤両方が、少なくとも二十四(24)時間間欠的に投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質およびさらなる治療剤は、重ならない隔日スケジュールで投与される。

10

【0342】

ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第二有効量のさらなる治療剤後 4 時間以降投与される。ある実施態様において、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、第二有効量のさらなる治療剤投与後、10 分以降、15 分以降、20 分以降、30 分以降、40 分以降、60 分以降、1 時間以降、2 時間以降、4 時間以降、6 時間以降、8 時間以降、10 時間以降、12 時間以降、24 時間以降、2 日以降、4 日以降、6 日以降、8 日以降、10 日以降、12 日以降、14 日以降、21 日以降または 30 日以降投与される。ある実施態様において、第二有効量のさらなる治療剤は、第一有効量のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質投与後、10 分以降、15 分以降、20 分以降、30 分以降、40 分以降、60 分以降、1 時間以降、2 時間以降、4 時間以降、6 時間以降、8 時間以降、10 時間以降、12 時間以降、24 時間以降、2 日以降、4 日以降、6 日以降、8 日以降、10 日以降、12 日以降、14 日以降、21 日以降または 30 日以降投与される。

20

【0343】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または両方は、静脈内、皮下、皮膚、経口、筋肉内および腹腔内からなる群から選択される経路により投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または両方は静脈内投与される。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質および／またはさらなる治療剤の一方または両方またはそれらの何らかの組み合わせは経口投与される。

30

【0344】

本発明の単位剤形を同一または異なる物理形態、すなわちカプセル剤または錠剤により経口および／または I V 点滴による液体などで投与できることは当業者に理解される。さらに、各投与のための単位剤形は特定の投与経路で異なり得る。いくつかの種々の剤形が、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質およびさらなる治療剤の組み合わせの一方または両方に存在し得る。医学的条件が違えば、異なる投与経路が必要となり得るため、ここに記載する組み合わせの同じ成分は組成および物理形態が寸分違わないものであり得るが、状態を軽減するために、なお、異なる方法でおそらく異なる時点で投与する必要がある。例えば、特に嘔吐を伴う持続的悪心などの状態は、経口剤形の使用を困難とし得て、そのような場合、他の単位剤形で投与する必要がある、おそらく、代わりにまたは同様に吸入、頬側、舌下または坐薬経路で、前にまたは後に使用される他の剤形と同一のものである。特定の剤形は、化学的安定性または薬物動態などの種々の因子の問題が存在し得るため、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質およびさらなる治療剤の特定の組み合わせについて必要であり得る。

40

【0345】

NK 標的化治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、NK 標的化治療と組

50

み合わせる。例えば、ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、NKp46を標的とする治療剤と共投与する。ある実施態様において、NKp46を標的とする治療剤はCD16、1以上の腫瘍関連抗原またはそれらの組み合わせにも結合する。NKp46を標的とする例示的治療剤は、引用により全ての目的のために本明細書に包含させる、米国出願US20170198038A1により詳細に記載される。

【0346】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、BiKEおよびTriKE治療標的化NK細胞を含む二および三特異的キラーエンゲージャー(BiKEおよびTriKE)治療と組み合わせる。BiKEおよびTriKEは、各目的の抗体の可変領域の単一重(VH)および軽(VL)鎖から構築される。VHおよびVLDメインを、短い柔軟性のあるポリペプチドリinkerにより結合させて、解離を阻止する。BiKEおよびTriKEは、引用により全ての目的のために本明細書に包含させる、米国出願US20180282386A1およびUS20180258396A1により詳細に記載される。BiKEおよびTriKEはNK細胞に特異的な結合ドメインを含み得る。

【0347】

ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、ハイリスク骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、全身性肥満細胞症または肥満細胞白血病を有することが知られるまたは疑われる対象を処置するために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、3週処置ブロックの単コースとして投与される。ある実施態様において、処置ブロックは、4連続24時間連続的点滴(約96時間)、続く72時間休薬を含む。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、5 μ g/kg/日、10 μ g/kg/日、25 μ g/kg/日、50 μ g/kg/日、100 μ g/kg/日または200 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも5 μ g/kg/日、少なくとも10 μ g/kg/日、少なくとも25 μ g/kg/日、少なくとも50 μ g/kg/日、少なくとも100 μ g/kg/日または少なくとも200 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも1 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも5 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも200 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも500 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、少なくとも1000 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、200 μ g/kg/日またはそれ以下の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、500 μ g/kg/日またはそれ以下の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、1000 μ g/kg/日またはそれ以下の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、1~200 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、5~200 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、1~500 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、1~1000 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、5~500 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、5~1000 μ g/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、最大耐容量で投与される。ある実施態様において、BiKEおよびTriKE治療は、最大耐容量未満で投与される。

【0348】

多特異的結合タンパク質(「TriNKET」)治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質国際公開例示的腫瘍関連抗原は、HER2、CD20、CD33、B細胞成熟抗原(BCMA)、EpCAM、CD2、

10

20

30

40

50

CD19、CD25、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、CLL1/CLEC12A、FLT3、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4、HLA-EおよびPD-L1を含むが、これらに限定されない。

【0349】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、体重に基づく多特異的結合タンパク質の用量を含む治療と組み合わせる。例えば、体重に基づく多特異的結合タンパク質の用量は、約0.01 µg〜約100 mg/kg体重、例えば約0.01 µg〜約100 mg/kg体重、約0.01 µg〜約50 mg/kg体重、約0.01 µg〜約10 mg/kg体重、約0.01 µg〜約1 mg/kg体重、約0.01 µg〜約100 µg/kg体重、約0.01 µg〜約50 µg/kg体重、約0.01 µg〜約10 µg/kg体重、約0.01 µg〜約1 µg/kg体重、約0.01 µg〜約0.1 µg/kg体重、約0.1 µg〜約100 mg/kg体重、約0.1 µg〜約50 mg/kg体重、約0.1 µg〜約10 mg/kg体重、約0.1 µg〜約1 mg/kg体重、約0.1 µg〜約100 µg/kg体重、約0.1 µg〜約10 µg/kg体重、約0.1 µg〜約1 µg/kg体重、約1 µg〜約100 mg/kg体重、約1 µg〜約50 mg/kg体重、約1 µg〜約10 mg/kg体重、約1 µg〜約100 µg/kg体重、約1 µg〜約50 µg/kg体重、約1 µg〜約10 µg/kg体重、約1 µg〜約1 mg/kg体重、約1 µg〜約100 mg/kg体重、約1 µg〜約50 mg/kg体重、約1 µg〜約10 mg/kg体重、約1 µg〜約100 µg/kg体重、約1 µg〜約50 µg/kg体重、約1 µg〜約10 µg/kg体重、約50 µg〜約100 mg/kg体重、約50 µg〜約50 mg/kg体重、約50 µg〜約10 mg/kg体重、約50 µg〜約1 mg/kg体重、約50 µg〜約100 µg/kg体重、約100 µg〜約100 mg/kg体重、約100 µg〜約50 mg/kg体重、約100 µg〜約10 mg/kg体重、約100 µg〜約1 mg/kg体重、約1 mg〜約100 mg/kg体重、約1 mg〜約50 mg/kg体重、約1 mg〜約10 mg/kg体重、約10 mg〜約100 mg/kg体重、約10 mg〜約50 mg/kg体重、約50 mg〜約100 mg/kg体重である。

【0350】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1日1回以上、毎週、毎月または毎年または2〜20年に1回投与する多特異的結合タンパク質の用量を含む治療と組み合わせる。当業者は、体液または組織中の標的化可能構築物または複合体の滞在時間および濃度の測定に基づき、投与の反復割合を容易に推定できる。多特異的結合タンパク質の投与は、カテーテルによるかん流または直接病巣内注射による、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、腔内であり得る。1日1回以上、週1回以上、月1回以上または年1回以上投与し得る。

【0351】

キメラ抗原受容体(CARs)治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、CAR治療と組み合わせる。用語「キメラ抗原受容体」、あるいは「CAR」は、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン(ここでは「一次シグナル伝達ドメイン」とも称する)を含む、組み換えポリペプチド構築物をいう。

【0352】

従って、ある実施態様において、CARは、腫瘍関連抗原に結合する細胞外抗原結合部位、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある実施態様において、CARは、1以上の少なくとも1つの共刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン(「共刺激シグナル伝達ドメイン」とも称する)をさらに含む。

【0353】

ある実施態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合scFvドメイン)、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達

ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある実施態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合 scFv ドメイン)、膜貫通ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある実施態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合 scFv ドメイン)、膜貫通ドメインおよび2つの共刺激シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある実施態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび少なくとも2つの共刺激シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。

10

【0354】

膜貫通ドメインについて、種々の実施態様において、CARは、CARの細胞外ドメインに融合する膜貫通ドメインを含むよう、設計される。ある実施態様において、膜貫通ドメインは、CARのドメインの一つと天然に結合するものである。いくつかの場合、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するため、同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのこのようなドメインの結合を回避するよう選択されるかアミノ酸置換により修飾される。他の実施態様において、膜貫通ドメインは、CAR T細胞表面の他のCARとホモ二量体化できる。他の実施態様において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列を、同じCAR T細胞に存在する天然結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するため、修飾または置換され得る。

20

【0355】

膜貫通ドメインはあらゆる天然に存在する膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。ある実施態様において、膜貫通領域は、CARが標的に結合したときは常に細胞内ドメインにシグナル伝達できる。ある実施態様において、膜貫通ドメインは、TCR α 鎖、TCR β 鎖、TCR ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択される1以上のタンパク質の膜貫通領域を含む。ある実施態様において、膜貫通ドメインは、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2DおよびNKG2Cからなる群から選択される1以上のタンパク質の膜貫通領域を含む。

30

40

【0356】

細胞外腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合 scFv ドメイン)は、ヒンジ領域により膜貫通ドメインに結合され得る。ヒトIgヒンジ(例えば、IgG4ヒンジ、IgDヒンジ)、Gly-Serリンカー、(G₄S)₄リンカー、KIR2DS2ヒンジおよびCD8 α ヒンジを含むが、これらに限定されない多様なヒンジが用いられ得る。

50

【0357】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが配置されている免疫細胞の専門化機能(例えば、T細胞の、サイトカイン分泌を含む、細胞溶解活性またはヘルパー活性)の少なくとも1つの活性化を担う。故に、ここで使用する用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に専門化機能の実施を指示するタンパク質の部分を用いる。通常細胞内シグナル伝達ドメイン全体が用いられ得るが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分が使用される限り、このような切断部分を、エフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクト鎖の代わりに使用し得る。故に、用語細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルの伝達に十分な、細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる切断部分を含むことが意図される。

10

【0358】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン(すなわち刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン)および1以上の共刺激シグナル伝達ドメイン(すなわち少なくとも1つの共刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメイン)を含む。

【0359】

ここで使用する用語「刺激分子」は、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部態様について刺激方向に免疫細胞の活性化を制御する、細胞質シグナル伝達配列を提供する、免疫細胞、例えば、T細胞、NK細胞またはB細胞により発現される分子を用いる。ある実施態様において、シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドを結合させたMHC分子の結合により開始され、増殖、活性化、分化などを含むが、これらに限定されないT細胞応答の介在に至る、一次シグナルである。

20

【0360】

刺激方法で作用する一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み得る。本発明で特に有用なITAM含有細胞質シグナル伝達配列の例は、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FcER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD79a、CD79b、DAP10およびDAP12を含む。ある実施態様において、1以上のCARの何れかにおける一次シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ由来の細胞質シグナル伝達配列を含む。

30

【0361】

ある実施態様において、一次シグナル伝達ドメインは、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、4-1BBおよび/またはCD3-ゼータの機能的シグナル伝達ドメインである。ある実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FcER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD79a、CD79b、DAP10および/またはDAP12の機能的シグナル伝達ドメインを含む。特定の実施態様において、一次シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体複合体と結合したゼータ鎖の機能的シグナル伝達ドメインである。

40

【0362】

ここで使用する用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、増殖を含むが、これに限定されないT細胞による共刺激応答に介在する、T細胞の同族結合パートナーを用いる。共刺激分子は、リンパ球の抗原に対する効率的応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。このような分子の例は、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1、CD11a/CD18)、CD2、CD7、CD258(LIGHT)、NKG2C、B7-H3およびCD83と特異的に結合するリガンドなどを含む。このような共刺激分子のさらなる例は、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKP80(KLRP1

50

)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/CbpおよびCD83と特異的に結合するリガンドを含む。ある実施態様において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、ここに記載する共刺激分子の機能的シグナル伝達ドメイン、例えば、OX40、CD27、CD28、CD30、CD40、PD-1、CD2、CD7、CD258、NKG2C、B7-H3、CD83に結合するリガンド、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOSおよび4-1BB(CD137)またはそれらの何らかの組み合わせである。

【0363】

ここで使用する用語「シグナル伝達ドメイン」は、二次メッセンジャーの産生によりまたはこのようなメッセンジャーに応答してエフェクターとして機能することにより、規定されたシグナル伝達経路を経て細胞活性を制御するために、細胞内で情報伝達に作用する、タンパク質の機能的部分をいう。

【0364】

CARの細胞質シグナル伝達部分内の細胞質シグナル伝達配列は、互いに無作為にまたは特定の順番で結合され得る。所望により、短オリゴまたはポリペプチドリンカー、例えば、2～10アミノ酸長が結合を形成し得る。

【0365】

抗体治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、癌を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のための抗体療法と組み合わせる。

【0366】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を、抗HER2抗体または抗HER2抗体プラットフォーム(例えば、抗HER2結合ドメイン、抗HER2抗体-薬物コンジュゲートまたは抗HER2 CARを含む二特異的または三特異的抗体)などの抗HER2結合ドメインを含む治療と組み合わせる。抗HER2抗体は、トラスツマブ(ハーセプチン(登録商標) - Roche/Genentech; Kanjinti - Amgen)、ペルツマブ(PERJETA(登録商標) - Roche/Genentech)およびMGAH22(引用により、全ての目的のために本明細書に包含させる米国特許8,802,093に詳述)を含むが、これらに限定されない。抗HER2抗体プラットフォームは、エリツマキシマブ(REXOMUN(登録商標) - Creative Biolabs)およびトラスツマブエムタンシン(アドートラスツマブエムタンシン/T-DM1; KADCYLA(登録商標) - Roche/Genentech)を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療を、癌を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療はIV点滴により投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、1mg/kg/日、2mg/kg/日、3mg/kg/日、4mg/kg/日、5mg/kg/日、6mg/kg/日、7mg/kg/日、8mg/kg/日、9mg/kg/日、10mg/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、少なくとも1mg/kg/日、少なくとも2mg/kg/日、少なくとも3mg/kg/日、少なくとも4mg/kg/日、少なくとも5mg/kg/日、少なくとも6mg/kg/日、少なくとも7mg/kg/日、少なくとも8mg/kg/

g/日、少なくとも9 mg/kg/日、少なくとも10 mg/kg/日の用量で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、1 mg/kg/日未満の用量で投与される。

【0367】

ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療を、乳癌を有することが知られるまたは疑われる対象、例えば、転移HER2過発現乳癌を有すると診断された対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、4 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、4 mg/kg/日を90分間のIV点滴で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、2 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、2 mg/kg/日を30分間のIV点滴で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、4 mg/kg/日の初期用量で投与され、その後毎週2 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、4 mg/kg/日の初期用量で投与され、その後毎週2 mg/kg/日を52週間投与される。

【0368】

ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療を、胃癌を有することが知られるまたは疑われる対象、例えば、転移HER2過発現胃癌を有すると診断された対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、8 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、8 mg/kg/日を90分間のIV点滴で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、6 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、6 mg/kg/日を30～90分間のIV点滴で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、8 mg/kg/日の初期用量で投与され、その後毎週6 mg/kg/日で投与される。ある実施態様において、抗HER2結合ドメイン治療は、8 mg/kg/日の初期用量で投与され、その後毎週6 mg/kg/日で52週間投与される。

【0369】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、抗CD20結合ドメインを含む治療、例えば、抗CD20抗体または抗CD20抗体プラットフォーム(例えば、抗CD20結合ドメイン、抗CD20抗体-薬物コンジュゲートまたは抗CD20 CARを含む二特異的または三特異的抗体)と組み合わせる。抗CD20抗体は、リツキシマブ(リツキサン(登録商標) - Roche/Genentech)、オクレリズマブ(OCREVUS(登録商標) - Roche/Genentech)、オビヌツズマブ(GAZYVA(登録商標) - Roche/Genentech)、オファツムマブ(ARZERRA(登録商標) - Novartis)およびベルツズマブを含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、癌を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療はIV点滴により投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、100 mg/m²、200 mg/m²、300 mg/m²、400 mg/m²、500 mg/m²、600 mg/m²、700 mg/m²、800 mg/m²、900 mg/m²または1000 mg/m²の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、375 mg/m²の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、少なくとも100 mg/m²、少なくとも200 mg/m²、少なくとも300 mg/m²、少なくとも400 mg/m²、少なくとも500 mg/m²、少なくとも600 mg/m²、少なくとも700 mg/m²、少なくとも800 mg/m²、少なくとも900 mg/m²または少なくとも1000 mg/m²の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、400 mg/m²未満の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、375 mg/m²未満の用量で投与される。

【0370】

ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、非ホジキンリンパ腫(NHL)を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、IV点滴で 375 mg/m^2 の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、IV点滴で 375 mg/m^2 未満の用量で投与される。

【0371】

ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、慢性リンパ球性白血病(CLL)を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、第一サイクルで 375 mg/m^2 をIV点滴の用量およびさらなる2~6サイクルでサイクルあたり 500 mg/m^2 をIV点滴の用量で投与される。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療は、IV点滴で 375 mg/m^2 未満の用量を投与される。組み合わせた抗CD20結合ドメインおよびヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、フルダラビンおよびシクロホスファミド(FC)と組み合わせて使用し得る。

【0372】

ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、関節リウマチ(RA)を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、1000mg2回で、IV点滴により、2週間離して投与する。ある実施態様において、抗CD20結合ドメイン治療を、24週間まで、1000mg2回で、IV点滴により、2週間離して投与する。ある実施態様において、組み合わせた抗CD20結合ドメインおよびヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、メトトレキサートと共投与する。

【0373】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、アゴニスト抗体を含む抗体治療を含む治療と組み合わせる。ある実施態様において、アゴニスト抗体は、抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体または抗CD27抗体である。ある実施態様において、アゴニスト抗体は、二特異的抗体である。ある実施態様において、アゴニスト抗体は、抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体または抗CD27抗体から選択される2以上の抗原結合ドメインを含む、多特異的抗体、例えば、二特異的抗体である。その例は、ウトミルマブ(Pfizer)などの4-1BBおよびCD137を標的とする二特異的アゴニスト抗体である。

【0374】

チェックポイント阻害剤治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、チェックポイント阻害剤治療と組み合わせ得る。遮断または阻害の標的とし得る例示的免疫チェックポイント分子は、CTLA-4、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(CD2ファミリーの分子に属し、全NK、 $\gamma\delta$ および記憶CD8+($\alpha\beta$)T細胞)、CD160(BY55とも称する)およびCGEN-15049を含むが、これらに限定されない。免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160およびCGEN-15049の1以上と結合し、活性を遮断または阻害する抗体またはその抗原結合フラグメントまたは他の結合タンパク質を含む。例示的免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ(抗PD-1；オプジーボ(登録商標) - BMS)、AMP224(抗PD-1；NCI)、ペムブロリズマブ(抗PD-1；MK-3475/キイトルーダ(登録商標) - Merck)、ピディリズマブ(抗PD-1抗体；CT-011 - Teva/CureTech)、アテゾリズマブ(抗PD-L1；テセントリク(登録商標) - Roche/Genentech)、デュルバルマブ(抗PD-L1；MEDI4736/イミフィン

10

20

30

40

50

ジ(登録商標) - Medimmune/AstraZeneca)、アベルマブ(抗PD-L1; バベンチオ(登録商標) - Pfizer)、BMS-936559(抗PD-L1-BMS)、イピリムマブ(抗CTLA-4; ヤーボイ(登録商標) - BMS)、トレメリマブ(抗CTLA-4; Medimmune/AstraZeneca)、リリルマブ(抗KIR; BMS)、モナリズマブ(抗NKG2A; Innate Pharma/AstraZeneca)、BY55(抗CD160)、抗OX40、抗TIM3および抗LAG3を含む。
【0375】

ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療を、癌を有することが知られるまたは疑われる対象の処置のために、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療はIV点滴により投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は、30分間のIVにより投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は3週間毎に投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mgまたは1000mgの用量で投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は、200mgの用量で投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は、少なくとも100mg、少なくとも200mg、少なくとも300mg、少なくとも400mg、少なくとも500mg、少なくとも600mg、少なくとも700mg、少なくとも800mg、少なくとも900mgまたは少なくとも1000mgの用量で投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療は、200mg未満の用量で投与される。ある実施態様において、チェックポイント阻害剤治療を、黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)、古典的ホジキンリンパ腫(cHL)、一次縦隔大B細胞リンパ腫(PMBCL)、尿路上皮癌腫、マイクロサテライト不安定高癌、胃癌、子宮頸癌、肝細胞癌腫(HCC)、メルケル細胞癌腫(MCC)、腎臓細胞癌腫(RCC)を有することが知られるまたは疑われる対象の処置に、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療と組み合わせて使用する。

【0376】

さらなるサイトカイン治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上のさらなるサイトカイン治療、1以上のケモカイン治療またはそれらの組み合わせと組み合わせる。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上のさらなるサイトカイン治療と組み合わせる。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上のケモカイン治療と組み合わせる。ある実施態様において、サイトカイン治療は、炎症促進性サイトカイン、Th1サイトカインまたはTh2サイトカインを含む。ある実施態様において、サイトカイン治療は、組み換えヒトサイトカインまたはケモカインを含む。

【0377】

ある実施態様において、サイトカイン治療は、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21およびIL-22)であるサイトカインを含む。ある実施態様において、サイトカイン治療は、増殖因子(例えば、腫瘍壊死因子(TNF)、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGF)であるサイトカインを含む。ある実施態様において、サイトカイン治療は、抗炎症性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF)を含む。

【0378】

ある実施態様において、ケモカイン治療は、炎症促進性ケモカイン(例えば、GRO-α、GRO-b、LIX、GCP-2、MIG、IP10、I-TACおよびMCP-1、RANTES、エオタキシン、SDF-1およびMIP3a)を含む。ある実施態様において、ケモカイン治療は、ケモカイン受容体を含む。ある実施態様において、ケモカイン治療は、CXCケモカイン受容体(例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6およびCXCR7)、CCケモカイン受容体(例えば、CCR

1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10およびCCR11)、CX3Cケモカイン受容体(例えば、CX3C11)またはXCケモカイン受容体(例えば、XCR1)を含む。ある実施態様において、ケモカイン治療は、Gタンパク質架橋膜貫通受容体を含む。

【0379】

ある実施態様において、サイトカイン治療は、IL-12シグナル伝達と相乗作用するサイトカイン治療を含む。ある実施態様において、サイトカイン治療は、IL-2サイトカインまたはその誘導体を含む。ある実施態様において、IL-2治療は、アルデスロイキン(Proleukin - Prometheus Therapeutics)である。ある実施態様において、IL-2治療および／またはアルデスロイキンを静脈内投与する。ある実施態様において、サイトカイン治療は、IL-15サイトカインまたはその誘導体を含む。ある実施態様において、IL-15治療は、ALT-803(Altor Bioscience)またはNKTR-255(Nektar)である。ある実施態様において、IL-15治療、NKTR-255および／またはALT-803を皮下投与する。ある実施態様において、ケモカイン治療は、CXCL9ケモカイン、CXCL10ケモカインまたはその誘導体を含む。

【0380】

ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、対象へのサイトカインまたはケモカインの投与を含む。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、対象への組み換えサイトカインまたはケモカインの投与を含む。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、サイトカインまたはケモカインを産生させるための細胞の操作を含む。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、サイトカインまたはケモカインを産生させるためのエキスピボ、インビトロまたはインビボでの細胞の操作を含む。

【0381】

ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、特異的細胞型または受容体を標的とするよう設計された、ウイルスベクターベースの送達プラットフォーム、例えば、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス(例えば、Tatsis et al., *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629)、第二、第三またはハイブリッド第二／第三世代レンチウイルスおよびあらゆる世代の組み換えレンチウイルスを含むが、これらに限定されないレンチウイルスを使用する、サイトカインまたはケモカインを産生させるための細胞の操作を含む(例えば、Hu et al., *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239(1): 45-61, Sakuma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443(3):603-18, Cooper et al., *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690, Zufferey et al., *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880)または米国特許5,173,414; Tratschin et al, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al, *Mol. Cell, Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); およびSamuiski et al, *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989)に詳述のアデノ随伴ウイルス(「AAV」)参照)。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、LNP、リポソームまたはエクソソームを使用するサイトカインまたはケモカインを産生させるための細胞の操作を含む。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、ヌクレアーゼベースのゲノム編集系(例えば、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)ファミリー、転写アクティベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)およびホーミングエンドヌクレアーゼ(HE)ベースのゲノム編集系またはその誘導体)を使用するなどの、ゲノム編集を使用するサイトカインまたはケモカインを産生させるための細胞の操作を含む。ある実施態様において、サイトカインまたはケモカイン治療は、エレクトロ

ポレーションを使用するサイトカインまたはケモカインを産生させるための細胞の操作を含む。

【0382】

自然免疫系アゴニスト治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上の自然免疫系アゴニストと組み合わせる。

