

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-526794  
(P2011-526794A)

(43) 公表日 平成23年10月20日(2011.10.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 61 K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 B 0 6 5
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 0 8 4
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	4 H 0 4 5
C 07 K 16/00 (2006.01)	C 07 K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-516891 (P2011-516891)	(71) 出願人	511001758 エマージェント プロダクト デベロップ メント シアトル, エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, リサーチ ブルバード 2273, スイート 400
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月25日 (2011.2.25)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/049616	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(87) 國際公開番号	W02010/003118	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開日	平成22年1月7日 (2010.1.7)		
(31) 優先権主張番号	61/134,091		
(32) 優先日	平成20年7月2日 (2008.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/134,090		
(32) 優先日	平成20年7月2日 (2008.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/134,089		
(32) 優先日	平成20年7月2日 (2008.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TGF- $\beta$  アンタゴニスト多重標的結合性分子

## (57) 【要約】

本開示は、TGF アンタゴニストドメインと、異種標的 (IL 6、IL 10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGF など) に対してアンタゴニスト作用を有するかまたは異種標的 (GITR など) に対してアゴニスト作用を有する別の結合ドメインとから構成される多重標的融合タンパク質を提供する。また、この多重特異性融合タンパク質は、これらの結合ドメインを分離し、二量体化を可能にする介在ドメインも含むことができる。また、本開示は、これらの多重特異性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、これらの融合タンパク質の組成物、ならびにこれらの多重特異性融合タンパク質および組成物を使用する方法も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ末端からカルボキシ末端までに、以下の構造のうちの1つを有する多重特異性融合タンパク質：

- (a) B D - I D - E D,
- (b) E D - I D - B D、または
- (c) E D 1 - I D - E D 2

[式中、

E D は、T G F アンタゴニストであり、E D 1 と E D 2 とは、異なるアンタゴニストであり、E D 1 または E D 2 は、T G F アンタゴニストであり、

I D は、介在ドメインであり、そして

B D は、T N F アンタゴニスト、I L 6 アンタゴニスト、I L 1 0 アンタゴニスト、V E G F アンタゴニスト、H G F アンタゴニスト、I G F アンタゴニストまたはG I T R アゴニストである]。

## 【請求項 2】

前記結合ドメインが、免疫グロブリン可変結合ドメインである、請求項 1 に記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 3】

前記外部ドメインが、受容体リガンドドメインである、請求項 1 または 2 に記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 4】

前記介在ドメインが、以下の構造：- L 1 - C H 2 C H 3 -

[式中、

L 1 は、免疫グロブリンヒンジリンカーであって、場合により、第 1 システインが異なるアミノ酸で置換されているI g G 1 ヒンジであり、

- C H 2 C H 3 - は、I g G 1 のF c ドメインのC H 2 C H 3 領域であって、場合により、突然変異させて、F c R n の相互作用は保持されるが、F c R I - I I I の相互作用が除かれている]

を有する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 5】

前記B D が、第 1 のリンカーによって前記介在ドメインに接続しており、前記 E D が、第 2 のリンカーによって前記介在ドメインに接続しており、前記第 1 および前記第 2 のリンカーは、同じであってもまたは異なっていてもよい、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 6】

前記第 1 および前記第 2 のリンカーが、配列番号 4 9 7 ~ 6 0 4 および 1 2 2 3 ~ 1 2 2 8 から選択され、場合により、前記第 1 リンカーが、配列番号 5 7 6 であり、前記第 2 リンカーが配列番号 1 2 2 3 である、請求項 5 に記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 7】

配列番号 7 3 5 ~ 7 4 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の多重特異性融合タンパク質。

## 【請求項 8】

1 つまたは複数の請求項 1 から 7 のいずれかに記載の多重特異性融合タンパク質、および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物。

## 【請求項 9】

前記多重特異性融合タンパク質が、前記組成物において二量体または多量体として存在する、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の多重特異性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 1】**

発現制御配列に作動可能に連結している請求項 1 0 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

**【請求項 1 2】**

請求項 1 1 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 1 3】**

悪性の状態を有する被験体を治療するための方法であって、治療有効量の請求項 1 から 9 のいずれかに記載の多重特異性融合タンパク質またはその組成物を投与する工程を含む方法。

**【請求項 1 4】**

前記悪性の状態が、乳癌、腎細胞癌、メラノーマまたは前立腺癌である、請求項 1 3 に記載の方法。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本開示は、一般に、多重標的結合性分子およびそれらの治療的適応の分野、より具体的には、形質転換増殖因子 - ベータ (TGF) アンタゴニストドメインと IL 6、IL 10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGF 1 もしくは IGF 2 などの異種標的に対してアンタゴニスト作用を有する別の結合ドメイン、または TGF アンタゴニストドメインと GITR などの異種標的に対してアゴニスト作用を有する別の結合ドメインのいずれかから構成される融合タンパク質、ならびにそれらの組成物および治療上の使用に関する。

20

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

形質転換増殖因子 - ベータ (TGF) は、免疫系において顕著な作用を有する強力なサイトカインである。免疫系における TGF の主要な機能は、寛容および外来病原体に対する初期の免疫応答を維持することである。哺乳動物において、TGF の 3 つのアイソフォーム、すなわち、TGF 1、TGF 2 および TGF 3 が同定されており、TGF 1 が、主要なアイソフォームである。TGF は、潜伏性型で分泌され、分泌された TGF 全部のうち、わずかなパーセントのみが、生理的状態下で活性化されるに過ぎない。TGF の生物学的作用は大部分、TGF の、受容体 ALK 5 および TGF 受容体 II (TGF R 2) への結合を通して生じる。具体的には、活性な TGF 二量体が、ALK 5 と TGF R 2 との四量体複合体に結合して、細胞のシグナル伝達を開始する。ALK 5 は、TGF の最初の結合には必要でないが、シグナル伝達には必要である。

30

**【0 0 0 3】**

TGF は、細胞の増殖、分化、細胞間および細胞 - マトリックス間の接着、細胞の運動性、ならびにリンパ球の活性化などの多くの細胞機能に影響を及ぼすことが示されている。(免疫応答の調節における TGF の役割の総説については、Liら (2006 年) *Annu. Rev. Immunol.* 24 巻 : 99 ~ 146 頁を参照されたい) さらに、TGF は、骨粗鬆症、高血圧、アテローム動脈硬化、肝硬変ならびに腎臓、肝臓および肺の線維性疾患などの多くの疾患の進行や腫瘍の進行を誘導または媒介するとも考えられている。TGF は、慢性炎症によって引き起こされる終末器官の傷害を増大させる恐れがあり、TGF アンタゴニストは、糖尿病性腎臓疾患、糸球体腎炎、シクロスリン媒介型腎臓損傷および全身性エリテマトーデス (SLE) などの疾患の動物モデルにおいて、この傷害を減弱させるのに有効であることが示されている (Borderら (1990 年) *Nature* 346 巻 : 371 ~ 374 頁; Borderら (1992 年) *Nature* 360 巻 : 361 ~ 364 頁; Isakaら (1999 年) *Kidney Int.* 55 巻 : 465 ~ 475 頁; Sharmaら (1996 年) *Diabetes* 45 巻 : 522 頁; Xingら (2004 年) *Transplantation* 15

40

50

巻：1433頁；Benigniら（2003年）J. Am. Soc. Nephrol. 14巻：1816頁）。癌に関しては、TGF- $\beta$ は、悪性の細胞に対して直接的な阻害活性を示すことができ、様々な腫瘍増殖因子および脈管形成因子の產生または活性を増大させることができる。

【0004】

TGF- $\beta$ ノックアウトマウスが、制御されない炎症および自己免疫に関連する重篤な病態を示すが、TGF- $\beta$ アンタゴニストの投与は、マウスおよびヒトにおいて忍容性良好である（Rusekら（2003年）Immunopharmacol. Immunotoxicol. 25巻：235～57頁；Dentonら（2007年）Arthritis Rheum. 56巻：323～33頁）。当技術分野で公知の、TGF- $\beta$ アンタゴニストを使用する治療方法は、TGF- $\beta$ に対する抗体の使用、TGF- $\beta$ R2外部ドメインIg融合タンパク質の使用、およびTGF- $\beta$ R1キナーゼ（TGF- $\beta$ R1 kinase）活性の小型分子阻害剤の使用を含む。これらの方は全て、疾患のげっ歯類モデルまたはヒトの臨床治験において、中程度の有益な影響を示している（Dentonら（2007年）Arthritis Rheum. 56巻：323頁）。実際に、マウスにおけるTGF- $\beta$ アンタゴニストの連続使用からは、TGF- $\beta$ -/-ノックアウトマウスの表現型から予想されるであろう免疫系の活性化の証拠は示されない。このことは、ヒト疾患におけるサイトカイン、インターロイキン、ケモカインおよび増殖因子の生物学の複雑な性質、ならびに2つ以上の経路を同時に阻害して、患者にとっての利益を最大化するための要件を部分的に反映している可能性が高い。10 20

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】図1A～Cは、ELISAにより測定されるように、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つを含有する多重特異性（Xceptor）融合タンパク質が、ハイパーIL6と特異的に結合し、これら多重特異性融合タンパク質が、IL6およびIL6R単独よりもハイパーIL6と優先的に結合することを示す図である。試験した2種の融合タンパク質だけがIL6と結合し、sIL6Rとは1つも結合しなかった。

【図1B】図1A～Cは、ELISAにより測定されるように、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つを含有する多重特異性（Xceptor）融合タンパク質が、ハイパーIL6と特異的に結合し、これら多重特異性融合タンパク質が、IL6およびIL6R単独よりもハイパーIL6と優先的に結合することを示す図である。試験した2種の融合タンパク質だけがIL6と結合し、sIL6Rとは1つも結合しなかった。30

【図1C】図1A～Cは、ELISAにより測定されるように、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つを含有する多重特異性融合タンパク質が、ハイパーIL6と特異的に結合し、これら多重特異性融合タンパク質が、IL6およびIL6R単独よりもハイパーIL6と優先的に結合することを示す図である。試験した2種の融合タンパク質だけがIL6と結合し、sIL6Rとは1つも結合しなかった。

【図2】図2は、ELISAにより測定されるように、様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つと融合したTNFR外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、TNF- $\alpha$ と結合することを示す図である。

【図3】図3は、ELISAにより測定されるように、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つを含有する多重特異性融合タンパク質が、ハイパーIL6およびTNF- $\alpha$ と同時に結合できることを示す図である。

【図4】図4は、ELISAにより測定されるように、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパーIL6結合ドメインの1つを含有する多重特異性融合タンパク質が、gp130をハイパーIL6との結合からブロックすることを示す図である。

【図5A】図5Aおよび5Bは、TNFR外部ドメインと融合した様々な異なるハイパー

10

20

30

40

50

I L 6 結合ドメインの 1 つを含有する多重特異性融合タンパク質が、T F - 1 細胞の、(A) I L 6 誘導性増殖または(B)ハイパー I L 6 誘導性増殖をブロックすることを示す図である。

【図 5 B】図 5 A および 5 B は、T N F R 外部ドメインと融合した様々な異なるハイパー I L 6 結合ドメインの 1 つを含有する多重特異性融合タンパク質が、T F - 1 細胞の、(A) I L 6 誘導性増殖または(B)ハイパー I L 6 誘導性増殖をブロックすることを示す図である。

【図 6】図 6 は、E L I S A により測定されるように、T N F R 外部ドメインと融合した様々な異なるハイパー I L 6 結合ドメインの 1 つを含有する多重特異性融合タンパク質が、T N F - 1 を T N F R との結合からブロックすることを示す図である。 10

【図 7】図 7 は、様々な異なるハイパー I L 6 結合ドメインの 1 つと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、L 9 2 9 細胞の T N F - 1 誘導性死滅をブロックすることを示す図である。

【図 8】図 8 は、E L I S A により測定した、様々な異なるハイパー I L 6 結合ドメインの 1 つと融合した T G F R 2 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、T G F 1 と結合することを示す図である。

【図 9】図 9 は、T G F R I I 外部ドメインと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、H T 2 細胞の I L 4 による増殖の T G F - 1 誘導性阻害をブロックすることを示す図である。 20

【図 10】図 10 は、I L 6 結合ドメインと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、H e p G 2 (肝) 細胞と結合しなかったことを示す図である。

【図 11】図 11 は、I L 6 結合ドメインと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、マウスにおける H I L 6 - 誘導性 S A A 応答をブロックすることを示す図である。 30

【図 12】図 12 は、I L 6 結合ドメインと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質が、マウスにおける H I L 6 誘導性 s g p 1 3 0 応答をブロックしたことを見た図である。

【図 13】図 13 A および B は、I L 6 結合ドメインと融合した T N F R 外部ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質の、それぞれ投与 2 時間後および 24 時間後の、マウスにおける T N F 誘導性 S A A 応答をブロックする能力に関する研究の結果を示す図である。 40

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0 0 0 6】

本開示は、多重特異性融合タンパク質を提供し、これを、本明細書では x c e p t o r 分子と呼ぶ。そのような多重特異性融合タンパク質の例示的な構造は、N - B D - I D - E D - C、N - E D - I D - B D - C、および N - E D 1 - I D - E D 2 - C [式中、N - および - C はそれぞれ、アミノ末端およびカルボキシ末端を表し、B D は、免疫グロブリン様または免疫グロブリン可変領域の結合ドメインであり、I D は、介在ドメインであり、かつ E D は、外部ドメイン(例えば、細胞外ドメイン)、例として、受容体リガンド結合ドメイン、システインに富むドメイン(A ドメイン; W O 0 2 / 0 8 8 1 7 1 および W O 0 4 / 0 4 4 0 1 1 を参照されたい)、セマフォリンまたはセマフォリン様のドメインなどである]を含む。いくつかの構築物中では、I D は、第 1 の結合ドメインと第 2 の結合ドメインとの間に配置された免疫グロブリンの定常領域またはそのサブ領域を含むことができる。その上さらなる構築物中では、B D および E D がそれぞれ、同じまたは異なるリンカー(例えば、1 ~ 50 個のアミノ酸を含むリンカー)、例として、(例えば、上部領域およびコア領域から構成される)免疫グロブリンヒンジ領域もしくはその機能性変異体、またはレクチンのドメイン間領域もしくはその機能性変異体、または分化抗原群(cluster of differentiation) (C D) 分子の茎領域もしくはその機能性変異体を介して、I D に連結されている。 50

## 【0007】

本開示をより詳細に記載する前に、本明細書において使用しようとする特定の用語の定義を提供することによって、本開示の理解を助けることができる。追加の定義も、本開示の全体を通して記載する。

## 【0008】

本記載においては、任意の濃度の範囲、パーセントの範囲、割合の範囲、または整数の範囲は、別段の記載がない限り、列挙する範囲に属する任意の整数値、および適宜、その分数（例として、ある整数の10分の1および100分の1）を含むと理解されたい。また、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚さなどの任意の物理的特性に関する、本明細書に列挙する任意の数の範囲は、別段の記載がない限り、列挙する範囲に属する任意の整数を含むと理解されたい。本明細書で使用する場合、「約（about）」または「から本質的になる（consisting essentially of）」は、別段の記載がない限り、表示する範囲、値または構造の±20%を意味する。本明細書で使用する場合、用語「a」および「a n」は、列挙する構成成分のうちの「1つまたは複数」を指すと理解されるべきである。選択肢（例えば、「または（or）」）の使用は、選択肢のうちの1つ、両方、またはそれらの任意の組合せのうちのいずれかを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用する場合、用語「含む（include）」と「含む（comprise）」とは、同義語として使用する。さらに、本明細書に記載する構造および置換基の種々の組合せから得られる個々の化合物または化合物群は、それぞれの化合物または化合物群が、個々に記載されているのと同じ程度で本出願によって開示されると理解されるべきである。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本開示の範囲に属する。

10

20

30

## 【0009】

本開示に従う「結合ドメイン」または「結合領域」は、例えば、生物学的分子（例えば、TGFもしくはIL6）、あるいは安定であっても一過性であっても、2つ以上の同じまたは異なる分子の複合体、または集合体もしくは凝集体（例えば、IL6/IL6R複合体）を特異的に認識し、それに結合する能力を有する任意のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドまたはペプチドであってよい。そのような生物学的分子として、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、アミノ酸、もしくはそれらの誘導体、脂質、脂肪酸、もしくはそれらの誘導体；炭水化物、糖類、もしくはそれらの誘導体；ヌクレオチド、ヌクレオシド、ペプチド核酸、核酸分子、もしくはそれらの誘導体；糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、リポタンパク質、プロテオリピド、もしくはそれらの誘導体；例えば、生物学的試料中に存在し得るその他の生物学的分子；またはそれらの任意の組合せが挙げられる。結合領域は、生物学的分子にかまたはその他の目的の標的に対しての、任意の天然に存在する、合成の、半合成の、または組換えにより產生された結合パートナーを含む。ウエスタンプロット、ELISAまたはBiacore解析を含めて、特定の標的と特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための多様なアッセイが公知である。

## 【0010】

本開示の結合ドメインおよびそれらの融合タンパク質が、標的分子に、例えば、約10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>11</sup> M<sup>-1</sup>、10<sup>12</sup> M<sup>-1</sup>または10<sup>13</sup> M<sup>-1</sup>以上の親和性またはK<sub>a</sub>（すなわち、1/Mの単位で示す、特定の結合相互作用の平衡結合定数）で結合する場合、それらは、標的に、「特異的または選択的に結合する」ことを含めて、所望の程度で結合を可能にできることを示す。一方、試験試料中に存在するその他の構成成分に顕著に結合するとはない。「高い親和性の」結合ドメインは、少なくとも10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>、少なくとも10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>、少なくとも10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>、少なくとも10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>、少なくとも10<sup>11</sup> M<sup>-1</sup>、少なくとも10<sup>12</sup> M<sup>-1</sup>、または少なくとも10<sup>13</sup> M<sup>-1</sup>以上のK<sub>a</sub>を有する結合ドメインを指す。あるいは、親和性を、Mの単位で示す、特定の結合相互作用の平衡解離定数（K<sub>d</sub>）（例えば、10<sup>-5</sup> M ~ 10<sup>-13</sup> M）と定義することもできる。本開

40

50

示に従う結合ドメインのポリペプチドおよび融合タンパク質の親和性は、従来の技法を使用して容易に決定することができる（例えば、Scatchardら（1949年）Ann. N. Y. Acad. Sci. 51巻：660頁；および米国特許第5,283,173号；第5,468,614号；Biacore（登録商標）解析；または均等物を参照されたい）。

#### 【0011】

本開示の結合ドメインは、本明細書の記載に従ってまたは当技術分野で公知の多様な方法（例えば、米国特許第6,291,161号；第6,291,158号を参照されたい）によって生成することができる。供給源として、ヒト、ラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダもしくはラマに由来する；Hamer - Castermanら（1993年）Nature、363巻：446頁、およびNguyenら（1998年）J. Mol. Biol.、275巻：413頁）、サメ（Rouxら（1998年）Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95巻：11804頁）、魚（Nguyenら（2002年）Immunogenetics、54巻：39頁）、げっ歯類、トリ、ヒツジを含めた、種々の種に由来する抗体の遺伝子配列（これらは、ファージライブラリーなどにおいて、抗体、sFv、scFvもしくはFabとしてフォーマットすることができる）、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列、またはフィブリノーゲンドメイン（例えば、Weiselら（1985年）Science 230巻：1388頁を参照されたい）、クニッソドメイン（例えば、米国特許第6,423,498号を参照されたい）、リポカリンドメイン（例えば、WO 2006/095164を参照されたい）、V様ドメイン（例えば、米国特許出願公開第2007/0065431号を参照されたい）、C型レクチンドメイン（ZelenksyおよびGreedy（2005年）FEBS J. 272巻：6179頁）、mAb<sup>2</sup>、もしくはFcab（商標）（例えば、PCT特許出願公開第WO 2007/098934号；第WO 2006/072620号を参照されたい）などの代替の非抗体骨格のループ領域に工学的に作製される多様なアミノ酸をコードする配列などが挙げられる。さらに、好都合な系（例えば、マウス、HuMAbマウス（登録商標）、TCマウス（商標）、KM-マウス（登録商標）、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど）において、ヒトIL6/IL6R複合体またはHyper-IL6（ペプチドリンカーによってIL6RにつなげられたIL6）などの合成単鎖IL6/IL6R複合体を免疫原として使用する、ハイブリドーマを開発するための伝統的な戦略を使用して、本開示の結合ドメインを開発することもできる。

#### 【0012】

抗体技術に関して当業者によって理解されている用語はそれぞれ、本明細書において明確に定義しない限り、当技術分野で与えられている意味を有する。例えば、用語「V<sub>L</sub>」および「V<sub>H</sub>」はそれぞれ、抗体の軽鎖および重鎖に由来する可変結合領域を指す。可変結合領域は、「相補性決定領域」（CDR）および「フレームワーク領域」（FR）として知られている個別の明確に定義されたサブ領域から構成される。用語「C<sub>L</sub>」および「C<sub>H</sub>」はそれぞれ、「免疫グロブリン定常領域」、すなわち、抗体の軽鎖および重鎖に由来する定常領域を指し、後者の領域は、その領域が由来する抗体のアイソタイプ（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）に応じて、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>およびC<sub>H4</sub>の定常領域ドメインにさらに分割可能であると理解されている。定常領域ドメインの一部がFc領域（「結晶化可能なフラグメント（fragment crystallizable）」領域）を構成し、この領域は、ADCC（抗体依存性細胞媒介型細胞傷害性）、ADCP（抗体依存性細胞媒介型食作用）、CDC（補体依存性細胞傷害性）、および補体結合、Fc受容体に対する結合、in vivoにおける、Fc領域を欠くポリペプチドと比べてより長い半減期、プロテインA結合性、ならびに正におそらく胎盤移行（Caponら（1989年）Nature、337巻：525頁を参照されたい）などの免疫グロブリンのエフェクター機能に関与するドメインを含有する。さらに、Fc領域を含有するポリペプチドは、ポリペプチドの二量体化または多量体化も可能にする。「ヒンジ領域」は、本明細書においては「リンカー」とも呼び、抗体の単鎖の可変結合領域と定常領

域との間に挿入され、それらを接続するアミノ酸配列であり、これは、ヒンジの形態をとって、抗体、または抗体様分子に可動性をもたらすことが当技術分野では公知である。

【0013】

抗原結合ドメインおよびエフェクター機能を付与するドメインは、免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスの間で交換することができるところから、免疫グロブリンのドメイン構造は工学的に作製しやすい。免疫グロブリンの構造および機能が、例えば、Harlowら編、Antibodies: A Laboratory Manual、Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、1988年) に概説されている。広範な序論、および組換え抗体技術の全ての態様に関する詳細な情報を、教科書Recombinant Antibodies (John Wiley & Sons、NY、1999年) に見出すことができる。詳細な抗体工学の実験室プロトコールの包括的なコレクションを、R. KontermannおよびS. Duebel編、The Antibody Engineering Lab Manual (Springer Verlag、Heidelberg / New York、2000年) に見出すことができる。

10

【0014】

本明細書で使用する場合、「誘導体」は、化合物の化学的または生物学的に改変した別形(version)であって、親化合物に構造的に類似し、その親化合物から(実際または理論的に)誘導可能である別形を指す。一般に、親化合物は、「誘導体」を生成するための出発材料であり得、一方、「類似体」を生成するためには、親化合物を出発材料として必ずしも使用するとは限らない場合がある点で、「誘導体」は、「類似体」とは異なる。類似体は、親化合物とは異なる化学的または物理的な特性を示す場合がある。例えば、誘導体は、親化合物と比較して、より親水性である場合もあり、または変化した反応性を示す場合(例えば、標的にに対する親和性を変化させるアミノ酸の変化を有するCDR)もある。

20

【0015】

用語「生物学的試料」は、被験体または生物学的供給源に由来する血液試料、生検検体、組織外植片、器官培養物、生物学的液体、あるいは任意のその他の組織もしくは細胞またはその他の調製物を含む。被験体または生物学的供給源は、例えば、ヒトまたは非ヒト動物、初代細胞培養物、または染色体に組み込まれたもしくはエピソーム性の組換え核酸配列を含有し得る遺伝子操作された細胞系、体細胞ハイブリッド細胞系、不死化したもしくは不死化可能な細胞系、分化したもしくは分化可能な細胞系、形質転換細胞系などを含めた、培養馴化細胞系(culture adapted cell line)であつてよい。本開示のさらなる実施形態では、被験体または生物学的供給源は、悪性の疾患、障害もしくは状態またはB細胞の障害を含めた、疾患、障害または状態を有することが疑われる場合、あるいはそれらを有する危険性がある場合がある。特定の実施形態では、被験体または生物学的供給源は、過剰増殖疾患、炎症性疾患または自己免疫疾患を有する疑いがある場合、またはそれらを有する危険性がある場合があり、本開示の特定のその他の実施形態では、被験体または生物学的供給源は、そのような疾患、障害または状態のリスクも、そのような疾患、障害または状態の存在も有さないことが知られている場合がある。