【0383】

ある実施態様において、自然免疫系アゴニストは、トール様受容体(TLR)アゴニストを含む。ある実施態様において、TLRアゴニストは、TLR1/2、TLR2/6、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR7/8またはTLR9アゴニストを含む。ある実施態様において、TLR2/6アゴニストは、リポタンパク質、例えば細菌リポタンパク質または誘導体、例えばPam2CSK4を含む。ある実施態様において、TLR1/2アゴニストは、リポタンパク質を含む。ある実施態様において、TLR3アゴニストは、dsRNAアナログ、例えばリントトリモド(AMPLIGEN(登録商標) - Hemispherx Biopharma)またはポリIC-LC(例えば、ヒルトノール(登録商標))を含む。ある実施態様において、TLR4アゴニストは、リポ多糖(LPS、エンドトキシンとも称する)または誘導体、例えば、リポDを含む。ある実施態様において、TLR7アゴニストは、レシキモド(R848とも称する)、イミキモド(ZYCLARA(登録商標)、Aldara-Medicis)およびガーディキモドを含むが、これらに限定されない、ssRNAまたは誘導体またはイミダゾキノリン誘導体を含む。ある実施態様において、TLR7アゴニストはTLR8アゴニスト、例えば、イミキモドまたはMedi-9197(AstraZeneca/Medimmune)でもある。ある実施態様において、TLR9アゴニストは、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)またはSD-101(Dynavax)を含む。

【0384】

ある実施態様において、自然免疫系アゴニストは、インターフェロン遺伝子刺激因子(STING)アゴニストを含む。ある実施態様において、STINGアゴニストは、環状ジヌクレオチド(CDN)を含む。ある実施態様において、CDNは環状ジAMP、環状ジGMPまたは環状-GMP-AMP(cGAMP)を含む。ある実施態様において、STINGアゴニストは、cGASを刺激する核酸(例えば、DNAまたはRNA)を含む。ある実施態様において、STINGアゴニストは、ADU-S100(MIW815とも称する - Aduro/Novartis)である。

【0385】

化学療法

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上の化学療法と組み合わせる。ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、癌と診断された対象を処置するための1以上の化学療法と組み合わせる。化学療法剤の例は、アルデスロイキン、アルボシジブ、アンチネオプラストンAS2-1、アンチネオプラストンA10、抗胸腺細胞グロブリン、アミホスチン三水合物、アミノカンプトテシン、三酸化ヒ素、ベータアレチン、Bcl-2ファミリータンパク質阻害剤ABT-263、ABT-199、BMS-345541、ボルテゾミブ(ベルケイド(登録商標))、ブリオスタチン1、ブスルファン、カルボプラチン、キャンパス-1H、CC-5103、カルムスチン、酢酸カスポフンギン、クロファラビン、シスプラチン、クラドリビン(ロイスタチン(登録商標))、クロラムブシル(リュウケラン(登録商標))、クルクミン、シクロスポリン、シクロホスファミド(Cyloxan、エンドキサン、Endoxana、Cyclostin)、シタラビン、デニロイキンジフチトクス、デキサメサゾン、DT PACE、ドセタキセル、ドラスタチン10、ドキソルビシン(アドリアマイシン(登録商標)、ADRIBLASTINE(登録商標))、塩酸ドキソルビシン、エンザスタウリン、エポエチンアルファ、エトポシド、エベロリムス(RAD001)、フェンレチニド、フィルグラスチム、メルファラン、メスナ、フラボピリドール、フルダラビン(フルダラ(登録商標))、ゲルダナマイシン(17-AAG)、イホスファミド、塩酸イリノテカン、イクサベピロン、レナリドマイド(レブラミド(登録商標)、CC-5013)

、リンホカイン活性化キラー細胞、メルファラン、メトトレキサート、塩酸ミトキサントロン、モテキサフィンガドリニウム、ミコフェノール酸モフェチル、ネララビン、オブリメルセン(GENASENSE(登録商標))、オバトクラックス(GX15-070)、オブリメルセン、酢酸オクトレオチド、オメガ-3 脂肪酸、オキサリプラチン、パクリタキセル、PD0332991、ペグ化リポソーム塩酸ドキシソルビシン、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン(NIPENT(登録商標))、ペリホシン、プレドニゾロン、プレドニゾン、R-ロスコビチン(SELICILIB(登録商標)、CYC202)、組み換えインターフェロンアルファ、組み換えインターロイキン-12、組み換えインターロイキン-11、組み換えFLT3リガンド、組み換えヒトトロポポエチン、リツキシマブ、サルグラモステム、シクエン酸ルデナフィル、シンバスタチン、シロリムス、スチリルスルホン、タクロリムス、タネスピマイシン、テムシロリムス(CC1-779)、サリドマイド、治療同種リンパ球、チオテパ、ティピファルニブ、ベルケイド(登録商標)(ボルテゾミブ(登録商標)またはPS-341)、ピンクリスチン(オンコビン(登録商標))、ピンクリスチン硫酸、二酒石酸ビノレルビン、ポリノスタット(SAHA)およびFR(フルダラビン、リツキシマブ)、CHOP(シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチン、プレドニゾン)、CVP(シクロホスファミド、ピンクリスチンおよびプレドニゾン)、FCM(フルダラビン、シクロホスファミド、ミトキサントロン)、FCR(フルダラビン、シクロホスファミド、リツキシマブ)、hyperCVAD(多分割シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルビシン、デキサメサゾン、メトトレキサート、シタラビン)、ICE(イホスファミド、カルボプラチンおよびエトポシド)、MCP(ミトキサントロン、クロラムブシルおよびプレドニゾロン)、R-CHOP(リツキシマブ+CHOP)、R-CVP(リツキシマブ+CVP)、R-FCM(リツキシマブ+FCM)、R-ICE(リツキシマブ+ICE)およびR-MCP(R-MCP)を含む。

【0386】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、結腸癌、直腸癌または結腸直腸癌(CRC)を有すると診断された対象を処置するための1以上の化学療法と組み合わせる。ある実施態様において、化学療法は、FOLFOX(5-FU、ロイコボリンおよびオキサリプラチン/Eloxatin)、FOLFIRI(ロイコボリン、5-FUおよびイリノテカン/Camptosar)、FOLFOXIRI(ロイコボリン、5-FU、オキサリプラチンおよびイリノテカン)、CapeOx(カペシタビンおよびオキサリプラチン)、5-FUとロイコボリン共投与、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))単独またはトリフルリジンおよびチピラシル(ロンサーフ(登録商標))を含む。ある実施態様において、化学療法は、VEGF標的化剤、例えばベバシズマブ(アバスタチン(登録商標))、ziv-アフリベルセプト(ザルトラップ(登録商標))、ラムシルマブ(CYRAMZA(登録商標))またはレゴラフェニブ(スチバーガ(登録商標))またはEGFR標的化剤、例えばセツキシマブ(アービタックス)またはパニツムマブ(ベクティビックス(登録商標))を含む。ある実施態様において、化学療法は、FOLFOX、FOLFIRI、FOLFOXIRI、CapeOx、5-FUとロイコボリン共投与、カペシタビン単独およびVEGF標的化剤またはEGFR標的化剤と一緒にトリフルリジン/チピラシルから選択される化学療法と共投与される。

【0387】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、乳癌を有すると診断された対象を処置するための1以上の化学療法と組み合わせる。ある実施態様において、化学療法は、ドキシソルビシン(アドリアマイシン(登録商標))、ペグ化リポソームドキシソルビシン、エピルビシン(ELLENCE(登録商標))、パクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル(タキソテル(登録商標))、アルブミン結合パクリタキセル(アブラキサン(登録商標))、5-フルオロウラシル(5-FU)、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標))、カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))、シスプラチン、ビノレルビン(ナベルビン(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ)、ゲムシタビン(ジェムザール(登録商標))、イクサベピロン(イグゼンプラ(登録商標))またはエリブリン(ハラヴェン)を含む。ある実施態様において、化学療法は、ドキシソルビシン(アドリアマイシン(登録商標))、ペグ化リポソームドキシソルビシン、エピルビシン(ELLENCE(登録商標))、パクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル(タ

10

20

30

40

50

キソテール(登録商標))、アルブミン結合パクリタキセル(アブラキサン(登録商標))、5-フルオロウラシル(5-FU)、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標))、カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))、シスプラチン、ビノレルビン(ナベルビン(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))、ゲムシタビン(ジェムザール(登録商標))、イクサベピロン(イグゼンプラ(登録商標))およびエリブリン(ハラヴェン(登録商標))から選択される2以上の化学療法の組み合わせを含む。

【0388】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、黒色腫／皮膚癌を有すると診断された対象を処置するための1以上の化学療法と組み合わせる。ある実施態様において、化学療法は、ダカルバジン(別名DTIC)、テモゾロミド、nab-パクリタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、カルボプラチンまたはビンブラスチンを含む。

10

【0389】

標的化剤治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、1以上の標的化剤と組み合わせる。一般に、標的化剤は、癌に関連する標的などの特定の分子標的に作用する。標的化剤は、標準化学療法が全ての急速に分裂している正常および癌性細胞に作用する点で、標準化学療法と区別される。標的化剤は、ホルモン治療、シグナル伝達阻害剤、遺伝子発現モジュレーター、アポトーシスインデューサー、血管形成阻害剤、免疫療法、毒素送達分子(例えば、抗体薬物-コンジュゲート)およびキナーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、標的化剤は受容体アゴニストまたはリガンドを含む。

20

【0390】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、結腸癌、直腸癌または結腸直腸癌(CRC)を有すると診断された対象を処置するための1以上の標的化剤と組み合わせる。ある実施態様において、標的化剤は、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))、パニツムマブ(ベクティビックス(登録商標))、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、ziv-アフリベルセプト(ザルトラップ(登録商標))、レゴラフェニブ(スチバーガ(登録商標))、ラムシルマブ(CYRAMZA(登録商標))、ニボルマブ(オブジーボ(登録商標))またはイピリムマブ(ヤーボイ(登録商標))を含む。

【0391】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、乳癌を有すると診断された対象を処置するための1以上の標的化剤と組み合わせる。ある実施態様において、標的化剤は、エベロリムス(アフィニール(登録商標))、タモキシフェン(ノルバデックス(登録商標))、トレミフェン(フェアストン(登録商標))、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))、フルベストラント(フェソロデックス(登録商標))、アナストロゾール(アリミデックス(登録商標))、エキセメスタン(アロマシン(登録商標))、ラパチニブ(タイケルブ(登録商標))、レトロゾール(フェマーラ(登録商標))、ペルツズマブ(PERJETA(登録商標))、adot-トラスツズマブエムタンシン(カドサイラ(登録商標))、パルボシクリブ(イブランス(登録商標))、リボシクリブ(KISQALI(登録商標))、マレイン酸ネラチニブ(NERLYNXTM)、アベマシクリブ(ベージニオTM)、オラパリブ(LYNPARZATM)、アテゾリズマブ(テセントリク(登録商標))またはアルペリシブ(PIQRAY(登録商標))を含む。

30

40

【0392】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、黒色腫／皮膚癌を有すると診断された対象を処置するための1以上の標的化剤と組み合わせる。ある実施態様において、標的化剤は、ビスモデギブ(エリベッジ(登録商標))、ソニデギブ(オドムゾ(登録商標))、イピリムマブ(ヤーボイ(登録商標))、ベムラフェニブ(ゼルボラフ(登録商標))、トラメチニブ(MEKINIST(登録商標))、ダブラフェニブ(タフィンラー(登録商標))、ペムブロリズマブ(キイトルーダ(登録商標))、ニボルマブ(オブジーボ(登録商標))、コビメチニブ(COTELLICTM)、アリトレチノイン(PANRETIN(登録商標))、アベルマブ(バベンチオ(登録商標))、エンコラフェニブ(ビラフトビTM)、ビニメチニブ(メクトビ(登録商標))またはセ

50

ミプリマブー r w l c (LIBTAYO(登録商標))を含む。

【0393】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、受容体アゴニストまたはリガンド治療と組み合わせる。ある実施態様において、受容体アゴニストまたはリガンド治療は、アゴニスト抗体を含む。ある実施態様において、受容体アゴニストまたはリガンド治療は、受容体リガンド、例えば 4-1 B B L または C D 4 0 L を含む。

【0394】

放射線療法

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、放射線療法と組み合わせる。ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、放射性同位体粒子、例えばインジウム I n-111、イットリウム Y-90 またはヨウ素 I-131 と組み合わせる。組み合わせ治療の例は、ヨウ素-131 トシツモマブ(ベキサール(登録商標))、イットリウム-90 イブリツモマブチウキセタン(ゼヴァリン(登録商標))およびベキサール(登録商標)と C H O P を含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、放射線療法は、外照射放射線療法(E B R T)、組織内放射線療法(密封小線源治療)、空洞内放射線療法、間質性密封小線源治療、放射線塞栓療法、少分割放射線療法、術中放射線療法(I O R T)、3 D-原体放射線療法、定位放射線手術(S R S)または体幹部定位放射線療法(S B R T)を含む。

【0395】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、結腸癌、直腸癌または結腸直腸癌(C R C)を有すると診断された対象を処置するための 1 以上の放射線療法と組み合わせる。ある実施態様において、放射線療法は、外照射放射線療法(E B R T)、組織内放射線療法(密封小線源治療)、空洞内放射線療法、間質性密封小線源治療または放射線塞栓療法を含む。

【0396】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、乳癌を有すると診断された対象を処置するための 1 以上の放射線療法と組み合わせる。ある実施態様において、放射線療法は、外照射放射線療法、少分割放射線療法、術中放射線療法(I O R T)または 3 D-原体放射線療法を含む。

【0397】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、黒色腫／皮膚癌を有すると診断された対象を処置するための 1 以上の放射線療法と組み合わせる。ある実施態様において、放射線療法は、定位放射線手術(S R S；例えば、ガンマナイフまたは線形加速器を使用)または体幹部定位放射線療法(S B R T)を含む。

【0398】

ワクチンおよび腫瘍溶解性ウイルス治療

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、特定の免疫応答、例えば、腫瘍特異的免疫応答を誘発できる、1 以上の免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物または腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせる。

【0399】

ある実施態様において、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質治療を、ワクチン組成物と組み合わせる。ワクチン組成物は、一般に標的とすべき腫瘍に特異的な複数の抗原およびまたはネオ抗原を含む。ワクチン組成物はワクチンとも称され得る。

【0400】

ある実施態様において、ワクチン組成物は、さらにアジュバントおよび／または担体を含む。ある実施態様において、ワクチン組成物は、T 細胞にペプチドを提示できる、タンパク質または樹状細胞(D C)などの抗原提示細胞などの担体を伴う。ある実施態様において、担体は、抗原またはネオ抗原が結合できる、足場構造、例えばポリペプチドまたは多糖である。

【0401】

10

20

30

40

50

一般に、アジュバントは、ワクチン組成物に混ぜることにより、抗原またはネオ抗原に対する免疫応答を増強するかまたは他の点で修飾するあらゆる物質である。所望により、アジュバントは、共有結合性または非共有結合性にコンジュゲートされる。アジュバントが抗原に対する免疫応答を増加する能力は、一般に免疫介在反応の顕著なまたは実質的な増加または疾患症状軽減により顕在化される。例えば、液性免疫の増加は、一般に抗原に対して誘発される抗体の力価増加により顕在化され、T細胞活性は、一般に細胞増殖または細胞毒性増加またはサイトカイン分泌により顕在化される。アジュバントは、例えば、を、一次液性またはTh応答を一次細胞またはTh応答に変えることにより、免疫応答も変え得る。適当なアジュバントは、1018 ISS、アルム、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、ISパッチ、ISS、ISCOマトリクス、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタナイドIMS 1312、モンタナイドISA 206、モンタナイドISA 50V、モンタナイドISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTelベクター系、PLG微粒子、レシキモド、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGF trap、R848、ベターグルカン、Pam3Cys、サポニン由来のAquila's QS21ステイミュロン(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA)、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣物および他の専売アジュバント、例えばRibil's Detox、QuilまたはSuperfosを含むが、これらに限定されない。不完全フロインドまたはGM-CSFなどのアジュバントは有用である。樹状細胞およびその調製に特異的ないくつかの免疫学的アジュバント(例えば、MF59)は先に記載されている(Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11)。サイトカインもまた使用され得る。いくつかのサイトカインは、樹状細胞のリンパ系組織への遊走(例えば、TNF-α)、樹状細胞のTリンパ球のための効率的抗原提示細胞への成熟加速(例えば、GM-CSF、IL-1およびIL-4)(米国特許5,849,589、特に引用により全体として本明細書に包含させる)および免疫アジュバントとしての作用(例えば、IL-12)に直接関連している(Gabrilovich D I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418)。ある実施態様において、アジュバントはCpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む。ある実施態様において、アジュバントはTLRアゴニストを含む。

【0402】

有用なアジュバントの他の例は、化学的に修飾されたCpGs(例えばCpR、Idera)、ポリ(I:C)(例えばポリi:C I2U)、非CpG細菌DNAまたはRNAならびに治療剤および／またはアジュバントとして作用し得る免疫活性小分子および抗体、例えばシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セレブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、ZD2171、AZD2171、イピリムマブ、トレメリムマブおよびSC58175を含むが、これらに限定されない。アジュバントおよび添加物の量および濃度は、当業者により過度の実験なく容易に決定され得る。さらなるアジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、サルグラモスチム)などのコロニー刺激因子を含む。

【0403】

ある実施態様において、ワクチン組成物は1を超える異なるアジュバントを含む。ある実施態様において、ワクチン組成物は、上記の何れかを含む何らかのアジュバント物質またはそれらの組み合わせを含む。ワクチンおよびアジュバントを一緒にまたは別々に何らかの適切な順番で投与することも考慮される。

【0404】

ある実施態様において、担体(または添加物)は、アジュバントと関係なく存在する。ある実施態様において、担体の機能は、分子量増加、活性または免疫原性増加、安定性付与

10

20

30

40

50

、生物学的活性増加または血清半減期延長である。ある実施態様において、担体は、T細胞へのペプチド提示を助ける。ある実施態様において、担体は、当業者に知られるあらゆる適当な担体、例えばタンパク質または抗原提示細胞を含む。担体タンパク質の例は、キーホールリンペットヘモシアニン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、サイログロブリンまたは卵白アルブミンなどの血清タンパク質、免疫グロブリンまたはインスリンまたはパルミチン酸などのホルモンを含むが、これらに限定されない。ヒトの免疫化のために、担体は、一般にヒトに許容されかつ安全である生理学的に許容される担体である。しかしながら、破傷風トキソイドおよび／またはジフテリアトキソイドは適当な担体である。あるいは、担体はデキストラン、例えばセファロースである。

【0405】

ある実施態様において、ワクチンは、特異的細胞型または受容体を標的とするよう設計された、ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォーム、例えばワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス(例えば、Tatsis et al., *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629参照)または第二、第三またはハイブリッド第二／第三世代レンチウイルスおよびあらゆる世代の組み換えレンチウイルスを含むが、これらに限定されないレンチウイルス(例えば、Hu et al., *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239(1): 45-61, Sakuma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443(3):603-18, Cooper et al., *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690, Zufferey et al., *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880参照)を含む。一般に、宿主への導入により、感染細胞は抗原またはネオ抗原を発現し、それによりペプチドに対する宿主免疫(例えば、CTL)応答が誘発される。

【0406】

上記ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング能により、ある実施態様において、ワクチン組成物は、1以上のウイルスベクターを含む。ある実施態様において、ウイルスベクターは、リンカーにより離されたまたは細胞内区画をターゲティングする1以上の配列が前にある非変異配列が隣接する配列を含む(例えば、Gros et al., *Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, Nat Med.* (2016) 22 (4):433-8, Stronen et al., *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, Science.* (2016) 352 (6291):1337-41, Lu et al., *Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, Clin Cancer Res.* (2014) 20(13):3401-10参照)。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば、米国特許4,722,848に記載される。他のベクターはBCG(カルメット・ゲラン桿菌)である。BCGベクターは、Stover et al. (*Nature* 351:456-460 (1991))に記載される。ネオ抗原の治療的投与または免疫化に有用な広範な他のワクチンベクター、例えば、チフス菌ベクターなどは、本明細書の記載から当業者に明らかである。

【0407】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を腫瘍溶解性ウイルス治療と組み合わせる。一般に、腫瘍溶解性ウイルスは、主に癌細胞に感染し、殺すよう操作されたウイルスである。ある実施態様において、癌細胞を殺す腫瘍溶解性ウイルスに加えて、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞に対する免疫応答を誘導する。

【0408】

ある実施態様において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質治療を、黒色腫／皮膚癌を有すると診断された対象を処置するための腫瘍溶解性ウイルス治療と組み合わせる。ある実施態様において、腫瘍溶解性ウイルスは、T-VECとも称するタリモジーン・ラハーパ

10

20

30

40

50

レブベック(IMLYGIC(登録商標))を含む。ある実施態様において、I L - 1 2 のサブユニットを含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を、腫瘍溶解性ウイルス(例えば、タリモジン・ラハーパレブベック(IMLYGIC(登録商標))または T - V E C) と組み合わせて癌(例えば、進行悪性腫瘍)の処置に使用する。

【0409】

上の記載は、本発明の複数の態様および実施態様を説明する。本特許出願は、これら態様および実施態様の全ての組み合わせおよび順列を特に意図する。

本開示は、例えば、以下に関する。

〔項1〕

(a) 第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを含む第一ポリペプチド；および

(b) 第二抗体 F c ドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチド

を含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

ここで、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドは各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドは F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異を含み、そして

多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合しているものである、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項2〕

エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害(A D C C)、抗体依存性細胞食作用(A D C P)および／または補体依存性細胞傷害(C D C)を誘導する F c の能力を含む、項1に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項3〕

ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質がフコシル化されている、項1または2に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項4〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト抗体 F c ドメインポリペプチドである、項1～3の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項5〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、I g D または I g E F c ドメインポリペプチドである、項1～4の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項6〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330 および／または331の位置に1以上の変異を含む、項1～5の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項7〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドである、項1～6の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項8〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより、234、235、237、329、330 および／または331の位置に1以上の変異を含む、項7に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項9〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが L 234 A、L 235 A、L 235 E、G 237 A、P 329 A、A 330 S および P 331 S から選択される1以上の変異を含む、項8に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 0〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A を含む、項 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 1〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を含む、項 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 2〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S を含む、項 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 C 2 2 0 S を含む、項 7 ～ 1 2 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 4〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 4 F c ドメインポリペプチドである、項 1 ～ 6 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 5〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、2 3 5 位および／または 3 2 9 位に 1 以上の変異を含む、項 1 4 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 6〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが L 2 3 5 E および P 3 2 9 A から選択される 1 以上の変異を含む、項 1 5 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 7〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 E を含む、項 1 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 8〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 E および P 3 2 9 A を含む、項 1 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 9〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 S 2 2 8 P を含む、項 1 4 ～ 1 8 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 2 0〕

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 2 1〕

多サブユニットサイトカインのサブユニットおよび免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドを含むポリペプチドであって、ここで、F c ドメインポリペプチドが異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する変異および F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異を含む、ポリペプチド。

〔項 2 2〕

F c ドメインがヒト I g G 1 抗体 F c ドメインである、項 2 1 に記載のポリペプチド。

〔項 2 3〕

F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A または L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、P 3 2 9 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される、項 2 2 に記載のポリペプチド。

〔項 2 4〕

F c のエフェクター機能を低減させる変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A である、項 2 2 または 2 3 に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

[項 2 5]

ヘテロ二量体化を促進する変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、K 3 6 0 E および K 4 0 9 W である、項 2 2 ～ 2 4 の何れかに記載のポリペプチド。

[項 2 6]

ヘテロ二量体化を促進する変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T である、項 2 2 ～ 2 4 の何れかに記載のポリペプチド。

[項 2 7]

F c ドメインが異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのジスルフィド結合形成を促進する変異をさらに含む、項 2 5 または 2 6 に記載のポリペプチド。

10

[項 2 8]

ヘテロ二量体化変異が K 3 6 0 E および K 4 0 9 W であるとき、ジスルフィド結合形成を促進する変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、Y 3 4 9 C である、項 2 7 に記載のポリペプチド。

[項 2 9]

ヘテロ二量体化変異が Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T であるとき、ジスルフィド結合形成を促進する変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、S 3 5 4 C である、項 2 7 に記載のポリペプチド。

[項 3 0]

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含む、項 2 8 に記載のポリペプチド。

20

[項 3 1]

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む、項 2 9 に記載のポリペプチド。

[項 3 2]

配列番号 2 9 0 または配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸。

[項 3 3]

配列番号 2 9 0 または配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む、発現ベクター。

[項 3 4]

項 3 2 に記載の核酸または項 3 3 に記載の発現ベクターを含む、細胞。

30

[項 3 5]

(a) 第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを含む第一ポリペプチド；および

(b) 第二抗体 F c ドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチド

を含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

ここで、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットが第一リンカーにより第一抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、ここで、第一リンカーは第一アミノ酸配列を含み、ここで、第一アミノ酸配列はアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E X₁ X₂ G X₃ (配列番号 2 3 7) (ここで、X₁ は L または A であり、X₂ は L、E または A であり、そして X₃ は A または G である) を含み、

40

ここで、X₁ が L であるおよび／または X₂ が L であるとき、第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドの少なくとも一方はヘテロ二量体化を促進する Q 3 4 7 R 変異を含み

ここで、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合しているものである、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 3 6]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番

50

号 2 3 9)を含む、項 3 5 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 3 7]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 3 9)からなる、項 3 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 3 8]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 1 0)を含む、項 3 6 または 3 7 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 3 9]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 1 0)からなる、項 3 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 0]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 3 8)を含む、項 3 5 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 1]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 2 3 8)からなる、項 4 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 2]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 8)を含む、項 4 0 または 4 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 3]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 8)からなる、項 4 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 4]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 5)を含む、項 4 0 または 4 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 5]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 5)からなる、項 4 4 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 6]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 6)を含む、項 4 0 または 4 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 7]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E L L G G (配列番号 1 6)からなる、項 4 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 4 8]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二

10

20

30

40

50

リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号65)を含む、項40または41に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項49]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号65)からなり、項48に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項50]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号66)を含む、項40または41に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

10

[項51]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(配列番号66)からなる、項50に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項52]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号240)を含む、項35に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項53]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号240)からなる、項52に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

20

[項54]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号12)を含む、項52または53に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項55]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号12)からなる、項54に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

30

[項56]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号67)を含む、項52または53に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項57]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号67)からなる、項56に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項58]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号68)を含む、項52または53に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

40

[項59]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(配列番号68)からなる、項58に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項60]

50

(a) 第一抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第一サブユニットを含む第一ポリペプチド；および

(b) 第二抗体Fcドメインポリペプチドおよび多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットを含む第二ポリペプチド

を含む、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質であって、

ここで、第一および第二抗体Fcドメインポリペプチドが各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、多サブユニットタンパク質の第一サブユニットが第一リンカーにより第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、ここで、第一リンカーが第一アミノ酸配列を含み、ここで、第一アミノ酸配列がアミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号1)(ここで、XはLまたはEである)を含み、そして

多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合しているものである、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項61]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)を含む、項60に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項62]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号2)からなる、項61に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項63]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(配列番号3)を含む、項61または62に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項64]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG(配列番号3)からなる、項63に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項65]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG(配列番号13)を含む、項61または62に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項66]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG(配列番号13)からなる、項65に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項67]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG(配列番号14)を含む、項61または62に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項68]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG(配列番号14)からなる、項67に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項69]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列RVESKYGPCCPPCPAPEFEGG(配列番号4)を含む、項60に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

10

20

30

40

50

[項 7 0]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) からなる、項 6 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 1]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) を含む、項 6 9 または 7 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 2]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) からなる、項 7 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 3]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 6 3) を含む、項 6 9 または 7 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 4]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 6 3) からなる、項 7 3 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 5]

多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 6 4) を含む、項 6 9 または 7 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 6]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 6 4) からなる、項 7 5 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 7]

第一および／または第二ポリペプチドが F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異を含む、項 3 5 ～ 7 6 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 8]

エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、抗体依存性細胞食作用 (A D C P) および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) を誘導する F c の能力を含む、項 7 7 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 7 9]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドである、項 7 7 または 7 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 0]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、各々、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A または L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、P 3 2 9 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される 1 以上の変異を含む、項 7 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 1]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A を含む、項 8 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 2]

10

20

30

40

50

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を含む、項 8 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 3]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S を含む、項 8 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 4]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 C 2 2 0 S を含む、項 7 9 ～ 8 3 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 5]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 4 F c ドメインポリペプチドである、項 7 7 または 7 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 6]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 5 E および P 3 2 9 A から選択される 1 以上の変異を含む、項 8 5 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 7]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 E を含む、項 8 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 8]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 E および P 3 2 9 A を含む、項 8 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 8 9]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 S 2 2 8 P を含む、項 8 5 ～ 8 8 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 0]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 6 0 E、K 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何らかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 7 ～ 1 3、3 5 ～ 5 9 および 7 9 ～ 8 4 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 1]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、項 9 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 2]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何らかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 6 0 E、K 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 7 ～ 1 3、3 5 ～ 5 9 および 7 9 ～ 8 4 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 3]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含む、項 9 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 4]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 7 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが E 3 5 7 N、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 1 4 ～ 1 9、6 0 ～ 7 6 および 8 5 ～ 8 9 の何れかに

10

20

30

40

50

記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 5]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、項 9 4 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 6]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが E 3 5 7 N、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 7 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 1 4 ~ 1 9、6 0 ~ 7 6 および 8 5 ~ 8 9 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

10

[項 9 7]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含む、項 9 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 9 8]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 6 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 1 4 ~ 1 9、6 0 ~ 7 6 および 8 5 ~ 8 9 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

20

[項 9 9]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、項 9 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 0]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが K 3 6 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、項 1 4 ~ 1 9、6 0 ~ 7 6 および 8 5 ~ 8 9 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

30

[項 1 0 1]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含む、項 1 0 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 2]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが鎖間ジスルフィド結合を導入するためにさらに変異される、項 1 ~ 1 9 または 3 5 ~ 1 0 1 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 3]

40

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Y 3 4 9 C を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 S 3 5 4 C を含む、項 1 0 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 4]

第一抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 S 3 5 4 C を含み、第二抗体 F c ドメインポリペプチドが変異 Y 3 4 9 C を含む、項 1 0 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 5]

多サブユニットタンパク質が多サブユニットサイトカインである、項 1 ~ 1 9 または 3 5 ~ 1 0 4 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 6]

多サブユニットサイトカインが I L - 1 2 である、項 1 0 5 に記載のヘテロ二量体 F c

50

融合タンパク質。

[項 1 0 7]

多サブユニットサイトカインの第一サブユニットがヒト IL-12 の p 4 0 サブユニットであり、多サブユニットサイトカインの第二の異なるサブユニットがヒト IL-12 の p 3 5 サブユニットである、項 1 0 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 8]

多サブユニットサイトカインの第一サブユニットがヒト IL-12 の p 3 5 サブユニットであり、多サブユニットサイトカインの第二の異なるサブユニットがヒト IL-12 の p 4 0 サブユニットである、項 1 0 6 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 0 9]

野生型 p 3 5 配列に対応する C 7 4 がセリンによって置換され、野生型 p 4 0 に対応する C 1 7 7 がセリンによって置換され、これらの置換がヒト IL-12 の野生型 p 3 5 および野生型 p 4 0 サブユニット間で形成される天然ジスルフィド結合を除去する、項 1 0 7 または 1 0 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 0]

ヒト IL-12 の p 3 5 サブユニットが V 1 8 5 C 置換を含み、ヒト IL-12 の p 4 0 サブユニットが Y 2 9 2 C 置換を含み、これがヒト IL-12 の p 3 5 サブユニットおよび p 4 0 サブユニット間に非天然ジスルフィド結合を形成する、項 1 0 9 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 1]

抗体可変ドメインをさらに含む、項 1 ~ 1 9 または 3 5 ~ 1 1 0 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 2]

抗体可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインを含む、項 1 1 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 3]

抗体重鎖可変ドメインが第一抗体 F c ドメインポリペプチドまたは第二抗体 F c ドメインポリペプチドの N 末端に融合する、項 1 1 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 4]

抗体重鎖可変ドメインが F a b を形成するように抗体軽鎖可変ドメインに結合する、項 1 1 3 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 5]

抗体重鎖可変ドメインが s c F v を形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、項 1 1 3 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 6]

多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットがそれぞれ第一抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端および第二抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端に融合する、項 1 1 3 ~ 1 1 5 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 7]

抗体重鎖可変ドメインが第一抗体 F c ドメインポリペプチドまたは第二抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端に融合する、項 1 1 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 8]

抗体重鎖可変ドメインが s c F v を形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、項 1 1 7 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 1 9]

多サブユニットタンパク質の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットがそれぞれ第一抗体 F c ドメインポリペプチドの N 末端および第二抗体 F c ドメインポリペプチドの N 末端に融合する、項 1 1 7 または 1 1 8 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

[項 1 2 0]

抗体可変ドメインをさらに含む、項 2 1 ～ 3 1 の何れかに記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 1〕

抗体可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインを含む、項 1 2 0 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 2〕

抗体重鎖可変ドメインがポリペプチドの N 末端に融合する、項 1 2 1 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 3〕

抗体重鎖可変ドメインが F a b を形成するように抗体軽鎖可変ドメインに結合する、項 1 2 2 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 4〕

抗体重鎖可変ドメインが s c F v を形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、項 1 2 2 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 5〕

多サブユニットサイトカインのサブユニットが免疫グロブリン F c ドメインの C 末端に融合する、項 1 2 2 ～ 1 2 4 に記載の何れかに記載のポリペプチド。

〔項 1 2 6〕

抗体重鎖可変ドメインがポリペプチドの C 末端に融合する、項 1 2 1 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 7〕

抗体重鎖可変ドメインが s c F v を形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、項 1 2 6 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 8〕

多サブユニットサイトカインのサブユニットが免疫グロブリン F c ドメインの N 末端に融合する、項 1 2 6 または 1 2 7 に記載に記載のポリペプチド。

〔項 1 2 9〕

抗体可変ドメインを含まない、項 1 ～ 1 9 または 3 5 ～ 1 1 0 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 0〕

プロテオグリカン結合ドメインをさらに含む、項 1 ～ 1 9 、 3 5 ～ 1 1 0 または 1 2 9 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 1〕

プロテオグリカン結合ドメインが腫瘍に特異的に発現される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、項 1 3 0 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 2〕

プロテオグリカン結合ドメインがシンデカン、セルグリシン、C S P G 4 、ベータグリカン、グリピカン、ペルレカン、ベルシカン、プレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン(S L R P)から選択される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、項 1 3 1 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 3〕

S L R P がデコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される、項 1 3 2 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 4〕

コラーゲン結合ドメインをさらに含む、項 1 ～ 1 9 、 3 5 ～ 1 1 0 または 1 2 9 ～ 1 3 3 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 5〕

コラーゲン結合ドメインが腫瘍に特異的に発現される 1 以上のコラーゲンに結合する、項 1 3 4 に記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

〔項 1 3 6〕

ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む、項 1 ～ 1 9 、 3 5 ～ 1 1 0 または 1 2 9 ～ 1

10

20

30

40

50

35の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項137]

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインまたはヒアルロン酸結合ドメインが第一抗体Fcドメインポリペプチドまたは第二抗体FcドメインポリペプチドのC末端に融合する、項130～136の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

[項138]

抗体可変ドメインを含まない、項21～31の何れかに記載に記載のポリペプチド。

[項139]

プロテオグリカン結合ドメインをさらに含む、項21～31の何れかに記載に記載のポリペプチド。

[項140]

プロテオグリカン結合ドメインが腫瘍に特異的に発現される1以上のプロテオグリカンに結合する、項139に記載に記載のポリペプチド。

[項141]

プロテオグリカン結合ドメインがシンデカン、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン、ペルレカン、ベルシカン、プレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン(SLRP)から選択される1以上のプロテオグリカンに結合する、項140に記載に記載のポリペプチド。

[項142]

SLRPがデコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される、項141に記載に記載のポリペプチド。

[項143]

コラーゲン結合ドメインをさらに含む、項21～31または138～142の何れかに記載に記載のポリペプチド。

[項144]

コラーゲン結合ドメインが腫瘍において特異的に発現される1以上のコラーゲンに結合する、項143に記載に記載のポリペプチド。

[項145]

ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む、項21～31または138～144の何れかに記載に記載のポリペプチド。

[項146]

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインまたはヒアルロン酸結合ドメインがポリペプチドのC末端に融合する、項139～145に記載の何れかに記載のポリペプチド。

[項147]

項1～20、35～119または129～137の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む、製剤。

[項148]

項1～20、35～119または129～137の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質または項120～128または138～146の何れかに記載のポリペプチドをコードする1以上の核酸を含む、細胞。

[項149]

癌を処置する方法であって、患者に項1～20、35～119または129～137の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質または項147に記載の製剤を投与することを含む、方法。

[項150]

急性放射線症候群を処置する方法であって、患者に項1～20、35～119または129～137の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質または項147に記載の製剤を投与することを含む、方法。

[項151]

10

20

30

40

50

急性放射線症候群が造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群、皮膚放射線症候群およびその何れかの組み合わせから選択される1以上の症候群を含む、項150に記載の方法。

[項152]

患者にチェックポイント阻害剤、サイトカイン、TLRアゴニスト、STINGアゴニスト、化学療法剤、癌標的剤、腫瘍溶解性ウイルス、ワクチン、照射、養子NK治療、幹細胞移植(SCT)治療、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞治療、多特異的結合タンパク質(TrinKET)および細胞老化を誘導する薬剤から選択される第二治療剤を投与することをさらに含む、項149に記載の方法。

[項153]

チェックポイント阻害剤が抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗KIR抗体、抗NKG2A抗体、抗LAG3抗体および抗TIM3抗体から選択される、項152に記載の方法。

[項154]

TLRアゴニストがTLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、TLR7/8アゴニスト、TLR9アゴニスト、TLR4アゴニストおよびTLR3アゴニストから選択される、項152に記載の方法。

[項155]

STINGアゴニストがADU-S100である、項152に記載の方法。

[項156]

化学療法剤がパクリタキセル、nab-パクリタキセル、ドキソルビシン、ゲムシタビンまたはシクロホスファミドである、項152に記載の方法。

[項157]

チェックポイント阻害剤がニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、リリルマブおよびモナリズマブから選択される、項152に記載の方法。

[項158]

TLRアゴニストがR848/レシキモド、VTX-2337、イミキモドおよびCpGオリゴデオキシヌクレオチドから選択される、項152に記載の方法。

[項159]

アゴニスト抗体が抗4-1BB/CD137抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗GITR抗体および抗CD27抗体から選択される、項152に記載の方法。

[項160]

サイトカインがIL-2、IL-15、CXCL9およびCXCL10から選択される、項152に記載の方法。

[項161]

多特異的結合タンパク質(TrinKET)が

(a) NKG2Dに結合する第一抗原結合部位；

(b) 腫瘍関連抗原に結合する第二抗原結合部位；および

(c) CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメインもしくはその一部またはCD16に結合する第三抗原結合部位

を含み；

ここで、腫瘍関連抗原がEpCAM、CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4およびPD-L1からなる群から選択される、項152に記載の方法。

[項162]

項1~20、35~119または129~137の何れかに記載のヘテロ二量体Fc融

10

20

30

40

50

合タンパク質または項 1 4 7 に記載の製剤が患者に静脈内、皮下、腹腔内または腫瘍内投与される、項 1 4 9 または 1 5 2 ～ 1 6 1 の何れかに記載の方法。

〔項 1 6 3〕

癌が急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、B 細胞リンパ腫、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、汎発性大 B 細胞リンパ腫食道癌、ユーイング肉腫、濾胞性リンパ腫、胃癌、消化器癌、消化器間質腫瘍、神経膠芽腫、頭頸部癌、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、腎臓細胞癌腫、神経芽腫、非小細胞肺癌、神経内分泌腫瘍、卵巣癌および膵臓癌、前立腺癌、肉腫、小細胞肺癌、T 細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺癌腫、甲状腺癌、尿路上皮癌、骨髄由来サプレッサー細胞により浸潤された癌、細胞外マトリクス沈着を伴う癌、高レベルの反応性間質を伴う癌および新血管形成を伴う癌からなる群から選択される、項 1 4 9 または 1 5 2 ～ 1 6 2 の何れかに記載の方法。

10

〔項 1 6 4〕

患者に単回用量のみのヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質を投与することを含む、癌を処置する方法。

〔項 1 6 5〕

単回用量が癌に対する完全応答の誘導に十分な量である、項 1 6 4 に記載の方法。

〔項 1 6 6〕

単回用量が癌の再発遅延または予防に十分な量である、項 1 6 5 に記載の方法。

〔項 1 6 7〕

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が
(a) 第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび I L - 1 2 の第一サブユニット；および

20

(b) 第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドおよび I L - 1 2 の第二の異なるサブユニットを含み、ここで、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、I L - 1 2 の第一サブユニットが第一リンカーにより第一抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、ここで、第一リンカーが第一アミノ酸配列を含み、ここで、第一アミノ酸配列が P K S S D K T H T C P P C P A P E X₁ X₂ G X₃ (配列番号 2 3 7) (ここで、X₁ は L または A であり、X₂ は L、E または A であり、そして X₃ は A または G である) を含み、

30

ここで、X₁ が L であるおよび／または X₂ が L であるとき、第一抗体 F c ドメインポリペプチドおよび第二抗体 F c ドメインポリペプチドの少なくとも一方はヘテロ二量体化を促進する Q 3 4 7 R 変異を含み、

ここで、I L - 1 2 の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合している、項 1 6 4 ～ 1 6 6 の何れかに記載の方法。

〔項 1 6 8〕

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 3 9) を含む、項 1 6 7 に記載の方法。

〔項 1 6 9〕

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 2 3 9) からなる、項 1 6 8 に記載の方法。

40

〔項 1 7 0〕

I L - 2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 F c ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 1 0) を含む、項 1 6 8 または 1 6 9 に記載の方法。

〔項 1 7 1〕

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G G (配列番号 1 0) からなる、項 1 7 0 に記載の方法。

〔項 1 7 2〕

50

IL-2の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号65)を含む、項167または168に記載の方法。

[項173]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号65)からなる、項172に記載の方法。

[項174]

IL-2の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号66)を含む、項167または168に記載の方法。

10

[項175]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号66)からなる、項174に記載の方法。

[項176]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号238)を含む、項167に記載の方法。

[項177]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号238)からなる、項176に記載の方法。

20

[項178]

IL-2の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号8)を含む、項176または177に記載の方法。

[項179]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号8)からなる、項178に記載の方法。

[項180]

IL-2の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号15)を含む、項176または177に記載の方法。

30

[項181]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号15)からなる、項180に記載の方法。

[項182]

IL-2の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号16)を含む、項176または177に記載の方法。

40

[項183]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号16)からなる、項182に記載の方法。

[項184]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAEGA(配列番号240)を含む、項167に記載の方法。

[項185]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列PKSSDKTHTCPCPAPEAEGA(配列番号240)を含む、項167に記載の方法。

50

号 240) からなる、項 184 に記載の方法。

[項 186]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 12) を含む、項 184 または 185 に記載の方法。

[項 187]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 12) からなる、項 186 に記載の方法。

[項 188]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 67) を含む、項 184 または 185 に記載の方法。

[項 189]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 67) からなる、項 188 に記載の方法。

[項 190]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 68) を含む、項 184 または 185 に記載の方法。

[項 191]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAEGA (配列番号 68) からなる、項 190 に記載の方法。

[項 192]

IL-2 のヘテロ二量体 IL-12-Fc 融合タンパク質が

(a) 第一抗体 Fcドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび IL-12 の第一サブユニット；および

(b) 第二抗体 Fcドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドおよび IL-12 の第二の異なるサブユニット
を含み、

ここで、第一および第二抗体 Fcドメインポリペプチドが各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、IL-12 の第一サブユニットが第一アミノ酸配列を含む第一リンカーにより第一抗体 Fcドメインポリペプチドに融合しており、ここで、第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 RVESKYGPCCPCPAPEFLGG (配列番号 1) (ここで、X は L または E である) を含み、そして

ここで、IL-12 の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合している、項 164 ~ 166 の何れかに記載の方法。

[項 193]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 RVESKYGPCCPCPAPEFLGG (配列番号 2) を含む、項 192 に記載の方法。

[項 194]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 RVESKYGPCCPCPAPEFLGG (配列番号 2) からなる、項 193 に記載の方法。

[項 195]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fcドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPCCPCPAPEFLG

10

20

30

40

50

G (配列番号 3) を含む、項 193 または 194 に記載の方法。

[項 196]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 3) からなる、項 195 に記載の方法。

[項 197]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 13) を含む、項 193 または 194 に記載の方法。

[項 198]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 13) からなる、項 197 に記載の方法。

[項 199]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 14) を含む、項 193 または 194 に記載の方法。

[項 200]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 14) からなる、項 199 に記載の方法。

[項 201]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) を含む、項 192 に記載の方法。

[項 202]

第一アミノ酸配列がアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) からなる、項 201 に記載の方法。

[項 203]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) を含む、項 201 または 202 に記載の方法。

[項 204]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) からなる、項 203 に記載の方法。

[項 205]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) を含む、項 201 または 202 に記載の方法。

[項 206]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) からなる、項 205 に記載の方法。

[項 207]

IL-2 の第二の異なるサブユニットが第二アミノ酸配列を含む第二リンカーにより第二抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合しており、そして、ここで第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) を含む、項 201 または 202 に記載の方法。

[項 208]

第二アミノ酸配列がアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) からなる、項 207 に記載の方法。

10

20

30

40

50

[項 2 0 9]

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が

(a) 第一抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第一ポリペプチドおよび I L - 1 2 の第一サブユニット；および

(b) 第二抗体 F c ドメインポリペプチドを含む第二ポリペプチドおよび I L - 1 2 の第二の異なるサブユニット

を含み、

ここで、第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異を含み、そして

ここで、I L - 1 2 の第一サブユニットおよび第二の異なるサブユニットが互いに結合している、項 1 6 4 ～ 1 6 6 の何れかに記載の方法。

[項 2 1 0]

エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、抗体依存性細胞食作用 (A D C P) および／または補体依存性細胞傷害 (C D C) を誘導する F c の能力を含む、項 2 0 9 に記載の方法。

[項 2 1 1]

ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質がフコシル化されている、項 2 0 9 または 2 1 0 に記載の方法。

[項 2 1 2]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト抗体 F c ドメインポリペプチドである、項 2 0 9 ～ 2 1 1 の何れかに記載の方法。

[項 2 1 3]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、I g D または I g E F c ドメインポリペプチドである、項 2 0 9 ～ 2 1 2 の何れかに記載の方法。

[項 2 1 4]

第一および／または第二ポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 9 7、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 9、3 3 0 および／または 3 3 1 の位置に 1 以上の変異を含む、項 2 1 3 に記載の方法。

[項 2 1 5]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 1 F c ドメインポリペプチドである、項 2 0 9 ～ 2 1 4 の何れかに記載の方法。

[項 2 1 6]

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより、2 3 4、2 3 5、2 3 7、3 2 9、3 3 0 および／または 3 3 1 の位置に 1 以上の変異を含む、項 2 1 5 に記載の方法。

[項 2 1 7]

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、P 3 2 9 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される 1 以上の変異を含む、項 2 1 6 に記載の方法。

[項 2 1 8]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A を含む、項 2 1 7 に記載の方法。

[項 2 1 9]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を含む、項 2 1 7 に記載の方法。

[項 2 2 0]

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、G

10

20

30

40

50

2 3 7 A、A 3 3 0 SおよびP 3 3 1 Sを含む、項 2 1 7に記載の方法。

〔項 2 2 1〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 C 2 2 0 Sを含む、項 2 1 5～2 2 0の何れかに記載の方法。

〔項 2 2 2〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドがヒト I g G 4 F c ドメインポリペプチドである、項 2 0 9～2 1 4の何れかに記載の方法。

〔項 2 2 3〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドが、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、2 3 5および／または3 2 9の位置に1以上の変異を含む、項 2 2 2に記載の方法。

〔項 2 2 4〕

第一および／または第二抗体 F c ドメインポリペプチドがL 2 3 5 EおよびP 3 2 9 Aから選択される1以上の変異を含む、項 2 2 3に記載の方法。

〔項 2 2 5〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 Eを含む、項 2 2 3に記載の方法。

〔項 2 2 6〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 L 2 3 5 EおよびP 3 2 9 Aを含む、項 2 2 3に記載の方法。

〔項 2 2 7〕

第一および第二抗体 F c ドメインポリペプチドが各々変異 S 2 2 8 Pを含む、項 2 2 2～2 2 6の何れかに記載の方法。

〔項 2 2 8〕

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む第二の異なるポリペプチドを含む、項 1 6 4～1 6 6 または 2 0 9～2 1 9 の何れかに記載の方法。

〔項 2 2 9〕

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含む第二の異なるポリペプチドを含む、項 1 6 4～1 6 6 または 2 0 9～2 1 9 の何れかに記載の方法。

〔項 2 3 0〕

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が患者に腫瘍内、皮下、腹腔内または静脈内投与される、項 1 6 4～2 2 9 の何れかに記載の方法。

〔項 2 3 1〕

ヘテロ二量体 I L - 1 2 - F c 融合タンパク質が患者に腫瘍内投与される、項 2 3 0 に記載の方法。

〔項 2 3 2〕

患者にチェックポイント阻害剤、サイトカイン、T L R アゴニスト、S T I N G アゴニスト、化学療法剤、癌標的剤、腫瘍溶解性ウイルス、ワクチン、照射、養子 N K 治療、幹細胞移植 (S C T) 治療、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞治療、多特異的結合タンパク質 (T r i N K E T) および細胞老化を誘導する薬剤から選択される第二治療剤を投与することをさらに含む、項 1 6 4～2 3 1 の何れかに記載の方法。

〔項 2 3 3〕

チェックポイント阻害剤が抗 P D 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 C T L A 4 抗体、抗 K I R 抗体、抗 N K G 2 A 抗体、抗 L A G 3 抗体および抗 T I M 3 抗体から選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 4〕

T L R アゴニストが T L R 7 アゴニスト、T L R 8 アゴニスト、T L R 7 / 8 アゴニスト、T L R 9 アゴニスト、T L R 4 アゴニストおよび T L R 3 アゴニストから選択される

10

20

30

40

50

、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 5〕

STING アゴニストが ADU-S 100 である、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 6〕

化学療法剤がパクリタキセル、nab-パクリタキセル、ドキシソルビシン、ゲムシタビンまたはシクロホスファミドである、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 7〕

チェックポイント阻害剤がニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、リリルマブおよびモナリズマブから選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 8〕