30

【0016】

特定の実施形態では、本開示は、TGFと、IL6、IL6R、IL6/IL6R複合体、IL10、GITR、VEGF、TNF、HGF、腫瘍壞死因子様の、アポトーシスの弱い誘導物質(TWEAK; また、腫瘍壞死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー12、TNFSF12としても公知である)、IGF1またはIGF2などのTGF以外の第2の標的との両方に結合する多重特異性融合タンパク質を提供することによって、異常なGF活性と関連がある細胞の枯渇または調節を可能にする。特定の実施形態では、多重特異性融合タンパク質は、第1および第2の結合ドメイン、第1および第2のリンカー、ならびに介在ドメインを含み、介在ドメインの一方の末端が、リンカーを

40

50

介して、TGF-R2外部ドメイン（例えば、細胞外ドメイン）である第1の結合ドメインに融合し、そして他方の末端が、リンカーを介して、第2の結合ドメインに融合している。いくつかの実施形態では、TGF-R2外部ドメイン全体の一部を利用する。具体的には、TGFのアンタゴニストとして機能するかまたはリガンド結合性を付与する、外部ドメイン内部のドメインを利用する。

【0017】

特定の実施形態では、第2の結合ドメインは、IL6アンタゴニスト（例として、IL6、IL6RまたはIL6/IL6Ra複合体に対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域）、IL10アンタゴニスト（例として、IL10に対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、IL10R1外部ドメイン（例えば、配列番号745）またはIL10R1外部ドメインのサブドメイン）、GITRアゴニスト（例として、GITRに対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、GITRL外部ドメイン（例えば、Genbank受託番号NP\_005083.2、配列番号746のアミノ酸74～181）またはGITRL外部ドメインのサブドメイン）、VEGFアンタゴニスト（例として、VEGFに対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、VEGFR2外部ドメイン（Genbank受託番号NP\_002244.1、配列番号747を参照されたい）またはVEGFR2外部ドメインのサブドメイン）、TNFアンタゴニスト（例として、TNFに対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、TNFR1外部ドメイン（Genbank受託番号NP\_001056.1；配列番号749を参照されたい）、TNFR1外部ドメインのサブドメイン、TNFR2外部ドメイン（Genbank受託番号NP\_001057.1；配列番号748を参照されたい）またはTNFR2外部ドメインのサブドメイン）、HGFアンタゴニスト（例として、HGFに対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、c-Met外部ドメインまたはc-Met外部ドメインのサブドメイン（例えば、配列番号750～752））、TWEAKアンタゴニスト（例として、TWEAKもしくはTWEAKRに対して特異性を示す免疫グロブリン結合ドメイン、またはTWEAKR外部ドメイン（例えば、配列番号761）もしくはそのTWEAK結合断片）、それとも、IGF1アンタゴニストあるいはIGF2アンタゴニスト（例として、IGF1またはIGF2に対して特異性を示す免疫グロブリン可変領域、IGF1R外部ドメイン（例えば、Genbank受託番号NP\_000866.1（配列番号753）のIGF1R外部ドメインまたはそのサブドメイン）、あるいはIGFBP（例えば、Genbank受託番号NP\_000587.1（IGFBP1；配列番号754）、NP\_000588.2（IGFBP2；配列番号755）、NP\_001013416.1（IGFBP3アイソフォームa；配列番号756）、NP\_000589.2（IGFBP3アイソフォームb；配列番号757）、NP\_001543.2（IGFBP4；配列番号758）、NP\_000590.1（IGFBP5；配列番号759）もしくはNP\_002169.1（IGFBP6；配列番号760）のIGFBP外部ドメイン）またはそのサブドメイン）である。

【0018】

本明細書では、膜または可溶性のIL6受容体（IL6R）とのIL6の複合体を、膜IL6Rまたは可溶性IL6R（sIL6R）のいずれかとのIL6の複合体を指す場合には、IL6xRと呼び、sIL6RとのIL6の複合体のみを指す場合には、sIL6xRと呼ぶ。いくつかの実施形態では、IL6xRに対して特異性を示す結合ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質は、以下の特性のうちの1つまたは複数を示す：（1）IL6xR複合体に対して、IL6もしくはIL6R単独に対してと比べて、同等以上の親和性を示すか、またはIL6R単独またはIL6xR複合体に対して、IL6単独に対してと比べて、より大きい親和性を示す；（2）sIL6xR複合体との結合について、膜gp130と競合するか、または可溶性gp130のsIL6xR複合体との結合を増強する；（3）IL6のシス-シグナル伝達よりも、IL6のトランス-シグナル伝達を優先的に阻害する；および（4）IL6以外のgp130ファミリーサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。

10

20

30

40

50

## TGF アンタゴニスト

上記で概要を述べたように、TGF は、線維症、自己免疫および癌などのいくつかの疾患に関連付けられている。腫瘍の発生の早期においては、TGF は、増殖阻害因子として作用する。しかし、腫瘍が発達するにつれて、TGF の増殖阻害特性を逃れる機構を発達させ、その結果、腫瘍の侵襲性の増加、転移の可能性の増加、および周囲の免疫応答の阻害が生じる (Luworら (2008年) *J. Clin. Neurosci.* 15(10): 1125-1130)。

6月10日(電子出版)。本開示のTGF アンタゴニストは、TGF の腫瘍促進活性を阻害する。このアンタゴニストドメインは、TGF の二量体化およびTGF 結合性を遮断する場合もあり、または、このドメインが、受容体系の構成成分に結合し、リガンド活性の阻害もしくは受容体複合体の集合の阻止のいずれかによって、活性を遮断する場合もある。

## 【0019】

いくつかの実施形態では、TGF アンタゴニストは、TGF R2 の細胞外ドメイン(「外部ドメイン」)であつてよい。特定の実施形態では、TGF アンタゴニストは、配列番号743、744に記載のTGF R2 外部ドメインまたはそれらの任意の組合せを含む。

## 【0020】

一態様では、本開示のTGF アンタゴニストまたはその融合タンパク質は、TGF に対して特異性を示し、約  $10^{-5}$  M ~  $10^{-13}$  M またはそれ未満の解離定数 ( $K_d$ ) を有する親和性を示す。特定の実施形態では、TGF アンタゴニストまたはその融合タンパク質は、約 300 pM 未満の親和性で TGF に結合する。別の尺度、すなわち、本明細書では  $k_{off}$  とも呼ぶ速度論的解離 ( $k_d$ ) が、複合体の解離速度、したがって、本開示のポリペプチド結合ドメインが結合している標的分子の「滞留時間」の尺度となる。 $k_d$  ( $k_{off}$ ) は、1 / 秒の単位を有する。本開示の例示的な TGF アンタゴニストは、約  $10^{-4}$  / 秒(例えば、約 1 日) ~ 約  $10^{-8}$  / 秒またはそれ未満の  $k_{off}$  を有することができる。特定の実施形態では、 $k_{off}$  は、約  $10^{-1}$  / 秒、約  $10^{-2}$  / 秒、約  $10^{-3}$  / 秒、約  $10^{-4}$  / 秒、約  $10^{-5}$  / 秒、約  $10^{-6}$  / 秒、約  $10^{-7}$  / 秒、約  $10^{-8}$  / 秒、約  $10^{-9}$  / 秒または約  $10^{-10}$  / 秒以下の範囲に及ぶことができる (Graff ら (2004年) *Protein Eng. Des. Sel.* 17 卷 : 293 頁を参照されたい)。いくつかの実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストまたはその融合タンパク質は、TGF に結合する同族の TGF 受容体と比較して、TGF に、より高い親和性で結合し、より低い  $k_{off}$  速度を有する。さらなる実施形態では、TGF の二量体化またはその他の細胞表面活性を遮断するかまたは変化させる本開示のTGF アンタゴニストまたはその融合タンパク質は、同族の TGF 受容体の親和性および二量体化速度と比較して、より中等度の親和性(すなわち、約  $10^{-8}$  M ~ 約  $10^{-9}$  M の  $K_d$ )、およびより中等度の  $off$  速度(すなわち、約  $10^{-4}$  / 秒付近の  $k_{off}$ )を有する場合がある。

## 【0021】

本開示の、TGF アンタゴニストとして機能する例示的な結合ドメインを、本明細書の記載に従つてまたは当技術分野で公知の多様な方法(例えば、米国特許第6,291,161号、第6,291,158号を参照されたい)によって生成することができる。供給源として、ヒト、ラクダ科(ラクダ、ヒトコブラクダもしくはラマに由来する; Hamers-Casterman ら (1993年) *Nature*、363卷: 446 頁、および Nguyen ら (1998年) *J. Mol. Biol.*、275卷: 413 頁)、サメ(Roux ら (1998年) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95卷: 11804 頁)、魚(Nguyen ら (2002年) *Immunogenetics*、54卷: 39 頁)、げっ歯類、トリ、ヒツジを含めた、種々の種に由来する抗体の遺伝子配列(これらは、ファージライブラリーなどにおいて、scFv もしくは Fab としてフォーマットすることができる)、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列、またはフィブリノーゲンドメイン(例えば、Weisell ら (1985年) *Sc* 10 卷: 50 頁を参照されたい)。

ience 230巻: 1388頁を参照されたい)、クニッツドメイン(例えば、米国特許第6,423,498号を参照されたい)、リポカリンドメイン(例えば、WO 2006/095164を参照されたい)、V様ドメイン(例えば、米国特許出願公開第2007/0065431号を参照されたい)、C型レクチンドメイン(ZelenksyおよびGreedy(2005年)FEBSSJ. 272巻: 6179頁)などの代替の非抗体骨格のループ領域中に工学的に作製される多様なアミノ酸をコードする配列などが挙げられる。さらに、好都合な系(例えば、マウス、HuMAbマウス(登録商標)、TCマウス(商標)、KM-マウス(登録商標)、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど)において、合成TGF または単鎖のTGF R2外部ドメインを免疫原として使用する、ハイブリドーマを開発するための伝統的な戦略を使用して、本開示の結合ドメインを開発することもできる。

10

#### 【0022】

例示的な例では、断片のFabファージライブラリー(例えば、Ho et al.(2005年)Nature Biotechnol. 23巻: 344頁を参照されたい)を使用して、(GenBank受託番号NP\_000651.3に記載のアミノ酸配列もしくはその断片を使用した)合成もしくは組換えのTGF に対する結合についてスクリーニングすることによって、TGF に対して特異性を示す、本開示のTGF アンタゴニストを同定することができる。本明細書に記載するまたは当技術分野で公知のTGF を、そのようなスクリーニングのために使用することができる。特定の実施形態では、TGF アンタゴニストを生成するために使用するTGF は、本明細書に記載するように、介在ドメインまたは二量体化ドメイン、例として、免疫グロブリンFcドメインまたはその断片をさらに含むことができる。

20

#### 【0023】

いくつかの実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストドメインは、本明細書に記載するV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインは、げっ歯類(例えば、マウス、ラット)、ヒト化またはヒトである。さらなる実施形態では、1つもしくは複数の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)または1つもしくは複数の重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)または両方のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%または少なくとも100%同一である配列を有し、各CDRが、本明細書に示す通り、最大3つのアミノ酸の変化を有する(すなわち、変化のうちの多くがフレームワーク(複数可)領域中にある)本開示のTGF アンタゴニストドメインを提供する。

30

#### 【0024】

さらなる実施形態では、本開示のTGF アンタゴニストドメインは、本明細書に記載するV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとを含み、これらは、そのようなV<sub>H</sub>ドメイン、V<sub>L</sub>ドメインまたは両方のアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも99.5%同一であり、各CDRが多くて最大3つのアミノ酸の変化を有する(すなわち、変化のうちの多くがフレームワーク領域(複数可)中にある)。

40

#### 【0025】

2つ以上のポリペプチドまたは核酸分子の配列の文脈においては、用語「同一の」または「パーセント同一性」は、手作業による整列によるか、または目視検査による、配列比較アルゴリズムなどの当技術分野で公知の方法を使用して測定して、比較ウインドウまたは指定領域にわたる最大の一一致について比較および整列を行う場合に、同じである2つ以上の配列もしくはサブ配列、または特定の領域にわたり、同じであるアミノ酸残基もしく

50

はヌクレオチドの特定のパーセントを有する（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である）2つ以上の配列もしくはサブ配列を意味する。例えば、パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適した好ましいアルゴリズムは、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschulら（1977年）Nucleic Acids Res. 25巻：3389頁、およびAltschulら（1990年）J. Mol. Biol. 215巻：403頁に記載されている。

#### 【0026】

これらまたは本明細書に記載するその他の実施形態のうちのいずれにおいても、V<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインは、いずれの配向にも配置することができ、本明細書に開示する約5個～約30個のアミノ酸のリンカーまたはこれら2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合するスペーサー機能をもたらすことができる任意のその他のアミノ酸配列によって分離することができる。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとをつなぐリンカーは、配列番号497～604および1223～1228に記載のアミノ酸配列、例として、リンカー47（配列番号543）またはリンカー80（配列番号576）を含む。多重特異性結合ドメインは、ラクダ抗体の構成に類似する少なくとも2つの特異的なサブ結合ドメイン、またはより従来型の哺乳動物抗体の対形成するV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖の構成に類似する少なくとも4つの特異的なサブ結合ドメインを有する。

#### 【0027】

さらなる実施形態では、本開示のTGFアンタゴニストドメインおよびそれらの融合タンパク質は、1つもしくは複数の相補性決定領域（「CDR」）または1つもしくは複数のそのようなCDRの複数コピーを含む結合ドメインを含むことができ、これらのCDRは、抗TGFもしくは抗TGF R2のscFv断片もしくはFab断片の可変領域からか、またはその重鎖もしくは軽鎖の可変領域から、入手、誘導または設計されている。

#### 【0028】

当技術分野において、CDRは、Kabatの定義、Chothiaの定義、AbMによる定義、および接觸による定義（contact definition）を含めた、当技術分野における種々の方法によって定義されている。Kabatの定義は、配列の変動性に基づいており、CDR領域を予測するために最も一般的に使用されている定義である（Johnsonら（2000年）Nucleic Acids Res. 28巻：214頁）。Chothiaの定義は、構造ループ領域の位置に基づいている（Chothiaら（1986年）J. Mol. Biol. 196巻：901頁；Chothia（1989年）Nature 342巻：877頁）。AbMによる定義は、Kabatの定義とChothiaの定義との間の折衷であり、Oxford Molecular Group製の抗体構造のモデル化についてのプログラムの一体形の組（integral suite）である（Martinら（1989年）Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 86巻：9268頁；Reesら、ABMTM、a computer program for modeling variable regions of antibodies、Oxford、UK；Oxford Molecular, Ltd.）。接觸による定義として公知の追加の定義は、最近になって導入されたものであり（MacCallumら（1996年）J. Mol. Biol. 5巻：732頁を参照されたい）、これは、入手可能な複合体の結晶構造の解析に基づいている。

#### 【0029】

慣例により、重鎖のCDRドメインを、H1、H2およびH3と呼び、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かう順に順次に番号が付けられている。CDR-H1は、約10～12残基の長さであり、Chothiaの定義およびAbMによる定義に従えば、Cysの後の4残基目から始まるか、またはKabatの定義に従えば、5残基後から

10

20

30

40

50

始まる。H1には、Trp、Trp-Val、Trp-IleまたはTrp-Alaが続くことができる。H1の長さは、AbMによる定義に従えば、およそ10~12残基であり、一方、Chothiaの定義では、最後の4残基が除外される。CDR-H2は、Kabatの定義およびAbMによる定義に従えば、H1の末端の後の15残基目から始まり、これには、一般に配列Leu-Glu-Trp-Ile-Gly（しかし、いくつかの変動が公知である）が先行し、一般に配列Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phen/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Alaが続く。Kabatの定義に従えば、H2の長さは約16~19残基であり、一方、AbMによる定義では、この長さは9~12残基であることが予測されている。CDR-H3は通常、H2の末端の後の33残基目から始まり、これには、一般に、アミノ酸配列Cys-Ala-Argが先行し、アミノ酸Glyが続き、CDR-H3は、3~約25残基の範囲に及ぶ長さを有する。

10

## 【0030】

慣例により、軽鎖のCDR領域を、L1、L2およびL3と呼び、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かう順に順次に番号が付けられている。CDR-L1は一般に、残基24あたりから始まり、一般にCysに続く。CDR-L1の後の残基は常にTrpであり、これから、以下の配列のうちの1つが始まる：Trp-Tyr-Gln、Trp-Leu-Gln、Trp-Phen-Gln、またはTrp-Tyr-Leu。CDR-L1の長さは、およそ10~17残基である。CDR-L2は、L1の末端の後の16残基目あたりから始まり、一般に、残基Ile-Tyr、Val-Tyr、Ile-LysまたはIle-Phenに続く。CDR-L2は、約7残基の長さである。CDR-L3は通常、L2の末端の後の33残基目から始まり、一般にCysに続き、CDR-L3には一般に配列Phen-Gly-XXX-Glyが続き、CDR-L3は、約7~11残基の長さを有する。本開示の結合ドメインは、抗TGFまたは抗TGF-R2の可変領域に由来する単一のCDRを含んでもよく、または同じであるかもしくは異なる場合がある複数のCDRを含んでもよい。

20

## 【0031】

したがって、本開示の結合ドメインは、抗TGFまたは抗TGF-R2の可変領域に由来する単一のCDRを含んでもよく、または同じであるかもしくは異なる場合がある複数のCDRを含んでもよい。特定の実施形態では、本開示の結合ドメインは、フレームワーク領域ならびにCDR1領域、CDR2領域およびCDR3領域を含むTGFまたはTGF-R2に対して特異性を示すV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとを含み、(a)V<sub>H</sub>ドメインは、重鎖CDR3のアミノ酸配列を含むか；または(b)V<sub>L</sub>ドメインは、軽鎖CDR3のアミノ酸配列を含むか；または(c)結合ドメインは、(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列と(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列とを含むか；もしくは結合ドメインは、(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列と(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列とを含み、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は同じ参照配列に見出される。さらなる実施形態では、本開示の結合ドメインは、フレームワーク領域ならびにCDR1領域、CDR2領域およびCDR3領域を含むTGFまたはTGF-R2に対して特異性を示すV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとを含み、(a)V<sub>H</sub>ドメインは、重鎖CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を含むか；または(b)V<sub>L</sub>ドメインは、軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を含むか；または(c)結合ドメインは、(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列と(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列とを含むか；もしくは結合ドメインは、(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列と(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列とを含み、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>アミノ酸配列は同じ参照配列に由来する。

30

## 【0032】

特異的なCDRを含む、本明細書に記載する実施形態のうちのいずれにおいても、結合ドメインは、(i)V<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であり、各CDRが多くて3つのアミノ酸の変化を有する（すなわち、変化のうちの多くがフレームワーク領域にある）アミノ酸配列を有するV<sub>H</sub>ドメイン；または(i) V<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%

40

50

、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %もしくは 9 9 %同一であり、 各 C D R が多くて 3 つのアミノ酸の変化を有する（すなわち、 变化のうちの多くがフレームワーク領域にある）アミノ酸配列を有する  $V_L$  ドメイン； または ( i i i ) ( i ) の  $V_H$  ドメインおよび ( i i ) の  $V_L$  ドメインの両方； もしくは  $V_H$  および  $V_L$  が同じ参照配列に由来する、 ( i ) の  $V_H$  ドメインおよび ( i i ) の  $V_L$  ドメインの両方を含むことができる。

#### 【 0 0 3 3 】

本開示の融合タンパク質の T G F アンタゴニストドメインは、 免疫グロブリン骨格などの免疫グロブリン様ドメインであってよい。 本開示が意図する免疫グロブリン骨格として、 s c F v、 ドメイン抗体または重鎖のみの抗体が挙げられる。 s c F v の場合、 本開示は、 結合性分子中のドメインまたは領域の被連結部分に適合することが当技術分野で公知である任意のリンカーペプチドによって、 重鎖および軽鎖の可変領域がつながっていることを意図する。 例示的なリンカーは、 G l y<sub>4</sub> S e r リンカーモチーフに基づくリンカー、 例として、 ( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>n</sub> [ 式中、 n = 1 ~ 5 ] である。 本開示の融合タンパク質の結合ドメインが、 非ヒト免疫グロブリンに基づくか、 または非ヒト C D R を含む場合、 結合ドメインは、 当技術分野で公知の方法に従って「ヒト化」することができる。

10

#### 【 0 0 3 4 】

あるいは、 本開示の融合タンパク質の T G F アンタゴニストドメインは、 免疫グロブリン骨格以外の骨格であってもよい。 本開示が意図するその他の骨格として、 機能性の立体構造をとる T G F 特異的 C D R ( 複数可 ) を提示する。 その他の意図する骨格として、 これらに限定されないが、 A ドメイン分子、 フィプロネクチン I I I ドメイン、 アンチカリン、 アンキリンリピートから工学的に作製された結合性分子、 アドネクチン、 クニツドメイン、 またはプロテイン A の Z ドメインの A f f i b o d y が挙げられる。

20

#### I L 6 アンタゴニスト

上記のように、 特定の実施形態では、 本開示は、 I L 6 アンタゴニストである（ 例えは、 優先的に、 I L 6 トランス - シグナル伝達を阻害するか、 または I L 6 シス - およびトランス - シグナル伝達の両方を阻害する ）結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。 特定の実施形態では、 本開示は、 以下の特性の 1 つまたは複数を有する I L 6 / I L 6 R 複合体に対して特異的な結合領域または結合ドメインを含有する、 多重特異性融合タンパク質を提供する： ( 1 ) I L 6 もしくは I L 6 R 単独と比較して I L 6 / I L 6 R 複合体に同等以上の親和性、 または I L 6 単独と比較して I L 6 R 单独もしくは I L 6 / I L 6 R 複合体に対してより大きな親和性を有する、 ( 2 ) s I L 6 / I L 6 R 複合体への可溶性 g p 1 3 0 の結合を増強する、 ( 3 ) I L 6 シス - シグナル伝達よりも I L 6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害する、 あるいは ( 4 ) I L 6 以外の g p 1 3 0 ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。 特定の好ましい実施形態では、 本開示による I L 6 / I L 6 R 複合体に対して特異的な結合ドメインは、 以下の特性を有する： ( 1 ) I L 6 単独と比較して I L 6 R 单独または I L 6 × R 複合体とのより大きな親和性、 ( 2 ) s I L 6 / I L 6 R 複合体への可溶性 g p 1 3 0 の結合性を増強する、 ( 3 ) I L 6 シス - シグナル伝達よりも I L 6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害する、 および ( 4 ) I L 6 以外の g p 1 3 0 ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。 例えば、 I L 6 / I L 6 R 複合体に特異的な結合領域または結合ドメインは、 免疫グロブリンの可変結合ドメインまたはその誘導体、 例えは抗体、 F a b、 s c F v などであることができる。 この開示との関連で、 I L 6 / I L 6 R 複合体に特異的な結合領域または結合ドメインは、 本明細書に記載の g p 1 3 0 でないことを理解すべきである。

30

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書で用いるように、「 I L 6 × R 複合体」 または「 I L 6 × R 」は、 I L 6 受容体との I L 6 の複合体を指し、 そこにおいて、 I L 6 受容体（ 例えは I L 6 R 、 I L 6 R A、 I L 6 R 1 および C D 1 2 6 としても公知である ）は膜タンパク質（ 本明細書で m

40

50

IL6RまたはmIL6Rと称する)または可溶性の形態(本明細書でsIL6RまたはsIL6Rと称する)である。用語「IL6R」は、mIL6RおよびsIL6Rの両方を包含する。一実施形態では、IL6xRは、IL6およびmIL6Rの複合体を含む。特定の実施形態では、IL6xR複合体は、1つまたは複数の共有結合を通して一緒に保持される。例えば、IL6Rのカルボキシ末端は、当技術分野でハイパーIL6として公知である、ペプチドリンカーを通してIL6のアミノ末端に融合させることができる(例えば、Fischerら(1997年)Nat. Biotechnol. 15巻:142頁を参照されたい)。ハイパーIL6リンカーは、架橋化合物、1~50個のアミノ酸配列、またはその組合せで構成することができる。ハイパーIL6は、二量体化ドメイン、例えば免疫グロブリンFcドメインもしくは免疫グロブリン定常ドメインサブ領域をさらに含むことができる。特定の実施形態では、IL6xR複合体は、非共有結合的相互作用を通して、例えば水素結合、静電的相互作用、ファンデルワールス力、塩橋、疎水性相互作用など、またはそれらの任意の組合せによって一緒に保持される。例えば、IL6およびIL6Rは、非共有結合で自然に結合することができ(例えば、天然に見られるように、または合成もしくは組換えタンパク質として)、または各々は、複合体の安定性をさらに高めるために、免疫グロブリンFcドメインなどの多量体化を促進するドメインに融合させることができる。

10

## 【0036】

本明細書で用いるように、「gp130」は、IL6xR複合体に結合するシグナル伝達タンパク質を指す。gp130タンパク質は、膜形態(mgp130)、可溶性形態(sgp130)またはそれらの任意の他の機能的形態であることができる。例示的なgp130タンパク質は、GenBank受託番号NP\_002175.2に記載の配列またはその任意の可溶性もしくは誘導体の形態を有する(例えば、Narazakiら(1993年)Blood 82巻:1120頁またはDiamondら(1997年)FEB S Lett. 412巻:379頁を参照されたい)。例示のために、そして理論によって縛られることを望まないが、mgp130タンパク質は、IL6/mILRまたはIL6/sILR複合体に結合することができるが、sgp130は主にIL6/sILR複合体に結合する(Schellerら(2006年)Scand. J. Immunol. 63巻:321頁を参照されたい)。したがって、本開示の結合ドメイン、またはその融合タンパク質の特定の実施形態は、IL6またはIL6R単独のいずれかよりも高い親和性でIL6xRに結合することによって、および好ましくはsIL6xR複合体がmgp130に結合するのと競合することによって、IL6xR複合体トランス-シグナル伝達を阻害することができる。本開示の結合ドメインは、(1)結合ドメインまたはその融合タンパク質が、sIL6xRへのgp130の結合を阻止し、そして結合ドメインが、sIL6xRとのgp130の結合と比較して同等以上の親和性でsIL6xRに結合するか、あるいは(2)結合ドメインまたはその融合タンパク質がsIL6xRへのsgp130の結合を強化または促進する場合に、gp130がsIL6xRへ結合するとの「競合する」。

20

30

## 【0037】

一態様では、本開示のIL6アンタゴニストは、IL6R単独よりも少なくとも2倍~1000倍高いIL6またはIL6xR複合体との親和性を有するか、あるいはIL6単独よりも少なくとも2倍~1000倍高いIL6RまたはIL6xR複合体との親和性を有する。IL6、IL6RまたはIL6xR複合体に結合することによって、本開示のIL6アンタゴニストは、IL6シス-およびトランス-シグナル伝達を優先的に阻害する。特定の実施形態では、IL6またはsIL6xR複合体に対する結合ドメインの親和性は、IL6xR複合体に対するgp130の親和性とほぼ同じであり、ここで「ほぼ同じ」は、同等のまたは最大約2倍まで高い親和性を意味する。特定の実施形態では、IL6、IL6RまたはIL6xR複合体に対する結合ドメインの親和性は、IL6xR複合体に対するgp130の親和性よりも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍

40

50

、少なくとも 10 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、1000 倍またはそれを超えて高い。例えば、IL6 × R 複合体に対する gp130 の親和性が約 2 nM ( 例えば、Gaillardら ( 1999 年 ) Eur. Cytokine Netw. 10 卷 : 337 頁を参照されたい ) である場合、IL6 × R 複合体に対して少なくとも 10 倍高い親和性を有する結合ドメインは約 0.2 nM 以下の解離定数 (  $K_d$  ) を有するであろう。

#### 【 0038 】

さらなる実施形態では、本開示の IL6 アンタゴニスト結合ドメインは、( a ) sIL6 × R 複合体に、IL6 または IL6R 単独のいずれかより少なくとも 2 倍、10 倍、25 倍、50 倍、75 倍 ~ 100 倍、100 倍 ~ 1000 倍高い親和性で結合し、そして ( b ) sIL6 × R 複合体への結合について膜 gp130 と競合するか、または sIL6 × R 複合体への可溶性 gp130 の結合を増強する、ポリペプチド配列を含む。さらなる実施形態では、sIL6 × R 複合体に、IL6 または IL6R 単独のいずれかより少なくとも 2 倍、10 倍、25 倍、50 倍、75 倍 ~ 100 倍、100 倍 ~ 1000 倍高い親和性で結合する本開示のポリペプチド結合ドメインは、( i ) IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達をより顕著にまたは優先的に阻害すること、( ii ) IL6 以外の gp130 サイトカインファミリー - メンバーのシグナル伝達を阻害しないこと、( iii ) IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害し、IL6 以外の gp130 ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を検出可能なに阻害しないこともでき、( iv ) これらの特性の 2 つ以上を有することができ、または ( v ) これらの特性の全てを有することができる。

10

20

30

40

#### 【 0039 】

特定の実施形態では、本開示のポリペプチド IL6 アンタゴニスト結合ドメインは、sIL6 × R 複合体に対して、IL6 または IL6R 単独のいずれかより少なくとも 2 倍 ~ 1000 倍高い親和性で結合し、IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達をより顕著にまたは優先的に阻害する。「 IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害する」ことは、sIL6 × R 活性は測定可能に低減するが、IL6 シス - シグナル伝達の減少は実質的に変更されない程度にトランス - シグナル伝達を変化させることを指す ( すなわち、阻害が最小限であるか、存在しないかまたは測定不能であることを意味する ) 。例えば、sIL6 × R 活性 ( 例えば、HepG2 細胞でのアンチキモトリプシン ( ACT ) の急性相発現 ) のバイオマーカーを測定して、トランス - シグナル伝達阻害を検出することができる。代表的なアッセイは、Jostockら ( Eur. J. Biochem. 2001 年 ) によって記載されている。簡潔には、HepG2 細胞を、sIL6 × R ( トランス - シグナル伝達 ) または IL6 ( シス - シグナル伝達 ) の存在下で刺激して ACT を過剰発現させることができるが、spg130 を加えることは、IL6 によって誘導される発現に実質的に影響せずに、sIL6 × R によって誘導される ACT の過剰発現を阻害する。同様に、IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害する本開示のポリペプチド結合ドメインは、sIL6 × R によって誘導される ACT の過剰発現を阻害する ( すなわち、トランス - シグナル伝達を阻害する ) が、IL6 によって誘導される発現に実質的に影響しない ( すなわち、シス - シグナル伝達を測定可能に減少させない ) 。このアッセイおよび当技術分野で公知である他のアッセイを用いて、IL6 シス - シグナル伝達よりも IL6 トランス - シグナル伝達の優先的阻害を測定することができる ( 例えば、Sporriら ( 1999 年 ) Int. Immunol. 11 卷 : 1053 頁、Miharaら ( 1995 年 ) Br. J. Rheum. 34 卷 : 321 頁、Chenら ( 2004 年 ) Immun. 20 卷 : 59 頁に記載の他のバイオマーカーを参照されたい ) 。

50

#### 【 0040 】

さらなる実施形態では、IL6 以外の gp130 ファミリーのサイトカインによるシグナル伝達は、本開示の結合ドメインポリペプチドまたはその多重特異性融合タンパク質によって実質的に阻害されない。例えば、gp130 を経る IL6 × R 複合体によるシス -

50

およびトランス-シグナル伝達は阻害されるが、白血病抑制因子 (LIF)、線毛神経向性因子 (CNTF)、神経ポイエチン (NPN)、カルジオトロフィン様サイトカイン (CLC)、オンコスタチンM (OSM)、IL-11、IL-27、IL-31、カルジオトロフィン-1 (CT-1) またはそれらの任意の組合せを経るシグナル伝達など、1つまたは複数の他のgp130ファミリーサイトカインによるシグナル伝達は、最小限に影響されるかまたは影響を受けない。

#### 【0041】

本開示の結合ドメインの好ましいin vivo半減期は、数日間または数週間のオーダーであるが、IL6およびsIL6の両方の生成は疾患状態で非常に上昇があるので、結合ドメイン濃度は低くてもよいが、標的は豊富であることができるることを、当業者は理解しよう（例えば、Luら（1993年）*Cytokine* 5巻：578頁を参照されたい）。したがって、特定の実施形態では、本開示の結合ドメインは、約10<sup>-5</sup>/秒（例えば、約1日）以下のk<sub>off</sub>を有する。特定の実施形態では、k<sub>off</sub>は、約10<sup>-1</sup>/秒から、約10<sup>-2</sup>/秒、約10<sup>-3</sup>/秒、約10<sup>-4</sup>/秒、約10<sup>-5</sup>/秒、約10<sup>-6</sup>/秒、約10<sup>-7</sup>/秒、約10<sup>-8</sup>/秒、約10<sup>-9</sup>/秒、約10<sup>-10</sup>/秒、またはそれ未満の範囲であってもよい。

10

#### 【0042】

例示的な実施例では、IL6またはIL6×R複合体に特異的な本開示の結合ドメインは、合成IL6×R複合体への結合についてスクリーニングすることによってFabファージの断片ライブラリーで同定された（Hoetら（2005年）*Nature Biotechnology* 23巻：344頁を参照されたい）。このスクリーニングのために用いられる合成IL6×R複合体は、N-IL6R（frag）-L1-IL6（frag）-L2-ID-Cの構造を含み、式中、Nはアミノ末端であり、Cはカルボキシ末端であり、IL6R（frag）は完全長IL6Rの断片であり、IL6（frag）はIL6の断片であり、L1およびL2はリンカーであり、IDは免疫グロブリンFcドメインなどの介在ドメインまたは二量体化ドメインである。

20

#### 【0043】

より具体的には、IL6×R複合体に特異的な結合ドメインを同定するために用いられるIL6×R（ハイパーIL6の形態）は、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の通りの構造を有する：（a）完全長タンパク質の最初の110個のアミノ酸および、カルボキシ末端部分（用いるアイソフォームに依存する（GenBank受託番号NP\_000556.1、アイソフォーム1またはNP\_852004.1、アイソフォーム2を参照されたい））を欠くIL6Rからの212個のアミノ酸の中央断片を、（2）G<sub>3</sub>Sのリンカーに融合し、次にそれを、（3）IL6の175個のアミノ酸のカルボキシ末端断片（すなわち、完全長タンパク質GenBank受託番号NP\_000591.1の最初の27個のアミノ酸を欠く）に融合し、次にそれを、（4）配列番号589に記載のIgG2Aヒンジであるリンカーに融合し、それを最後に、免疫グロブリンG1（IgG1）Fcドメインからなる二量体化ドメインに融合する。特定の実施形態では、IgG1Fcドメインからなる二量体化ドメインは、以下のアミノ酸の1つまたは複数が変異している（すなわち、その位置に異なるアミノ酸を有する）：位置234のロイシン（L234）、位置235のロイシン（L235）、位置237のグリシン（G237）、位置318のグルタミン酸（E318）、位置320のリシン（K320）、位置322のリシン（K322）、またはそれらの任意の組合せ（EU番号付け）。例えば、これらのアミノ酸のいずれか1つを、アラニンに変換することができる。さらなる実施形態では、IgG1Fcドメインは、L234、L235、G237、E318、K320およびK322（Kabat番号付けによる）の各々がアラニンに変異している（すなわち、それぞれL234A、L235A、G237A、E318A、K320AおよびK322A）。

30

#### 【0044】

一実施形態では、本開示のIL6アンタゴニスト結合ドメインを同定するために用いられるIL6×R複合体は、配列番号606に記載のアミノ酸配列を有する。特定の実施形

40

50

態では、IL6×R複合体に特異的な結合ドメインを含むポリペプチドであって、IL6×RがsIL6×Rであり、配列番号606に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドが提供される。さらなる実施形態では、IL6×R複合体に特異的な結合ドメインを含むポリペプチドは、(1)IL6もしくはIL6R単独に対する親和性と比較してIL6×R複合体に対して同等以上の親和性を有する、またはIL6単独に対する親和性と比較してIL6R単独もしくはIL6×R複合体に対してより大きな親和性を有するか、(2)sIL6×R複合体との結合について膜gp130と競合するか、またはsIL6×R複合体への可溶性gp130の結合を増強するか、(3)IL6シス-シグナル伝達よりもIL6トランス-シグナル伝達を優先的に阻害するか、あるいは、(4)IL6以外のgp130ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を阻害しないか、(5)特性(1)～(4)のうちの任意の組合せを有するか、あるいは(6)(1)～(4)の特性の全てを有する。本開示の結合ドメインを同定するために用いることができるか、または前記結合特性のいずれかを測定するための参照複合体として用いることができる他の例示的なIL6×R複合体が、例えば、米国特許出願公開第2007/0172458号、第2007/0031376号、および米国特許第7,198,781号、第5,919,763号に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【0045】

一部の実施形態では、本開示のIL6アンタゴニスト結合ドメインは、本明細書に記載のIL6、IL6RまたはIL6×R複合体、好ましくはヒトIL6、ヒトIL6RまたはヒトIL6×R複合体に特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、齧歯動物(例えば、マウス、ラット)のもの、ヒト化されたものまたはヒトのものである。IL6、IL6RまたはIL6×Rに特異的なそのようなV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む結合ドメインの例を、それぞれ配列番号435～496および373～434に記載する。さらなる実施形態では、IL6×Rに特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、そこにおいて、それぞれ配列番号373～434および435～496に記載のように、結合ドメインは、1つまたは複数の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)のアミノ酸配列に、または1つまたは複数の重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)に、またはその両方に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも100%同一である配列を含み、各CDRは、最大で3つのアミノ酸変化を有する(すなわち、変化の多くは1つまたは複数のフレームワーク領域内に見られる)。

## 【0046】

さらなる実施形態では、本開示の結合ドメインは、それぞれ配列番号435～496および373～434に記載の、IL6×Rに特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含み、それらは、そのようなV<sub>H</sub>ドメイン、V<sub>L</sub>ドメイン、または両方のアミノ酸配列に少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であり、各CDRは、0、1、2または3個のアミノ酸変化を有する。例えば、本開示のV<sub>H</sub>ドメイン、V<sub>L</sub>ドメインまたは両方のアミノ酸配列は、結合ドメインTRU6-1002(配列番号608を参照されたい)を含む例示的なxceptor分子からの、それぞれV<sub>H</sub>ドメイン(例えば、アミノ酸512～636)、V<sub>L</sub>ドメイン(例えば、アミノ酸652～759)、または両方のアミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少

くとも 99.5% 同一であることができ、そこにおいて、各 CDR は、0、1、2 または 3 個のアミノ酸変化を有する。

【0047】

本明細書に記載のこれらのまたは他の実施形態のいずれかでは、V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインは、いずれの向きにも配置することができ、本明細書に開示される最大で約 10 個のアミノ酸リンカーで、または 2 個のサブ結合ドメインの相互作用に適合するスペーサー機能を提供することができる他の任意のアミノ酸配列で分離されてもよい。特定の実施形態では、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを結合するリンカーは、リンカー 47 (配列番号 543) またはリンカー 80 (配列番号 576) のように、配列番号 497 ~ 604 および配列番号 1223 ~ 1228 に記載のアミノ酸配列を含む。

10

【0048】

さらなる実施形態では、本開示の IL6 アンタゴニスト結合ドメインは、抗 IL6、抗 IL6R または抗 IL6xR 複合体の scFv または Fab 断片の可変領域から、あるいはその重鎖または軽鎖可変領域から得られたか、誘導されたかまたは設計された、1つまたは複数の相補性決定領域 (「CDR」)、または 1 つまたは複数のそのような CDR の複数のコピーを含むことができる。したがって、本開示の結合ドメインは、IL6 または抗 IL6xR の可変領域からの単一の CDR を含むことができ、またはそれは、同じであってもまたは異なってもよい複数の CDR を含むことができる。特定の実施形態では、本開示の IL6 アンタゴニスト結合ドメインは、フレームワーク領域ならびに CDR1、CDR2 および CDR3 領域を含む V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含み、そこにおいて、(a) V<sub>H</sub> ドメインは、配列番号 435 ~ 496 のいずれか 1 つで見られる重鎖 CDR3 のアミノ酸配列を含み、または (b) V<sub>L</sub> ドメインは、配列番号 373 ~ 434 のいずれか 1 つで見られる軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列を含み、または (c) 結合ドメインは (a) の V<sub>H</sub> アミノ酸配列および (b) の V<sub>L</sub> アミノ酸配列を含み、または結合ドメインは (a) の V<sub>H</sub> アミノ酸配列および (b) の V<sub>L</sub> アミノ酸配列を含み、そこにおいて、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> は同じ参照配列中に見られる。さらなる実施形態では、本開示の結合ドメインは、フレームワーク領域ならびに CDR1、CDR2 および CDR3 領域を含む IL6xR 複合体に特異的な V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含み、そこにおいて、(a) V<sub>H</sub> ドメインは、配列番号 435 ~ 496 のいずれか 1 つで見られる重鎖 CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を含み、または (b) V<sub>L</sub> ドメインは、配列番号 373 ~ 434 のいずれか 1 つで見られる軽鎖 CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を含み、または (c) 結合ドメインは (a) の V<sub>H</sub> アミノ酸配列および (b) の V<sub>L</sub> アミノ酸配列を含み、または結合ドメインは (a) の V<sub>H</sub> アミノ酸配列および (b) の V<sub>L</sub> アミノ酸配列を含み、そこにおいて、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> アミノ酸配列は同じ参照配列に由来する。IL6、IL6R または IL6xR 複合体に対する例示的な軽鎖および重鎖可変ドメインの CDR を、それぞれ配列番号 1 ~ 186 および 1187 ~ 1192、ならびに 187 ~ 372 および 1193 ~ 1198 で提供する。

20

【0049】

IL6 アンタゴニスト軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 373 ~ 434 および 1199 ~ 1204 で提供し、それぞれ対応する重鎖可変領域を配列番号 435 ~ 496 および 1205 ~ 1210 で提供する。

30

【0050】

IL6、IL6R または IL6xR に対する特異的 CDR を含む本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、結合ドメインは、(i) 配列番号 435 ~ 496 のいずれか 1 つで見られる V<sub>H</sub> ドメインのアミノ酸配列と、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列を有する V<sub>H</sub> ドメイン、または (ii) 配列番号 373 ~ 434 のいずれか 1 つで見られる V<sub>L</sub> ドメインのアミノ酸配列と、少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列を有する V<sub>L</sub> ドメイン、または (iii) (i) の V<sub>H</sub> ドメインおよび (

40

50

i i ) の  $V_L$  ドメインの両方、または  $V_H$  および  $V_L$  が同じ参照配列に由来する、( i ) の  $V_H$  ドメインおよび( i i ) の  $V_L$  ドメインの両方を含むことができる。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、本開示の結合ドメインは、免疫グロブリン骨格などの免疫グロブリン様ドメインであってもよい。本開示で意図される免疫グロブリン骨格には、s c F v 、F a b 、ドメイン抗体または重鎖のみの抗体が含まれる。さらなる実施形態では、抗 I L 6 もしくは抗 I L 6 × R 抗体( 例えは、マウスまたはラットなどのヒト以外、キメラ、ヒト化、ヒトの抗体 ) 、またはそれ配列番号 4 3 5 ~ 4 9 6 、ならびに 3 7 3 ~ 4 3 4 のいずれか 1 つに記載の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインのアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 % 、8 5 % 、9 0 % 、9 1 % 、9 2 % 、9 3 % 、9 4 % 、9 5 % 、9 6 % 、9 7 % 、9 8 % 、9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する F a b 断片もしくは s c F v 断片が提供され、それらは以下の特性の 1 つまたは複数を有することもできる：( 1 ) I L 6 もしくは I L 6 R 単独に対する親和性と比較して I L 6 × R 複合体に対して同等以上の親和性、または I L 6 単独に対する親和性と比較して I L 6 R 単独もしくは I L 6 × R 複合体に対してより大きな親和性を有するか、( 2 ) s I L 6 × R 複合体との結合について膜 g p 1 3 0 と競合するか、または s I L 6 × R 複合体への可溶性 g p 1 3 0 の結合を増強するか、( 3 ) I L 6 シス - シグナル伝達よりも I L 6 トランス - シグナル伝達を優先的に阻害するか、あるいは( 4 ) I L 6 以外の g p 1 3 0 ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。そのような抗体、F a b または s c F v は、本明細書に記載の方法のいずれかで用いることができる。特定の実施形態では、本開示は、I L 6 アンタゴニスト( すなわち、I L 6 シス - およびトランス - シグナル伝達を阻害することができる ) である結合ドメインを含むポリペプチドを提供する。さらなる実施形態では、本開示による I L 6 アンタゴニストは、I L 6 以外の g p 1 3 0 ファミリーのサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。例示的な I L 6 アンタゴニストには、I L 6 または I L 6 × R に特異的な結合ドメイン、例えは免疫グロブリン可変結合ドメインまたはその誘導体( 例えは、抗体、F a b 、s c F v など ) が含まれる。

【 0 0 5 2 】

あるいは、本開示の結合ドメインは、免疫グロブリン以外の骨格の一部であってもよい。意図される他の骨格には、A ドメイン分子、フィブロネクチン I I I ドメイン、アンチカリン、アンキリンリピートを工学的に作製された結合分子、アドネクチン、クニッツドメインまたはプロテイン A の Z ドメインアフィボディ( a f f i b o d y ) が含まれる。I L 1 0 アンタゴニスト

特定の実施形態では、本開示は、I L 1 0 アンタゴニストである( すなわち、I L 1 0 シグナル伝達を阻害することができる ) 結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的な I L 1 0 アンタゴニストには、I L 1 0 または I L 1 0 R 1 に特異的な結合ドメイン、例えは免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体( 例えは、抗体、F a b 、s c F v など ) 、または I L 1 0 R 1 外部ドメインが含まれる。

【 0 0 5 3 】

I L 1 0 は、アルファ - らせん構造を共有するサイトカインスーパーファミリーのメンバーである。実験的証拠は存在しないが、全てが 6 つのアルファ - らせんを有することが示唆されている( F i c k e n s c h e r , H . ら、2 0 0 2 年、 T r e n d s I m m u n o l . 2 3 卷 : 8 9 頁 ) 。 I L 1 0 は 4 つのシスティンを有し、その内 1 つだけがファミリーメンバーの間で保存されている。 I L 1 0 はその二量体化に寄与する V 字形の折たたみを証明しているので、この構造にジスルフィド結合は重要でないようである。 I L 1 0 へのファミリーメンバーのアミノ酸同一性は、2 0 % ( I L - 1 9 ) ~ 2 8 % ( I L - 2 0 ) の範囲である( D u m o u t e r ら、2 0 0 2 年、 E u r . C y t o k i n e N e t w . 1 3 卷 : 5 頁 ) 。

【 0 0 5 4 】

I L 1 0 は、T h 1 細胞による I F N - および G M - C S F サイトカイン生成を阻害した、マウスにおける T h 2 サイトカインとして最初に記載された( M o o r e ら、2 0

10

20

30

40

50

01年、*Ann. Rev. Immunol.* 19巻: 683頁、Fiorentinolら、1989年、*J. Exp. Med.* 170巻: 2081頁)。

【0055】

ヒトIL10は、長さが178アミノ酸であり、18アミノ酸のシグナル配列および160アミノ酸の成熟セグメント、および約18kDa(モノマー)の分子量を有する。ヒトIL10は可能性のあるN連結グリコシル化部位を含まず、グリコシル化されていない(Dumouterら、2002年、*Eur. Cytokine Netw.* 13巻: 5頁、Vieiraら、1991年、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88巻: 1172頁)。それは、2つの鎖内ジスルフィド結合を形成する4つのシステイン残基を含む。ヒトIL10のらせんA~Fの長さは、それぞれ、21、8、19、20、12および23アミノ酸である。1つのモノマーのらせんA~Dは、第2のモノマーのらせんEおよびFと非共有結合的に相互作用して、非共有結合性のV字形ホモダイマーを形成する。機能的領域は、IL10分子上にマッピングされている。N末端では、前らせんA残基番号1~9は肥満細胞増殖に関与するが、C末端では、らせんF残基番号152~160は白血球分泌および化学走性を媒介する。

【0056】

IL10を発現することが公知である細胞には、CD8+T細胞、ミクログリア、CD14+(CD16+ではない)単球、Th2 CD4+細胞(マウス)、ケラチノサイト、肝臓の星状細胞、Th1およびTh2のCD4+T細胞(ヒト)、黒色腫細胞、活性化マクロファージ、NK細胞、樹状細胞、B細胞(CD5+およびCD19+)ならびに好酸球が含まれる。