TLR アゴニストが R 8 4 8 / レシキモド、VTX-2337、イミキモドおよび CpG オリゴデオキシヌクレオチドから選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 3 9〕

アゴニスト抗体が抗 4-IBB / CD 137 抗体、抗 OX 40 抗体、抗 CD 40 抗体、抗 CD 40 L 抗体、抗 GITR 抗体および抗 CD 27 抗体から選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 4 0〕

サイトカインが IL-2、IL-15、CXCL9 および CXCL10 から選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 4 1〕

多特異的結合タンパク質 (Trinket) が

(a) NKGD2 に結合する第一抗原結合部位；

(b) 腫瘍関連抗原に結合する第二抗原結合部位；および

(c) CD 16 に結合するのに十分な抗体 Fc ドメインもしくはその一部または CD 16 に結合する第三抗原結合部位

を含み；

ここで、腫瘍関連抗原が EPCAM、CD 2、CD 19、CD 20、CD 30、CD 38、CD 40、CD 52、CD 70、EGFR / ERBB1、IGF1R、HER3 / ERBB3、HER4 / ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4 および PD-L1 からなる群から選択される、項 2 3 2 に記載の方法。

〔項 2 4 2〕

癌が急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、B 細胞リンパ腫、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、汎発性大 B 細胞リンパ腫食道癌、ユーイング肉腫、濾胞性リンパ腫、胃癌、消化器癌、消化器間質腫瘍、神経膠芽腫、頭頸部癌、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、腎臓細胞癌腫、神経芽腫、非小細胞肺癌、神経内分泌腫瘍、卵巣癌および膵臓癌、前立腺癌、肉腫、小細胞肺癌、T 細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺癌腫、甲状腺癌、尿路上皮癌、骨髄由来サプレッサー細胞により浸潤された癌、細胞外マトリクス沈着を伴う癌、高レベルの反応性間質を伴う癌および新血管形成を伴う癌からなる群から選択される、項 1 6 4 ~ 2 4 1 の何れかに記載の方法。

〔項 2 4 3〕

癌が転移癌である、項 1 4 9 または 1 5 2 ~ 2 4 2 の何れかに記載の方法。

〔項 2 4 4〕

転移癌が局所、領域性または遠位転移癌である、項 2 4 3 に記載の方法。

【実施例】

〔0 4 1 0〕

一般的に記載していた本発明は、ここで、単に本発明のある態様および実施態様を説明する目的で包含させ、本発明を限定する意図はない次の実施例を参照してより容易に理解される。

10

20

30

40

50

【0411】

実施例1 - 製造方法

本発明のタンパク質は、一般に組み換えDNAテクノロジーを使用して製造される。ある例示的实施態様において、第一抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第一サブユニット(ヒトIL-12のp40サブユニット)を含む第一ポリペプチドをコードする第一核酸配列を、第一発現ベクター(pET-pSURE-Puro)にクローン化した；第二抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第二の異なるサブユニット(ヒトIL-12のp35サブユニット)を含む第二ポリペプチドをコードする第二核酸配列を第二発現ベクター(pET-pSURE-Puro)にクローン化した；そして第一および第二発現ベクターを、一緒に宿主細胞に安定にトランスフェクトして、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を産生した。

10

【0412】

第一発現ベクターによりコードされる例示的アミノ酸配列を配列番号292に示す。第一発現ベクターは、Y349C変異を含むヒトIgG1 Fc配列に融合したヒトIL-12のp40サブユニットを含む第一ポリペプチドをコードした。第一ポリペプチドは、ヘテロ二量体化を促進するK360EおよびK409W変異およびエフェクター機能を低減するLALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異も含んだ。配列番号292において、リーダー配列は斜体で示し、ヒトIL-12のp40サブユニット配列は下線を引き、変異は太字で示す。

【化3】

20

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCIWELKKDVYVVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEED
GITWILDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKKEDGIWS
TDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC
GAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS
FFIRDIHKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE
KKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSPKSSDKTHTCPPC
 PAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKG
 QPREPQVCTLPSPRDELLENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号
 292)

30

【0413】

第二発現ベクターからコードされる例示的アミノ酸配列を配列番号293に示す。第二発現ベクターは、S354C変異を含むヒトIgG1 Fc配列に融合したヒトIL-12のp35サブユニットを含む第二ポリペプチドをコードした。第二ポリペプチドは、ヘテロ二量体化を促進するQ347R、D399VおよびF405T変異およびエフェクター機能を低減するLALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異も含んだ。配列番号293で、リーダー配列は斜体で示し、ヒトIL-12のp35サブユニット配列は下線を引き、変異は太字で示す。

40

50

【化 4】

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKAR
QTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT
SFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF
NSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSG
GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHENHHT
QKSLSLSPG (配列番号 293)

10

【0414】

最高タンパク質収率を達成するために、種々の比の第一および第二発現ベクターを探索して、宿主細胞へのトランスフェクションのための最適比を決定する。トランスフェクション後、単クローンを、限界希釈、ELISA、FACS、顕微鏡検査またはClonepixなどの当分野で知られる方法を使用する、細胞銀行作製のために単離する。

【0415】

クローンを、タンパク質のバイオリアクター規模拡大および発現維持に適する条件下、培養。タンパク質を、遠心分離、デプス濾過、細胞溶解、均質化、凍結・解凍、親和性精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィーおよび混合モードクロマトグラフィーを含む当分野で知られる方法を使用して、単離および精製する。

20

【0416】

実施例 2 — CT26 腫瘍モデルにおけるサイレントFcドメインポリペプチドと融合したIL-12による腫瘍抑制

この実施例は、組み換えマウスIL-12(rmIL-12)の2つのIL-12-Fc融合構築物がマウス結腸癌モデルにおける腫瘍進行を制御する相対的能力を記載する。この実施例で使用した2つのIL-12-Fc融合バリエーションは、野生型マウスIgG2aFcドメインポリペプチドのN末端に融合した野生型マウスIL-12 p40およびp35サブユニットを含むmIL-12-Fc野生型(DF-mIL-12-Fc wt)および変異L234A、L235AおよびP329Gを有するマウスIgG2aFcドメインポリペプチドのN末端に融合した野生型マウスIL-12 p40およびp35サブユニットを含むmIL-12-Fcサイレント(DF-mIL-12-Fc si)であった。タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す。

30

mIL-12-p40-mIgG2A-EW(DF-mIL-12-Fc wtの第一鎖)

40

50

【化 5】

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNL TCDTPEEDDITWISDQRHGVIGSGKTLTIT
VKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFKCEAPNYSG
RFTCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTL DQRDYEKYSVSC
QEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIHKPDPPKNLQMKPLKNSQVE
VSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCK
GGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFP
PKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR
VVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM
TEKQVTL TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSWLRVE
KKNWVERNNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号 286)

10

m I L - 1 2 - p 3 5 - m I g G 2 A - R V T (D F - m I L - 1 2 - F c w t の第二鎖)
【化 6】

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDMVKTAREKCLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKT
CLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN
AALQNNHHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCIL
LHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG
GPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE
DYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPRVYVL
PPPEEEMTKKQVTL TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLVSDGSYTM
SKLRVEKKNWVERNNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号 287)

20

m I L - 1 2 - p 4 0 - m I g G 2 A - E W - L A L A P G (D F - m I L - 1 2 - F c
s i の第一鎖)
【化 7】

30

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNL TCDTPEEDDITWISDQRHGVIGSGKTLTIT
VKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFKCEAPNYSG
RFTCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTL DQRDYEKYSVSC
QEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIHKPDPPKNLQMKPLKNSQVE
VSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCK
GGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIF
PPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL
RVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL GAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE
MTEKQVTL TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSWLRV
EKKNWVERNNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号 288)

40

m I L - 1 2 - p 3 5 - m I g G 2 A - R V T - L A L A P G (D F - m I L - 1 2 - F c
s i の第二鎖)

50

【化 8】

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKT
CLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN
AALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCIL
LHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAG
GPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRE
DYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPRVYVL
PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLVSDGSYTM
SKLRVEKKNWVERNNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号 289)

10

【0417】

簡潔には、B a l b / c マウスの脇腹に 10^6 C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後 14 日目、腫瘍体積が 270mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群 ($n = 10$ / 群) に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ の r m I L - 1 2、 $1\mu\text{g}$ r m I L - 1 2 に相当するモル用量の D F - m I L - 1 2 - F c w t、 $1\mu\text{g}$ r m I L - 1 2 に相当するモル用量の D F - m I L - 1 2 - F c s i または $1\mu\text{g}$ の m I g G 2 a アイソタイプ対照で週 1 回腹腔内処置した。腫瘍増殖を 60 日間評価した。

【0418】

20

図 5 A ~ 5 C に示すとおり、I L - 1 2 (図 5 A) および D F - m I L - 1 2 - F c w t (図 5 B) は一部マウスで腫瘍進行を効率的に制御したが、D F - m I L - 1 2 - F c s i のみが頑強な腫瘍退縮を誘導し、100% 完全腫瘍退縮をもたらした(図 5 C)。さらに、全生存は D F - m I L - 1 2 - F c s i 治療での処置により有意に延長され、処置マウスの 100% が 60 日目になお生存し、一方アイソタイプ対照、D F - m I L - 1 2 - F c w t および I L - 1 2 で処置されたマウスの中央生存期間はそれぞれ 27 日、33 日および 46 日であった(図 6)。

【0419】

次に、種々の用量の D F - m I L - 1 2 - F c w t および D F - m I L - 1 2 - F c s i の腫瘍進行制御を比較した。簡潔には、B a l b / c マウスの脇腹に 10^6 C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後 14 日目、腫瘍体積が 300mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群 ($n = 10$ / 群) に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ に相当するモル用量の D F - m I L - 1 2 - F c w t または $0.1\mu\text{g}$ r m I L - 1 2 または $1\mu\text{g}$ に相当するモル用量の D F - m I L - 1 2 - F c s i または $0.1\mu\text{g}$ I L - 1 2 で週 1 回腹腔内処置した。腫瘍増殖を 55 日間評価した。

30

【0420】

図 7 A ~ 7 D に示すとおり、D F - m I L - 1 2 - F c w t での処置は、 $1\mu\text{g}$ r m I L - 1 2 モル当量用量で一部マウスで腫瘍進行を低減させ、2 マウスで完全退縮させたが(図 7 A)、 $0.1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル当量用量で腫瘍抑制は観察されなかった(図 7 C)。対照的に、 $1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル当量用量の D F - m I L - 1 2 - F c s i 処置は 100% 完全腫瘍退縮をもたらした(図 7 B)、低用量の $0.1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル等量で腫瘍増殖の頑強な遅延を誘導した(図 7 D)。 $1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル当量の D F - m I L - 1 2 - F c w t で処置したマウスの中央生存は 32 日であり、 $0.1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル当量の D F - m I L - 1 2 - F c s i で処置したマウスの 34 日の中央生存に類似し、D F - m I L - 1 2 - F c s i がその野生型バリエーションより 10 倍強力であったことを示唆する(図 8)。D F - m I L - 1 2 - F c w t は $0.1\mu\text{g}$ I L - 1 2 モル等量用量で効率的ではなく、アイソタイプ処置群と同じ 24 日の中央生存を示した。

40

【0421】

次に、D F - m I L - 1 2 - F c s i の種々の投与経路のインビボ有効性を比較した。簡潔には、B a l b / c マウスの脇腹に 10^6 C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌腫細胞を

50

皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍体積が 270mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$ /群)に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたはモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照で週1回腹腔内または皮下処置した。腫瘍増殖を60日間にわたり評価した。

【0422】

図22A-22Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内(図22A)および皮下(図22B)投与何れも頑強な腫瘍退縮を誘導し、100%完全腫瘍退縮をもたらした。故に、DF-mIL-12-Fc si処置は、種々の投与経路を使用して有効性が示された。

【0423】

実施例3 - B16F10腫瘍モデルにおけるサイレントFcドメインポリペプチドに融合したIL-12による腫瘍抑制

この実施例は、マウス黒色腫瘍モデルにおけるDF-mIL-12-Fc wtおよびDF-mIL-12-Fc siが腫瘍増殖を制御する相対的能力を記載する。簡潔には、C57BL/6マウスに 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後8日目、腫瘍体積が 250mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$)に無作為化し、週1回 $0.5\mu\text{g}$ のIL-12、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12に対応するモル用量のDF-mIL-12-Fc wt、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12に対応するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $0.5\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照で処置した。腫瘍増殖を32日間評価した。

【0424】

図9A~9Cに示すとおり、試験したIL-12-Fc構築物の各々は腫瘍増殖を遅延させたが、DF-mIL-12-Fc siは腫瘍増殖制御に最も効率的であった。DF-mIL-12-Fc siで処置したマウスの中央生存期間は29日であり、それぞれ16日、26日および22日であったアイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc wtおよびIL-12で処置されたマウスの中央生存期間より長かった(図10)。

【0425】

次に、種々の用量のDF-mIL-12-Fc wtおよびDF-mIL-12-Fc siの腫瘍増殖制御を比較した。簡潔には、C57BL/6マウスの脇腹に 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後8日目、マウスを種々の処置群($n=10$ /群)に無作為化し、 $0.5\mu\text{g}$ または $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc wtまたは $0.5\mu\text{g}$ または $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで週1回腹腔内処置した。腫瘍増殖を30日間評価した。

【0426】

図11A~11Dに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siは、何れの用量でも、腫瘍増殖抑制がDF-mIL-12-Fc wtより優れた。さらに、各用量で、DF-mIL-12-Fc wtで処置したマウスの中央生存は20日であった。対照的に、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで処置したマウスの中央生存は21日であり、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで処置したマウスの中央生存は28日であった(図12)。これらの結果は、高用量($0.5\mu\text{g}$ IL-12モル等量)のDF-mIL-12-Fc siは、その野生型対応物またはアイソタイプ対照と比較して、マウスの生存を有意に延長させたことを示した。

【0427】

次に、DF-mIL-12-Fc si処置の単回投与を、先に記載した毎週処置と比較した。簡潔には、C57BL/6マウスに 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後8日目、腫瘍体積が 200mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$)に無作為化し、週1回 $0.5\mu\text{g}$ IL-12に対応するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたはモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照で処置した。腫瘍増殖を39日間評価した。

【0428】

10

20

30

40

50

図23に示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの単回投与は100%のマウスで腫瘍増殖を低減させたが、腫瘍増殖は、毎週投与と比較して早く起こった(図9C)。さらに、マウスは一過性体重減少を示したが、初回投与後のみであった(データは示していない)。従って、DF-mIL-12-Fc siの単回投与は治療困難腫瘍モデルで初期有効性を示したが、続く毎週投与がこのモデルでは良好に腫瘍増殖を遅延させる。

【0429】

次に、DF-mIL-12-Fc siの種々の投与経路のインビボ有効性を比較した。簡潔には、C57BL/6マウスに 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目、腫瘍体積が 260mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$)に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたはモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照で週1回腹腔内または皮下処置した。腫瘍増殖を40日間評価した。

【0430】

図24A~24Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内(図24A)および皮下(図24B)投与は、何れも100%のマウスで腫瘍退縮を誘導した。故に、DF-mIL-12-Fc si処置は、種々の投与経路を使用して有効性が示された。

【0431】

実施例4 — DF-hIL-12-Fc wtおよびrhIL-12のインビトロ有効性
インビトロバイオアッセイを使用して、rhIL-12と比較したDF-hIL-12-Fc siの有効性を評価した。

【0432】

IL-12の有効性をHEK-Blue IL-12レポーターアッセイを使用してアッセイした。IL-12R+ HEK-Blueレポーター細胞(InvivoGen)を培養培地から集め、培養培地で 1×10^6 細胞/mLに調節した。DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)および組み換えヒトIL-12(rhIL-12; PeproTech)を培地で希釈した。 $100\mu\text{L}$ のPBMC懸濁液を $100\mu\text{L}$ の希釈試験品と混合し、48時間インキュベートした。上清を集め、IL-12受容体とレポーター細胞により安定に発現されるシグナル伝達成分の結合を、製造業者の指示に従い細胞から分泌される胚アルカリホスファターゼの測定により検出した。簡潔には、 $25\mu\text{L}$ のサンプル上清を $200\mu\text{L}$ のQU抗Blue試薬と混合し、暗所でRTで10分間インキュベートした。次いでプレートをSpectraMax i3xプレートリーダーで 620nm で読み、光学密度を相対的IL-12活性を表すものとして報告した。

【0433】

図13Aに示すとおり、IL-12R+ HEKレポーター細胞によるSEAP産生は、DF-hIL-12-Fc siまたはrhIL-12の濃度の増加と共に増えた。HEK-Blueレポーターアッセイにおいて測定されたIL-12応は、試験した濃度でDF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12で同等であった。

【0434】

次に、IL-12有効性を、ヒトPBMCからのIFN γ 産生の定量により評価した。PBMCを、ヒト末梢血バフィーコートから密度勾配遠心分離を使用して単離し、培養培地で 1×10^6 細胞/mLに調節した。DF-hIL-12-Fc siおよび組み換えヒトIL-12(rhIL-12)を培地で希釈した。 $100\mu\text{L}$ のPBMC懸濁液を $100\mu\text{L}$ の希釈試験品と混合し、48時間インキュベートした。上清を集め、IFN γ を、ヒトIFN- γ ELISA MAXキット(BioLegend)を使用して定量した。IFN γ ELISAプレート展開後、SpectraMax i3x装置で 450nm で読み、 540nm でバックグラウンド減算した。サンプルウェルのIFN γ 含量を、アッセイ標準曲線からサンプル読取り値を内挿することにより近似させた。

【0435】

図13Bに示すとおり、IFN γ 産生は、IFN γ 応答強度を増幅させるための $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のPHAとの同時処置で、ヒトPBMCをDF-hIL-12-Fc siまたはrh

10

20

30

40

50

IL-12と培養したとき増加した。IL-12刺激後IFN- γ 産生は、試験した濃度でDF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12で同等であった。

【0436】

従って、2つの細胞型および刺激条件でのEC50値は1桁以上違うが、DF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12の同等な活性が両アッセイで示され、DF-hIL-12-Fc si構築物が天然組み換えヒトIL-12に類似する有効性を示すことが示唆される。

【0437】

実施例5 - DF-hIL-12-Fc siまたはrhIL-12 IV点滴後のサル血漿におけるIL-12、DF-hIL-12-Fc siおよびIFN γ 濃度

10

薬力学(PD)および薬物動態(PK)を、DF-hIL-12-Fc siまたはrhIL-12のIV点滴後カニクイザルで評価した。

【0438】

カニクイザルに、DF-hIL-12-Fc siおよび組み換えヒトIL-12を10 μ g/kgでIV点滴で投与した。

【0439】

免疫アッセイを、Quantikine ELISAヒトIL-12 p70免疫アッセイキットに基づくDF-hIL-12-Fc siおよびヒトIL-12の検出に使用した：このアッセイは定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術を用いた。ヒトIL-12 p70に特異的なモノクローナル抗体を固相キャプチャーとして使用し、検出を抗体HRPタグ付レポーターを使用して達成した。標準およびRhIL-12またはDF-hIL-12-Fc si対照標準添加QCを、試験サンプルと共にマイクロタイタープレートのウェルにピペットで加え、サンプルに存在するすべてのIL-12 p70を、固相の固定化抗体に結合させた。非結合物質を洗い流し、ヒトIL-12 p70に特異的な酵素架橋ポリクローナル抗体をウェルに加えた。非結合抗体-酵素試薬を洗い流し、TMB基質を各ウェルに加えた。得られた酵素反応は青色生成物を生じ、酸停止溶液を加えたとき黄色になった。各ウェルで測定された色の強度は、初期段階で結合したrhIL-12またはDF-hIL-12-Fc siの量に直接比例する。プレートを、データ収集ソフトウェア、SoftMax Pro Enterprise version 4.6と共に、SpectraMaxマイクロプレートリーダーで540nmを対照として450nmで読んだ。データをテキストファイルに変換し、Watson LIMS v.7.2.0.02にインポート／処理した。Logistic(Auto Estimate)曲線フィッティングを重み係数1で使用して、回帰を実施した。

20

30

【0440】

未処置MSDマイクロタイタープレートのサル吸着ヤギ抗ヒトIgGでのコーティングと室温でのインキュベーションを含む、免疫アッセイ(メソスケールディスカバリー(MSD) - ELISA様免疫アッセイ)もDF-hIL-12-Fc siの検出に使用した。プレートを洗浄し、遮断し、洗浄し、試験サンプルと共にDF-hIL-12-Fc si対照標準を添加した標準曲線および品質管理サンプルとインキュベートした。このインキュベーション後、プレートを洗浄し、ビオチン抗ヒトIL-12/IL-23 p40を一次検出抗体としてプレートに加えた。さらなる洗浄工程後、ストレプトアビジンコンジュゲートSULFO-TAGを二次検出抗体として加えた。プレートを最後に洗浄し、MSD Read緩衝液Tをプレートに加え、プレートをMSD Sector Imager S600を使用して読んだ。生MSDデータをテキストファイルにエクスポートし、次いでEnvigoでカスタム設計したExcelスプレッドシートプログラムを使用してWatson LIMS互換性ファイルに変換した。データをインポートし、Watson LIMS Software v.7.2.0.02で回帰させた。

40

【0441】

メソスケールディスカバリー方法を、カニクイザル血漿におけるNHP炎症促進性バイオマーカーの相対的定量的測定のために使用した。方法は、カニクイザルK2 EDTA血漿(サル血漿と称する)のPro-inflammatory Panel 1 BiomarkerIFN γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6 IL-8およびIL-10の相対的定量的測定のサンドイッチ

50

免疫アッセイ方法を使用した。方法は、V-PLEXおよびV-PLEX Plus、Catalog No. K15056D-1、K15056D-2、K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6のMSD非ヒト霊長類(NHP)キットに基づく。方法は、ヒトキャプチャーおよびカニクイザルと反応する検出抗体を使用する。キットは、96ウェル多スポットプレートの各ウェルに独立した十分定義されたスポットのキャプチャー抗体でプレコートされたプレートを提供する。プレートをサル血漿サンプルとインキュベートし、洗浄し、次いで電気化学発光(ECL)ラベル(MSD SULFO-TAG)とコンジュゲートした検出抗体(各検体特異的)とインキュベートした。サンプル中の検体は作動中の電極表面に固定化したキャプチャー抗体に結合させ、結合検体による検出抗体の動員がサンドイッチを完成させる。プレートを洗浄し、MSD Read緩衝液を、電気化学発光(ECL)に適切な化学環境を作るため加えた。プレートを、MSD Sector Imager 600(SI600)装置に充填し、そこで、電圧をプレート電極に適用し、捕捉ラベルを発光させた。装置は、相対的光単位(RLU)の観点で発光強度を測定し、サンプル中の検体の相対的定量的測定を提供する。生RLUデータをテキストファイルにエクスポートし、次いでEnvigoでカスタム設計したExcelスプレッドシートプログラムを使用してWatson LIMS互換性ファイルに変換した。データをその後インポートし、Watson LIMS Software v.7.2.0.02で回帰させた。

【0442】

図14は、IV投与後経時的なDF-hIL-12-Fc siおよび組み換えヒトIL-12の相対的血漿濃度を示す。データは、DF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12の濃度が、予想どおり経時的に減少することを示した。しかしながら、DF-hIL-12-Fc siは長い半減期を示し、全体的に時間経過に伴う曝露量がrhIL-12と比較して全体的に多かった。

【0443】

図14はまたIV投与後のサル血漿のIFN γ の相対的濃度(PD)を示す。データは、DF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12の薬力学は、IFN γ 産生により評価して、何れもIV投与後活性を示したことを示す。しかしながら、DF-hIL-12-Fc siは、rhIL-12と比較して高いピーク活性および長い持続を示した。

【0444】

実施例6 - マウスサロゲートDF-mIL-12-Fc siの薬理学的特徴づけ

DF-mIL-12-Fc siと名付けた半減期が長いマウスIL-12バリエーションの血清半減期およびインビボ薬力学を試験した。

【0445】

1 μ g IL-12に対応する当モル量のDF-mIL-12-Fc siを非腫瘍担持Balb/cマウスに静脈内注射し、PK/PD特徴をIL-12と比較した。ナイーブBalb/c(n=6)に、1 μ g DF-mIL-12-Fc siおよびIL-12(1 μ g IL-12に相当するモル)を静脈内注射した。注射0.017時間、0.5時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間、96時間、144時間および219時間後、採血した。血清のIL-12およびIFN γ レベルを、先に記載のとおりELISAにより分析した。

【0446】

図15Aおよび15Bに示し、表15に定量化するとおり、DF-mIL-12-Fc siは約30時間の長期化血清半減期を示し(図15B、DF-mIL-12-Fc si $T_{1/2}$ = 29.85時間)、これはIL-12の5倍長かった(図15A; IL-12 $T_{1/2}$ = 6.05時間)。半減期延長に加えて、DF-mIL-12-Fc si介在IFN γ 産生(AUC = 916654)もIL-12(AUC = 20304と比較して長かった)。

【0447】

次に、DF-mIL-12-Fc siの種々の投与経路のPK/PD性質を比較した。1 μ g IL-12に対応する当モル量のDF-mIL-12-Fc siを、静脈内、