【0057】

T細胞において、IFN-ガンマ生成のIL10による阻害の最初の観察は、今では補助細胞によって媒介される間接作用であると考えられている。しかし、T細胞に対するさらなる作用には以下のものが含まれる: IL10誘導性のCD8+T細胞化学走性、IL-8に向かってのCD4+T細胞化学走性の阻害、活性化に続くIL-2生成の抑制、Bcl-2上方制御を通してのT細胞アポトーシスの阻害、ならびにB7/CD28同時刺激が付随する弱い抗原曝露に続くT細胞増殖の妨害(Akdisら、2001年、*Immunology* 103巻: 131頁)。

【0058】

B細胞では、IL10は関連するが異なるいくつもの機能を有する。TNF-およびCD40Lと共同して、IL10はナイーブ(IgD+)B細胞で、IgA生成を誘導する。TGF-/CD40Lはクラススイッチを促進するが、IL10は分化および増殖を開始すると考えられている。TGF-が存在しない場合、IL10は、IgG1およびIgG3(ヒト)の誘導においてCD40Lと協力し、したがってIgGサブタイプの直接のスイッチ因子であり得る。IL10は、IL-4によって誘導されるIgE分泌に対して様々な作用を有する。IL-4によって誘導されるクラススイッチの時にIL10が存在する場合、それはその作用を逆転させる。IgE関与(commitment)の後にそれが存在する場合、それはIgE分泌を増強する。IL10の存在下でのCD27/CD70相互作用は、記憶B細胞からのプラズマ細胞の形成を促進する(Agemaitsら、1998年、*Blood* 91巻: 173頁)。

【0059】

肥満細胞およびNK細胞も、IL10によって影響される。肥満細胞に対し、IL10はGM-CSFおよびTNF-放出をブロックしつつ、ヒスタミン放出を誘導する。IL10はラットでは肥満細胞によって放出されることが公知であるので、この作用はオートクリンであるかもしれない。その多面的(pleiotrophic)性質の証拠として、IL10はNK細胞に対して反対の作用を及ぼす。TNF-およびGM-CSF生成をブロックするよりは、実際には、IL10はNK細胞においてこの機能を促進する。さらに、それはIL-2によって誘導されたNK細胞増殖を強化し、IL-18によって刺激されたNK細胞におけるIFN-分泌を促進する。IL-12および/またはIL

10

20

30

40

50

- 18 の両方と協力して、IL-10 は NK 細胞の細胞傷害性を強化する (Caiら、1999年、Eur. J. Immunol. 29巻: 2658頁)。

【0060】

IL-10 は、好中球に対する明らかな抗炎症効果を有する。それはケモカインMIP-1、MIP-1 および IL-8 の分泌を阻害し、炎症性媒介物質IL-1 および TNF- の生成をブロックする。さらに、それは、スーパーオキシドを生成する好中球の能力を低下させ、その結果 PMN によって媒介される抗体依存性細胞傷害を妨害する。IL-10 は、おそらく CXCR1 を通して、IL-8 および fMLP によって誘導される化学走性もブロックする (Vicicissoら、1998年、Eur. Cytokine Network. 9巻: 247頁)。

10

【0061】

樹状細胞 (DC) に対して、IL-10 は一般に免疫抑制作用を示す。それは、DC を犠牲にして CD14+マクロファージ分化を促進するようである。食作用中、マクロファージは貧弱な抗原提示細胞である。IL-10 は、T 細胞 (特に Th1 型細胞に対して) を刺激する DC の能力を低下させるようである。文献中のデータが相反しているので、IL-10 がどのようにこれを達成するかは不明である。MHC-II 発現と比較して、それは下方制御されるか、不变であるか、または上方制御されることがある (Sharmaら、1999年、J. Immunol. 163巻: 5020頁)。B7-1/CD80 に関して、IL-10 はその発現を上方制御または下方制御する。B7-2/CD86 は、T 細胞の活性化で重要な役割を演ずる。この分子に対して、IL-10 は上方制御および下方制御の両方に関与する。しかし、おそらく最も重要な調節は、CD40 で起こる (IL-10 はその発現を低下させるようである)。局所のレベルでは、IL-10 は、炎症性サイトカインに応じるランゲルハンス細胞移動を阻害することによって、免疫賦活をブロックすることができる。あるいは、IL-10 は、CCR1、CCR2 および CCR5 の下方制御および CCR7 の上方制御を通常含む、炎症によって誘導される DC 成熟段階をブロックする。この妨害により、CCR1、CCR2 および CCR5 の停滞 (retention) を伴い、DC が局所リンパ節に移動できなくなる。結果は、T 細胞を刺激しないが、それに応答することなく炎症性ケモカインに結合 (および除去) する、不動の DC である (D-Amicic ら、2000年 Nat. Immunol. 1巻: 387頁)。

20

【0062】

単球に対して、IL-10 はいくつかの実証された作用を及ぼす。例えば、IL-10 は細胞表面のMHC-II 発現を明らかに低下させるようである。それは、刺激の後に IL-12 の生成も阻害する。それは、M-CSF と共同して単球からマクロファージへの移行を促進するが、マクロファージの表現型は明白でない (すなわち CD16+/細胞傷害性対 CD16-)。IL-10 は単球の GM-CSF 分泌および IL-8 の生成も減少させ、一方では IL-1ra の放出を促進する (Gessner ら、1997年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻: 14620頁)。結合組織構成要素のヒアルロネクチンは、今では IL-10 に応じて単球によって分泌されることが公知である。これは、細胞移動、特にヒアルロネクチンが細胞外間隙を通しての細胞移動を妨害することが公知である腫瘍細胞転移において、なんらかの重要性を有するかもしれない (Gessner ら、1997年)。

30

【0063】

ヒト IL-10R1 は、限られた数の細胞型で発現される、90~110 kDa の、1回貫通型の I 型膜貫通糖タンパク質である (Liu ら、1994年、J. Immunol. 152巻: 1821頁)。脾臓、骨格筋、脳、心臓および腎臓では、弱い発現が見られる。胎盤、肺および肝臓は中間レベルの発現を示したが、単球、B 細胞、大顆粒リンパ球および T 細胞は高レベルを発現する (Liu ら、1994年)。発現されるタンパク質は、21 アミノ酸のシグナルペプチド、215 アミノ酸の細胞外領域、25 アミノ酸の膜貫通セグメントおよび 317 アミノ酸の細胞質ドメインを含む、578 アミノ酸のタンパク質である。細胞外領域に 2 つの FNIII モチーフ、および、細胞質ドメインに STA

40

50

T3ドッキング部位に加えてJAK1結合領域がある(Kotenkoら、2000年、Oncogene 19巻:2557頁、Kotenkoら、1997年、EMBO J. 16巻:5894頁)。IL10R1は、約200pMのKdでヒトIL10に結合する。

#### 【0064】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、IL10またはIL10R1に特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、齧歯動物(例えば、マウス、ラット)のもの、ヒト化されたものまたはヒトのものである。IL10に特異的なそのようなV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む結合ドメインの例には、米国特許出願公開第2007/0178097A1号に開示のものが含まれるが、それらに限定されない。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、例えば配列番号745に示すIL10R1外部ドメイン、またはその断片を含むこともできる。さらなる実施形態では、IL10に特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、そこにおいて、結合ドメインは、配列番号745のアミノ酸配列、または配列番号745のアミノ酸22~401に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも100%同一である配列を含み、ポリペプチド結合ドメインはIL10に結合して、その活性を阻害する。

#### GITRアゴニスト

特定の実施形態では、本開示は、GITRアントゴニストである(すなわち、GITRシグナル伝達を増加させることができる)結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的なGITRアントゴニストには、GITRまたはGTRLに特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体(例えば、抗体、Fab、scFvなど)、またはGTRL外部ドメインが含まれる。

#### 【0065】

グルココルチコイドによって誘導される腫瘍壞死因子受容体(GITR;AITRとしても公知である)は、I型膜貫通タンパク質およびTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである(Nocentiniら、(2007年)Eur. J. Immunol. 37巻:1165~9頁)。細胞質ドメインは、4-1BBおよびCD27の細胞質ドメインと相同意を有する。GITRは末梢血T細胞、骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節で発現され、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節T細胞で構成的に発現される(Kwonら、(2003年)Exp. Mol. Med. 35巻:13頁)。さらに、それはナチュラルキラー(NK)細胞において低レベルで構成的に発現され、Toll様受容体リガンドまたはIL-15のいずれかによる刺激の際に誘導される(Liuら、(2008年)J. Biol. Chem. 283巻:8202頁)。

#### 【0066】

GITRの発現は、T細胞の活性化の後に増加する。GITRの活性化は、エフェクタ-Tリンパ球を同時活性化し、調節T細胞活性を調節する。そのリガンドGTRLへのGITRの結合は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>エフェクターT細胞を、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節T細胞の阻害作用に対して耐性にすることが示されている。

#### 【0067】

GITRリガンド(GTRL)は、II型膜タンパク質である。それは、長さが173アミノ酸であり、20kDaの推定分子量を有する。25~28kDaの実験による分子量は、グリコシル化を示唆するものである。GTRLは抗原提示細胞(APC)で発現され、ヒト臍静脈内皮細胞で構成的に発現される(Nocentiniら、同上)。しかし、それは休止または刺激されたT細胞、B細胞系または末梢血単核細胞では発現されない。

#### 【0068】

GITR/GTRL系は、腫瘍およびウイルス感染に対する耐性を高めることが示さ

10

20

30

40

50

れている（Nocentiniら、同上）。具体的には、抗GITRモノクローナル抗体DTA-1は、調節T細胞依存性抑制を阻害し、T細胞応答を高めることが示された。マウスでのDTA-1の投与は、B16黒色腫腫瘍の拒絶を誘導した。GITRは、自己免疫／炎症過程にも関与し、白血球溢出も調節する。GITR-/-マウスは、炎症性疾患状態への感受性の低下を示し、炎症でのGITRの正の役割を示す。

#### 【0069】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、GITRまたはGITRLに特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、齧歯動物（例えば、マウス、ラット）のもの、ヒト化されたものまたはヒトのものである。GITRに特異的なそのようなV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む結合ドメインの例には、米国特許出願公開第2007/0098719A1号に開示のものが含まれるが、それらに限定されない。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、GITRL外部ドメイン（例えばGenbank受託NP\_005083.2（配列番号746）のアミノ酸74～181）またはその断片を含むこともできる。さらなる実施形態では、GITRに特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、前記結合ドメインは、配列番号746のアミノ酸74～181に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも100%同一である配列を含み、前記ポリペプチド結合ドメインはGITRに結合して、その活性を高める。

10

20

#### VEGFアンタゴニスト

特定の実施形態では、本開示は、VEGFアンタゴニスト（すなわち、VEGFシグナル伝達を阻害することができる）である結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的なVEGFアンタゴニストには、VEGFまたはVEGFR2に特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体（例えば、抗体、Fab、scFvなど）、またはVEGFR2外部ドメインが含まれる。

30

#### 【0070】

血管内皮増殖因子（VEGFまたはVEGF-A）は、新脈管形成および脈管形成で重要な役割を演ずる、進化の過程で保存されたホモ二量体糖タンパク質および強力な内皮細胞特異的マイトジエンである（Leeら（2007年）PLOS Medicine 6巻：1101～1116頁）。VEGFは、新脈管形成に必要不可欠な様々な細胞内シグナル伝達および生理的応答、例えば細胞内Ca<sup>2+</sup>流入、化学走性（移動）、プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体およびコラゲナーゼの発現、ならびに血管透過性を誘導する。その生物学的作用は、主に内皮細胞で発現される2つの高親和性受容体チロシンキナーゼ、すなわちVEGF受容体1（VEGFR1）および2（VEGFR2）を通して引き出される。

40

#### 【0071】

VEGFAは、ジスルフィド結合によって連結されるホモダイマーである、分泌タンパク質である。それは、P1GFとのヘテロダイマーとしても見出される。VEGFA mRNAの選択的スプライシングは、ヒトのVEGFA121、VEGFA145、VEGFA165、VEGFA189およびVEGFA206、ならびにマウスのVEGFA120、VEGFA164およびVEGFA188を含む、様々なアイソフォームをもたらす。1つのVEGFAアイソフォームだけを発現する遺伝子操作マウスの研究は、これらのマウスでの組織特異血管欠損が表すように、VEGFアイソフォームが血管の発達および機能において、異なるが、幾分重複する役割を有することを示す。VEGFアイソフォームは、ニューロピリシンおよびヘパラン硫酸へのVEGFA120結合を含まないがVEGFA165およびVEGFA188との受容体結合を含む、それらの生化学的性状の差を示す。ヘパラン硫酸はこれらの受容体の結合およびトランス活性化を媒介することができるので、ヘパラン硫酸への識別的親和性は、VEGFR1およびVEGFR2へのそれらの結合で重要である。さらに、ヘパラン硫酸への識別的な結合は、内皮細胞生存、接着および血管分岐形成を含む、異

40

50

なるVEGF作用をもたらすと報告されている。VEGF164およびVEGF188の両方はヘパラン硫酸に結合し、それらをそれぞれ部分的または完全に細胞に結合した状態にするが、VEGF120はヘパラン硫酸に結合せず、自由に拡散する。

【0072】

VEGFアイソフォームは、発現の組織特異的パターンを示す。VEGF189、VEGF-165およびVEGF-121アイソフォームは広く発現されるが、VEGF206およびVEGF-145は一般的でない。その発現は、増殖因子、サイトカイン、ゴナドトロピン、一酸化窒素、低酸素、低血糖および腫瘍形成突然変異によって調節される。

【0073】

腫瘍進行におけるVEGFの古典的役割は、既存の血管から新しい毛細管を形成する過程である血管形成の正の調節因子としてである。腫瘍増殖は、それら自身の血管新生を誘導する腫瘍の能力に強く依存する。VEGF発現は、いくつかの癌細胞系で、ならびに乳癌、脳癌および卵巣癌に由来するいくつかの臨床検体で報告されている。したがって、VEGFの拮抗は、不完全な血管形成を通して腫瘍増殖を効果的に防止することができる。VEGFは、腫瘍細胞などの他の細胞によるその放出の後にパラクリン様式で、またはVEGF産生内皮細胞でオートクリンの方法で、内皮細胞に対してその作用を発揮する。VEGFは、そのコグネイト受容体VEGFR1(FLT1としても公知である)、VEGFR2(KDRまたはFLK1としても公知である)およびニューロピリン1(NRP1)に結合する。

【0074】

成体でのVEGF発現は、細胞型特異的で、転写から翻訳までの多くのレベルで制御され、腫瘍および様々な病的状態で上方制御される。VEGF転写の最も特徴のわかっている刺激因子の1つは低酸素であり、それは低酸素誘導性因子1アルファ(HIF1)転写因子の安定化によって作用する。VEGFの低酸素調節は、mRNAの安定化を通して転写後にも起こる。VEGF発現は、IGF-1、I1-6、I1-1、PDGF、TNF-、TGF-、およびFGF-4を含む他の増殖因子およびサイトカインによって誘導される。さらに、VEGF発現は、伸長を含む物理的力によっても刺激され、1つの推定上の転写因子はKruppel様因子2である。VEGFプロモーターの分析は他の多くの可能性のある転写因子応答エレメントを明らかにし、例えばSP1応答エレメントを経るEGFおよびHGFシグナル伝達など、そのいくつかの経路は解明されている。

【0075】

VEGFファミリーのメンバーは、in vivoで2つの非常に重要な過程である新脈管形成およびリンパ管形成を促進し、それらは、既存の脈管構造からのそれぞれ新しい血管およびリンパ管の増殖に関与する。これらの過程は、創傷治癒、卵巣濾胞の発達、子宮内膜増殖の正常な過程、ならびに網膜症、関節リウマチおよび固形腫瘍増殖などの病理学的過程を制御する。VEGF、VEGF165bの新しく同定されたスプライス変異体は、新脈管形成に対して阻害作用を有すると仮定される。リンパ管形成は、リンパ系を通すリンパ節転移および癌の広がりと相關している。

【0076】

VEGF活性は、内皮細胞で主に発現される高親和性受容体チロシンキナーゼによって媒介される。これらは以下の通りである：主に血管内皮細胞によって発現されるVEGFR-1(FLT-1)およびVEGFR-2(FLK-1/KDR)、ならびにリンパ内皮細胞で発現されるVEGFR-3(FLT-4)。これらの受容体は、増殖因子に結合する7つの細胞外の免疫グロブリン様ドメインと、それに続く、キナーゼ挿入配列によって遮断される単一の膜貫通領域および保存された細胞内チロシンキナーゼドメインを特徴とする。これらの受容体はそれ自体酵素であり、リガンド結合によって活性化されると、それらは二量体化し、自己リン酸化を経る。この段階は、特定のチロシン残基の上でそれらをリン酸化することによって他の標的タンパク質を直接活性化する受容体の能力を高める。

【0077】

10

20

30

40

50

VEGF キナーゼリガンド / 受容体のシグナル伝達系は、血管の発達および血管透過性の調節で重要な役割を演ずる。HIV-1 感染の場合には、細胞外のウイルス Tat タンパク質との相互作用が、カボジ肉腫病変での新脈管形成を高めるようである。

#### 【0078】

VEGF は、VEGFR1、VEGFR2、Nrp-1 および Nrp-2 に結合するが、内皮でのその主なシグナル伝達受容体は VEGFR2 である。VEGFR2 は受容体チロシンキナーゼのファミリーに属し、VEGF との結合後、チロシンキナーゼの二量体化および活性化があり、細胞質テールの特定のチロシン残基のリン酸化がもたらされ、それは次にシグナル伝達分子のドッキングを促進する。VEGFR2 は、内皮細胞内のシグナル伝達経路の開始を担う。VEGFR2 への VEGF の結合に続いて、VEGF は、内皮細胞における増殖、生存、接着、移動、毛細管形態形成および遺伝子発現に対するその作用を媒介する。そのキナーゼ活性が VEGFR2 のそれより 10 倍低いので、VEGFR1 は、VEGFR2 と比較して VEGF 媒介シグナル伝達で相対的に小さい役割を有する。乳癌細胞系は、VEGF ならびに VEGF 受容体 VEGFR1、VEGFR2 および NRP1 を両方発現する。最近の研究は、VEGF が、VEGF 受容体発現腫瘍細胞のためのオートクリン増殖および生存因子として働くことを示している。しかし、VEGF が腫瘍細胞の生存を媒介する機構は、深く調査する必要がある (Leeら、2007 年、PLoS Medicine 6 卷 : 1101 ~ 1116 頁)。

10

#### 【0079】

VEGFR1 は内皮細胞 (EC) によっても発現されるが、それは主に VEGFR2 シグナル伝達を調節する作用をすると考えられている。有糸分裂誘発、化学走性、細胞生存および内皮細胞の形態変化は、主に VEGFR-2 によって媒介される。分裂誘発シグナルは Raf-Mek-Erk 経路の活性化によって誘導されるが、抗アポトーシス性の作用および化学走性は PI3K/Akt の活性化によって媒介される。VEGFR-2 への VEGF の結合は、PI3K/Akt 依存的に、新脈管形成に関与する接着分子であるいくつかのインテグリンの活性化ももたらす。内皮細胞で発現されることとは別に、VEGFR-2 は造血幹細胞で見出され、それが造血幹細胞の生存を高め、そして、VEGFR-2 が網膜前駆体細胞でも見出され、それが神経発生および脈管形成で重要な役割を演ずる。

20

#### 【0080】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、VEGF または VEGFR2 に特異的な  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む。特定の実施形態では、 $V_H$  および  $V_L$  ドメインは、齧歯動物 (例えば、マウス、ラット) のもの、ヒト化されたものまたはヒトのものである。VEGF に特異的なそのような  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む結合ドメインの例には、米国特許出願公開第 2007/0141065 A1 号に開示のものが含まれるが、それらに限定されない。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、VEGFR2 外部ドメイン (Genbank 受託 NP\_002244.1、配列番号 747 を参照されたい) またはその断片を含むこともできる。さらなる実施形態では、VEGF に特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、前記結合ドメインは、配列番号 747 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、または少なくとも 100% 同一である配列を含み、前記ポリペプチド結合ドメインは VEGF に結合して、その活性を阻害する。

30

#### TNF アンタゴニスト

特定の実施形態では、本開示は、TNF アンタゴニスト (すなわち、TNF シグナル伝達を阻害することができる) である結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的な TNF アンタゴニストには、TNF に特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体 (例えば、抗体、Fab、scFv など)、または TNFR1 もしくは TNFR2 外部ドメインが含まれる。

40

50

## 【0081】

腫瘍壞死因子受容体 (TNFR) は、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであり、CD120またはカケクチンとしても公知である腫瘍壞死因子 (TNF) の受容体である。このサイトカイン受容体の2つの変異体、TNFR1およびTNFR2 (CD120a受容体およびCD120b受容体) がある。TNFR1 (Genbank受託番号NP\_001056.1) は、約55KDの分子量を有し、したがってp55と呼ばれることもある。開示されている融合タンパク質でTNF結合ドメインとして用いることができるTNFRドメインは、TNFR1配列のアミノ酸44～149に位置する。TNFR2 (Genbank受託番号NP\_001057.1) は、約75KDの分子量を有し、したがってp75と呼ばれることもある。開示されている融合タンパク質でTNF結合ドメインとして用いることができるTNFRドメインは、TNFR2配列のアミノ酸40～141に位置する。

## 【0082】

大多数の細胞型および組織は、両方のTNF受容体を発現するようである。両方とも細胞表面ならびに可溶性の形態で存在し、両方ともシグナル伝達で活性であるが、それらは異なる細胞応答を媒介することができる。TNFR1は、ほとんどのTNF応答をシグナル伝達する役割を担うようである。他の活性の中でも、TNFR2は胸腺細胞増殖を刺激し、NF- $\kappa$ B活性化し、細胞傷害性のような主にTNF-R1によって媒介される応答のシグナル伝達で、TNFR1を補助する。

## 【0083】

抗TNF抗体などのTNFアンタゴニストは、様々な炎症状態に正の影響を及ぼすことができる。例えば、インフリキシマブは、米国で、関節リウマチ、クローン病、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、プラーク乾癬および潰瘍性大腸炎の治療に対し適用される。近年では、TNF阻害剤エタネルセプト (etanercept) の脊髄周囲への送達が、アルツハイマー病患者で症状を軽減することが示されている (TobinickおよびGross (2008年) BMC Neurol. 8巻: 27～36頁、Griffith (2008年) J. Neuroinflammation, 5巻: 3～6頁)。

## 【0084】

REMICADE (登録商標) (インフリキシマブ) 処方情報によると、TNFに帰せられる生物活性には、以下のものが含まれる：インターロイキン (IL) 1および6などの炎症性サイトカインの誘導、内皮層透過性を増加させることによる白血球移動の強化、ならびに内皮細胞および白血球による接着分子の発現、好中球および好酸球機能活性の活性化、急性相反応物質および他の肝臓タンパク質の誘導、ならびに滑膜細胞および/または軟骨細胞によって生成される組織分解酵素の誘導。

## 【0085】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、TNFに特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインはヒトのものである。TNFに特異的なそのようなV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む結合ドメインの例には、米国特許出願公開第2007/0249813号に開示のものが含まれるが、それらに限定されない。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、TNFR1外部ドメイン (Genbank受託NP\_001056.1、配列番号749を参照されたい) もしくはその断片、またはTNFR2外部ドメイン (Genbank受託NP\_001057.1、配列番号748を参照されたい) もしくはその断片を含むこともできる。TNFR1およびTNFR2外部ドメインは、米国特許出願公開第2007/0128177号に記載されている。さらなる実施形態では、TNFに特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、そこにおいて、前記結合ドメインは、配列番号748または749のアミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも100%同一である配列を含み、前記ポリペプチド結合ドメインはT

10

20

30

40

50

N F に結合して、その活性を阻害する。

#### H G F アンタゴニスト

上記のように、特定の実施形態では、本開示は、H G F アンタゴニスト（すなわち、H G F シグナル伝達を阻害することができる）である結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的なH G F アンタゴニストには、H G F に特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体（例えば、抗体、F a b、s c F v など）、またはc - M e t 外部ドメインもしくはそのサブドメイン（例えば、c - M e t のS e m a ドメイン、P S I ドメインまたは両ドメイン）が含まれる。

#### 【0086】

チロシンキナーゼ受容体c - M e t（肝細胞増殖因子（H G F）はそのリガンドの1つであるので、肝細胞増殖因子受容体H G F R としても公知である）は、胚形成および組織修復の正常な過程の間に活性である。これらの両過程で、細胞は隣接細胞から解離して、血流に入る。血流では、c - M e t によって誘導されるアポトーシスからの保護、および固着非依存的な増殖能力は、細胞が溢出、増殖して最終的に分化するまで、それらが生存することを可能にする。組織修復では、損傷に隣接した上皮細胞が分離、変形し、それらが増殖して上皮層を再構成する損傷域に向かって移動する場合に、c - M e t は上皮 - 間葉移行の過程に関与する。

#### 【0087】

しかし、c - M e t が構成的に活性化される場合、それを発現する細胞は腫瘍形成性および転移性になる。構成的c - M e t 活性化は、複数の機構によっておこることが証明されている。最も一般的なものは受容体の過剰発現であり、それは、c - M e t 遺伝子増幅（例えば、結腸直腸（c o l e c t o r a l ）腫瘍で）、他のオンコジーンによって誘導される強化されたc - M e t 転写、または低酸素活性化転写の結果として起こる。別の機構には、点突然変異（例えば、遺伝性の乳頭状腎癌、小児肝細胞癌、散発性の乳頭状腎癌、胃癌および頭頸部扁平上皮癌で）および染色体転座を含む、c - M e t 遺伝子の構造的变化が含まれる。さらに別の機構には、異常な翻訳後プロセシング、前駆体タンパク質の切断の欠落、受容体の下方制御を阻止する突然変異および受容体の切断（例えば、筋骨格腫瘍で）などのc - M e t の構造的变化が含まれる。さらに別の機構は、H G F 依存性オートクリン / パラクリン活性化である。パラクリン活性化により、間葉細胞による異常なH G F 生成の存在下で病的になることができる。オートクリン活性化は、腫瘍細胞がc - M e t およびH G F の両方を異常に発現する場合に起こる（例えば、骨肉腫、横紋筋肉腫、神経膠腫ならびに甲状腺、乳房および肺の癌腫で）。最後に、構成的c - M e t 活性化は、他の膜受容体（例えば、R O N 、E G F 受容体ファミリーメンバー、F A S およびB プレキシン）によるトランス活性化に起因することもある。C o r s o ら、T R E N D S M o l . M e d . 11巻：284頁（2005年）を参照。

#### 【0088】

c - M e t シグナル伝達経路を標的にする抗癌戦略も、上掲のC o r s o らに記載されている。これらには、H G F の拮抗または中和、c - M e t キナーゼ活性の阻害、c - M e t 二量体化の阻止、c - M e t 細胞内活性の阻害、およびc - M e t またはH g f 発現のサイレンシングが含まれていた。M i c h i e l l i ら、C a n c e r C e l l 、6巻：61～73頁（2004年）は、c - M e t へのH G F 結合およびc - M e t 亦モニ量体化を両方妨害する、「デコイM e t」と呼ばれる可溶性のc - M e t 受容体を記載している。マウスでのレンチウイルスベクターによるデコイM e t の送達は、ヒト異種移植片の腫瘍細胞の増殖および生存を阻害すると報告された。デコイM e t は、腫瘍新脈管形成を損ない、自発的転移の形成を抑制し、腫瘍退縮の誘導において放射線療法と相乗的に作用することが観察された。

#### 【0089】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、H G F に特異的なV <sub>H</sub> およびV <sub>L</sub> ドメインを含む。特定の実施形態では、V <sub>H</sub> およびV <sub>L</sub> ドメインは、齧歯動物（例えば、マウス、ラット）のもの、ヒト化されたものまたはヒトのものである。H G F に特異的なその

10

20

30

40

50

のような  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む結合ドメインの例には、米国特許出願公開第 2005 / 0118643 号に開示のものが含まれるが、それらに限定されない。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、配列番号 750、751 もしくは 752 の c-Met 外部ドメイン、またはその断片を含むこともできる。さらなる実施形態では、HGF に特異的なポリペプチド結合ドメインが提供され、そこにおいて、前記結合ドメインは、配列番号 750、751 または 752 のアミノ酸配列に、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、または少なくとも 100% 同一である配列を含み、前記ポリペプチド結合ドメインは HGF に結合して、その活性を阻害する。

10

### 【0090】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、本明細書に記載の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む c-Met アンタゴニストドメインである。特定の実施形態では、 $V_H$  および  $V_L$  ドメインはヒトのものである。そのような  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含む結合ドメインの例を、それぞれ配列番号 1132 ~ 1184 および 1079 ~ 1131 に示す。さらなる実施形態では、それぞれ配列番号 1079 ~ 1131 および 1132 ~ 1184 に示すような、1つまたは複数の軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) のアミノ酸配列に、または1つまたは複数の重鎖可変領域 ( $V_H$ ) に、またはその両方に、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、または少なくとも 100% 同一である配列を有する本開示の c-Met アンタゴニストドメインが提供され、各 CDR は、多くとも最大で 3 個のアミノ酸変化を有する。

20

### 【0091】

さらなる実施形態では、本開示の c-Met アンタゴニストドメインは、それぞれ配列番号 1132 ~ 1184 および 1079 ~ 1131 に記載の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含み、それらは、そのような  $V_H$  ドメイン、 $V_L$  ドメインまたは両方のアミノ酸配列に、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 99.5% 同一であり、そこにおいて、各 CDR は、0、1、2 または 3 個以下の突然変異を有する。例えば、本開示の  $V_H$  ドメイン、 $V_L$  ドメインまたは両方のアミノ酸配列は、例示的な結合ドメイン TRU(H) - 343 からのそれぞれ  $V_H$  ドメイン (配列番号 1174)、 $V_L$  ドメイン (配列番号 1121) または両方のアミノ酸配列に、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99.5% 同一であることができる。

30

### 【0092】

本開示の結合ドメインは、抗 HGF または抗 c-Met の可変領域からの単一の CDR を含むことができ、またはそれは、同じであってもまたは異なってもよい複数の CDR を含むことができる。特定の実施形態では、本開示の結合ドメインは、フレームワーク領域ならびに CDR1、CDR2 および CDR3 領域を含む HGF または c-Met に特異的な  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含み、そこにおいて、(a)  $V_H$  ドメインは、配列番号 1132 ~ 1184 のいずれか 1 つで見られる重鎖 CDR3 のアミノ酸配列を含み、または (b)  $V_L$  ドメインは配列番号 1079 ~ 1131 のいずれか 1 つで見られる軽鎖 CDR3

40

50

のアミノ酸配列を含み、または(c)結合ドメインは(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列および(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含み、あるいは結合ドメインは(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列および(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含み、そして、そこにおいて、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は同じ参照配列に見られる。さらなる実施形態では、本開示の結合ドメインは、フレームワーク領域ならびにCDR1、CDR2およびCDR3領域を含むHGFまたはc-Metに特異的なV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含み、そこにおいて、(a)V<sub>H</sub>ドメインは、配列番号1132～1184のいずれか1つで見られる重鎖CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を含み、または(b)V<sub>L</sub>ドメインは、配列番号1079～1131のいずれか1つで見られる軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を含み、または(c)結合ドメインは(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列および(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含み、あるいは結合ドメインは(a)のV<sub>H</sub>アミノ酸配列および(b)のV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含み、そこにおいて、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>アミノ酸配列は同じ参照配列に由来する。

10

## 【0093】

特異的CDRを含む本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、結合ドメインは、(i)配列番号1132～1184のいずれか1つで見られるV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するV<sub>H</sub>ドメイン、または(ii)配列番号1079～1131のいずれか1つで見られるV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するV<sub>L</sub>ドメイン、または(iii)(i)のV<sub>H</sub>ドメインおよび(ii)のV<sub>L</sub>ドメインの両方を含むことができ、あるいは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>が同じ参照配列に由来する、(i)のV<sub>H</sub>ドメインおよび(ii)のV<sub>L</sub>ドメインの両方を含むことができる。c-Metに対する例示的な軽鎖および重鎖の可変ドメインCDRを、それぞれ配列番号762～920および921～1078に提供する。

20

## 【0094】

c-Metアンタゴニストの軽鎖および重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1079～1131および1132～1184に提供する。

30

## TWEAKアンタゴニスト

特定の実施形態では、本開示は、TWEAKアンタゴニストである（すなわち、TWEAKシグナル伝達を阻害することができる）結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的なTWEAKアンタゴニストには、TWEAKに特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体（例えば、抗体、Fab、scFvなど）、またはTWEAKR外部ドメインもしくはその断片が含まれる。

40

## 【0095】

TWEAKは、腫瘍壞死因子(TNF)リガンドファミリーに属し、炎症性活性、新脈管形成および細胞増殖を含む複数の細胞応答を調節するサイトカインである。TWEAKは、切断されて生物活性のある可溶性のサイトカインを生成する、II型膜貫通タンパク質である。TWEAKタンパク質中の様々なドメインの位置が、例えば、米国特許出願公開第2007/0280940号に示されている。TWEAKはTNFと重複するシグナル伝達機能を有するが、ずっと広い組織分布を示す。TWEAKは、細胞型特異的に細胞死の複数の経路を通してアポトーシスを誘導することができ、内皮細胞の増殖および移動を促進することもわかり、したがって新脈管形成の調節因子として作用する。

50

## 【0096】

コグネイトTWEAK受容体、TWEAKRまたは線維芽細胞増殖因子誘導性14(Fn14)は、非リンパ系細胞型によって発現されるTNF受容体スーパーファミリーメンバーである(Wileyら(2001年)Immunity 15巻:837頁)。TWEAKおよびTWEAKRの発現は、正常な組織では比較的低いが、組織損傷および疾患の状況では劇的な上方制御を受ける。TWEAK/R経路は急性組織修復機能を促進し、

50

したがって急性損傷の後に生理的に機能するが、慢性炎症疾患状況では病理的に機能する。T N F と対照的に、T W E A K は発達またはホメオスタシスでいかなる明らかな役割も演じない。T W E A K / R 経路の概説は、Burklyら(2007年)Cytokine 40巻：1頁に提供されている。持続的に活性化されているT W E A K は、慢性炎症、病理的過形成および新脈管形成を促進し、前駆体細胞の分化を阻害することによって組織修復を潜在的に妨げる。T W E A K タンパク質は、活性化単球およびT細胞の表面、および腫瘍細胞系上で、ならびに休止および活性化単球、樹状細胞およびN K 細胞では細胞内で同定されている。T W E A K 発現は、全てが炎症性細胞の浸潤および/または常在の先天性免疫細胞型の活性化に関連する急性損傷、炎症疾患および癌との関連で、標的組織において局所的に顕著に増加する。循環中のT W E A K レベルは、多発性硬化症および全身性エリテマトーデスなどの慢性炎症疾患を有する患者で、顕著に増加することが示されている。

10

## 【0097】

T W E A K をブロックするモノクローナル抗体は、マウスのコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルで有効であることが示されている(Kamatara(2006年)J. Immunol. 177巻：6433頁、Perperら(2006年)J. Immunol. 177巻：2610頁)。ヒト滑膜細胞に及ぼすT W E A K およびT N F の関節炎誘発(anthritogenic)活性は、しばしば相加的であったりまたは相乗的であってお互いに無関係のようであり、T W E A K およびT N F は関節リウマチの病理において平行して作用することができることを示している。T N F 阻害剤に対するRA患者の臨床上の応答に関する該患者の不均一性が、T W E A K による病理的寄与を反映し得ると推測されている。

20

## 【0098】

米国特許第7,169,387号は、T W E A K に特異的なモノクローナル抗体の調製、および慢性GVHDのマウスモデルを用いる移植片対宿主病(GVHD)の発生の局面をブロックするためのその使用を記載する。米国特許出願公開第2007/0280940号は、T W E A K R およびT W E A K に対するT W E A K R デコイ受容体および抗体、ならびに脳浮腫および細胞死に関連する中枢神経系の疾患の治療におけるそれらの使用を記載する。

30

## 【0099】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、T W E A K に特異的なV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメインは、げっ歯類(例えば、マウス、ラット)、ヒト化またはヒトのものである。T W E A K に特異的なそのようなV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメインを含む結合ドメインの例には、例えば、米国特許第7,169,387号に開示されるものが含まれる。T W E A K をブロックするモノクローナル抗体は、マウスのコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルで有効であることが示されている(Kamatara(2006年)J. Immunol. 177巻：6433頁、Perperら(2006年)J. Immunol. 177巻：2610頁)。

## 【0100】

特定の実施形態では、T W E A K アンタゴニストは、T W E A K R (FN14としても公知である)の細胞外ドメイン(「外部ドメイン」)であってもよい。本明細書で用いるように、T W E A K R 外部ドメインは、T W E A K R 、可溶性T W E A K R またはそれらの任意の組合せの細胞外の部分を指す。特定の実施形態では、T W E A K アンタゴニストは、GenBank受託番号NP\_057723.1(配列番号761)に記載のT W E A K R の最初の70個のアミノ酸などの、T W E A K R のアミノ末端部分、またはT W E A K アンタゴニストとして機能し続けるその任意の断片を含む。他の実施形態では、T W E A K アンタゴニストは、配列番号761のアミノ酸28～70を含む(すなわち、天然のリーダー配列がない)。その上さらなる他の実施形態では、T W E A K アンタゴニストは、配列番号761のアミノ酸配列、または配列番号761のアミノ酸28～70に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも

40

50

92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または少なくとも100%同一である配列を含み、前記アンタゴニストはTWEAKに結合して、その活性を阻害する。

#### 【0101】

本明細書に記載の結合タンパク質または融合タンパク質の、TWEAKへのTWEAKの結合を減少させる能力は、米国特許出願公開第2007/0280940号に記載のものを含む当業者に公知であるアッセイを用いて決定することができる。

#### IGFアンタゴニスト

上記のように、特定の実施形態では、本開示は、IGF1またはIGF2アンタゴニストである（すなわち、IGF1またはIGF2シグナル伝達を阻害することができる）結合領域または結合ドメインを含有するポリペプチドを提供する。例示的なIGF1またはIGF2アンタゴニストには、IGF1またはIGF2に特異的な結合ドメイン、例えば免疫グロブリン可変結合ドメインもしくはその誘導体（例えば、抗体、Fab、scFvなど）、またはIGF1RまたはIGFBP外部ドメインもしくはそのサブドメインが含まれる。

#### 【0102】

インスリン様増殖因子（IGF）は、哺乳動物の成長および発達で重要な役割を演ずるペプチドファミリーを含む。インスリン様増殖因子1（IGF1）は、以下の特徴を有する分泌タンパク質である：ジスルフィド結合（アミノ酸54～96、66～109、95～100）；Dペプチドドメイン（アミノ酸111～118）；カルボキシル末端プロペプチドドメイン（Eペプチド）（アミノ酸119～153）；インスリン鎖A様ドメイン（アミノ酸90～110）；インスリン鎖B様ドメイン（アミノ酸49～77）；インスリン連結Cペプチド様ドメイン（アミノ酸78～89）；プロペプチドドメイン（アミノ酸22～48）；およびシグナル配列ドメイン（アミノ酸1～21）。

#### 【0103】

IGF1は、肝臓、骨格筋、骨および軟骨を含む複数の組織で合成される。IGF1の血中濃度の変化は肝臓によるその合成および分泌の変化を反映し、それは、実験動物で総血清IGF1の80%を占める。IGF1の残りは、末梢で、通常結合組織細胞型によって、例えばほとんどの組織に存在する間質細胞によって合成される。末梢で合成されるIGF1は、オートクリンおよびパラクリン機構によって細胞増殖を調節する働きをすることができる。これらの組織の中で、新しく合成され、分泌されるIGF1は、結合組織細胞自体に存在する受容体に結合して増殖を刺激することができる（オートクリン）か、または、それは、実際はIGF1を合成しないが、局所的に分泌されるIGF1によって増殖が刺激される、隣接する細胞型（しばしば上皮細胞型）の上の受容体に結合することができる（パラクリン）（Clemmons, 2007年, Nat Rev Drug Discov. 6巻(10号) : 821～33頁）。IGF1の合成は、ヒト下垂体成長ホルモン（GH、ソマトトロピンとしても公知である）を含むいくつかの因子によって調節される。IGF2濃度は胎児の成長中に高いが、IGF1と比較して成体の期間ではGH依存性がより低い。

#### 【0104】

IGF1は、筋骨格系、肝臓、腎臓、腸、神経系組織、心臓および肺を含む様々な組織で、細胞の増殖および/または生存を高める。IGF1は細胞増殖を促進する重要な役割も演じ、その結果、IGF1の阻害はアテローム硬化症の治療のための潜在的な補助的手段として探求されている。IGF1作用を阻害することが、他の形態の抗癌療法の効果を強化するための、または腫瘍細胞増殖を直接に阻害するための特異的療法として提案されている。

#### 【0105】

IGF1と同様に、IGF2はIGF1Rを通して作用する。IGF2は、その分裂促進性および抗アポトーシス性の機能により、腫瘍での重要なオートクリン増殖因子である

10

20

30

40

50

(Kanedaら、2005年、Cancer Res 65巻(24号):11236~11240頁)。IGF2の発現の増加が、結腸直腸癌、肝臓癌、食道癌および副腎皮質の癌、ならびに肉腫を含む、多種多様の悪性疾患でしばしば見られる。悪性の乳房上皮細胞を囲む間質線維芽細胞でIGF2の大量の発現が見られるので、IGF2によるパラクリンシグナル伝達も、乳癌を含む腫瘍で役割を果たす。

#### 【0106】

インスリン様増殖因子1受容体(IGF1R)は、ジスルフィド結合によって連結される2つのアルファ鎖および2つのベータ鎖の四量体である。前駆体の切断は、アルファおよびベータサブユニットを生成する。IGF1Rは、タンパク質キナーゼスーパーファミリーである、チロシンタンパク質キナーゼファミリー、およびインスリン受容体サブファミリーに関係している。それは、3つのフィブロネクチンIII型ドメイン、および1つのタンパク質キナーゼドメインを含む(Lawrenceら、2007年、Current Opinion in Structural Biology 17巻:699頁)。アルファ鎖はリガンド結合ドメインの形成に寄与し、ベータ鎖はキナーゼドメインを有する。それは1回貫通I型膜タンパク質であり、様々な組織で発現される。

10

#### 【0107】

キナーゼドメインは、IGF1またはIGF2によって刺激される下流シグナル伝達力スケードの活性化のために必要である、チロシン-タンパク質キナーゼ活性を有する。自己リン酸化は、キナーゼ活性を活性化する。ベータサブユニットの細胞質ドメインのチロシン残基が自己リン酸化されると、IGF1Rはin vitroで、PIK3R1と、ならびにIRS1およびSHC1のPTB/PIDドメインと相互作用する。IGF1Rは、形質転換事象で重大な役割を演ずる。それはほとんどの悪性組織で高度に過剰発現され、そこでは、それは細胞生存を高めることによって抗アポトーシス因子として機能する。この受容体を欠く細胞は、v-Srcを除いては、ほとんどのオンコジーンによって形質転換することができない。

20

#### 【0108】

インスリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)ファミリーは、ナノモルの親和性でIGFに結合する、約250個の残基の6個の可溶性タンパク質(IGFBP1~6)を含む。それらの配列相同性のため、IGFBPは、共通の全体的折畳みを共有すると想定され、緊密に関連するIGF結合決定因子を有すると予想される。各IGFBPは、ほぼ同等の長さの3つの異なるドメイン、すなわち、高度に保存されたシステインに富むNおよびCドメイン、ならびに各IGFBP種に特異な中央リソードドメインに分割することができる。NおよびCドメインは両方ともIGFへの結合に関与するが、IGF結合におけるこれらのドメインの各々の具体的な役割は確定されていない。C末端のドメインが、IGFの他の種よりもIGFの1つの種に対するIGFBPの優先傾向についての役割を担うことができる。C末端のドメインは、細胞外マトリックス成分との相互作用を通してIGF結合親和性の調節にも関与し、ほぼ確実に、IGF1非依存性作用の媒介に関与している。中央のリソードドメインは最も保存されていない領域で、いかなるIGFBPのIGF結合部位の一部としても引用されたことはない。このドメインは、IGFBPについて公知である、翻訳後修飾、特異的タンパク質分解、ならびに酸不安定性サブユニットおよび細胞外マトリックスの結合の部位である。このドメインでのタンパク質分解性切片は、IGFに対するIGF受容体と競合することができない低親和性のN末端およびC末端の断片を生成すると考えられ、したがって、そのタンパク質分解はIGFBPからのIGF放出の主な機構であると想定される。しかし、最近の研究は、生じるN末端およびC末端の断片がIGF活性をまだ阻害することができ、インタクトなタンパク質のそれらと異なる機能的特性を有することを示す(Sitarら(2006年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103巻(35号):13028~33頁)。

30

#### 【0109】

IGF結合タンパク質は、IGFの半減期を延長する分泌タンパク質であり、細胞培養に及ぼすIGFの増殖促進効果を阻害または刺激することが示されている。それらは、I

40

50

G F と I G F の細胞表面受容体との相互作用を変化させ、その上細胞移動を促進する。それらは、I G F 1 および I G F 2 に等しくよく結合する。全ての I G F B P の C 末端のドメインは、サイログロブリン 1 型ドメインと配列相同性を示し、二次構造の共通要素（ヘリックスおよび 3 - ストランドから 4 - ストランドの シート）を共有する。分子のコアは、コンセンサスな 3 つのジスルフィド対合によって連結され、保存されている T y r / P h e アミノ酸を有し、Q C 、 C W C V モチーフを有する。これらの基本的特徴は C B P 1 、 C B P 4 および C B P 6 で保存され、C ドメインの構造はこれまでに解決されているが、詳細では顕著な変動が存在する。例えば、C B P 4 はヘリックス 2 を有するが、C B P 1 の対応する残基は、サイログロブリン 1 型ドメインスーパーファミリーの他の構造で見られる短いベータストランドを形成する。C B P のこの特定の領域は、高い配列多様性を有し、I G F 複合体の形成に関与し、したがって親和性調節因子の役割を果たすことができる。

10

## 【 0 1 1 0 】

I G F / I G F 受容体結合の阻害は、細胞増殖を妨害し、糖尿病、アテローム硬化症および癌を含む、I G F 系の調節の欠乏から生じる多くの共通する疾患における天然の I G F アンタゴニストとしての、I G F B P およびバリエントの開発のための戦略を表わす。

## 【 0 1 1 1 】

一部の実施形態では、本開示の結合ドメインは、I G F 1 または I G F 2 に特異的な V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含む。特定の実施形態では、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインは、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）、ヒト化またはヒトのものである。さらに、または代わりに、本開示の結合ドメインは、Genbank 受託番号 N P \_ 0 0 0 8 6 6 . 1 (配列番号 7 5 3 ) の I G F 1 R 外部ドメインもしくはそのサブドメイン、または Genbank 受託番号 N P \_ 0 0 0 5 8 7 . 1 ( I G F B P 1 ; 配列番号 7 5 4 ) 、 N P \_ 0 0 0 5 8 8 . 2 ( I G F B P 2 ; 配列番号 7 5 5 ) 、 N P \_ 0 0 1 0 1 3 4 1 6 . 1 ( I G F B P 3 アイソフォーム a ; 配列番号 7 5 6 ) 、 N P \_ 0 0 0 5 8 9 . 2 ( I G F B P 3 アイソフォーム b ; 配列番号 7 5 7 ) 、 N P \_ 0 0 1 5 4 3 . 2 ( I G F B P 4 ; 配列番号 7 5 8 ) 、 N P \_ 0 0 0 5 9 0 . 1 ( I G F B P 5 ; 配列番号 7 5 9 ) または N P \_ 0 0 2 1 6 9 . 1 ( I G F B P 6 ; 配列番号 7 6 0 ) の I G F B P 外部ドメイン、またはそれらのサブドメインを含み得る。まだその上さらなる実施形態では、I G F 1 または I G F 2 アンタゴニストは、配列番号 7 5 4 ~ 7 6 0 のアミノ酸配列に少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、少なくとも 9 9 . 5 % 、または少なくとも 1 0 0 % 同一である配列を含み、前記アンタゴニストは I G F 1 および I G F 2 の少なくとも 1 つの活性を阻害する。