10

20

30

40

50

腹腔内または皮下投与により非腫瘍担持 B a l b / c マウスに単回用量として注射し、P K / P D 特徴を記載のとおり評価した。

【0448】

図15C～15Eに示し、表16に定量化するとおり、静脈内(図15C)、腹腔内(図15D)または皮下(図15E)投与は、種々の投与経路にわたり同等な D F - m I L - 1 2 - F c s i 介在 I F N γ 産生をもたらした。顕著なことに、皮下投与は低い I L - 1 2 C_{max}をもたらした。従って、D F - m I L - 1 2 - F c s i 投与の薬物動態(例えば、I L - 1 2 濃度)は投与経路により変わったが、薬力学的性質(I F N γ 産生)は長期化されたままであり、異なる経路にわたり比較的同等であった。

【表15】

表15 — D F - m I L - 1 2 - F c s i および r m I L - 1 2 の薬理学的特徴

	I L - 1 2					I F N γ
	T _{1/2}	スパン	T _{max}	C _{max}	AUC	AUC
r m I L - 1 2	6.05	9.15	0.13	358.65	999.81	20304
DF-mIL-12-Fc	29.85	6.92	0.19	258.20	5636.49	916654

【表16】

表16 — I V、I P および S C での D F - m I L - 1 2 - F c の薬理学的特徴

	T _{1/2}	スパン	T _{max}	C _{max}	AUC
静脈内	31.5	6.4	0.2	257.2	5985.6
腹腔内	34.70	5.19	N/A	75.09	3964.21
皮下	37.5	4.1	36.0	23.1	1938.1

【0449】

実施例7 — B 1 6 F 1 0 マウスモデルにおける D F - m I L - 1 2 - F c s i および P D - 1 遮断の組み合わせ

D F - m I L - 1 2 - F c s i および P D - 1 遮断の組み合わせ治療を確立された B 1 6 F 1 0 腫瘍で抗腫瘍免疫応答が増幅され得るか分析するために、実施した。

【0450】

C 5 7 B L / 6 マウスに、10⁶ B 1 6 F 1 0 黒色腫細胞をマウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍接種後8日目、マウスを無作為化した(n=10/群)。平均腫瘍体積が約245mm³に達したら、マウスを0.5 μ g アイソタイプ対照、0.5 μ g D F - m I L - 1 2 - F c s i、200 μ g 抗 P D - 1 クローン R M P 1 - 1 4 または組み合わせ D F - m I L - 1 2 - F c s i / 抗 P D - 1 で腹腔内処置した。動物に D F - m I L - 1 2 - F c s i を週1回および抗 P D - 1 を週2回注射した。腫瘍増殖を60日間評価し、生存および体重をモニターした。

【0451】

図16A～16Cに示すとおり、D F - m I L - 1 2 - F c s i 単独投与は腫瘍退縮を遅らせ(図16A)、P D - 1 単独は腫瘍増殖に最小効果を有するが(図16B)、D F - m I L - 1 2 - F c s i と P D - 1 遮断の組み合わせは腫瘍増殖をさらに遅延させ(図16C)、抗 P D - 1 処置が D F - m I L - 1 2 - F c s i 処置への抗腫瘍応答をさらに増幅したことが示唆された。

【0452】

図17Aおよび17Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc si治療およびPD-1遮断との組み合わせでの全生存は延長され、アイソタイプの15日および200 µg抗PD-1処置マウスの17.5日(図17A)と比較して、29日(DF-mIL-12-Fc si単剤療法)および36日(組み合わせ)の中央生存を示した。顕著なことに、高い応答率にかかわらず、DF-mIL-12-Fc siおよび組み合わせ治療のレジメンは、B16F10腫瘍担持マウスにより忍容性が良好であると考えられた(図17B)。

【0453】

従って、DF-mIL-12-Fc siおよびPD-1遮断の組み合わせ治療は、何れか処置単独と比較して有効性の改善を示した。

【0454】

実施例8 - B16F10マウスモデルにおけるDF-mIL-12-Fc siとmcFAE-C26.99 Tr iNKETの組み合わせ

DF-mIL-12-Fc siとmcFAE-C26.99 Tr iNKETの組み合わせ治療を確立されたB16F10腫瘍で抗腫瘍免疫応答が増幅され得るか分析するために、実施した。

【0455】

C57BL/6マウスに、マウスの脇腹に10⁶ B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目マウスを無作為化した(n=10/群)。腫瘍平均が200 mm³に達したら、マウスを150 µgアイソタイプ対照または0.5 µg DF-mIL-12-Fc si、150 µg Tr iNKETまたは組み合わせDF-mIL-12-Fc si / Tr iNKETで腹腔内処置した。腫瘍増殖を60日間評価し、生存および体重をモニターした。

【0456】

図18Aに示すとおり、DF-mIL-12-Fc si単剤療法は、腫瘍増殖を低減させた。200 mm³の腫瘍体積で開始するmcFAE-C26.99 Tr iNKETの単剤としての処置は、腫瘍進行を遅延させなかった(図18B)。対照的に、DF-mIL-12-Fc siとmcFAE-C26.99の組み合わせは、DF-mIL-12-Fc si単独(図18C)と比較してさらに抗腫瘍応答を増強し、30%の完全応答体(CR)(n=3)をもたらし、Tr iNKET処置がDF-mIL-12-Fc si処置への抗腫瘍応答をさらに増幅したことが示唆された。

【0457】

図19Aに示すとおり、DF-mIL-12-Fc si治療およびmcFAE-C26.99 Tr iNKETとの組み合わせでの全生存は延長され、アイソタイプの16日およびTr iNKET処置マウスの17日と比較して、29日(DF-mIL-12-Fc si単剤療法)および60日(Tr iNKET組み合わせ)の中央生存を示した。顕著なことに、高い応答率にかかわらず、DF-mIL-12-Fc siおよび組み合わせ治療のレジメンは、B16F10腫瘍担持マウスにより忍容性が良好であると考えられた(図19B)。

【0458】

3完全応答体(上記実験からのCRおよびデータは図18Cに示す)を、最初の腫瘍接種72日後、2×10⁶ B16F10黒色腫細胞で再負荷した。年齢適合ナイブC57BL/6マウスを対照群として使用した。初期DF-mIL-12-Fc si / Tr iNKETコンボ処置群からの3マウス中1は無腫瘍のままであり、他のマウスは、95日目に腫瘍形成の開示が示され、第三のマウスの腫瘍進行は年齢適合対照群に類似し(図20)、組み合わせ治療での免疫学的記憶の形成が示唆された。

【0459】

従って、DF-mIL-12-Fc siおよびTr iNKETの組み合わせ治療は、マウス集団における、完全、持続性応答を示したことを含み、何れかの処置単独と比較して、有効性の改善を示した。

【0460】

10

20

30

40

50

実施例 9 - DF-mIL-12-Fc siでの処置は、CT26 腫瘍における完全回復を促進する

この実施例は、DF-mIL-12-Fc siでの処置がCT26 腫瘍担持マウスにおける回復を促進することを示す。

【0461】

Balb/cマウスの脇腹に、 10^6 CT26-Ty rp1 結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍体積が 270mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群に無作為化し、週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ r mIL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を腹腔内注射した。腫瘍増殖を60日間評価した。完全応答体を、最初の腫瘍接種72日後、 10^6 CT26細胞で再負荷した。年齢適合ナীব Balb/Cマウスを対照群として使用した。

10

【0462】

図21Aは、CT26 腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを単回投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図21Bは、CT26 腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを毎週投与されたマウスの体重を示すグラフである。図21Cは、CT26 腫瘍細胞の接種で再負荷された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0463】

図21A～Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc si投与は、mIgG2aアイソタイプと比較して強固な腫瘍退縮をもたらし、処置動物の体重に影響する毒性は観察されなかった。図21Cに示すとおり、初期DF-mIL-12-Fc si処置マウスは無腫瘍のままであり、DF-mIL-12-Fc si処置による免疫学的記憶の形成が示唆された。

20

【0464】

実施例 10 - 腹腔内または皮下送達したDF mIL-12-Fc siは、CT26 腫瘍モデルにおける腫瘍体積の低減に有効である

この実施例は、腹腔内または皮下DF-mIL-12-Fc si投与がCT26 腫瘍担持マウスにおける100%完全回復を確実にすることを示す。

【0465】

簡潔には、Balb/cマウスの脇腹に 10^6 CT26-Ty rp1 結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍体積が 270mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群に無作為化し、週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を腹腔内注射するかまたは週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を皮下注射した。腫瘍増殖を60日を超えて評価した。

30

【0466】

図22Aは、CT26 腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを腹腔内送達により毎週投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図22Bは、CT26 腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを皮下送達により毎週投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

40

【0467】

図22A～Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内または皮下送達は、CT26 腫瘍体積低減に有効であった。

【0468】

実施例 11 - DF-mIL-12-Fc si単回投与はB16F10マウスモデルにおける腫瘍体積低減に有効である

この実施例は、DF-mIL-12-Fc siの単回投与がB16F10 黒色腫瘍担持

50

マウスの腫瘍体積低減に有効であることを示す。

【0469】

簡潔には、C57BL/6マウスに、マウスの脇腹に 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目マウスを無作為化した。腫瘍平均が 200mm^3 に達したら、マウスを単回用量アイソタイプ対照または $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siで腹腔内処置した。腫瘍増殖を50日間評価した。

【0470】

図23に示すとおり、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siの単回投与は、B16F10腫瘍担持マウスの腫瘍体積低減に有効である。

【0471】

実施例12 - 腹腔内または皮下送達されたDF-mIL-12-Fc siはB16F10マウスモデルにおける腫瘍体積低減に有効である

この実施例は、腹腔内または皮下DF-mIL-12-Fc si投与が、B16F10黒色腫瘍担持マウスにおける100%完全回復をもたらすことを示す。

【0472】

簡潔には、C57BL/6マウスの脇腹に 10^6 B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目、マウスを無作為化した。腫瘍平均が 200mm^3 に達したら、マウスに週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を腹腔内注射するかまたは週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を皮下注射した。腫瘍増殖を40日間評価した。

【0473】

図24A～Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内または皮下送達は、アイソタイプ対照と比較してB16F10腫瘍体積低減に有効であった。

【0474】

実施例13 - DF-mIL-12-Fc siは単回投与として効果的である

この実施例は、DF-mIL-12-Fc siが単回投与したときCT26腫瘍体積低減に有効であるおよび反復投与したとき、さらにより有効であることを示す。

【0475】

簡潔には、Balb/cマウスの脇腹に 10^6 CT26-Tyrp1結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍体積が 270mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$ /群)に無作為化し、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル等量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siを単回または $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回腹腔内注射した。あるいは、マウスに週1回 $1\mu\text{g}$ の $1\mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量のDF-mIL-12-Fc siまたは $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を腹腔内注射した。腫瘍増殖を60日を超えて評価した。

【0476】

図25Aは、CT26腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを単回投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図25Bは、CT26腫瘍細胞を接種され、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siまたはmIgG2aアイソタイプを毎週投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0477】

図21Aおよび図25Aに示すとおり、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siの単回投与は、mIgG2aアイソタイプと比較して、腫瘍担持マウスの強力な70%完全回復をもたらした。しかしながら、図5Cおよび図25Bに示すとおり、 $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siの反復毎週投与は、mIgG2aアイソタイプと比較して、腫瘍担持マウスの100%完全回復を確実にした。図21Bに示すとおり、全反復DF-mIL-12-Fc si投与は、体重により評価して、観察される毒性はなく、忍容性が良好であった。

10

20

30

40

50

【0478】

さらに、完全応答体(CR)の逆の脇腹に 5×10^5 CT26-Tyrp1結腸癌腫細胞を再負荷し、腫瘍進行を、同じ腫瘍用量を負荷されたナイーブマウスと比較した。図21Cに示すとおり、再負荷後、ナイーブマウスで腫瘍は増殖したが、100%の完全応答体は無腫瘍のままであった。従って、DF-hIL-12-Fc siの単回投与は、マウス集団で完全、持続性応答を示した。

【0479】

実施例14 - DF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置したカニクイザルにおける薬物動態

カニクイザルにおいて $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28A)、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28B)または $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28C)のDF-hIL-12-Fc siを皮下注射後、ELISA様免疫アッセイメソスケールディスカバリー(MSD)免疫アッセイ方法を使用して薬物動態を決定した。簡潔には、未処置MSDマイクロタイタープレートサル吸着ヤギ抗ヒトIgGで被覆し、室温でインキュベートした。コーティングおよびインキュベーション後、プレートを洗浄し、遮断し、洗浄し、試験サンプルと共に、DF-hIL-12-Fc si対照標準を添加した標準曲線および品質管理サンプルとインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、ビオチン抗ヒトIL-12/IL-23 p40を一次検出抗体としてプレートに加えた。さらなる洗浄工程後、ストレプトアビジンコンジュゲートSULFO-TAGを二次検出抗体として加えた。プレートを最後の洗浄をして、その後MSD read buffer Tをプレートに加えた。プレートをMSD Sector Imager S6000を使用して読んだ。

【0480】

図28A~28Cは、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28A)、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28B)または $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図28C)のDF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置されたカニクイザルにおける薬物動態を示す線グラフである。

【0481】

データは、全試験用量で類似する薬物動態プロファイルで、DF-hIL-12-Fc siおよびrhIL-12の濃度が、予想どおり経時的に減少することを示す。

【0482】

実施例15 - DF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置されたカニクイザルにおけるサイトカイン放出

カニクイザルにおける $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Aおよび29B)、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Cおよび29D)または $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Eおよび29F)でのDF-hIL-12-Fc si皮下注射後のサイトカインの定量的測定を、MSD免疫アッセイキットを使用して決定した。方法は、カニクイザルK2 EDTA血漿(サル血漿と称する)におけるPro-inflammatory Panel 1 BiomarkerであるIFN γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8およびIL-10の相対的定量的測定のために、サンドイッチ免疫アッセイキット(Pro-inflammatory Panel 1 BiomarkerおよびV-PLEX Plus Chemokine Panel 1 NHP Kit)を使用した。方法は、V-PLEXおよびV-PLEX Plus、Catalog No. K15056D-1、K15056D-2、K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6のMSD非ヒト霊長類(NHP)キットに基づく。方法は、カニクイザルと反応するヒトキャプチャーおよび検出抗体を使用する。キットは、96ウェル多スポットプレートの各ウェル内の、独立した、十分定義されたスポット上にキャプチャー抗体でプレコートされたプレートを提供する。プレートをサル血漿サンプルとインキュベートし、洗浄し、次いで電気化学発光(ECL)ラベル(MSD SULFO-TAG)とコンジュゲートした検出抗体(各検体特異的)とインキュベートした。サンプル中の検体は作動電極表面に固定化したキャプチャー抗体に結合する；結合検体による検出抗体の動員がサンドイッチを完成させる。プレートを洗浄し、MSD Read緩衝液を、電気化学発光(ECL)に適切な化学環境を作るため加えた。プレートを、MSD Sector Imager 600(SI600)装置に装着し、そこで、電圧をプレート電極に適用し、捕捉ラベルを発光させた。装置は、相対的光単位(R

10

20

30

40

50

L U)の観点で発光強度を測定し、サンプル中の検体の相対的定量的測定を提供する。生 R L Uデータをテキストファイルにエクスポートし、次いでEnvigoでカスタム設計した E x c e l スプレッドシートプログラムを使用してWatson LIMS互換性ファイルに変換した。データをその後インポートし、Watson LIMS Software v.7.2.0.02で回帰させた。

【0483】

図29A～29Fは、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Aおよび29B)、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Cおよび29D)または $4\mu\text{g}/\text{kg}$ (図29Eおよび29F)のDF-hIL-12-Fc si単回皮下投与で処置したカニクイザルにおけるIFN γ (図29A、29Cおよび29E)およびIP10/CXCL10(図29B、29Dおよび29F)の濃度を示す線グラフである。

【0484】

図29Aに示すとおり、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ でのDF-hIL-12-Fc si単回皮下投与は、検出可能レベルのIFN γ をもたらさなかった。 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ および $4\mu\text{g}/\text{kg}$ のDF-hIL-12-Fc siの皮下投与は、投与後4日目にピークとなるIFN γ レベル増加を一部動物でもたらした(図29Cおよび29E)。 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ および $4\mu\text{g}/\text{kg}$ でのDF-hIL-12-Fc si皮下投与は、全て投与後4日目ピークとなるIP10/CXCL10レベル上昇をもたらした(図29B、29Dおよび29F)。

【0485】

実施例16 — 4T1同所性マウスモデルにおける照射または化学療法を使用したDF-mIL-12-Fc si組み合わせ治療

DF-mIL-12-Fc si投与により誘発される抗腫瘍活性が増幅され得るかを示すために、照射または化学療法を使用した組み合わせ試験を実施した。簡潔には、Balb/cマウスに乳房脂肪パッドに 5×10^5 4T1-luc腫瘍細胞を同所性に注射した。腫瘍接種後14日目、マウスを無作為化した($n=10$ /群)。マウスを、アイソタイプ、DF-mIL-12-Fc si(何れも $1\mu\text{g}$ IL-12と等モル)皮下、 $5\text{mg}/\text{kg}$ ドキシル(登録商標)(化学療法)静脈内または10Gy照射を単剤療法またはドキシル(登録商標)もしくは照射と組み合わせたDF-mIL-12-Fc siで処置した。腫瘍増殖を経時的に評価した。図30は、乳癌細胞を接種され、アイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc si、ドキシル(化学療法)または10Gy照射を単剤療法またはドキシル(登録商標)もしくは照射と組み合わせたDF-mIL-12-Fc siを毎週投与された個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。グラフは腫瘍増殖 $\pm$ 標準誤差平均の群平均を示す。

【0486】

図30に見られるとおり、DF-mIL-12-Fc si単剤療法はそれ自体4T1腫瘍担持マウスで有効であったが、組み合わせ治療は抗腫瘍免疫応答を増強し、10～30%のマウスで完全腫瘍退縮に至った。

【0487】

実施例17 — PD-1遮断耐性大CT26結腸癌腫瘍に対するDF-mIL-12-Fc si介在抗腫瘍有効性

この実施例は、DF-mIL-12-Fc siが、PD-1遮断耐性CT26-Ty rp1腫瘍に対する強力な、抗腫瘍応答を誘発するか否かを分析する。Balb/cマウスに 0.5×10^6 CT26-Ty rp1腫瘍細胞を注射した。平均腫瘍体積が約 120mm^3 に達したとき接種した後、マウスを9日目に無作為化した。マウスを $200\mu\text{g}$ アイソタイプまたは抗PD-1抗体(週2回)で処置した。図31Aは、CT26-Ty rp1腫瘍細胞を接種され、アイソタイプ対照または抗PD-1抗体で処置(週2回)されたBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。17日目、抗PD-1(平均腫瘍体積約 800mm^3)で先に処置した群を2処置群に細分した。群1はPD-1遮断処置週2回を継続して受け続け、群2はPD-1遮断(週2回)とDF-mIL-12-Fc si($1\mu\text{g}$ 毎週)を受けた。図31Bは、抗PD-1抗体(週2回)と $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si毎週処置で処置した、先に抗PD-1抗体処置したBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0488】

図31Aに示すとおり、抗PD-1単剤療法は腫瘍進行を制御できなかった。しかしながら、図31Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの追加は、有効な腫瘍退縮をもたらした。

【0489】

実施例18 — 大CT26結腸癌腫瘍に対するDF-mIL-12-Fc siの局所処置は、アブスコパル抗腫瘍応答を誘導する

この実施例は、DF-mIL-12-Fc si処置がアブスコパル治療効果を誘導できるか否かを示す。簡潔には、Balb/cに、左(0.8×10^6 腫瘍細胞)および右(0.4×10^6 腫瘍細胞)脇腹療法にCT26-Tyrp1結腸癌腫瘍細胞を皮下移植した。腫瘍接種後13日目、左腫瘍に、 $0.1 \mu\text{g}$ アイソタイプ対照または $0.1 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siを、2~3週間、週1回注射した。図32Aは、Balb/cマウス CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、アイソタイプ対照またはDF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)処置された処置(Tr)腫瘍の腫瘍増殖曲線を示すグラフである。右腫瘍は未処置(NT)のままであった。

【0490】

図32Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種されたBalb/cマウスにおける未処置(NT)腫瘍の腫瘍増殖曲線を示すグラフである。

【0491】

図32A~32Bに示すとおり、対照アイソタイプ処置腫瘍は、右部分および左部分両方で増殖し続けた。図32A~32Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siは、局所注射部位(図32A)および遠位非処置腫瘍(図32B)で有効な抗腫瘍応答をもたらし、アブスコパル治療効果を示した。

【0492】

実施例19 — 大CT26結腸癌腫瘍に対するDF-mIL-12-Fc si介在抗腫瘍有効性

この実施例は、変異L234A、L235AおよびP329Gを有するマウスIgG2a FcドメインポリペプチドのN末端に融合した野生型マウスIL-12 p40およびp35サブユニットを含むDF-mIL-12-Fc si(実施例2に記載)が、大きな腫瘍容積に対して効果的であることを示す。

【0493】

CT26大結腸癌腫瘍に対するDF-mIL-12-Fc si介在抗腫瘍有効性を試験した。簡潔には、Balb/cマウスに 10^6 CT26-Tyrp1結腸癌腫瘍細胞を皮下注射した。腫瘍接種後18日目、腫瘍体積が 800 mm^3 に達したとき、マウスを種々の処置群($n=10$ /群)に無作為化し、 $1 \mu\text{g}$ または $2 \mu\text{g}$ IL-12に相当するモル用量に相当するDF-mIL-12-Fc siまたはモル用量のmIgG2aアイソタイプで単回または週1回腹腔内処置した。

【0494】

腫瘍増殖を65日間評価した。図26Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、 $2 \mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照または $1 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)処置されたBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図26Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、 $2 \mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照または $2 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siで1回(毎週)処置されたBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図33Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、 $2 \mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照または $2 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siで1回処置されたBalb/cマウスの腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図33Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種され、 $2 \mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照、 $1 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si(毎週投与)、 $2 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si(毎週投与)または $2 \mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si(1回)で処置されたBalb/cマウスの平均腫瘍増殖曲線を示すグラフである。図26A、26Bおよび33Aは、

10

20

30

40

50

個々のマウスの腫瘍増殖曲線を示す。図33Bは、腫瘍平均±標準誤差平均を示す。

【0495】

図26A、26Bおよび33Bに示すとおり、DF-mIL-12-Fc siの毎週投与(1 μgまたは2 μg)は、腫瘍進行の制御に効率的であり、100%のマウスがDF-mIL-12-Fc si処置に応答した。さらに、図33Aに示すとおり、2 μg DF-mIL-12-Fc siでの単回処置は腫瘍退縮を示し、100%応答率をもたらした。この実施例に記載するデータおよび図は、DF-mIL-12-Fc siが単回投与したとき、大CT26腫瘍体積の減少に有効であるだけでなく、CT26腫瘍体積低減に有効であることも示す。

【0496】

実施例20 - B16F10黒色腫に対するDF-mIL-12-Fc si処置は、血清および腫瘍におけるサイトカインおよびケモカイン産生を誘導する

この実施例は、DF-mIL-12-Fc si処置がB16F10腫瘍担持C57BL/6マウスの血中および腫瘍でIFNγ、CXCL9およびCXCL10のレベルを上昇させることを示す。簡潔には、C57BL/6マウスに、10⁶ B16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目(平均腫瘍体積が150 mm³に達したとき)、マウスを無作為化した(n=8/群)。マウスにアイソタイプ対照、IL-12または1 μg IL-12と等モルのDF-mIL-12-Fcを腹腔内処置した。

【0497】

処置72時間後、血清および腫瘍溶解物を調製し、マルチプレックステクノロジーを使用してIFNγ(図27A)、CXCL9(図27B)およびCXCL10(図27C)発現を分析した。図34A~Cは、マウスにおける平均サイトカイン/ケモカインレベルを示す。

【0498】

図27A~27Cに示すとおり、0.5 μgのDF-mIL-12-Fc si単回投与は、血清(左パネル)および腫瘍内(右パネル)でのIFNγ(図27A)、CXCL9(図27B)およびCXCL10(図27C)の発現増加をもたらし、一方IL-12処置はほとんどまたは全く効果がなかった。

【0499】

実施例21 - LALAPAおよびLALAPG変異を有するDF hIL-12-Fc siは、類似するIFNγ刺激活性およびFcγR結合消失を示す

この実施例は、LALAPA(L234A、L235AおよびP329A)変異またはLALAPG(L234A、L235AおよびP329G)変異を有するIgG1 Fcを有するDF hIL-12-Fc siのIFNγ刺激およびFcγR結合活性を示す。完結には、ヒトPBMCを、2日間、5 μg/mlフィトヘマグルチニン(PHA)およびLALAPAまたはLALAPG変異を有するDF hIL-12-Fc-siの漸増用量両方と培養した。2日間刺激後、上清を収集し、IFNγ含量をELISAにより測定した。FcγR結合活性を決定するために、高親和性FcγR CD32およびCD64を発現するTHP-1細胞に結合したフルオロフォアコンジュゲートhIgG1アイソタイプ抗体(83 nM)をフローサイトメトリーにより決定した。

【0500】

図34Aに示すとおり、hIL-12-Fc-LALAPAおよびhIL-12-Fc-LALAPGは、PHAと同時に、PHA単独で生じる量より相当多くPBMCからのIFNγ産生を刺激する能力を有する。

【0501】

図34Bに示すとおり、標識hIgG1アイソタイプ抗体との混合物中の16倍モル過剰のhIL-12-Fc-wt(1.3 μM)の同時の包含は、おそらくCD32およびCD64へのIgG1結合の競合により、結合シグナルを相当低減させた。対照的に、同じ濃度で、hIL-12-Fc-LALAPAまたはhIL-12-Fc-LALAPG何れとのインキュベーションも、検出可能なIgG1アイソタイプ結合をもたらさず、LALAPAおよびLALAPG変異に起因する両タンパク質のFcγR結合消失が示唆された。