20

## 多重特異性融合タンパク質

本開示は、T G F のアンタゴニストであるドメイン（「T G F アンタゴニストドメイン」）、および I L 6 アンタゴニスト、I L 1 0 アンタゴニスト、G I T R アゴニスト、V E G F アンタゴニスト、T N F アンタゴニスト、H G F アンタゴニスト、T W E A K アンタゴニストまたは I G F アンタゴニストなどの T G F リガンド以外のリガンドのアンタゴニストまたはアゴニストであるドメイン（「異種結合ドメイン」）を含む、多重特異性融合タンパク質を提供する。T G F アンタゴニストドメインは融合タンパク質のアミノ末端に存在し、異種結合ドメインは融合タンパク質のカルボキシ末端に存在してよく、または異種結合ドメインはアミノ末端に存在してよく、T G F アンタゴニストはカルボキシ末端に存在してよいことは意図される。本明細書に言及するように、本開示の結合ドメインは、介在ドメイン（例えば、免疫グロブリン定常領域またはそのサブ領域）のそれぞれの末端と融合することができる。さらに、2 つ以上の結合ドメインを、当技術分野で公知であるかまたは本明細書に記載するリンクによって、介在ドメインにそれぞれ接合させることができる。

30

## 【 0 1 1 2 】

40

50

本明細書で使用する「介在ドメイン」は、1つまたは複数の結合ドメインの足場としてのみ働くアミノ酸配列を指し、したがって融合タンパク質は、組成物中に単鎖ポリペプチドとして、主に（例えば、50%以上の融合タンパク質集団）または実質的に（例えば、90%以上の融合タンパク質集団）存在する。例えば、特定の介在ドメインは、構造機能（例えば、スペーシング、柔軟性、剛性）または生物機能（例えば、ヒト血液中などの血漿中の半減期の増加）を有し得る。血漿中の本開示の融合タンパク質の半減期を増加することができる例示的な介在ドメインには、アルブミン、トランスフェリン、血清タンパク質と結合する足場ドメインなど、またはこれらの断片が含まれる。

### 【0113】

特定の好ましい実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質に含有される介在ドメインは、水素結合、静電的相互作用、ファンデルワース力、ジスルフィド結合、疎水性相互作用など、またはこれらの任意の組合せなどによる、非共有結合または共有結合相互作用による、少なくとも2つの単鎖ポリペプチドまたはタンパク質の結合を促進することができるアミノ酸配列を指す「二量体化ドメイン」である。例示的な二量体化ドメインには、免疫グロブリン重鎖定常領域またはサブ領域が含まれる。二量体化ドメインは、二量体、またはより高次のマルチマー複合体（例えばトリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマーなど）の形成を促進することができる理解されるはずである。

### 【0114】

「定常サブ領域」は、供給源の抗体中で見られる全ての定常領域ドメインを含むわけではないが、1つまたは複数の免疫グロブリン定常領域ドメインの一部または全部に相当するかまたはそれらに由来する、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列を指すために、本明細書で定義する用語である。好ましい実施形態では、本開示の融合タンパク質の定常領域ドメインは、IgG、IgA、またはIgDのCH2ドメインおよびCH3ドメイン、より好ましくはIgG1のCH2およびCH3、およびさらにより好ましくはヒトIgG1のCH2およびCH3を含有する。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質の定常領域ドメインは、いくつかのFc受容体と結合する能力を保持し（FcRn結合など）、かつin vivoでの比較的長い半減期を保持しながら、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）、および補体活性化および補体依存性細胞傷害性（CDC）の最小エフェクター機能を欠くか、または有する。特定の実施形態では、本開示の結合ドメインをヒトIgG1定常領域またはサブ領域と融合させ、IgG1定常領域またはサブ領域は、以下：234位のロイシン（L234）、235位のロイシン（L235）、237位のグリシン（G237）、318位のグルタミン酸（E318）、320位のリシン（K320）、322位のリシン（K322）、またはこれらの任意の組合せ（EUナンバリング）が突然変異した1つまたは複数のアミノ酸を有する。

### 【0115】

Fc受容体（CD16、CD32、CD64、CD89、FcR1、FcRn）または補体成分C1q（例えば、米国特許第5,624,821号；Presta（2002年）Curr. Pharma. Biotechnol. 3:237を参照されたい）とFcの相互作用を変えることができる突然変異を、Fcドメインの内側または外側に作製するための方法は、当技術分野で公知である。本開示の特定の実施形態は、FcRnおよびプロテインAとの結合が保たれ、Fcドメインが他のFc受容体またはC1qともはや相互作用しないかまたは最小限で相互作用する、ヒトIgG由来の定常領域またはサブ領域を有する免疫グロブリンまたは融合タンパク質を含む組成物を含む。例えば、本開示の結合ドメインは、位置297のアスパラギン（EUナンバリングの下でN297）が別のアミノ酸に突然変異して、この位置におけるグリコシル化を低下または消失しており、したがってFcRnおよびC1qへのFcの効果的な結合が無効にされている、ヒトIgG1定常領域またはサブ領域と融合することができる。別の例示的な突然変異は、C1qの結合はノックアウトしているがFcの結合には影響を与えないP331Sである。

10

20

30

40

50

## 【0116】

さらなる実施形態では、免疫グロブリンFc領域は、免疫グロブリン参照配列と比較して改変型グリコシル化パターンを有し得る。例えば、様々な遺伝的技法のいずれかを利用して、グリコシル化部位を形成する1つまたは複数の特定のアミノ酸残基を変えることができる(Coら、(1993年) Mol. Immunol. 30巻:1361頁; Jacobsonら、(2006年) J. Thromb. Haemost. 4巻:1047頁; Schusterら、(2005年) Cancer Res. 65巻:7934頁; Warnockら、(2005年) Biotechnol. Bioeng. 92巻:831頁を参照されたい)。あるいは、本開示の融合タンパク質が産生される宿主細胞を操作して、改変型グリコシル化パターンを生み出すことができる。当技術分野で公知である1つの方法は、例えば、ADCを増大する両断型、非フコシル化変異体の形の改変型グリコシル化をもたらす。これらの変異体は、オリゴ糖修飾酵素を含有する宿主細胞での発現から生じる。あるいは、Biowa/Kyowa HakkoのPotential技術は、本開示によるグリコシル化分子のフコース含有量を減らすために意図される。公知である1つの方法では、GDP-フコースの産生によって、免疫グロブリンFc領域のグリコシル化パターンを修飾する、組換え免疫グロブリン産生用のCHO宿主細胞を提供する。

10

## 【0117】

あるいは、化学的技法を使用して本開示の融合タンパク質のグリコシル化パターンを改変する。例えば、様々なグリコシダーゼ阻害剤および/またはマンノシダーゼ阻害剤は、ADC活性の増大、Fc受容体の結合を増大、およびグリコシル化パターンの改変の、1つまたは複数の所望の効果をもたらす。特定の実施形態では、(IL6、IL6R、IL6xR、IL10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGFアンタゴニストと、またはGITRアゴニストと結合したTGFアンタゴニストドメインを含有する)本開示の多重特異性融合タンパク質を発現する細胞を、前記宿主細胞によって産生される免疫糖タンパク質分子のADCを増大する濃度で炭水化物修飾物質を含み、前記炭水化物修飾物質が800μM未満の濃度で存在する培地で増殖する。好ましい実施形態では、これらの多重特異性融合タンパク質を発現する細胞を、100μM、200μM、300μM、400μM、500μM、600μM、700μM、または800μMなど100~800μMの濃度で、カスタノスペルミンまたはキフネンシン、より好ましくはカスタノスペルミンを含む培地で増殖する。カスタノスペルミンなどの炭水化物修飾物質を用いてグリコシル化を改変するための方法は、米国特許出願No.2009/0041756またはPCT公開No.WO2008/052030中に与えられる。

20

30

## 【0118】

別の実施形態では、免疫グロブリンFc領域は、エフェクター細胞Fc受容体への結合に影響を与えるアミノ酸修飾を有し得る。これらの修飾は、Prestaら(2001年)Biochenn. Soc. Trans. 30巻:487頁に開示された手法などの、当技術分野で公知である任意の技法を使用して作製することができる。別の手法では、Xencor XmAb技術を利用して、Fcドメインに相当する定常サブ領域を操作して、細胞殺傷エフェクター機能を高めることができる(Lazarら、(2006年) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 103巻:4005頁を参照されたい)。この手法を使用して、例えば、FCRに対する改善された特異性および結合性を有する定常サブ領域を作製し、それによって細胞殺傷エフェクター機能を高めることができる。

40

## 【0119】

またさらなる実施形態では、定常領域またはサブ領域は、このような介在ドメインを欠く、相当する融合タンパク質と比較して、血漿半減期または胎盤通過を場合によっては増大することができる。特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質の延長した血漿半減期は、ヒトにおいて、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも24、少な

50

くとも 30、少なくとも 36、少なくとも 40、少なくとも 48 時間、少なくとも数日間、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも数週間、少なくとも 1 カ月、少なくとも 2 カ月、少なくとも数カ月以上である。

### 【0120】

定常サブ領域は、以下のドメイン： $C_{H_2}$  ドメインおよび $C_{H_3}$  ドメイン（IgA、IgD、IgG、IgE または IgM）、および $C_{H_4}$  ドメイン（IgE、IgM）のいずれかの一部または全部を含むことができる。したがって、本明細書で定義する定常サブ領域は、免疫グロブリン定常領域の一部分に相当するポリペプチドを指すことができる。定常サブ領域は、同じ、または異なる、免疫グロブリン、抗体アイソタイプ、または対立遺伝子変異体由来の $C_{H_2}$  ドメインおよび $C_{H_3}$  ドメインを含むことができる。いくつかの実施形態では、 $C_{H_3}$  ドメインは切断型であり、その配列を参照によって本明細書に組み込む、配列番号 366～371 として PCT 公開 No. WO 2007/146968 中に挙げられたカルボキシ末端配列を含む。特定の実施形態では、本開示のポリペプチドの定常サブ領域は、アミノ末端リンカー、カルボキシ末端リンカー、または両末端のリンカーを場合によっては有してよい、 $C_{H_2}$  ドメインおよび $C_{H_3}$  ドメインを有する。

### 【0121】

「リンカー」は、約 2～約 150 アミノ酸のリンカーなどの、他のペプチドまたはポリペプチドと接合または連結したペプチドである。本開示の融合タンパク質において、リンカーは介在ドメイン（例えば、免疫グロブリン由来定常サブ領域）と結合ドメインを接合することができ、またはリンカーは結合ドメインの 2 つの可変領域を接合することができる。例えばリンカーは、抗体ヒンジ領域配列から得られる、由来する、または設計されるアミノ酸配列、結合ドメインを受容体に連結する配列、または結合ドメインを細胞表面膜貫通領域または膜アンカーに連結する配列であってよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、生理的条件または他の標準的ペプチド条件（例えば、ペプチド精製条件、ペプチド保存に関する条件）下で少なくとも 1 つのジスルフィド結合に関与することができる、少なくとも 1 つのシステインを有することができる。特定の実施形態では、免疫グロブリンヒンジペプチドに相当するかまたはそれに類似するリンカーは、そのヒンジのアミノ末端に向けて位置するヒンジシステインに相当するシステインを保持する。さらなる実施形態では、リンカーは IgG1 または IgG2A ヒンジに由来し、ヒンジシステインに相当する 1 つのシステインまたは 2 つのシステインを有する。特定の実施形態では、1 つまたは複数のジスルフィド結合は介在ドメイン間の鎖間ジスルフィド結合として形成される。他の実施形態では、本開示の融合タンパク質は、結合ドメインに直接融合した介在ドメインを有することができる（すなわち、リンカーまたはヒンジなし）。いくつかの実施形態では、介在ドメインは二量体化ドメインである。

### 【0122】

本開示の多重特異性融合タンパク質の介在ドメインまたは二量体化ドメインを、ペプチドリンカーによって 1 つまたは複数の末端結合ドメインに結合させることができるものである。スペーシング機能を与えることに加え、リンカーは、融合タンパク質内および、融合タンパク質とそれらの標的（複数可）間またはそれらの中の両方で、融合タンパク質の 1 つまたは複数の結合ドメインを正確に配向するのに適した、柔軟性または剛性を与えることができる。さらにリンカーは、ヒトなどの、投与の必要性のある被験体への投与後、*in vitro* と *in vivo* の両方で完全長融合タンパク質の発現および精製タンパク質の安定性を助長することができ、これらの同じ被験体で非免疫原性であるかまたは免疫原性が低いことが好ましい。特定の実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質の介在ドメインまたは二量体化ドメインのリンカーは、ヒト免疫グロブリンヒンジの一部または全部を含むことができる。

### 【0123】

さらに、結合ドメインは $V_H$  および $V_L$  ドメインを含むことができ、これらの可変領域ドメインはリンカーによって組合せることができる。例示的な可変領域結合ドメインリンカーには、 $n$  が 1～5 の整数である、 $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$ 、 $(G$

10

20

30

40

50

$\text{IgY}_3\text{Ser}$ )<sub>1</sub> (  $\text{IgY}_4\text{Ser}$  )<sub>n</sub>、 (  $\text{IgY}_3\text{Ser}$  )<sub>n</sub> (  $\text{IgY}_4\text{Ser}$  )<sub>n</sub>、または (  $\text{IgY}_4\text{Ser}$  )<sub>n</sub> などの (  $\text{IgY}_n\text{Ser}$  ) ファミリーに属するリンカーが含まれる ( 例えは、それぞれ配列番号 518、525、542、585、586 および 603 に相当するリンカー-22、29、46、89、90 および 116 を参照されたい )。好ましい実施形態では、これらの (  $\text{IgY}_n\text{Ser}$  ) ベースのリンカーは可変ドメインを連結させるために使用し、結合ドメイン ( 例えは、scFv ) を介在ドメイン ( 例えは、IgG CH2CH3 ) に連結させるためには使用しない。

#### 【 0124 】

介在ドメイン ( 例えは、免疫グロブリン由来定常サブ領域 ) を結合ドメインに接合するため、または結合ドメインの 2 つの可変領域を接合するために使用することができる例示的なリンカーは、配列番号 497 ~ 604 および 1223 ~ 1228 で提供する。

10

#### 【 0125 】

本開示で意図するリンカーには、例えは、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの任意のドメイン間領域 ( 例えは、抗体ヒンジ領域 )、または I I 型膜タンパク質のファミリーである C 型レクチンの茎部領域由来のペプチドが含まれる。これらのリンカーは、約 2 ~ 約 150 アミノ酸、または約 2 ~ 約 40 アミノ酸、または約 8 ~ 約 20 アミノ酸、好ましくは約 10 ~ 約 60 アミノ酸、より好ましくは約 10 ~ 約 30 アミノ酸、および最も好ましくは約 15 ~ 約 25 アミノ酸の長さ範囲である。例えは、リンカー-1 ( 配列番号 497 ) は 2 アミノ酸長であり、リンカー-116 ( 配列番号 603 ) は 36 アミノ酸長である。

20

#### 【 0126 】

一般的な長さ以外を考慮すると、本開示の融合タンパク質における使用に適したリンカーには、IgG ヒンジ、IgA ヒンジ、IgD ヒンジ、IgE ヒンジ、またはそれらの変異体から選択される抗体ヒンジ領域が含まれる。特定の実施形態では、リンカーは、ヒト IgG1、ヒト IgG2、ヒト IgG3、ヒト IgG4、またはそれらの断片もしくは変異体から選択される抗体ヒンジ領域 ( 上部およびコア領域 ) であってよい。本明細書で使用するように、「免疫グロブリンヒンジ領域」であるリンカーは、CH1 のカルボキシル末端と ( IgG、IgA、および IgD に関して ) CH2 のアミノ末端または ( IgE および IgM に関して ) CH3 のアミノ末端の間に見られるアミノ酸を指す。本明細書で使用する「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」は、抗体の重鎖に見られる、( IgG、IgA、および IgD に関して ) CH1 領域と CH2 領域の間に介入しそれらを結び付ける、または ( IgE および IgM に関して ) CH2 領域と CH3 領域の間に介入しそれらを結び付ける、天然に存在するアミノ酸配列を指す。好ましい実施形態では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域配列はヒトである。

30

#### 【 0127 】

結晶学的研究によれば、IgG ヒンジドメインは、機能上および構造上 3 つの領域：上部ヒンジ領域、コアまたは中央ヒンジ領域、および底部ヒンジ領域に分割することができる ( Shinら、( 1992 年 ) *Immunological Reviews* 130 卷： 87 頁 )。例示的な上部ヒンジ領域には、IgG1 で見られる EPKSCDKTHT ( 配列番号 1240 )、IgG2 で見られる ERKCCV ( 配列番号 1241 )、IgG3 で見られる E L K T P L G D T T H T ( 配列番号 1242 ) または EPKSCDT PPP ( 配列番号 1243 )、および IgG4 で見られる E SK Y G P P ( 配列番号 1244 ) が含まれる。例示的な中央ヒンジ領域には、IgG1 および IgG2 で見られる CPPCP ( 配列番号 1245 )、IgG3 で見られる CPRCP ( 配列番号 1246 )、および IgG4 で見られる CPSCP ( 配列番号 1247 ) が含まれる。IgG1、IgG2、および IgG4 抗体はそれぞれ 1 つの上部および中央ヒンジを有するようであり、一方 IgG3 は、4 つ ( 1 つの E L K T P L G D T T H T CPRCP ( 配列番号 1248 ) および 3 つの EPKSCDT PPP CPRCP ( 配列番号 1249 ) ) をタンデムで有する。

40

#### 【 0128 】

50

IgAおよびIgD抗体はIgG様コア領域を欠くようであり、IgDは2つの上部ヒンジ領域をタンデムで有するようである（配列番号1250および1251を参照されたい）。IgA1およびIgA2抗体で見られる例示的な野生型上部ヒンジ領域は、配列番号1252および1253において述べる。

## 【0129】

IgEおよびIgM抗体は、対照的に、典型的なヒンジ領域の代わりに、ヒンジ様の性質を有するCH2領域を有する。IgEおよびIgMの例示的な野生型CH2上部ヒンジ様配列は、それぞれ配列番号1254（V C S R D F T P P T V K I L Q S S S D G G G H F P P T I Q L L C L V S G Y T P G T I N I T W L E D G Q V M D V D L S T A S T T Q E G E L A S T Q S E L T L S Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G H T F E D S T K K C A ）および配列番号1255（V I A E L P P K V S V F V P P R D G F F G N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S G V T T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K E S D W L G Q S M F T C R V D H R G L T F Q Q N A S S M C V P ）に記載される。

## 【0130】

「改变野生型免疫グロブリンヒンジ領域」または「改变型免疫グロブリンヒンジ領域」は、（a）最大30%のアミノ酸が変化した（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失の）野生型免疫グロブリンヒンジ領域、（b）最大30%のアミノ酸が変化した（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失の）少なくとも10アミノ酸長（例えば、少なくとも12、13、14または15アミノ酸長）である野生型免疫グロブリンヒンジ領域の一部分、または（c）コアヒンジ領域を含む野生型免疫グロブリンヒンジ領域の一部分（その一部分は4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸長、または少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸長であってよい）を指す。特定の実施形態では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域の1つまたは複数のシステイン残基を、1つまたは複数の他のアミノ酸残基（例えば、1つまたは複数のセリン残基）によって置換することができる。改变型免疫グロブリンヒンジ領域は、別のアミノ酸残基（例えば、セリン残基）によって置換された野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基を、代替的または追加的に有することができる。

## 【0131】

結合領域（connecting region）として使用することができる代わりのヒンジおよびリンカー配列は、IgV様またはIgC様ドメインを結合させる細胞表面受容体の一部分から作製することができる。細胞表面受容体が多数のIgV様ドメインをタンデムで含有するIgV様ドメイン間の領域、および細胞表面受容体が複数のタンデムIgC様領域を含有するIgC様ドメイン間の領域も、結合領域またはリンカーペプチドとして使用することができる可能性がある。特定の実施形態では、ヒンジおよびリンカー配列は5～60アミノ酸長であり、主として柔軟性である場合があるが、さらなる剛性特性を与える場合もあり、最小-シート構造とともに-らせん構造を主として含有する場合がある。配列は血漿および血清中で安定であり、タンパク質分解的切断に耐性があることが好ましい。いくつかの実施形態では、配列は1つまたは複数のジスルフィド結合を形成して分子のC末端を安定化する能力を与える、C P P Cなどの天然に存在するモチーフまたは加えられたモチーフを含んでよい。他の実施形態では、配列は1つまたは複数のグリコシル化部位を含んでよい。ヒンジおよびリンカー配列の例には、C D 2、C D 4、C D 2 2、C D 3 3、C D 4 8、C D 5 8、C D 6 6、C D 8 0、C D 8 6、C D 9 6、C D 1 5 0、C D 1 6 6、およびC D 2 4 4の、IgV様とIgC様の間またはIgC様またはIgV様ドメインの間のドメイン間領域が含まれる。代わりのヒンジは、C D 6 9、C D 7 2 およびC D 1 6 1などの非免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー由来のI I型受容体のジスルフィド含有領域から作製することもできる。

## 【0132】

いくつかの実施形態では、ヒンジリンカーは、鎖間ジスルフィド結合を形成するための

10

20

30

40

50

1つのシスティン残基を有する。他の実施形態では、リンカーは、鎖間ジスルフィド結合を形成するための2つのシスティン残基を有する。さらなる実施形態では、ヒンジリンカーは、免疫グロブリンドメイン間領域（例えば、IgG1ヒンジの上部およびコア配列を含む抗体ヒンジ領域など）、またはI型C型レクチンの茎部領域（I型膜タンパク質由来、例えば、PCT出願公開No. WO 2007/146968からの配列番号111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、287、289、297、305、307、309～311、313～331、346、373～377、380、または381などの、該刊行物に記載された例示的なレクチンの茎部領域配列を参照されたい）に由来しており、これらの配列は参考によって本明細書に組み込む。

### 【0133】

一態様では、本明細書に記載するTGFアンタゴニストを含有する例示的な多重特異性融合タンパク質は、IL6、IL10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGFアンタゴニスト、またはGITRアゴニストなどのTGF以外の標的に特異的である、少なくとも1つの追加的結合領域（binding region）または結合ドメインも含有する。例えば、本開示の多重特異性融合タンパク質は、介在ドメイン（ヒトIgG1 CH2CH3 Fc領域など）によって、IL6、IL10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGFアンタゴニスト、またはGITRアゴニストドメインと連結したTGFアンタゴニストドメインを有する。特定の実施形態では、多重特異性融合タンパク質は、第一および第2の結合ドメイン、第一および第2のリンカー、ならびに介在ドメインを含み、この介在ドメインの一末端は、TGFアンタゴニストである第1の結合ドメイン（例えば、TGF R2外部ドメイン、抗TGF R2外部ドメイン、抗TNF-TGF）に第1のリンカーを介して融合し、そして他の末端では第2のリンカーを介して、IL6、IL10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGFアンタゴニスト、またはGITRアゴニストである異なる結合ドメインに融合している。

### 【0134】

特定の実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質の第1のリンカーと第2のリンカーは、例えば配列番号497～604および1223～1228からそれぞれ独立に選択される。例えば、第1または第2のリンカーは、リンカー-102（配列番号589）、47（配列番号543）、80（配列番号576）、またはこれらの任意の組合せであってよい。さらなる例では、1つのリンカーはリンカー-102（配列番号589）であり、かつ他のリンカーはリンカー-47（配列番号543）であり、または1つのリンカーはリンカー-102（配列番号589）であり、かつ他のリンカーはリンカー-80（配列番号576）である。さらなる例では、IL6、IL6R、IL6xR、IL10、VEGF、TNF、HGF、TWEAK、IGF、GITR、TGF R2外部ドメイン、またはTGFに特異的なドメインなどの、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む本開示の結合ドメインは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間に、リンカー-46（配列番号542）などのさらなる（第3の）リンカーを有することができる。これらの実施形態のいずれかにおいて、リンカーは1～5個の追加的接合アミノ酸と隣接している場合があり、これは単にこのような組換え分子の作製の結果であり得るか（例えば、核酸分子を接合するための特定の制限酵素認識部位の使用は、1個～数個のアミノ酸の挿入をもたらす場合がある）、または本開示の目的のために、任意の特定のリンカーコア配列の一部と考えることができる。

### 【0135】

さらなる実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質の介在ドメインは、免疫グロブリン定常領域またはサブ領域から構成され（好ましくは、IgG、IgA、もしくはIgDのCH2CH3、またはIgEもしくはIgMのCH3CH4）、介在ドメインは