10

20

30

40

50

【0502】

番号付けした実施態様

ここに開示する実施態様は、番号付けした実施態様の開示に提供する実施態様 P 1 ~ P 1 2 1 を提供する。

【0503】

実施態様 P 1 :

第一抗体 F c 配列を含む第一ポリペプチドおよび第二の異なる抗体 F c 配列を含む第二ポリペプチド

を含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

ここで、第一ポリペプチドは多サブユニットタンパク質のサブユニットのタンパク質配列をさらに含み、

ここで、タンパク質配列は、アミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F X G G (配列番号 1) を含むリンカーにより第一抗体 F c 配列(ここで、X は L または E である)に融合しており；そして

多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットが第二の異なる抗体 F c 配列に融合しており、そして多サブユニットタンパク質のサブユニットが互いに結合しており、

ここで、第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列は各々ヘテロ二量体化を促進する異なる変異を含み、

ここで、第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列は互いに結合しているものである、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0504】

実施態様 P 2 : リンカーがアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 2) を含む、実施態様 P 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0505】

実施態様 P 3 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 3) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0506】

実施態様 P 4 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 3) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0507】

実施態様 P 5 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 1 3) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0508】

実施態様 P 6 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 1 3) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 5 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0509】

実施態様 P 7 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 1 4) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0510】

実施態様 P 8 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G

G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 14) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 7 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0511】

実施態様 P 9：タンパク質配列と第一抗体 F c 配列を融合するリンカーがアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G (配列番号 2) からなる、実施態様 P 2 ～ P 8 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0512】

実施態様 P 10：リンカーがアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) を含む、実施態様 P 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0513】

実施態様 P 11：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 10 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0514】

実施態様 P 12：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S G G G G S G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 5) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 11 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0515】

実施態様 P 13：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 10 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0516】

実施態様 P 14：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 63) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 13 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0517】

実施態様 P 15：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 10 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0518】

実施態様 P 16：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G S G G G G S R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 64) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 15 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0519】

実施態様 P 17：タンパク質配列と第一抗体 F c 配列を融合するリンカーがアミノ酸配列 R V E S K Y G P P C P P C P A P E F E G G (配列番号 4) からなる、実施態様 P 10 ～ P 16 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0520】

実施態様 P 18：

第一抗体 F c 配列を含む第一ポリペプチドおよび第二の異なる抗体 F c 配列を含む第二ポリペプチド

を含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

ここで、第一ポリペプチドは多サブユニットタンパク質のサブユニットのタンパク質配列

10

20

30

40

50

をさらに含み、

ここで、タンパク質配列がアミノ酸配列EPKSSDKTHTCPPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号6)またはPKSSDKTHTCPPCPAPEX₁X₂GX₃(配列番号237)を含むリンカーにより第一抗体Fc配列(ここで、X₁はLまたはAであり、X₂はL、EまたはAであり、そしてX₃はAまたはGである)に融合しており；そして多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットが第二の異なる抗体Fc配列に融合しており、そして多サブユニットタンパク質のサブユニットが互いに結合しており、そしてここでX₁がLであるおよび／またはX₂がLであるとき、第一抗体Fc配列および第二の異なる抗体Fc配列の少なくとも1つはヘテロ二量体化を促進するQ347R変異を含み、

10

ここで、第一抗体Fc配列および第二の異なる抗体Fc配列は互いに結合しているものである、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0521】

実施態様P19：リンカーがアミノ酸配列EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号7)またはPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号238)を含む、実施態様P18のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0522】

実施態様P20：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号8)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号241)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P19のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

20

【0523】

実施態様P21：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号8)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号241)からなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P20のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0524】

実施態様P22：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号15)またはGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号242)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P19のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

30

【0525】

実施態様P23：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号15)またはGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号242)からなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P22のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

40

【0526】

実施態様P24：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号16)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号243)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P19のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0527】

実施態様P25：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号16)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(配列番号243)か

50

らなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P24のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0528】

実施態様P26：タンパク質配列と第一抗体Fc配列を融合するリンカーがアミノ酸配列EPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号7)またはPKSSDKTHTCPCPAPELLGG(配列番号238)からなる、実施態様P19～P25の何れかのヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0529】

実施態様P27：リンカーがアミノ酸配列EPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号9)またはPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号239)を含む、実施態様P18のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

10

【0530】

実施態様P28：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号244)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P27のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0531】

実施態様P29：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号10)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号244)からなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P28のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

20

【0532】

実施態様P30：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号65)またはGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号245)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P27のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0533】

実施態様P31：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号65)またはGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号245)からなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P30のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

30

【0534】

実施態様P32：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号66)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号246)を含むリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P27のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

40

【0535】

実施態様P33：多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号66)またはGGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号246)からなるリンカーにより、第二の異なる抗体Fc配列に融合される、実施態様P32のヘテロ二量体Fc融合タンパク質。

【0536】

実施態様P34：タンパク質配列と第一抗体Fc配列を融合するリンカーがアミノ酸配列EPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(配列番号9)またはPKSSDKTHT

50

C P P C P A P E A A G G (配列番号 239) からなる、実施態様 P 27 ~ P 33 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0537】

実施態様 P 35 : リンカーがアミノ酸配列 E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 11) または P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 240) を含む、実施態様 P 18 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0538】

実施態様 P 36 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 12) または G G G G S G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 247) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 35 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

10

【0539】

実施態様 P 37 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 12) または G G G G S G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 247) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 36 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0540】

実施態様 P 38 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 67) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 248) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 35 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

20

【0541】

実施態様 P 39 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 67) または G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 248) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 38 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

30

【0542】

実施態様 P 40 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 68) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 249) を含むリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 35 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0543】

実施態様 P 41 : 多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットがアミノ酸配列 G G G G S G G G G S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 68) または G G G G S G G G G S P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 249) からなるリンカーにより、第二の異なる抗体 F c 配列に融合される、実施態様 P 40 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

40

【0544】

実施態様 P 42 : タンパク質配列と第一抗体 F c 配列を融合するリンカーがアミノ酸配列 E P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 11) または P K S S D K T H T C P P C P A P E A E G A (配列番号 240) からなる、実施態様 P 35 ~ P 41 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0545】

実施態様 P 43 : 第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列が互いにヘテロ二量体化を促進するために変異された I g G 4 F c 配列である、実施態様 P 1 ~ P 17 の何

50

れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0546】

実施態様 P 4 4：第一抗体 F c 配列が K 3 7 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が E 3 5 7 N、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0547】

実施態様 P 4 5：第一抗体 F c 配列が E 3 5 7 N、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が K 3 7 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0548】

実施態様 P 4 6：第一抗体 F c 配列が変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0549】

実施態様 P 4 7：第一抗体 F c 配列が変異 E 3 5 7 N、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 K 3 7 0 E および R 4 0 9 W を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0550】

実施態様 P 4 8：第一抗体 F c 配列が K 3 6 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0551】

実施態様 P 4 9：第一抗体 F c 配列が Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が K 3 6 0 E、R 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0552】

実施態様 P 5 0：第一抗体 F c 配列が変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0553】

実施態様 P 5 1：第一抗体 F c 配列が変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 K 3 6 0 E および R 4 0 9 W を含む、実施態様 P 4 3 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0554】

実施態様 P 5 2：第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列が互いにヘテロ二量体化を促進するように変異された I g G 1 F c 配列である、実施態様 P 1 8 ~ P 4 2 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0555】

実施態様 P 5 3：第一抗体 F c 配列が K 3 6 0 E、K 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 5 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0556】

実施態様 P 5 4：第一抗体 F c 配列が Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、F 4 0 5 T およびそれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が K 3 6 0 E、K 4 0 9 W およびそれらの組み合わせからなる群から選択される

10

20

30

40

50

1 以上の変異を含む、実施態様 P 5 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0557】

実施態様 P 5 5：第一抗体 F c 配列が変異 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含む、実施態様 P 5 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0558】

実施態様 P 5 6：第一抗体 F c 配列が変異 Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含む、実施態様 P 5 2 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0559】

実施態様 P 5 7：I g G 4 または I g G 1 F c 配列がエフェクター機能を低減するようにさらに変異されている、実施態様 P 4 3 ～ P 5 6 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0560】

実施態様 P 5 8：第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列が各々変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A または L 2 3 5 E および／または P 3 2 9 A を含む、実施態様 P 5 7 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0561】

実施態様 P 5 9：第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列が各々 G 2 3 7 A、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S およびその何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の変異を含む、実施態様 P 5 7 または実施態様 P 5 8 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0562】

実施態様 P 6 0：第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列が各々変異 G 2 3 7 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S を含む、実施態様 P 5 7 または実施態様 P 5 8 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0563】

実施態様 P 6 1：I g G 4 または I g G 1 F c 配列が鎖間ジスルフィド架橋を導入するようにさらに変異されている、実施態様 P 4 3 ～ P 6 0 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0564】

実施態様 P 6 2：第一抗体 F c 配列が変異 Y 3 4 9 C を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 S 3 5 4 C を含む、実施態様 P 6 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0565】

実施態様 P 6 3：第一抗体 F c 配列が変異 S 3 5 4 C を含み、第二の異なる抗体 F c 配列が変異 Y 3 4 9 C を含む、実施態様 P 6 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0566】

実施態様 P 6 4：多サブユニットタンパク質のサブユニットが多サブユニットサイトカインのサブユニットである、実施態様 P 1 ～ P 6 3 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0567】

実施態様 P 6 5：サイトカインが I L - 1 2 である、実施態様 P 6 4 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0568】

実施態様 P 6 6：少なくとも 1 つの抗体可変ドメインをさらに含む、実施態様 P 1 ～ P 6 5 の何れかに記載のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0569】

実施態様 P 6 7：少なくとも 1 つの抗体重鎖可変領域が F a b を形成するように抗体軽鎖可変領域に結合しており、ここで、F a b が第一抗体 F c 配列および／または第二の異なる抗体 F c 配列の N 末端に結合する、実施態様 P 6 6 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【0570】

実施態様 P 6 8 : 多サブユニットタンパク質のサブユニットおよび多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットのタンパク質配列がそれぞれ第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列の C 末端に結合する、実施態様 P 6 7 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 1 】

実施態様 P 6 9 : 多サブユニットタンパク質のサブユニットおよび多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットのタンパク質配列がそれぞれ第二の異なる抗体 F c 配列および第一抗体 F c 配列の C 末端に結合する、実施態様 P 6 7 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 2 】

実施態様 P 7 0 : 第一ポリペプチドが第一抗体 F c 配列に対して C 末端に位置する抗体重鎖可変ドメインを含む、実施態様 P 6 6 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 3 】

実施態様 P 7 1 : 第二ポリペプチドが第二の異なる抗体 F c 配列に対して C 末端に位置する抗体重鎖可変ドメインを含む、実施態様 P 6 6 または実施態様 P 7 0 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 4 】

実施態様 P 7 2 : 抗体重鎖可変領域が s c F v を形成するように抗体軽鎖可変領域に結合する、実施態様 P 7 0 または実施態様 P 7 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 5 】

実施態様 P 7 3 : 多サブユニットタンパク質のサブユニットおよび多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットのタンパク質配列がそれぞれ第一抗体 F c 配列および第二の異なる抗体 F c 配列の N 末端に結合する、実施態様 P 7 0 ~ 7 2 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 6 】

実施態様 P 7 4 : 多サブユニットタンパク質のサブユニットおよび多サブユニットタンパク質のさらなるサブユニットのタンパク質配列がそれぞれ第二の異なる抗体 F c 配列および第一抗体 F c 配列の N 末端に結合する、実施態様 P 7 0 ~ P 7 2 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 7 】

実施態様 P 7 5 : 抗体可変ドメインを含まない、実施態様 P 1 ~ P 6 5 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 8 】

実施態様 P 7 6 : プロテオグリカン結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 1 ~ P 6 5 または実施態様 P 7 5 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 7 9 】

実施態様 P 7 7 : プロテオグリカン結合ドメインが腫瘍で特異的に発現される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、実施態様 P 7 6 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 0 】

実施態様 P 7 8 : プロテオグリカン結合ドメインがシンデカン、セルグリシン、C S P G 4、ベータグリカン、グリピカン、ペルレカン、ベルシカン、プレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン (S L R P) から選択される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、実施態様 P 7 7 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 1 】

実施態様 P 7 9 : S L R P がデコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される、実施態様 P 7 8 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 2 】

実施態様 P 8 0 : コラーゲン結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 1 ~ P 6 5 または実施態様 P 7 5 ~ P 7 9 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 3 】

10

20

30

40

50

実施態様 P 8 1 : コラーゲン結合ドメインが腫瘍で特異的に発現される 1 以上のコラーゲンに結合する、実施態様 P 8 0 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 4 】

実施態様 P 8 2 : ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 1 ~ P 6 5 または実施態様 P 7 5 ~ P 8 1 のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 5 】

実施態様 P 8 3 : プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインまたはヒアルロン酸結合ドメインが第一抗体 F c ドメインポリペプチドまたは第二抗体 F c ドメインポリペプチドの C 末端に融合する、実施態様 P 7 6 ~ P 8 2 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 8 6 】

実施態様 P 8 4 : 先の実施態様の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む、製剤。

【 0 5 8 7 】

実施態様 P 8 5 : 実施態様 P 1 ~ P 8 3 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質をコードする 1 以上の核酸を含む、細胞。

【 0 5 8 8 】

実施態様 P 8 6 : 癌を処置する方法であって、患者に実施態様 P 1 ~ P 8 3 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質または実施態様 P 8 4 の製剤を投与することを含む、方法。

【 0 5 8 9 】

実施態様 P 8 7 : 急性放射線症候群を処置する方法であって、患者に実施態様 P 1 ~ P 8 3 の何れかのヘテロ二量体 F c 融合タンパク質または実施態様 P 8 4 の製剤を投与することを含む、方法。

【 0 5 9 0 】

実施態様 P 8 8 : 急性放射線症候群が造血放射線症候群、消化器放射線症候群、神経血管放射線症候群、皮膚放射線症候群およびその何れかの組み合わせからなる群から選択される 1 以上の症候群を含む、実施態様 P 8 7 の方法。

【 0 5 9 1 】

実施態様 P 8 9 : 配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含む第一ポリペプチドおよび配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む第二ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質。

【 0 5 9 2 】

実施態様 P 9 0 : 多サブユニットサイトカインのサブユニットおよび免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドを含むポリペプチドであって、ここで、F c ドメインポリペプチドが異なる免疫グロブリン F c ドメインポリペプチドとのヘテロ二量体化を促進する変異および F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異を含む、ポリペプチド。

【 0 5 9 3 】

実施態様 P 9 1 : F c ドメインがヒト I g G 1 抗体 F c ドメインである、実施態様 P 9 0 のポリペプチド。

【 0 5 9 4 】

実施態様 P 9 2 : F c のエフェクター機能を低減させる 1 以上の変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A または L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、P 3 2 9 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S から選択される、実施態様 P 9 1 のポリペプチド。

【 0 5 9 5 】

実施態様 P 9 3 : F c のエフェクター機能を低減させる変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A である、実施態様 P 9 1 または実施態様 P 9 2 のポリペプチド。

【 0 5 9 6 】

実施態様 P 9 4 : ヘテロ二量体化を促進する変異が、E U ナンバリングシステムにより番号付けして、K 3 6 0 E および K 4 0 9 W である、実施態様 P 9 1 ~ P 9 3 の何れかのポ

10

20

30

40

50

リペプチド。

【0597】

実施態様P95：ヘテロ二量体化を促進する変異が、EUNANバリングシステムにより番号付けして、Q347R、D399VおよびF405Tである、実施態様P91～P93の何れかのポリペプチド。

【0598】

実施態様P96：Fcドメインが異なる免疫グロブリンFcドメインポリペプチドとのジスルフィド結合形成を促進する変異をさらに含む、実施態様P94またはP95のポリペプチド。

【0599】

実施態様P97：ヘテロ二量体化変異がK360EおよびK409Wであるとき、ジスルフィド結合形成を促進する変異が、EUNANバリングシステムにより番号付けして、Y349Cである、実施態様P96のポリペプチド。

【0600】

実施態様P98：ヘテロ二量体化変異がQ347R、D399VおよびF405Tであるとき、ジスルフィド結合形成を促進する変異が、EUNANバリングシステムにより番号付けして、S354Cである、実施態様P96のポリペプチド。

【0601】

実施態様P99：配列番号290のアミノ酸配列を含む、実施態様P97のポリペプチド。

【0602】

実施態様P100：配列番号291のアミノ酸配列を含む、実施態様P98のポリペプチド。

【0603】

実施態様P101：抗体可変ドメインをさらに含む、実施態様P90～P100の何れかのポリペプチド。

【0604】

実施態様P102：抗体可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインを含む、実施態様P101のポリペプチド。

【0605】

実施態様P103：抗体重鎖可変ドメインがポリペプチドのN末端に融合する、実施態様P102のポリペプチド。

【0606】

実施態様P104：抗体重鎖可変ドメインがFabを形成するように抗体軽鎖可変ドメインに結合する、実施態様P103のポリペプチド。

【0607】

実施態様P105：抗体重鎖可変ドメインがscFvを形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、実施態様P103のポリペプチド。

【0608】

実施態様P106：多サブユニットサイトカインのサブユニットが免疫グロブリンFcドメインのC末端に融合する、実施態様P101～P105の何れかのポリペプチド。

【0609】

実施態様P107：抗体重鎖可変ドメインがポリペプチドのC末端に融合する、実施態様P101のポリペプチド。

【0610】

実施態様P108：抗体重鎖可変ドメインがscFvを形成するようにさらに抗体軽鎖可変ドメインに融合する、実施態様P107のポリペプチド。

【0611】

実施態様P109：多サブユニットサイトカインのサブユニットが免疫グロブリンFcドメインのN末端に融合する、実施態様P107またはP108のポリペプチド。

【0612】

10

20

30

40

50

実施態様 P 1 1 0 : 抗体可変ドメインを含まない、実施態様 P 9 0 ~ P 1 0 0 の何れかのポリペプチド。

【 0 6 1 3 】

実施態様 P 1 1 1 : プロテオグリカン結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 9 0 ~ P 1 0 0 または P 1 1 0 の何れかのポリペプチド。

【 0 6 1 4 】

実施態様 P 1 1 2 : プロテオグリカン結合ドメインが腫瘍に特異的に発現される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、実施態様 P 1 1 1 のポリペプチド。

【 0 6 1 5 】

実施態様 P 1 1 3 : プロテオグリカン結合ドメインがシンデカン、セルグリシン、C S P G 4、ベータグリカン、グリピカン、ペルレカン、ベルシカン、プレビカンおよび小ロイシンリッチプロテオグリカン(S L R P)から選択される 1 以上のプロテオグリカンに結合する、実施態様 P 1 1 2 のポリペプチド。

【 0 6 1 6 】

実施態様 P 1 1 4 : S L R P がデコリン、ビグリカン、アスポリン、フィブロモジュリンおよびルミカンから選択される、実施態様 P 1 1 3 のポリペプチド。

【 0 6 1 7 】

実施態様 P 1 1 5 : コラーゲン結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 9 0 ~ P 1 0 0 または 1 1 0 ~ 1 1 4 の何れかのポリペプチド。

【 0 6 1 8 】

実施態様 P 1 1 6 : コラーゲン結合ドメインが腫瘍に特異的に発現される 1 以上のコラーゲンに結合する、実施態様 P 1 1 5 のポリペプチド。

【 0 6 1 9 】

実施態様 P 1 1 7 : a ヒアルロン酸結合ドメインをさらに含む、実施態様 P 9 0 ~ P 1 0 0 または 1 1 0 ~ 1 1 6 の何れかのポリペプチド。

【 0 6 2 0 】

実施態様 P 1 1 8 : プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメインまたはヒアルロン酸結合ドメインがポリペプチドの C 末端に融合する、実施態様 P 1 1 1 ~ P 1 1 7 の何れかのポリペプチド。

【 0 6 2 1 】

実施態様 P 1 1 9 : 実施態様 P 8 9 ~ P 1 1 8 の何れかの配列番号 2 9 0 または配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸。

【 0 6 2 2 】

実施態様 P 1 2 0 : 実施態様 P 8 9 ~ P 1 1 8 の何れかの配列番号 2 9 0 または配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む核酸を含む、発現ベクター。

【 0 6 2 3 】

実施態様 P 1 2 1 : 実施態様 P 1 1 9 の核酸または実施態様 P 1 2 0 の発現ベクターを含む、細胞。

【 0 6 2 4 】

引用による取り込み

ここに引用した特許文献および科学論文の各々の開示全体を、引用により全ての目的のために本明細書に包含させる。

【 0 6 2 5 】

均等

本発明は、その精神または必須の特徴から逸脱することなく、他の特異的形態で具体化され得る。したがって、前記実施態様はその記載に本発明を限定するのではなく、全ての点で例示的と解釈されるべきである。故に、本発明の範囲は、前記ではなく、添付する特許請求の範囲により示され、特許請求の範囲の意味および範囲に入る全ての変更はそれに包含されることが意図される。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

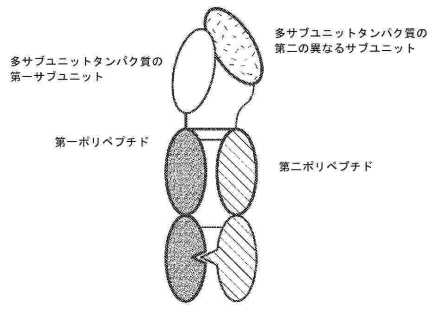


FIG. 1A

【図 1 - 2】

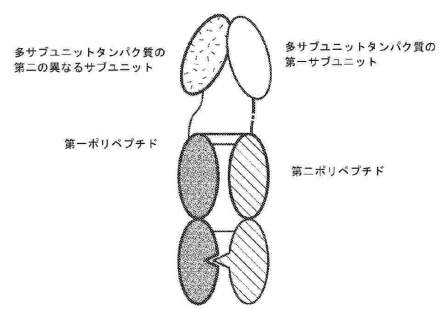


FIG. 1C

10

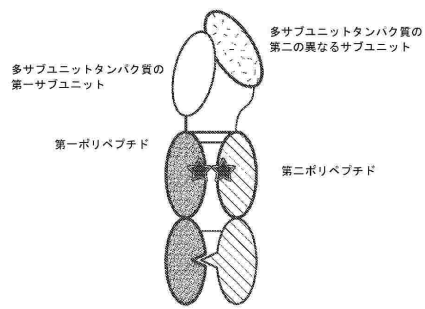


FIG. 1B

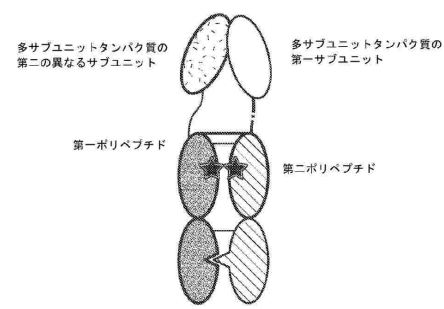


FIG. 1D

20

【図 1 - 3】

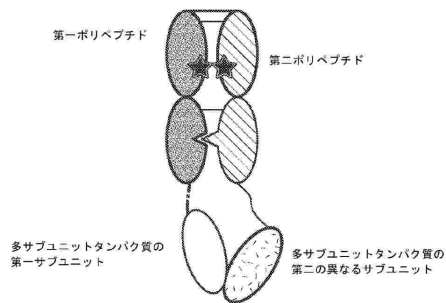


FIG. 1E

【図 2】

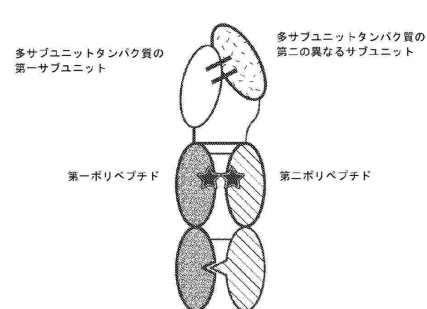


FIG. 2A

30

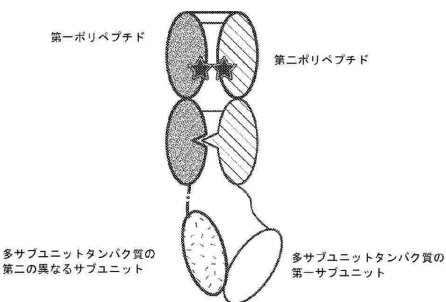


FIG. 1F

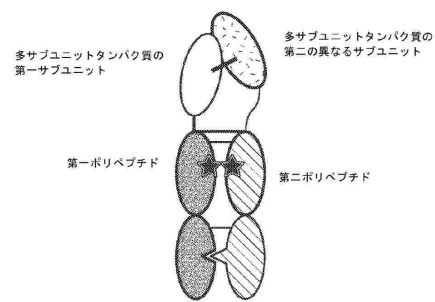


FIG. 2B

40

50

【図 3】

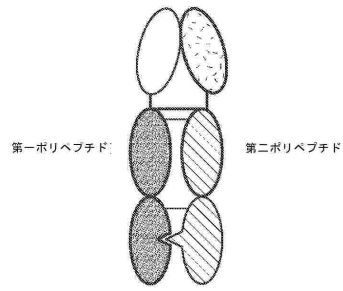


FIG. 3A

【図 4 - 1】

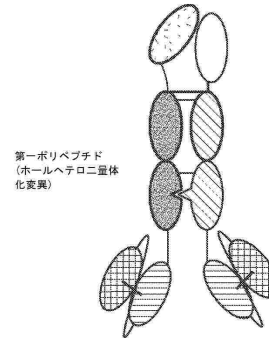


FIG. 4A

10

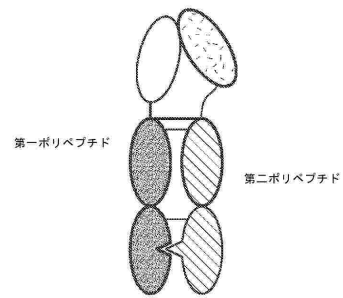


FIG. 3B

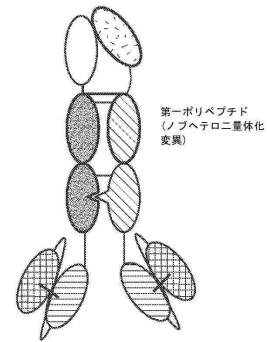


FIG. 4B

20

【図 4 - 2】

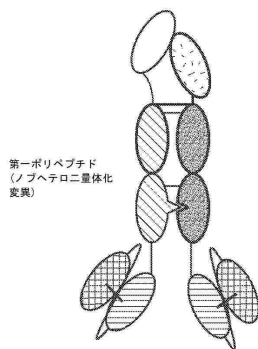


FIG. 4C

【図 4 - 3】

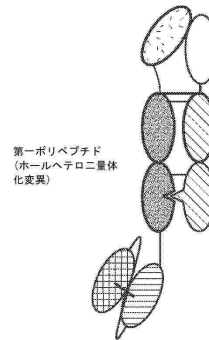


FIG. 4E

30

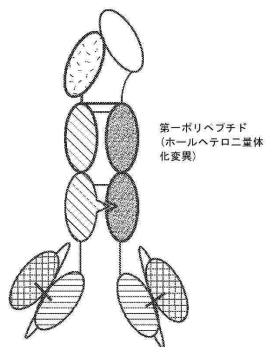


FIG. 4D

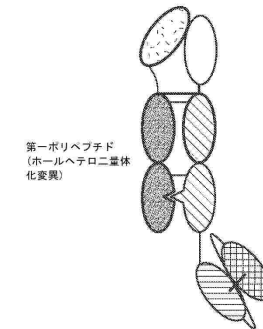


FIG. 4F

40

50

【図 4 - 4】

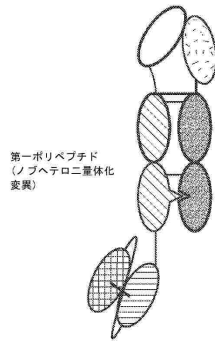


FIG. 4G

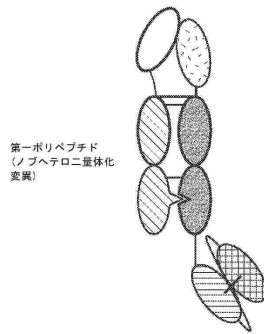


FIG. 4H

【図 4 - 5】

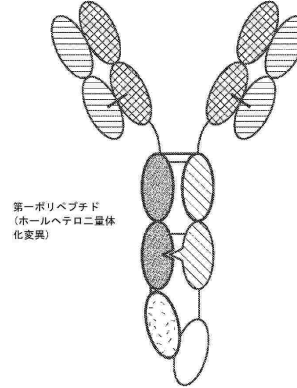


FIG. 4I

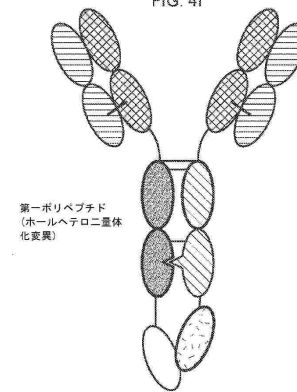


FIG. 4J

【図 4 - 6】

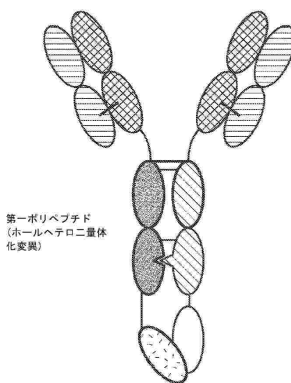


FIG. 4K

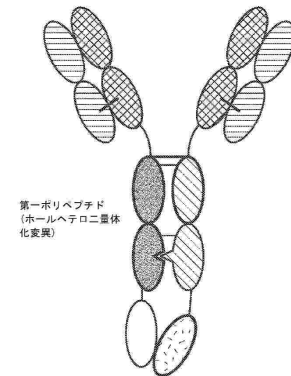


FIG. 4L

【図 5 - 1】

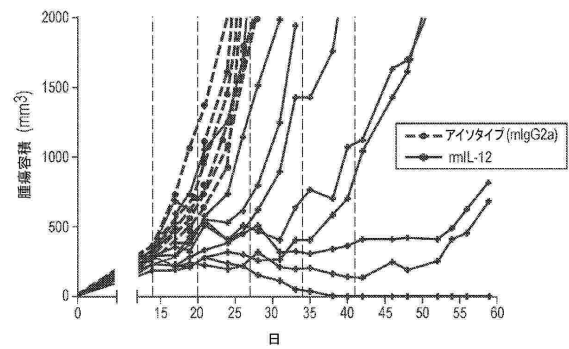


FIG. 5A

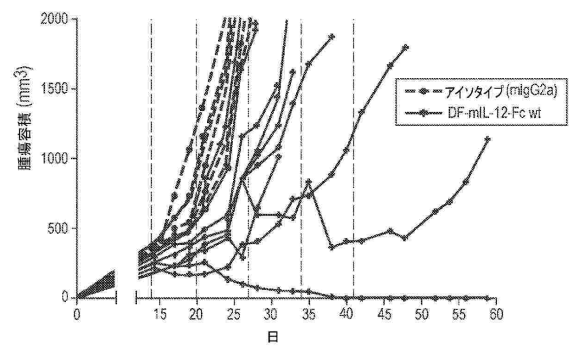


FIG. 5B

10

20

30

40

50

【図 5 - 2】

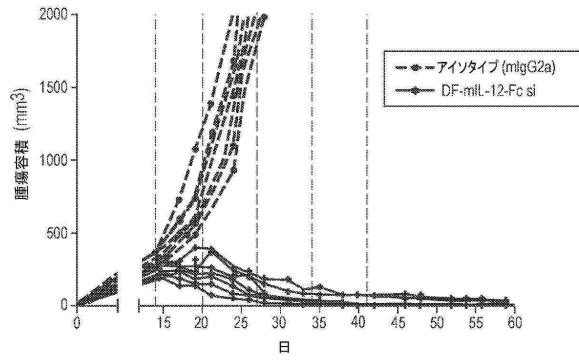


FIG. 5C

【図 6】

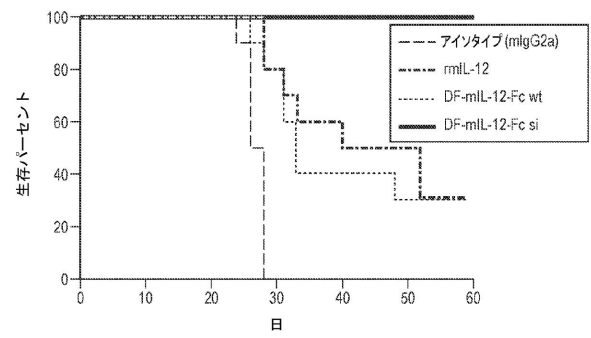


FIG. 6

【図 7 - 1】

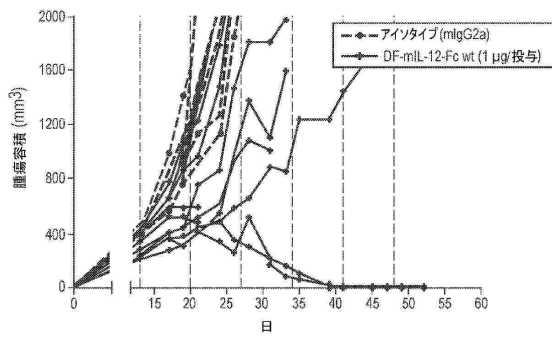


FIG. 7A

【図 7 - 2】

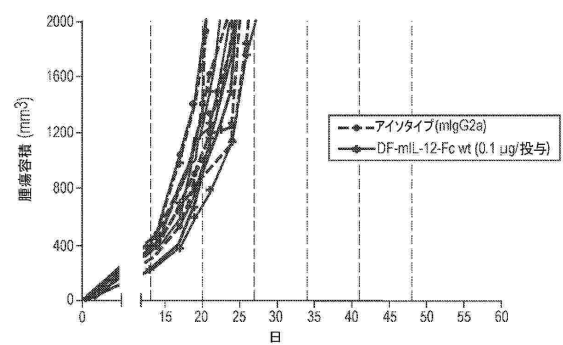


FIG. 7C

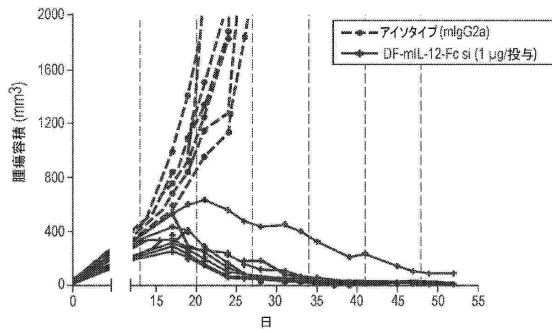


FIG. 7B

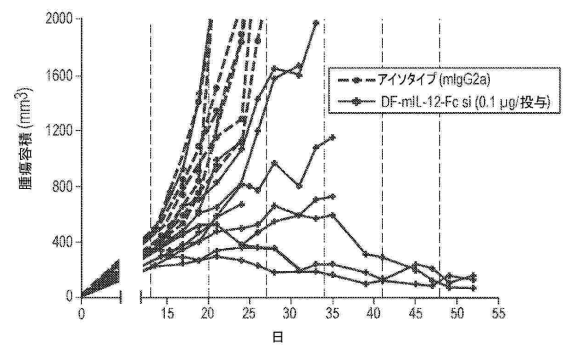


FIG. 7D

10

20

30

40

50

【図 8】

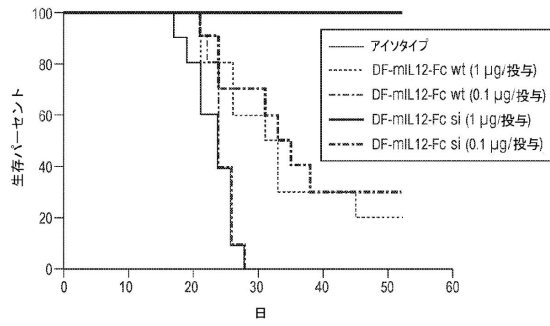


FIG. 8

【図 9 - 1】

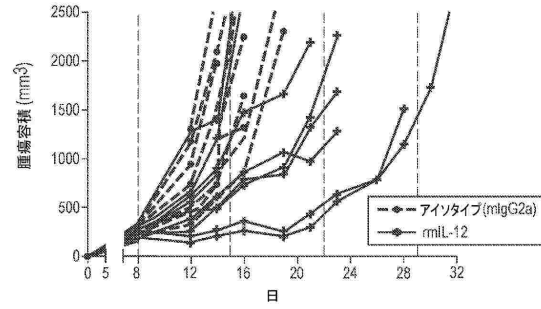


FIG. 9A

10

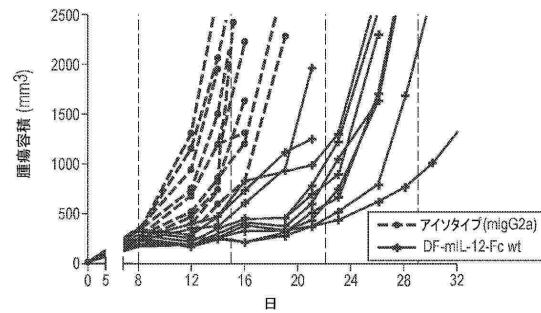


FIG. 9B

20

【図 9 - 2】

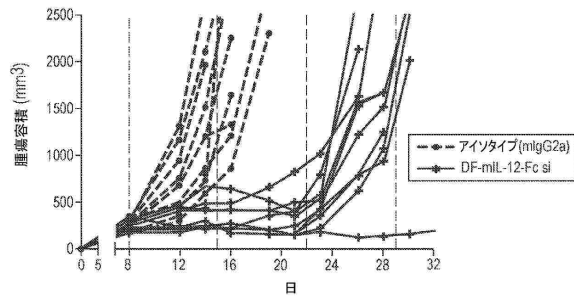


FIG. 9C

【図 10】

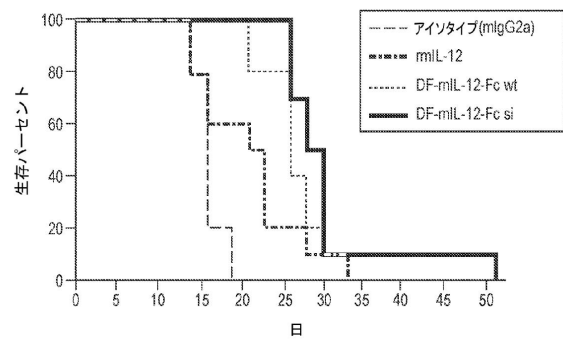


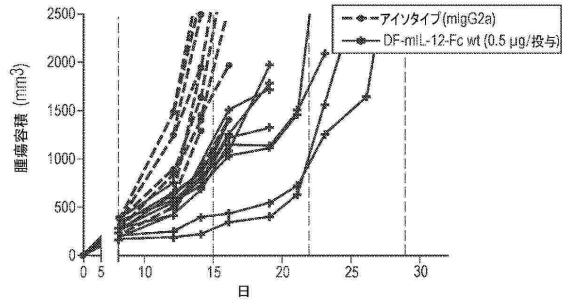
FIG. 10

30

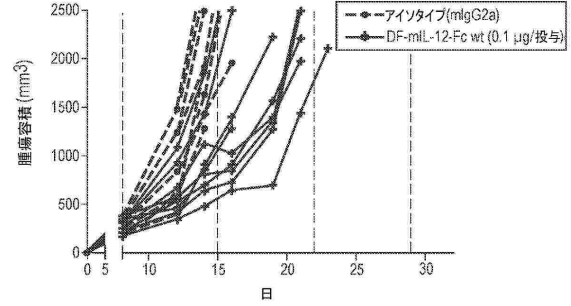
40

50

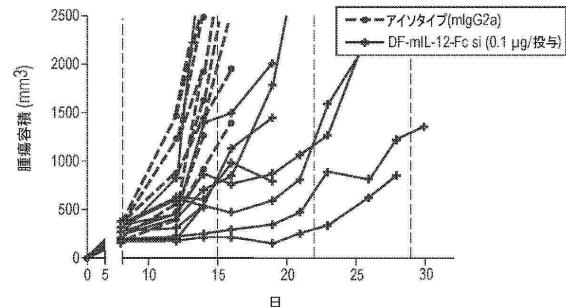
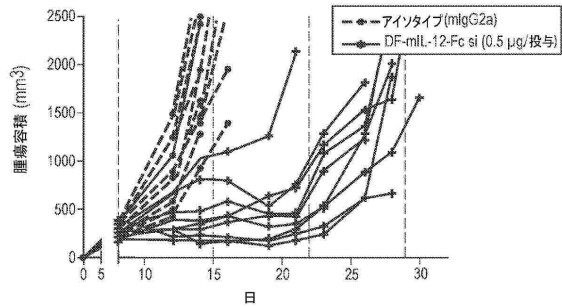
【図 1 1 - 1】



【図 1 1 - 2】

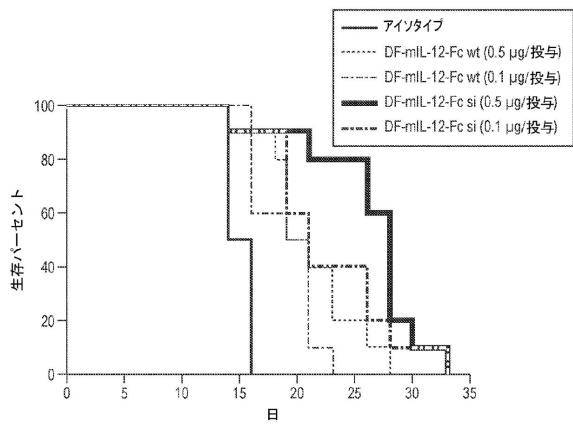


10

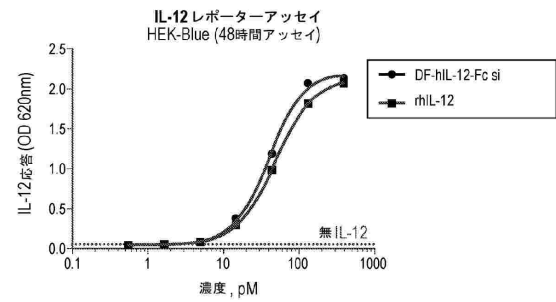


20

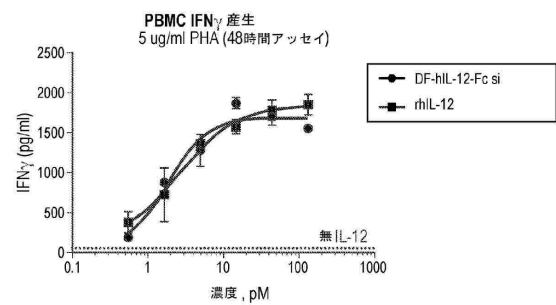
【図 1 2】



【図 1 3】



30



40

50

【図 14】

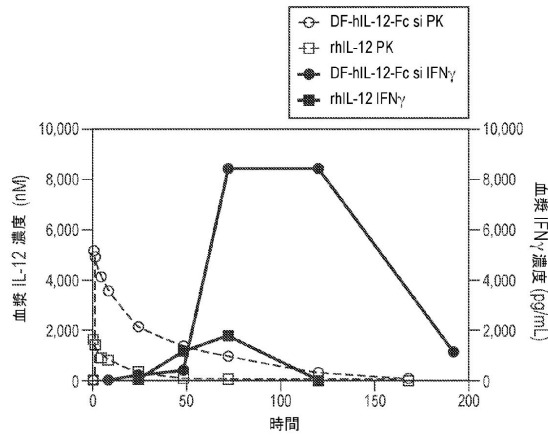


FIG. 14

【図 15 - 1】

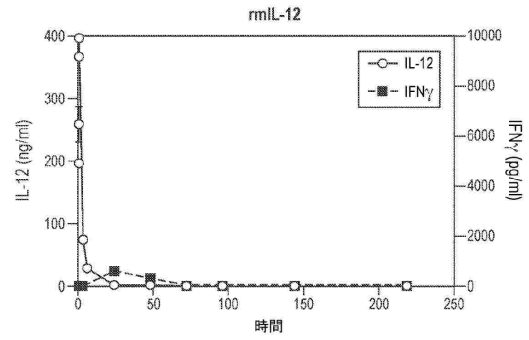


FIG. 15A

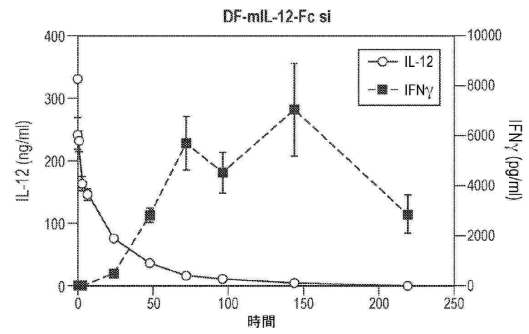


FIG. 15B

【図 15 - 2】

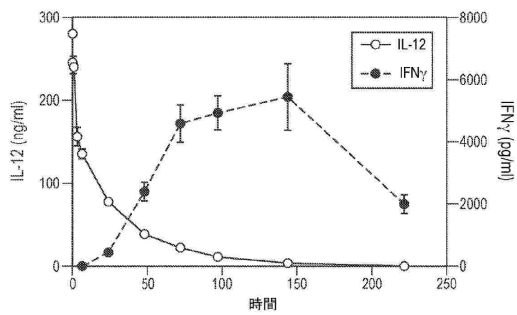


FIG. 15C

【図 15 - 3】

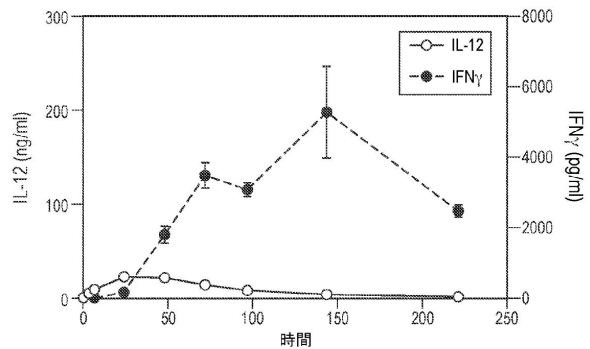


FIG. 15E

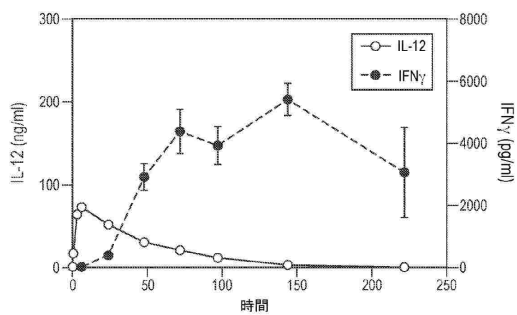


FIG. 15D

10

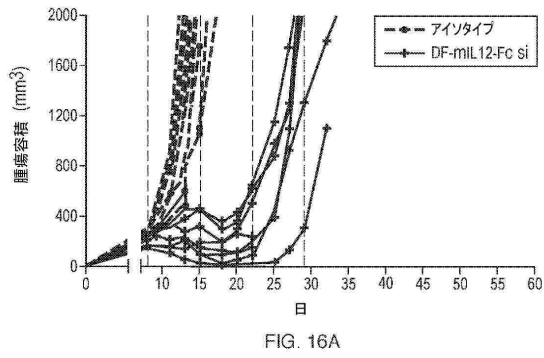
20

30

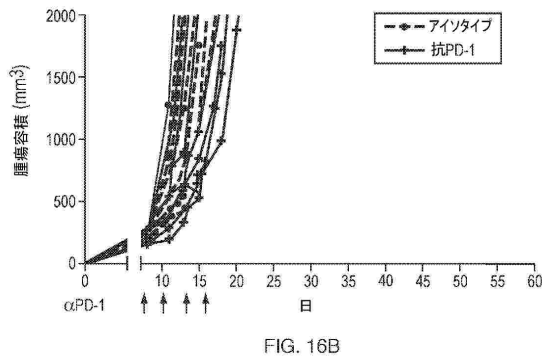
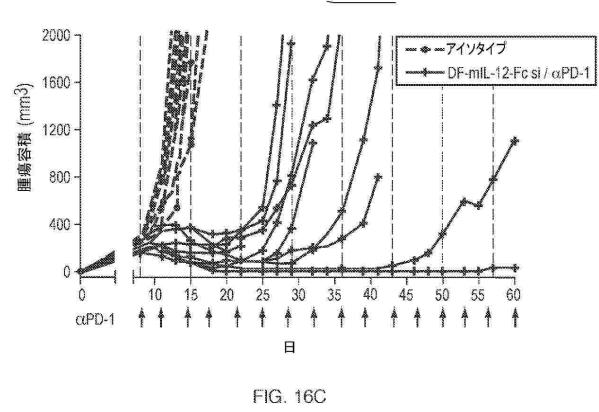
40

50

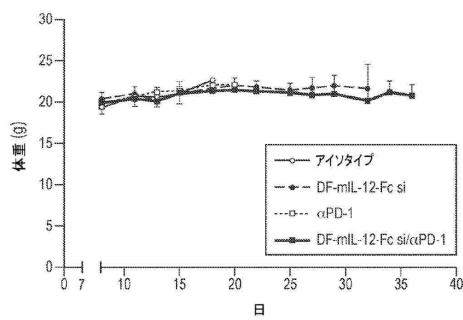
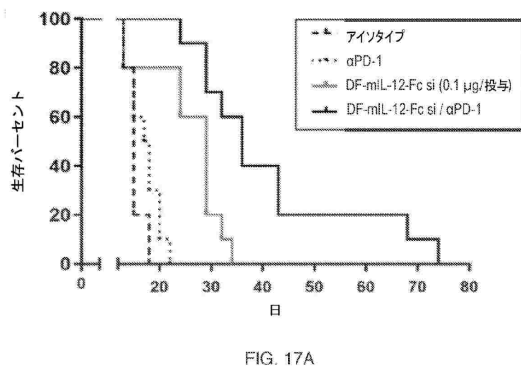
【図 16-1】