10

20

30

40

50

T G F アンタゴニストドメインと、I L 6、I L 10、V E G F、T N F、H G F、T W E A K、I G F、アンタゴニスト結合ドメインまたはG I T R アゴニスト結合ドメインの間に配置される。特定の実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質の介在ドメインは、アミノ末端にT G F アンタゴニスト、およびカルボキシ末端にI L 6、I L 6 x R、I L 10、V E G F、T N F、H G F、T W E A K、I G F またはG I T R に特異的な結合ドメインを有する。他の実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質の介在ドメインは、アミノ末端にI L 6、I L 10、V E G F、T N F、H G F、T W E A K、I G F アンタゴニスト結合ドメインまたはG I T R アゴニスト結合ドメインに特異的な結合ドメイン、およびカルボキシ末端にT G F アンタゴニストを有する。さらなる実施形態では、免疫グロブリン定常領域サブ領域は免疫グロブリンG 1 (I g G 1) のC H 2 およびC H 3 ドメインを含む。関連実施形態では、I g G 1 のC H 2 およびC H 3 ドメインは、以下の突然変異したアミノ酸(すなわち、その位置に異なるアミノ酸を有する)：234位のロイシン(L 234)、235位のロイシン(L 235)、237位のグリシン(G 237)、318位のグルタミン酸(E 318)、320位のリシン(K 320)、322位のリシン(K 322)、またはこれらの任意の組合せ(E Uナンバリング)の1つまたは複数を有する。例えば、これらのアミノ酸のいずれか1つをアラニンに変えることができる。さらなる実施形態では、K a b a t ナンバリングによれば、C H 2 ドメインは、それぞれアラニンに突然変異したL 234、L 235、G 237、E 318、K 320 およびK 322(すなわち、それ自体L 234 A、L 235 A、G 237 A、E 318 A、K 320 A、およびK 322 A)を有する。

10

20

30

40

50

## 【0136】

いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質は、T G F R 2 外部ドメインまたはT G F R 2 外部ドメインのサブドメイン、またはこれらの任意の組合せを含む、T G F アンタゴニストを有する。例えば、T G F アンタゴニストは、G e n B a n k 受託番号N P \_ 0 0 1 0 2 0 0 1 8 . 1 に記載のアミノ酸7 3 ~ 1 7 6、G e n B a n k 受託番号N P \_ 0 0 3 2 3 3 . 4 に記載のアミノ酸4 8 ~ 1 5 1、またはこれらの任意の組合せを含むことができる。さらなる実施形態では、T G F アンタゴニストは、配列番号7 4 3 または7 4 4 に記載のアミノ酸配列を含む。

## 【0137】

さらなる実施形態では、本開示のT G F アンタゴニストを有する本開示の多重特異性融合タンパク質はまた、I L 6 またはI L 6 R 単独のいずれかに対するよりI L 6 x R に対して高い親和性を有し、s I L 6 x R 複合体のm g p 1 3 0 への結合と競合し、またはs g p 1 3 0 のs I L 6 x R 複合体への結合を高める、I L 6 アンタゴニスト結合ドメインを有する。特定の実施形態では、I L 6 x R に特異的な結合ドメインは、(i)配列番号4 3 5 ~ 4 9 6 のいずれか1つにおいて見られるV H ドメインのアミノ酸配列と少なくとも8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %または1 0 0 %同一であるアミノ酸配列を有するV H ドメイン、または(ii)配列番号3 7 3 ~ 4 3 4 のいずれか1つにおいて見られるV L ドメインのアミノ酸配列と少なくとも8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %または1 0 0 %同一であるアミノ酸配列を有するV L ドメイン、または(iii)(i)のV H ドメインと(ii)のV L ドメインの両方、またはV H とV L が同じ参照配列に由来する(i)のV H ドメインと(ii)のV L ドメインの両方を含む。一実施形態では、このようなV H およびV L ドメインは、例示的な結合ドメインT R U 6 - 1 0 1 9 を形成することができる(それぞれ配列番号4 5 3 および3 9 1 を参照されたい)。

## 【0138】

なおさらなる実施形態では、I L 6 もしくはI L 6 R に対するより、またはI L 6 もしくはI L 6 R いずれかの単独に対するよりも、I L 6 x R に対して高い親和性で結合し、s I L 6 x R 複合体との結合に関してg p 1 3 0 と競合し、またはs I L 6 x R 複合体へのs g p 1 3 0 の結合を高めるI L 6 アンタゴニスト結合ドメインは、フレームワー

ク領域および CDR 1、CDR 2 および CDR 3 領域を含む VH および VL ドメインを含み、(a) VH ドメインは配列番号 435～496 のいずれか 1 つにおいて見られる重鎖 CDR 1、CDR 2、および CDR 3 のアミノ酸配列を含み、または (b) VL ドメインは配列番号 373～434 のいずれか 1 つにおいて見られる軽鎖 CDR 1、CDR 2、および CDR 3 のアミノ酸配列を含み、または (c) 結合ドメインは (a) の VH アミノ酸配列および (b) の VL アミノ酸配列を含むか、または、VH アミノ酸配列と VL アミノ酸配列が同じ参照配列に由来する結合ドメインは、(a) の VH アミノ酸配列および (b) の VL アミノ酸配列を含む。これらの多重特異性融合タンパク質の VL ドメインと VH ドメインはいずれかの配向に配置することができ、本明細書に開示する最大約 5～30 アミノ酸のリンカーによって隔てることができる。特定の実施形態では、VH ドメインと VL ドメインを接合するリンカーは、リンカー 47 (配列番号 543) またはリンカー 80 (配列番号 576) のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、IL6 アンタゴニスト結合ドメインを含む多重特異性融合タンパク質は、IL6 シスおよびトランスシグナル伝達、好ましくはトランスシグナル伝達を測定可能に阻害し、および場合によっては、IL6 以外の gp130 ファミリーサイトカインのシグナル伝達を阻害しない。

10

20

30

40

50

## 【0139】

本明細書で Xceptor 分子と呼ぶ、このような多重特異性融合タンパク質の例示的な構造は、BD が免疫グロブリン様または免疫グロブリン可変領域結合ドメインであり、X が介在ドメインであり、かつ ED が受容体外部ドメインなどである、N-BD-X-ED-C、N-ED-X-BD-C、N-ED1-X-ED2-C を含む。いくつかの構築物では、X は第 1 と第 2 の結合ドメインの間に配置された免疫グロブリン定常領域またはサブ領域を含むことができる。いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下のような構造：-L1-X-L2- (L1 および L2 がそれぞれ独立に 2～約 150 アミノ酸を含むリンカーであり、かつ X が免疫グロブリン定常領域またはサブ領域である) を含む介在ドメイン (X) を有する。さらなる実施形態では、多重特異性融合タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、または別の血清タンパク質結合タンパク質である介在ドメインを有し、該融合タンパク質は組成物中に単鎖ポリペプチドとして主にまたは実質的に存在する。なおさらなる実施形態では、本開示の多重特異性融合タンパク質は、以下の構造：N-BD1-X-L2-BD2-C を有し、ここで、N および C がアミノ末端およびカルボキシ末端をそれぞれ表し、BD1 が TGF-R2 の外部ドメインと少なくとも約 90% 同一である TGF アンタゴニストであり、-X- が -L1-CH2CH3- であり、式中の L1 が第一システィンの置換により場合によっては突然変異した第一 IgG1 ヒンジであり、式中の -CH2CH3- が、場合によっては突然変異して、FcRn の相互作用を保持しながら Fc-RI-I 交互作用が消失した、IgG1 Fc ドメインの CH2CH3 領域であり、L2 が配列番号 497～604 および 1223～1228 から選択されるリンカーであり、かつ BD2 が IL6 または IL6×R 複合体に特異的な結合ドメインである。

## 【0140】

特定の実施形態では、多重特異性 Xceptor 融合タンパク質は、(a) 配列番号 743 もしくは 744 に記載の配列と少なくとも 80%～100% 同一であるアミノ酸配列を含む TGF アンタゴニスト、および (b) それぞれ配列番号 435～496 に記載の配列と少なくとも 80%～100% 同一である CDR 1、CDR 2、および CDR 3 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、およびそれぞれ配列番号 373～434 に記載の配列と少なくとも 80%～100% 同一である CDR 1、CDR 2、および CDR 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む IL6 アンタゴニストを有し、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i) (a) の TGF アンタゴニストまたは (b) の IL6 アンタゴニストが第 1 のリンカーと融合しており、(ii) 第 1 のリンカーが配列番号 625 のアミノ酸 276～489 を含む CH2 および CH3 の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(iii) CH2CH3 定常領域ポリペプチドが第 2 のリンカーと融合しており、そして (iv) 第 2 のリンカーが (a) の TGF アン

タゴニストまたは(b)のIL6アンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第1のリンカーはリンカー47(配列番号543)またはリンカー80(配列番号576)であり、第2のリンカーはリンカー102(配列番号589)であり、IL6アンタゴニストのV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間のさらなる(第3の)リンカーはリンカー46(配列番号542)である。

【0141】

他の実施形態では、多重特異性Xceptor融合タンパク質は、(a)配列番号743もしくは744に記載の配列に少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むTGFアンタゴニスト、および(b)配列番号745のアミノ酸配列または配列番号745のアミノ酸22~401と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むIL10アンタゴニストを有し、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i)(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のIL10アンタゴニストが第1のリンカーと融合しており、(ii)第1のリンカーがCH2およびCH3の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(iii)CH2CH3定常領域ポリペプチドが第2のリンカーと融合しており、そして(iv)第2のリンカーが(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のIL10アンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第1のリンカーはリンカー47(配列番号543)またはリンカー80(配列番号576)であり、第2のリンカーはリンカー102(配列番号589)である。

10

【0142】

さらなる実施形態では、多重特異性Xceptor融合タンパク質は、(a)配列番号743もしくは744に記載の配列と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むTGFアンタゴニスト、および(b)配列番号747のアミノ酸配列と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むVEGFアンタゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i)(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のVEGFアンタゴニストが第1のリンカーと融合しており、(ii)第1のリンカーがCH2およびCH3の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(iii)CH2CH3定常領域ポリペプチドが第2のリンカーと融合しており、そして(iv)第2のリンカーが(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のVEGFアンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第1のリンカーはリンカー47(配列番号543)またはリンカー80(配列番号576)であり、第2のリンカーはリンカー102(配列番号589)である。

20

30

【0143】

さらなる実施形態では、多重特異性Xceptor融合タンパク質は、(a)配列番号743もしくは744に記載の配列と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むTGFアンタゴニスト、および(b)配列番号748または749のアミノ酸と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列を含むTNFアンタゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i)(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のTNFアンタゴニストが第1のリンカーと融合しており、(ii)第1のリンカーがCH2およびCH3の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(iii)CH2CH3定常領域ポリペプチドが第2のリンカーと融合しており、そして(iv)第2のリンカーが(a)のTGFアンタゴニストまたは(b)のTNFアンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第1のリンカーはリンカー47(配列番号543)またはリンカー80(配列番号576)であり、第2のリンカーはリンカー102(配列番号589)である。具体的な実施形態では、多重特異性Xceptor融合タンパク質は配列番号1236のアミノ酸配列を有する。

40

【0144】

さらなる実施形態では、多重特異性Xceptor融合タンパク質は、(a)配列番号743または744に記載の配列と少なくとも80%~100%同一であるアミノ酸配列

50

を含む T G F アンタゴニスト、および (b) それぞれ配列番号 921 ~ 1078 に記載の配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一である C D R 1、C D 2、および C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖可変領域、およびそれぞれ配列番号 762 ~ 920 に記載の配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一である C D R 1、C D R 2、および C D R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む H G F アンタゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i) (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の H G F アンタゴニストが第 1 のリンカーと融合しており、(i i) 第 1 のリンカーが C H 2 および C H 3 の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(i i i) C H 2 C H 3 定常領域ポリペプチドが第 2 のリンカーと融合しており、そして (i v) 第 2 のリンカーが (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の H G F アンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第 1 のリンカーはリンカー 47 (配列番号 543) またはリンカー 80 (配列番号 576) であり、第 2 のリンカーはリンカー 102 (配列番号 589) であり、H G F アンタゴニストの V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインの間のさらなる (第 3 の) リンカーはリンカー 46 (配列番号 542) である。

10

## 【0145】

さらに他の実施形態では、多重特異性 X c e p t o r 融合タンパク質は、(a) 配列番号 743 または 744 に記載の配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む T G F アンタゴニスト、および (b) 配列番号 761 のアミノ酸配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む T W E A K アンタゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i) (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の T W E A K アンタゴニストが第 1 のリンカーと融合しており、(i i) 第 1 のリンカーが C H 2 および C H 3 の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(i i i) C H 2 C H 3 定常領域ポリペプチドが第 2 のリンカーと融合しており、そして (i v) 第 2 のリンカーが (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の T W E A K アンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第 1 のリンカーはリンカー 47 (配列番号 543) またはリンカー 80 (配列番号 576) であり、かつ第 2 のリンカーはリンカー 102 (配列番号 589) である。具体的実施形態では、多重特異性 X c e p t o r 融合タンパク質は配列番号 1237 のアミノ酸配列を有する。

20

## 【0146】

さらに他の実施形態では、多重特異性 X c e p t o r 融合タンパク質は、(a) 配列番号 743 もしくは 744 に記載の配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む T G F アンタゴニスト、および (b) 配列番号 754 ~ 760 のアミノ酸配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む I G F アンタゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i) (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の I G F アンタゴニストが第 1 のリンカーと融合しており、(i i) 第 1 のリンカーが C H 2 および C H 3 の免疫グロブリン重鎖定常領域と融合しており、(i i i) C H 2 C H 3 定常領域ポリペプチドが第 2 のリンカーと融合しており、そして (i v) 第 2 のリンカーが (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の I G F アンタゴニストと融合している。特定の実施形態では、第 1 のリンカーはリンカー 47 (配列番号 543) またはリンカー 80 (配列番号 576) であり、かつ第 2 のリンカーはリンカー 102 (配列番号 589) である。

30

## 【0147】

他の実施形態では、多重特異性 X c e p t o r 融合タンパク質は、(a) 配列番号 743 または 744 に記載の配列と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む T G F アンタゴニスト、および (b) 配列番号 746 のアミノ酸 74 ~ 181 と少なくとも 80% ~ 100% 同一であるアミノ酸配列を含む G I T R アゴニストを有し、ここで、アミノ末端からカルボキシ末端またはカルボキシ末端からアミノ末端で、(i) (a) の T G F アンタゴニストまたは (b) の G I T R アゴニストが第 1 のリンカーと融合しており、(i i) 第 1 のリンカーが C H 2 および C H 3 の免疫グロブリン重鎖定常領域

40

50

と融合しており、(i i i) C H 2 C H 3 定常領域ポリペプチドが第2のリンクーと融合しており、そして(i v)第2のリンクーが(a)のT G F アンタゴニストまたは(b)のG I T R アゴニストと融合している。特定の実施形態では、第1のリンクーはリンクー47(配列番号543)またはリンクー80(配列番号576)であり、第2のリンクーはリンクー102(配列番号589)である。

#### 多重特異性融合タンパク質の作製

本明細書に記載する任意の結合ドメインポリペプチドまたは融合タンパク質を効率よく产生するために、リーダーペプチドを使用して発現されるポリペプチドおよび融合タンパク質の分泌を容易にする。任意の従来のリーダーペプチド(シグナル配列)の使用により、新たに(n a s c e n t l y)発現されたポリペプチドまたは融合タンパク質を分泌経路に誘導し、リーダーペプチドとポリペプチドまたは融合タンパク質の間の接合部においてまたはその近辺での成熟ポリペプチドまたは融合タンパク質からのリーダーペプチドの切断をもたらすと予想される。特定のリーダーペプチドは、分子操作を容易にするためのリーダーペプチドのコード配列の最初のところまたは最後のところに制限エンドヌクレアーゼ切断部位の容易な含有(inclusion)を可能にする、ポリヌクレオチドによってコードされる配列の使用など、当技術分野で公知である考慮事項に基づいて選択される。ただし、このような導入配列は、新たに発現されたタンパク質からのリーダーペプチドのいかなる所望のプロセシングにも許容されない形では干渉しない、またはリーダーペプチドがポリペプチドまたは融合タンパク質の成熟中に切断されない場合、ポリペプチドまたは融合タンパク質分子のいかなる所望の機能にも許容されない形では干渉しないかのいずれかである、アミノ酸を指定するものとする。本開示の例示的なリーダーペプチドには、天然リーダー配列(すなわち、天然タンパク質で発現される配列)、またはXが任意のアミノ酸でありnが0~3であるH<sub>3</sub>N-M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G(X)<sub>n</sub>-C O<sub>2</sub>H(配列番号1185)またはH<sub>3</sub>N-M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G-C O<sub>2</sub>H(配列番号1186)などの異種リーダー配列の使用が含まれる。

#### 【0148】

本明細書に記すように、本明細書に記載する、外部ドメインなどの結合ドメインの変異体および誘導体、軽鎖および重鎖可変領域およびCDRが意図される。一例では、1つまたは複数のアミノ酸残基が特異的結合因子のアミノ酸配列を補充する挿入変異体を提供する。挿入はタンパク質の一末端または両末端に位置してよく、または特異的結合因子のアミノ酸配列の内部領域内に位置してよい。本開示の変異体生成物は、成熟状態の特異的結合因子の生成物、すなわちリーダー配列またはシグナル配列が除去され、生成するタンパク質が追加的アミノ末端残基を有する特異的結合因子の生成物も含む。追加的アミノ末端残基は別のタンパク質に由来してよく、または特異的タンパク質に由来するとして同定可能ではない1つまたは複数の残基を含むことができる。位置-2および-1に追加的メチオニンおよびリシン残基を有する本開示のポリペプチドと同様に、位置-1に追加的メチオニン残基を有するポリペプチドを意図する。追加のM e t、M e t-L y sまたはL y s残基(または一般に1つまたは複数の塩基性残基)を有する変異体は、細菌宿主細胞中の高い組換えタンパク質产生に特に有用である。

#### 【0149】

本明細書で使用する「アミノ酸」は、天然アミノ酸(自然界に存在するアミノ酸)、置換された天然アミノ酸、非天然アミノ酸、置換された非天然アミノ酸、またはこれらの任意の組合せを指す。天然アミノ酸に関する指定は、本明細書では標準一文字または三文字コードのいずれかとして記す。天然極性アミノ酸は、アスパラギン(A s pまたはN)およびグルタミン(G l nまたはQ)、およびアルギニン(A r gまたはR)、リシン(L y sまたはK)、ヒスチジン(H i sまたはH)、およびこれらの誘導体などの塩基性アミノ酸、ならびにアスパラギン酸(A s pまたはD)およびグルタミン酸(G l uまたはE)、およびこれらの誘導体などの酸性アミノ酸を含む。天然疎水性アミノ酸は、トリプトファン(T r pまたはW)、フェニルアラニン(P h eまたはF)、イソロイシン(I

10

20

30

40

50

LeまたはI)、ロイシン(LeuまたはL)、メチオニン(MetまたはM)、バリン(ValまたはV)、およびこれらの誘導体、ならびにグリシン(GlyまたはG)、アラニン(AlaまたはA)、プロリン(ProまたはP)、およびこれらの誘導体などの他の非極性アミノ酸を含む。中程度の極性の天然アミノ酸は、セリン(SerまたはS)、スレオニン(ThrまたはT)、チロシン(TyrまたはY)、システイン(CysまたはC)、およびこれらの誘導体を含む。他に指定しない限り、本明細書に記載する任意のアミノ酸はD-またはL-形状(configuration)のいずれかであってよい。

## 【0150】

置換変異体は、アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸残基が除去され代わりの残基に置換されている融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、置換は現実には保存性であるが、しかしながら、本開示は非保存的である置換も包含する。物理的性質および二次および三次タンパク質構造に対する寄与に従って、アミノ酸を分類することができる。保存的置換は、類似した性質を有する別のアミノ酸に代えて1つのアミノ酸の置換として、当技術分野で理解されている。例示的な保存的置換は、すぐ下の表1に記載する(1997年3月13日に公開されたWO97/09433、10頁を参照されたい)。

## 【0151】

## 【表1】

表1. 保存的置換 I

側鎖	特性	アミノ酸
脂肪族	非極性	G, A, P, I, L, V
	極性-非荷電	S, T, M, N, Q
	極性-荷電	D, E, K, R
芳香族		H, F, W, Y
その他		N, Q, D, E

あるいは、保存的アミノ酸は、すぐ下の表2に述べるように、Lehninger(Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY: NY(1975年)、71~77頁)に記載されたのと同様に分類することができる。

## 【0152】

## 【表2】

表2. 保存的置換 II

側鎖	特性	アミノ酸
非極性(疎水性)	脂肪族	A, L, I, V, P
	芳香族	F, W
	イオウ含有	M
	ボーダーライン	G
非荷電-極性	ヒドロキシル	S, T, Y
	アミド	N, Q
	スルフヒドリル	C
	ボーダーライン	G
正に荷電(塩基性)		K, R, H
負に荷電(酸性)		D, E

変異体または誘導体は、特異的発現系の使用から生じる追加のアミノ酸残基を有することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合生成物の一

10

20

30

40

50

部として所望のポリペプチドを発現する市販のベクターの使用は、該所望のポリペプチドからのG S T成分の切断後に位置-1に追加のグリシン残基を有する、該所望のポリペプチドを与える。ヒスチジンタグが、アミノ酸配列、一般に配列のカルボキシおよび/またはアミノ末端に取り込まれている変異体を含めた、他のベクター系での発現から生じる変異体も意図される。

【0153】

本開示の結合ドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸残基が除去されている、欠失変異体も意図される。欠失は融合タンパク質の一末端もしくは両末端で生じ得るか、またはアミノ酸配列内の1つもしくは複数の残基の除去からもたらされ得る。

10

【0154】

特定の例示的実施形態では、本開示の融合タンパク質はグリコシル化されており、グリコシル化のパターンは、(組換え宿主細胞で調製される場合)タンパク質が発現される宿主細胞、および培養条件を含めた様々な要因に依存する。

20

【0155】

本開示は、融合タンパク質の誘導体も提供する。誘導体は、アミノ酸残基の挿入、欠失、または置換以外の修飾を有する特異的結合ドメインポリペプチドを含む。特定の実施形態では、修飾は現実には共有結合であり、例えば、ポリマー、脂質、他の有機および無機成分との化学結合を含む。本開示の誘導体を調製して特異的結合ドメインポリペプチドの循環半減期を増大することができ、または本開示の誘導体を設計して、所望の細胞、組織もしくは器官に対する該ポリペプチドの標的化能力を改善することができる。

20

【0156】

本開示は、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号および同第4,179,337号に記載されたような、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールなどの1つまたは複数の水溶性ポリマーの結合を含むように、共有結合により修飾されたかまたは誘導体化された融合タンパク質をさらに包含する。当技術分野で公知であるさらに他の有用なポリマーには、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロースおよび他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えば、グリセロール)およびポリビニルアルコール、およびこれらのポリマーの混合物が挙げられる。特に好ましいのは、ポリエチレングリコール(P E G)誘導体化タンパク質である。水溶性ポリマーは特異的位置、例えば本開示によるタンパク質およびポリペプチドのアミノ末端で結合することができ、またはポリペプチドの1つもしくは複数の側鎖とランダムに結合することができる。治療能力を改善するためのP E Gの使用は米国特許第6,133,426号に記載される。

30

【0157】

本開示の特定の実施形態は免疫グロブリンまたはF c融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、特にF cドメインがF c R n、新生児F c受容体と相互作用することができる場合、長い半減期、例えば数時間、1日以上、またはさらに1週間以上を有することができる。F cドメインにおけるF c R nに関する結合部位は、細菌プロテインAおよびGが結合する部位でもある。これらのタンパク質間の強い結合は、例えば、タンパク質精製中にプロテインAまたはプロテインG親和性クロマトグラフィーを利用することによって、本開示の抗体または融合タンパク質を精製するための手段として使用することができる。

40

【0158】

タンパク質の精製技法は当業者には周知である。これらの技法は、1レベルでの、ポリペプチドおよび非ポリペプチド画分の粗製物分画を含む。部分的または完全な精製(または均質性までの精製)を実施するためにクロマトグラフィー技法および電気泳動技法を使用する、さらなる精製がしばしば所望される。純粋融合タンパク質の調製に特に適した分

50

析法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に有効な方法は、迅速タンパク質液体クロマトグラフィーおよびHPLCである。

【0159】

本開示の特定の態様は、融合タンパク質の精製、および特定の実施形態では、融合タンパク質の実質的精製に関する。本明細書で使用する用語「精製融合タンパク質」は他の成分から単離可能な組成物を指すものとし、融合タンパク質は、その自然に得られる状態に對して任意の程度まで精製される。したがって精製融合タンパク質は、それが天然に存在し得る環境から遊離した融合タンパク質も指す。