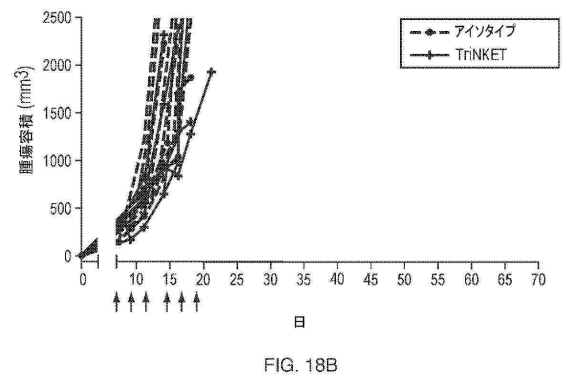
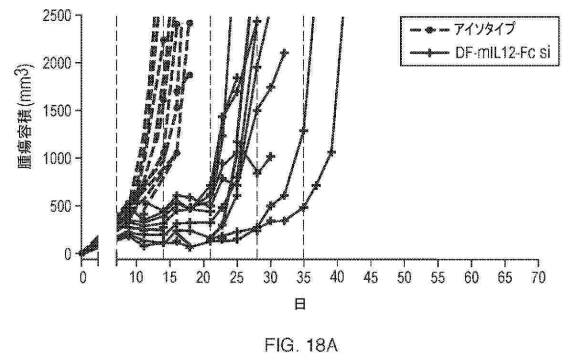
【図 16-2】



【図 17】



【図 18-1】



10

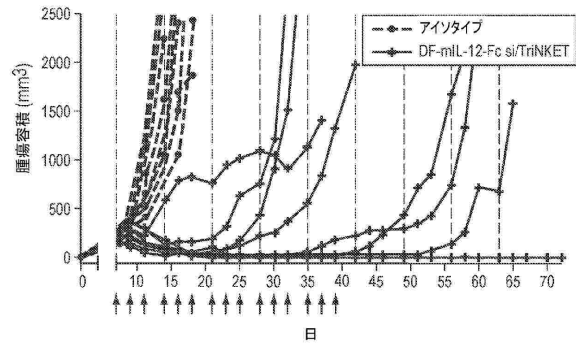
20

30

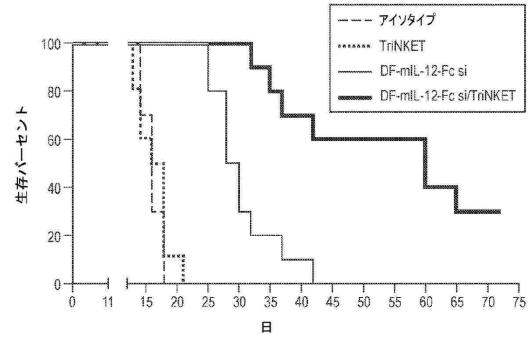
40

50

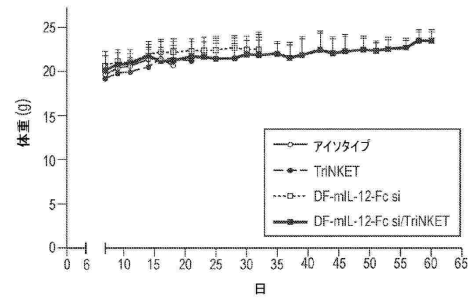
【図 18-2】



【図 19】

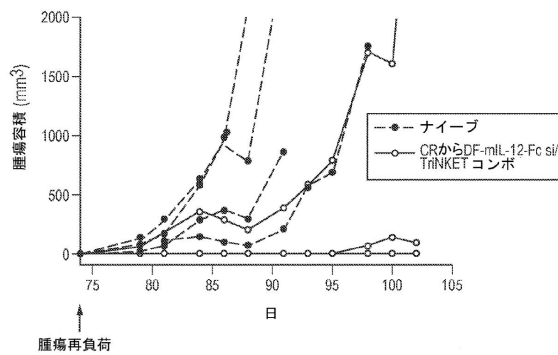


10

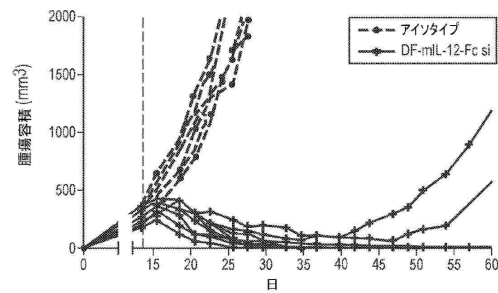


20

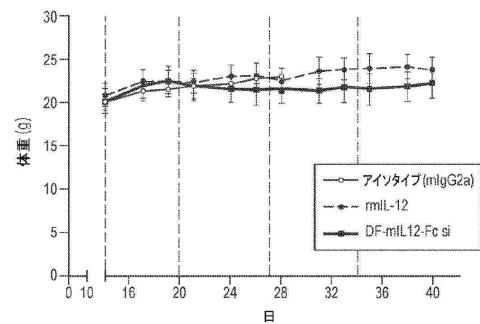
【図 20】



【図 21-1】



30



40

50

【図 2 1 - 2】

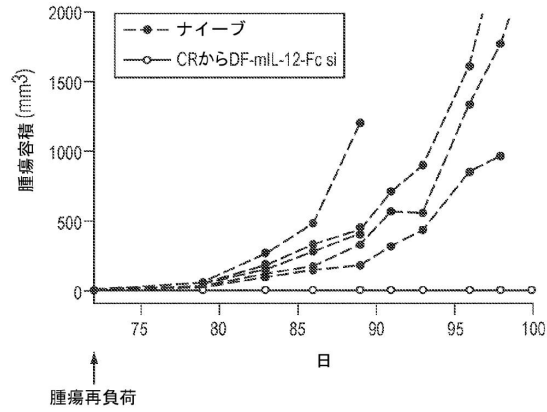


FIG. 21C

【図 2 2】

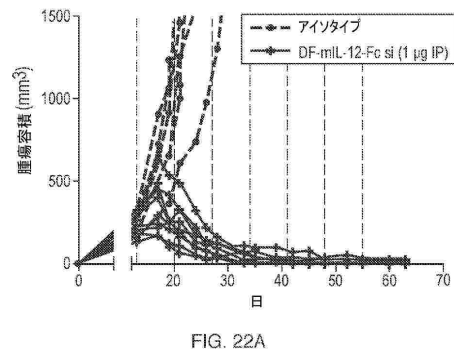


FIG. 22A

10

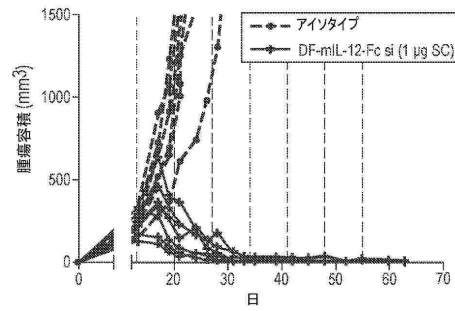


FIG. 22B

20

【図 2 3】

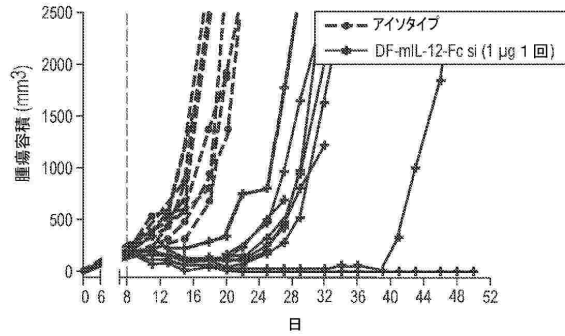


FIG. 23

【図 2 4】

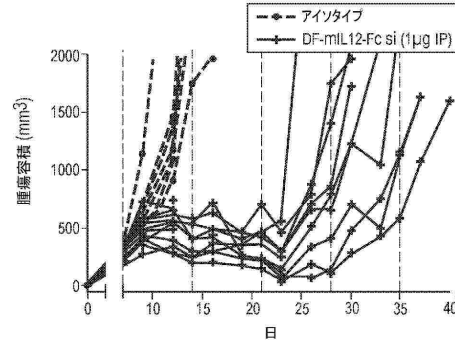


FIG. 24A

30

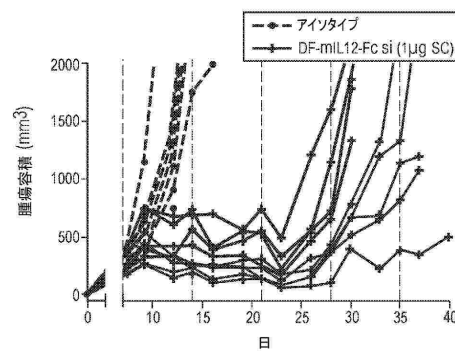


FIG. 24B

40

50

【図 25】

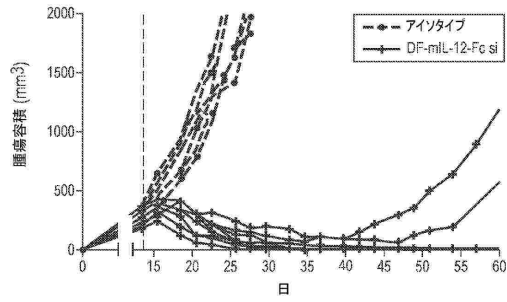


FIG. 25A

【図 26】

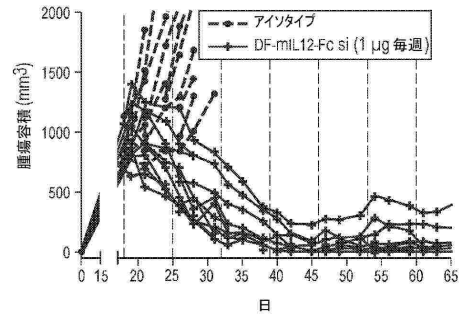


FIG. 26A

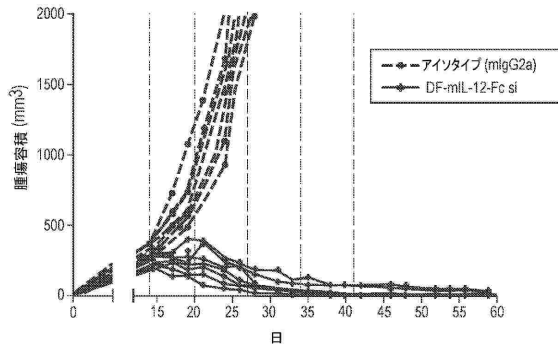


FIG. 25B

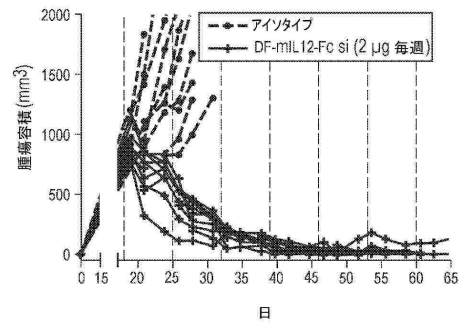


FIG. 26B

【図 27-1】

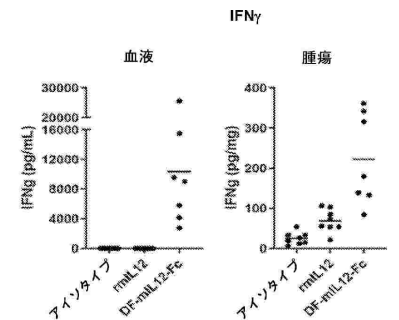


FIG. 27A

【図 27-2】

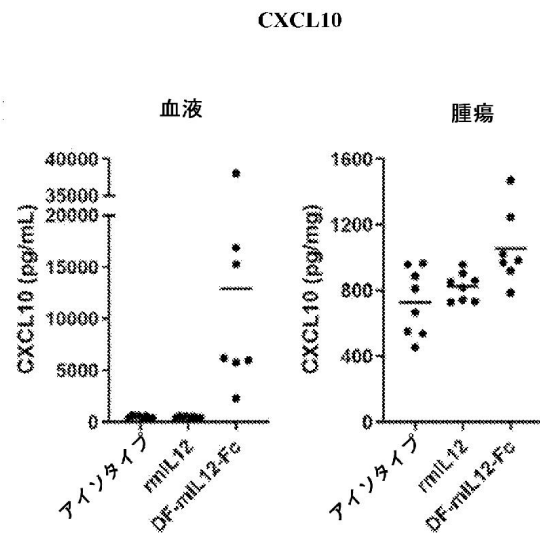


FIG. 27C

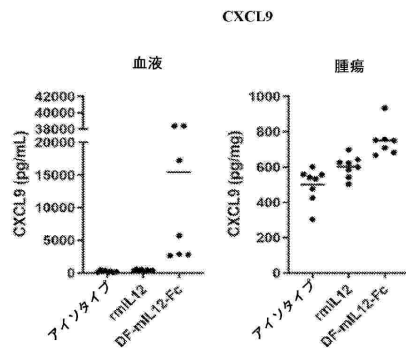


FIG. 27B

10

20

30

40

50

【図 28-1】

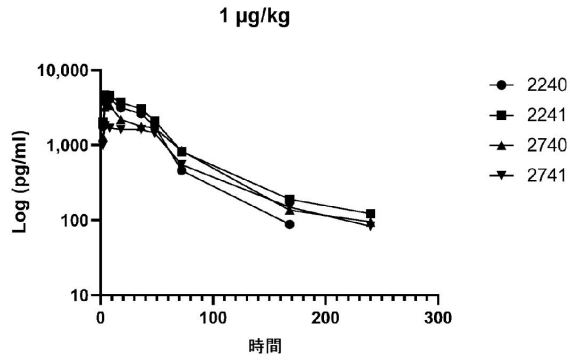


FIG. 28A

【図 28-2】

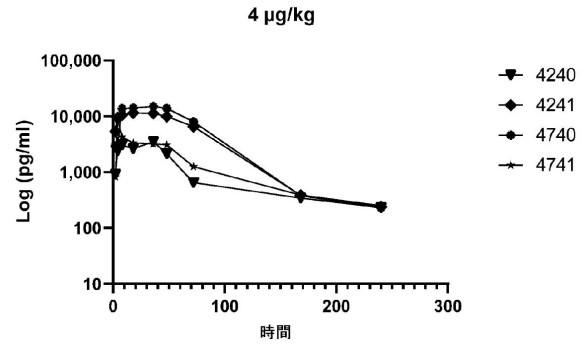


FIG. 28C

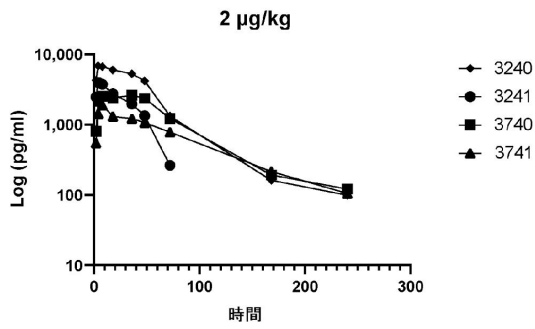


FIG. 28B

【図 29-1】

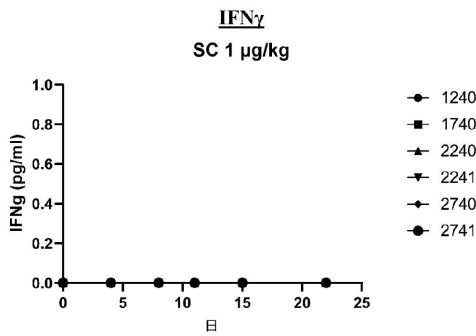


FIG. 29A

【図 29-2】

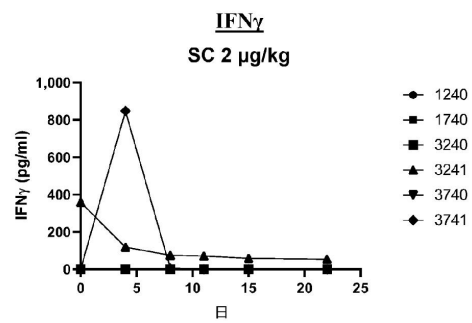


FIG. 29C

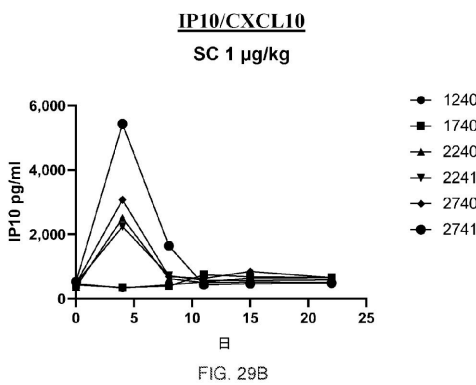


FIG. 29B

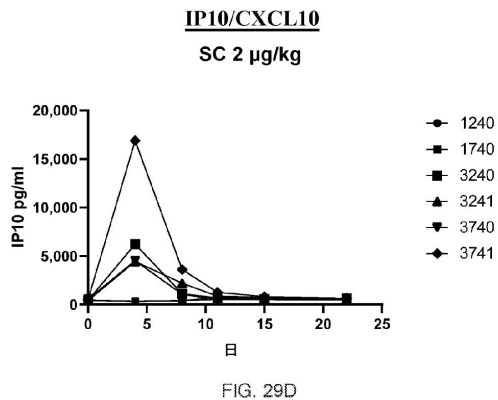


FIG. 29D

10

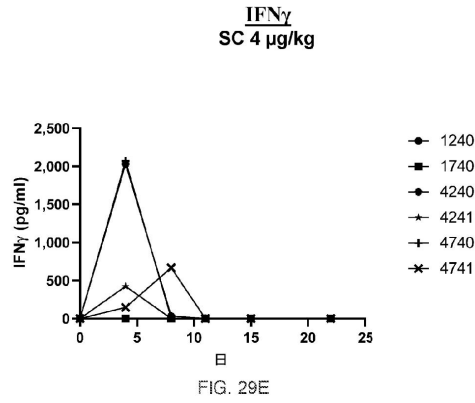
20

30

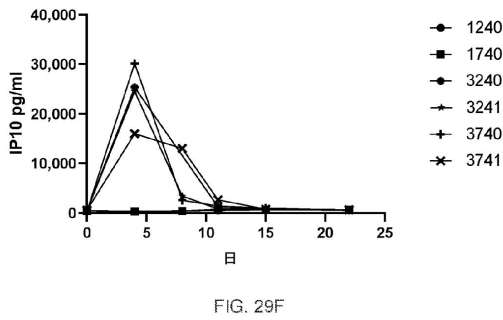
40

50

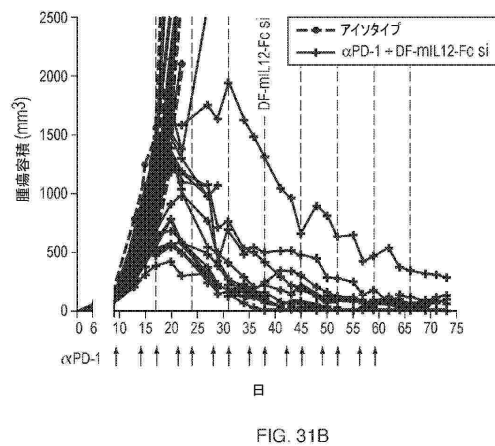
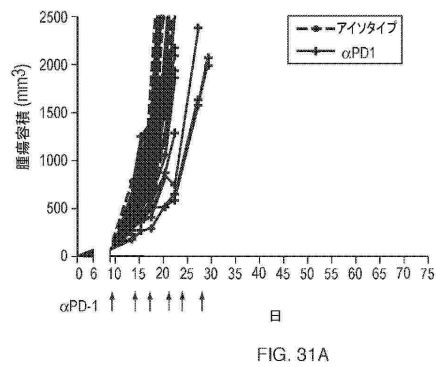
【図 29-3】



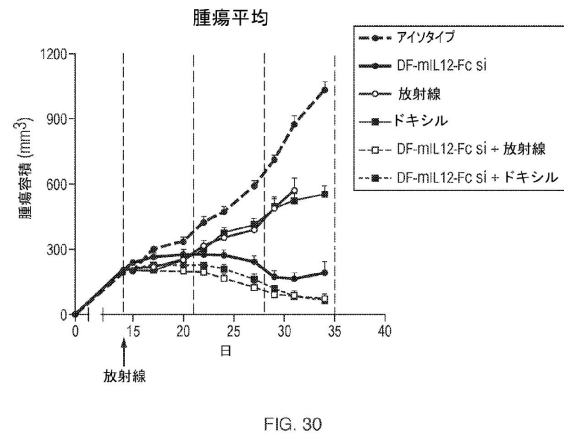
IP10/CXCL10
SC 4 μ g/kg



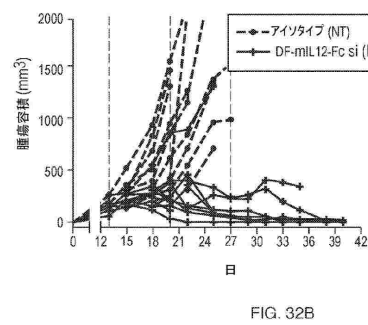
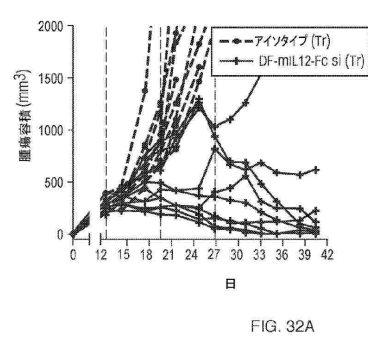
【図 31】



【図 30】



【図 32】



10

20

30

40

50

【図 3 3】

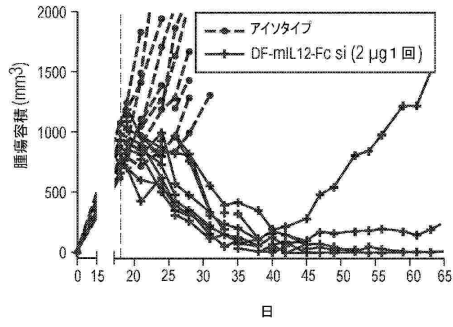


FIG. 33A

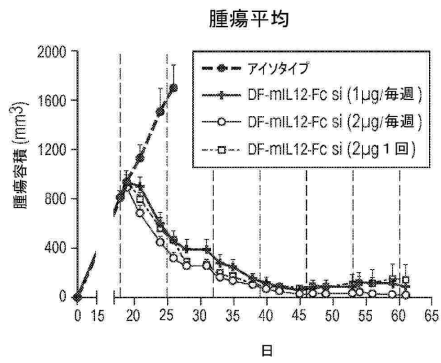


FIG.33B

【図 3 4】

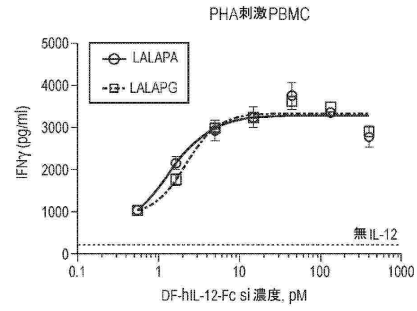


FIG. 34A

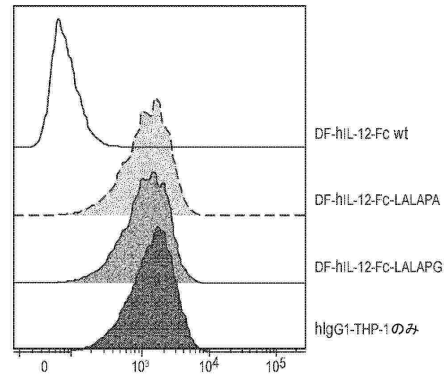


FIG. 34B

【配列表】

0007630426000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	39/02 (2006.01)	A 6 1 P	39/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
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	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	31/675 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068	
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	31/675	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
		C 0 7 K	19/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/749,489

(32)優先日 平成30年10月23日(2018.10.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/827,347

(32)優先日 平成31年4月1日(2019.4.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/895,889

(32)優先日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

レイン 2 5 番

(72)発明者 ジャンーマリー・キューニコ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州サマービル、タワー・コート 5 番、アパートメント・ナンバー 4

(72)発明者 アシャ・グリーンバーグ

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州レキシントン、フォーレン・ロード 3 7 番

(72)発明者 エバ・グティエレス

アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州ウォルサム、ヒルクレスト・ストリート 6 7 番

(72)発明者 ウィリアム・ヘイニー

アメリカ合衆国 0 1 7 7 8 マサチューセッツ州ウェイランド、リンカーン・ロード 6 1 番

(72)発明者 ニコライ・ヴァクトマン

アメリカ合衆国 0 1 7 4 2 マサチューセッツ州コンコード、モニュメント・ストリート 1 7 7 6 番

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

特開 2 0 1 8 - 0 9 3 8 7 9 (J P, A)

特表 2 0 1 6 - 5 1 6 0 5 6 (J P, A)

特表 2 0 1 5 - 5 0 5 8 1 3 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 3 0 8 0 6 (W O, A 1)

特表 2 0 1 4 - 5 0 6 7 9 3 (J P, A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 2 7 9 5 (J P, A)

JUNG, K., et al., "Heterodimeric Fc-fused IL12 shows potent antitumor activity by generating memory CD8+ T cells.", ONCOIMMUNOLOGY, 2018年03月06日, Vol.7, No.7, e1438800 (pp.1-13), DOI: 10.1080/2162402X.2018.1438800

LO, M., et al., "Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2017年03月03日, Vol.292, No.9, pp.3900-3908, DOI: 10.1074/jbc.M116.767749

HA, J.-H., et al., "Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: From design to applications in therapeutic antibodies and proteins.", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 2016年, Vol.7, 394 (pp.1-16), DOI: 10.3389/fimmu.2016.00394

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d