【0160】

一般に「精製された」は、様々な他の成分を除去するための分画を施した融合タンパク質の組成物を指し、その組成物はその発現される生物活性を実質的に保持する。用語「実質的に精製された」を使用する場合、この表記は、融合タンパク質が組成物の主成分を形成する：例えば、組成物の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99重量%以上のタンパク質を構成する、融合結合タンパク質の組成物を指す。

【0161】

精製度を定量化するための様々な方法は、本開示に照らすと当業者には公知である。これらは例えば、活性画分の特異的結合活性の決定、またはSDS/PAGE分析による画分の融合タンパク質の量の評価を含む。タンパク質画分の純度を評価するのに好ましい方法は、画分の結合活性を計算し、それを初期抽出物の結合活性と比較し、したがって「精製倍数」によって評価する本明細書の精製度を計算することである。結合活性の量を表すために使用する実際の単位は、当然ながら、精製を追跡するために選択する個々のアッセイ技法、および発現される融合タンパク質が検出可能な結合活性を示すかどうかに依存する。

【0162】

タンパク質精製において使用するのに適した様々な技法は、当業者には周知である。これらは例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈澱、または熱変性、次に遠心分離；イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、および親和性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；およびこれらの技法と他の技法の組合せを含む。当技術分野で一般に公知であるように、これらの様々な精製工程を実施する順序は変えることができること、または特定の工程を省略して、実質的に精製されたタンパク質の調製に適した方法をさらにもたらすことができることが考えられる。

【0163】

融合タンパク質は常にその最も精製された状態で提供されるという、一般要件は存在しない。実際、実質的にあまり精製されていないタンパク質が、特定の実施形態において有用性があるということが意図される。部分的な精製は、組合せにおいてより少ない精製工程を使用することによって、または同じ一般的な精製スキームの異なる形態を利用することによって実施することができる。例えば、HPLC装置を利用して実施するカチオン交換カラムクロマトグラフィーは、低圧クロマトグラフィーシステムを利用する同じ技法より高い精製を、一般にもたらすであろうことは理解される。相対的低精製度を示す方法は、タンパク質産物の全体的回収、または発現されたタンパク質の結合活性の維持において利点があり得る。

【0164】

ポリペプチドの移動は、異なるSDS/PAGE条件と共に、時には著しく変わる可能性があることは公知である(Capaldiら(1977年)Biochem. Biophys. Res. Comm. 76巻:425頁)。したがって、異なる電気泳動条件下において、精製または部分的に精製された融合タンパク質発現産物の見かけの分子量が、変わること可能性があることは理解されよう。

ポリヌクレオチド、発現ベクター、および宿主細胞

10

20

30

40

50

本開示は、本開示の多重特異性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド（単離または精製または純粋ポリヌクレオチド）、このようなポリヌクレオチドを含むベクター（クローニングベクターおよび発現ベクターを含む）、および本開示によるポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換またはトランスフェクトした細胞（例えば、宿主細胞）を提供する。

【0165】

特定の実施形態では、本開示の結合ドメイン、または1つまたは複数のこのような結合ドメインを含有する多重特異性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）を意図する。多重特異性融合タンパク質構築物をコードする発現カセットは、添付の実施例において提供される。

10

【0166】

本開示は、本開示のポリヌクレオチドを含むベクター、および特に、組換え発現構築物にも関する。一実施形態では、本開示は、本開示のTGFアンタゴニストドメインおよびIL6またはIL6/IL6R結合ドメイン、ならびにこのような多重特異性融合タンパク質コード配列の転写、翻訳およびプロセシングを引き起こすかまたは容易にする他のポリヌクレオチド配列を含有する多重特異性融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを意図する。

【0167】

原核生物および真核生物宿主と共に使用するに適したクローニングおよび発現ベクターは、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY、(1989年)に記載される。例示的なクローニング/発現ベクターには、クローニングベクター、シャトルベクターおよびプラスミド、ファージミド、ファスミド、コスミド、ウイルス、人工染色体に基づいてよい発現構築物、または核酸媒体中に含有されるポリヌクレオチドの増幅、移動および/または発現に適していることが当技術分野で公知である任意の核酸媒体が挙げられる。

20

【0168】

本明細書で使用する「ベクター」は、連結した別の核酸を運ぶことができる核酸分子を意味する。例示的なベクターには、プラスミド、酵母人工染色体およびウイルスゲノムが含まれる。特定のベクターは宿主細胞で自己複製することができるが、一方他のベクターは宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは本明細書では「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と呼び、これらは発現制御配列と作動可能に連結し、したがってこれらの配列の発現を誘導することができる核酸配列を含有する。

30

【0169】

特定の実施形態では、発現構築物はプラスミドベクターに由来する。例示的な構築物には、アンピシリン耐性遺伝子、ポリアデニル化シグナルおよびT7プロモーター部位をコードする核酸配列を有する修飾pNASSベクター（Clontech, Palo Alto, CA）、CHEF1プロモーターを有するpDEF38およびpNEF38（CMC ICOS Biologics, Inc.）、およびCMVプロモーターを有するpD18（Lonza）が挙げられる。他の適切な哺乳動物発現ベクターが周知である（例えば、Ausubelら、1995年；Sambrookら、上掲を参照；例えば、In vitrorogen, San Diego, CA；Novagen, Madison, WI；Pharmacia, Piscataway, NJからのカタログも参照されたい）。適切な選択剤（例えば、メトトレキセート）の施用後の遺伝子増幅に起因する融合タンパク質の高い産生レベルを促進するのに適した調節制御下で、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）コード配列を含む、有用な構築物を調製することができる。

40

【0170】

一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカー、および前記したような下流構造配列の転写を誘導するための高発現遺伝子由来

50

のプロモーターを含む。本開示によるポリヌクレオチドと作動可能に連結したベクターは、クローニングまたは発現構築物をもたらす。例示的なクローニング/発現構築物は、少なくとも1つの発現制御エレメント、例えば本開示のポリヌクレオチドと作動可能に連結したプロモーターを含有する。本開示によるベクターおよびクローニング/発現構築物における、エンハンサー、因子特異的結合部位、ターミネーターおよびリボソーム結合部位などの、追加発現制御エレメントも意図される。本開示によるポリヌクレオチドの異種構造配列は、翻訳開始配列および翻訳終結配列とともに適切な段階で構築する。したがって、例えば、本明細書で提供する融合タンパク質コード核酸は、宿主細胞でこのようなタンパク質を発現させるための組換え発現構築物としての、様々な発現ベクター構築物のいずれか1つに含ませることができる。

10

## 【0171】

適切なDNA配列（複数可）を、様々な手順によって例えばベクターに挿入することができる。一般に、当技術分野で公知である手順によって、適切な制限エンドヌクレアーゼ切断部位（複数可）にDNA配列を挿入する。クローニング、DNA単離、増幅および精製のための標準的技法、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含めた酵素反応のための標準的技法、および様々な分離技法が意図される。いくつかの標準的技法は、例えば、Ausubelら (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA, 1993年) ; Sambrookら (Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1989年) ; Maniatisら (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1982年) ; Glover (Ed.) (DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK, 1985年) ; Hames and Higgins (Eds.) (Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK, 1985年) ; およびその他に記載される。

20

## 【0172】

発現ベクターにおけるDNA配列は、少なくとも1つの適切な発現制御配列（例えば、構成的プロモーターまたは制御的プロモーター（regulated promoter））と作動可能に連結して、mRNA合成を誘導する。このような発現制御配列の代表例には、前記したような真核生物細胞またはそれらのウイルスのプロモーターが含まれる。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは他のベクターを選択マーカーとともに使用して、任意の所望の遺伝子から選択することができる。真核生物プロモーターには、CMV即時初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスマタロチオネイン-Iが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は十分に当業者のレベルの範囲内であり、本開示によるタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸と作動可能に連結した少なくとも1つのプロモーターまたは制御的プロモーターを含む、特定の特に好ましい組換え発現構築物の調製は、本明細書に記載する。

30

## 【0173】

本開示のポリヌクレオチドの変異体も意図する。変異体ポリヌクレオチドは、本明細書に記載する定義された配列のポリヌクレオチドの1つと少なくとも90%、および好ましくは95%、99%、または99.9%同一であり、または約65~68で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、または約42で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミドのストリンジエントハイブリダイゼーション条件下において、定義された配列のこれらのポリヌクレオチドの1つとハイブリダイズする。ポリヌクレオチド変異体は、結合ドメイン、またはその融合タンパク質をコードする能力を保持し、本明細書に記載する機能を有する。

40

50

## 【0174】

用語「ストリンジエント」を使用して、ストリンジエントとして当技術分野で一般に理解されている条件を指す。ハイブリダイゼーションストリンジエンシーは主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関するストリンジエント条件の例は、約65～68で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、または約42で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミドである(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989年を参照されたい)。

## 【0175】

よりストリンジエントな条件(より高い温度、より低いイオン強度、より高濃度のホルムアミドまたは他の変性剤など)も使用することはできるが、しかしながら、ハイブリダイゼーションの割合は影響を受ける可能性がある。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに関する場合、さらなる例示的なストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、37(14塩基オリゴヌクレオチド用)、48(17塩基オリゴヌクレオチド用)、55(20塩基オリゴヌクレオチド用)、および60(23塩基オリゴヌクレオチド用)における $6 \times SSC$ 、0.05%のピロリン酸ナトリウム中の洗浄を含む。

## 【0176】

本開示のさらなる態様は、本開示のポリヌクレオチドまたはベクター/発現構築物のいずれかを用いて形質転換またはトランスフェクトした、または他の方法でそれらを含有する宿主細胞を提供する。本開示のポリヌクレオチドまたはクローニング/発現構築物は、形質転換、トランスフェクション、および形質導入を含めた、当技術分野で公知である任意の方法を使用して適切な細胞中に導入する。宿主細胞は、例えば $ex\ vi\ vo$ 遺伝子療法を含めた $ex\ vi\ vo$ 細胞療法を受けた被験体の細胞を含む。本開示によるポリヌクレオチド、ベクター、またはタンパク質を有するとき本開示の一態様として意図する真核生物宿主細胞には、被験体自身の細胞(例えば、ヒト患者自身の細胞)に加えて、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系(発現される多価結合分子のグリコシル化パターンを修飾することができる修飾型CHO細胞を含む、米国特許出願No.2003/0115614を参照されたい)、COS細胞(COS-7など)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、HEK293細胞、HepG2細胞、N細胞、3T3細胞、Spodoptera frugiperda細胞(例えば、Sf9細胞)、Saccharomyces cerevisiae細胞、および本開示によるタンパク質またはペプチドの発現、そして場合によっては単離において有用であることが当技術分野で公知である任意の他の真核生物細胞が挙げられる。Escherichia coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、Streptomyces、または本開示によるタンパク質またはペプチドの発現、そして場合によっては単離に適していることが当技術分野で公知である任意の原核生物細胞を含めた、原核生物細胞も意図される。原核生物細胞からタンパク質またはペプチドを単離する際に、特に、封入体からタンパク質を抽出するための当技術分野で公知である技法を、使用することができる事が意図される。適切な宿主の選択は、本明細書の教示から当業者の範囲内にある。本開示の融合タンパク質をグリコシル化する宿主細胞が意図される。

## 【0177】

用語「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)は、組換え発現ベクターを含有する細胞を指す。このような用語は、特定の被験体細胞だけでなく、このような細胞の子孫を指すことを目的とすることは理解されるはずである。特定の修飾は変異または環境の影響のいずれかによって後の世代で起こる可能性があるので、このような子孫は、実際は、

10

20

30

40

50

親細胞と同一ではない可能性があるが、本明細書で使用する用語「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。

【0178】

組換え宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、または特定遺伝子の増幅に適するように改変した従来の栄養培地で培養することができる。例えば温度、pHなどの、発現用に選択した特定宿主細胞のための培養条件は、当業者には容易に明らかであろう。様々な哺乳動物細胞培養系を利用して、組換えタンパク質を発現させることも可能である。哺乳動物発現系の例には、G l u z m a n ( 1 9 8 1 年 ) C e l l 2 3 卷 : 1 7 5 頁によって記載されたサル腎臓線維芽細胞の C O S - 7 系、および適合ベクターを発現することができる他の細胞系、例えば C 1 2 7 、 3 T 3 、 C H O 、 H e L a および B H K 細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、例えば、多価結合タンパク質発現構築物の調製に関して本明細書に記載するように、複製起点、適切なプロモーター、そして場合によってはエンハンサー、およびさらに任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および 5' 隣接非転写配列を含む。 S V 4 0 スプライス、およびポリアデニル化部位由来の D N A 配列を使用して、必要とされる非転写遺伝子エレメントを与えることができる。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、 D E A E デキストラント媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション ( D a v i s ら、 ( 1 9 8 6 年 ) B a s i c M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y ) を含めた、当業者が精通している様々な方法によって実施することができる。

10

20

30

40

50

【0179】

一実施形態では、本開示によるタンパク質またはポリペプチドの発現を誘導する組換えウイルス構築物を、宿主細胞に形質導入する。形質導入した宿主細胞は、ウイルス出芽中にウイルス粒子によって取り込まれた宿主細胞膜の一部分由来の、発現タンパク質またはポリペプチドを含有するウイルス粒子を生成する。

組成物および使用法

T G F 、 I L 6 、 I L 1 0 、 G I T R 、 V E G F 、 T N F 、 H G F 、 T W E A K 、 I G F 1 または I G F 2 調節不全と関連した疾患状態に罹患したヒトまたは非ヒト哺乳動物を治療するために、本開示の多重特異性融合タンパク質を、1回または複数回の投与過程後に疾患状態の症状を改善するのに有効である量で被験体に投与する。ポリペプチドであるので、本開示の多重特異性融合タンパク質は、以下でより十分論じるように、注射または注入による静脈内投与に使用することができる、他の薬学的に許容される賦形剤の安定剤を場合によっては含む、薬学的に許容される希釈剤に懸濁または溶解することができる。

【0180】

薬学的に有効な用量は、疾患状態の発生を予防、阻害する、または疾患状態を治療する（症状をある程度、好ましくは症状全てを改善する）のに必要とされる用量である。薬学的に有効な用量は、治療薬、併用薬剤、および医学分野の当業者が認識している他の要因の考慮下での、疾患の型、使用する組成物、投与の経路、治療する被験体の型、特定被験体の身体特性に依存する。例えば、0.1 m g / 体重 1 k g ~ 1 0 0 m g / 体重 1 k g の量（一回用量として、または適切な間隔である1時間毎、毎日、毎週、毎月、またはこれらの任意の組合せで与える複数回用量で投与することができる）の活性成分を、本開示の結合ドメインポリペプチドまたは多重特異性融合タンパク質の効力に応じて投与することができる。

【0181】

特定の態様では、融合タンパク質の組成物を本開示によって提供する。本開示の医薬組成物は一般に、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と組合せて1つまたは複数の型の結合ドメインまたは融合タンパク質を含む。このような担体は、利用する用量および濃度でレシピエントに無毒である。治療用途の薬学的に許容される担体は薬剤分野では周知であり、例えば R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i

ences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro (Ed.) 1985年)に記載されている。例えば、生理的pHで滅菌生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水を使用することができる。防腐剤、安定剤、色素などを医薬組成物内に提供することができる。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、またはp-ヒドロキシ安息香酸のエステルを防腐剤として加えることができる。上記文献1449頁。さらに、抗酸化剤および懸濁剤を使用することができる。上記文献。本発明の化合物は遊離塩基または塩の形態のいずれかで使用することができ、両方の形態が本発明の範囲内に存在すると考えられる。

## 【0182】

医薬組成物は、バッファーなどの希釈剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、炭水化物(例えば、グルコース、スクロース、またはデキストリン)、キレート剤(例えば、EDTA)、グルタチオンまたは他の安定剤または賦形剤も含有することができる。中性緩衝生理食塩水、または非特異的血清アルブミンと混合した生理食塩水は、例示的な適切な希釈剤である。生成物は、希釈剤として適切な賦形剤溶液を使用して、凍結乾燥品として製剤にすることが好ましい。

## 【0183】

本開示の組成物を使用して、TGFまたはIL6調節不全の結果であるかまたはこれと関係するヒトおよび非ヒト哺乳動物における疾患状態を治療することができる。TGFの増大した産生または活性は、腫瘍形成、新脈管形成、転移、転移性移動、ならびに上皮癌および間葉癌を含めた、様々な疾患プロセスに関与している(例えば、Of特ら(1998年) *Curr. Biol.* 8巻:1243頁; Pardalí & Mousaka(2007年) *Biochim. Biophys. Acta* 1775巻:21頁を参照されたい)。さらに、TGFシグナル伝達は、新脈管形成および血管障害の発症と関係している(Bertolinoら(2005年) *Chest* 128巻:585S頁)。

## 【0184】

IL10はリンパ球疾患の発生において重要な役割を果たすことができる(米国特許第5,639,600号)、およびIL10は、非ホジキンリンパ腫細胞の増殖を増大することができることが示唆されている(Voorzangerら(1996年) *Cancer Res.* 56巻:5499頁)。さらに近年、TGFとIL10は一緒に働いて制御された炎症応答を確実にすることが提議されている(Li & Flavell(2008年) *Immunity* 28巻:468頁)。腫瘍発現型GITRLはヒトにおいて免疫破壊を媒介することが示唆されている(Baltzら(2007年) *FASEB J.* 21巻:2442頁)。VEGFおよびTGFの過剰発現は子宮頸癌の発症と関係している(Baritakiら(2007年) *Int. J. Oncol.* 31巻:69頁)。TNFは腎細胞癌の発症と関係している(Harrisonら(2007年) *J. Clin. Oncol.* 25巻:4542~9頁)。TGFは扁平上皮癌細胞のHGF依存的浸潤を促進することが示されており(Lewisら(2004年) *Br. J. Cancer* 90巻:822頁)、そしてHGFは細胞増殖を刺激し、ヒト膵臓癌細胞でのTGFの発現を高めることができ(Ohbaら(1999年) *J. Gastroenterol.* 34巻:498~504頁)。さらに、TGFおよびHGFは胃癌細胞の浸潤性を刺激することが示されている(Inoueら、(1977年) *Jpn. J. Cancer Res.* 88巻:152頁)。IGF1Rは、肉腫を含めた癌の治療において同定されている(Scotland & Picci(2008年) *Curr. Opin. Oncol.* 20巻:419~27頁; Yuen & Macaulay(2008年) *Expert Opin. Ther. Targets* 12巻:589~603頁)。

## 【0185】

IL-6トランスシグナル伝達は結腸癌などの悪性疾患に関与しており、一方IL6シ

10

20

30

40

50

スシグナル伝達は、ホルモン非依存性前立腺癌、B細胞非ホジキンリンパ腫などのB細胞増殖障害、および腎臓、乳房、結腸、肺、脳、および他の組織の進行癌を含めた悪性疾患に関与している（例えば、Sansoneら（2007年）J. Clin. Invest. 117巻：3988頁を参照されたい）。したがって、本開示の多重特異性融合タンパク質は、様々なTGF関連自己免疫障害（全身性エリテマトーデス（SLE）または関節リウマチなど）、アルツハイマー病または過剰増殖疾患、または多発性嚢胞腎、肺癌、結腸癌、尿路上皮癌、膀胱癌、腎細胞癌、乳癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、ユーリング肉腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、頭頸部癌、メラノーマ、グリア芽腫、膵臓癌、または肝細胞癌などを含めた悪性疾患障害を治療する際に有用である。

## 【0186】

10

「薬学的に許容される塩」は、薬学的に許容され親化合物の所望の薬理活性を有する、本開示の結合ドメインポリペプチドまたは融合タンパク質の塩を指す。このような塩には、以下の（1）例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸で形成される酸付加塩、または例えば酢酸、プロピオン酸、ヘキサン酸、シクロヘンタンプロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、マル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3-（4-ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、4-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸、4-メチルビシクロ[2.2.2]-オクト-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプタン酸、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、第三級ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフト酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸などの有機酸で形成される酸付加塩、または（2）親化合物に存在する酸性プロトンが、金属イオン、例えばアルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、またはアルミニウムイオンによって置換されるか、または例えばエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、N-メチルグルカミンなどの有機塩基と配位結合するかのいずれかのときに形成される塩が挙げられる。

20

## 【0187】

30

特定の例示的実施形態では、本開示のポリペプチドまたは融合タンパク質を、例えばボーラス注射または注入によって静脈内投与する。静脈内以外の投与の経路には、経口、局所、非経口（例えば、舌下または口腔）、舌下、直腸、腔、および鼻腔内が含まれる。本明細書で使用する用語非経口は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内、海綿内、鞘内（intrathecal）、道内（intrametal）、尿道内注射、脊髄周囲または注入技法を含む。患者への組成物の投与により、その中に含有される活性成分に生物学的利用能を与えることができるよう、医薬組成物を製剤化する。患者に投与される組成物は1つまたは複数の投薬単位（dosage unit）の形態をとり、例えば錠剤は1つの投与単位であってよく、かつエアロゾル形態での本開示の1つまたは複数の化合物の容器は複数の投薬単位を保持することができる。

## 【0188】

40

経口投与用に、スクロース、カオリン、グリセリン、スターチデキストラン、シクロデキストリン、アルギン酸ナトリウム、エチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースなどの、賦形剤および/または結合剤が存在してよい。甘味剤、防腐剤、色素/着色剤、香味増進剤、またはこれらの任意の組合せが、場合によっては存在してよい。コーティングシェルも場合によっては使用することができる。

## 【0189】

注射により投与することを目的とする組成物に、1つまたは複数の界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、バッファー、安定剤、等張化剤、またはこれらの任意の組合せを、場合によっては含めることができる。

## 【0190】

50

核酸ベースの製剤に関して、または本開示による発現産物を含む製剤に関して、約0.

0.1 μg / 体重 1 kg ~ 約 100 mg / 体重 1 kg を、例えば、皮内、皮下、筋肉内、または静脈内経路によって、または所与の環境の状況下に適した当技術分野で公知である任意の経路によって投与する。好ましい用量は、例えば約 1 μg / kg ~ 約 20 mg / kg であり、約 5 μg / kg ~ 約 10 mg / kg が特に好ましい。投与の回数および頻度は宿主の応答に依存することは、当業者には明らかであろう。

#### 【0191】

本開示の医薬組成物は、例えば固体、液体、または気体（エアロゾル）の形などの、患者への投与を可能にする任意の形態であってよい。本明細書に記載する任意の経路による投与用に、組成物は液体の形態、例えばエリキシル剤、シロップ、溶液、乳濁液または懸濁液であってよい。

10

#### 【0192】

本明細書で使用する液状医薬組成物は、溶液、懸濁液の形態、または他の同様の形態であれ、以下の構成成分：注射用水、食塩水溶液（例えば、生理食塩水溶液）、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム溶液、溶媒または懸濁媒体として働くことができる合成モノ-またはジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒などの滅菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などのバッファー、エチレンジアミン 4 酢酸などのキレート剤、およびナトリウム、塩化物、またはデキストロースなどの張性を調節するための薬剤の 1 つまたは複数を含むことができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックでできたアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入することができる。生理食塩水溶液は好ましい添加剤である。注射用医薬組成物は滅菌状態であることが好ましい。

20

#### 【0193】

調製物に、アルミニウム塩、油中水型エマルジョン、生分解性油性ビヒクル、水中油型エマルジョン、生分解性マイクロカプセル、およびリポソームを含めた送達ビヒクルなどの、他の構成成分を含めることも所望される場合がある。このようなビヒクルにおいて使用するためのアジュバントの例には、N - アセチルムラミル - L - アラニン - D - イソグルタミン (MDP)、リポ多糖 (LPS)、グルカン、IL - 12、GM - CSF、-インターフェロン、およびIL - 15 が含まれる。

30

#### 【0194】

当業者に公知である任意の適切な担体を本開示の医薬組成物において利用することができるが、担体の型は投与の形式、および徐放が所望されるかどうかに応じて変わる。非経口投与用に、担体は水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、バッファー、またはこれらの任意の組合せを含むことができる。経口投与用に、前記の担体、または、マンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム、またはこれらの任意の組合せなどの固形担体のいずれかを利用することができる。

#### 【0195】

第 2 の薬剤と併せた、本開示の多重特異性融合タンパク質組成物の投与も意図される。第 2 の薬剤は、炎症、自己免疫、および癌などの、特定の疾患状態用の標準的治療剤として、当技術分野で認められている薬剤であってよい。意図される例示的な第 2 の薬剤には、サイトカイン、増殖因子、ステロイド、NSAID、DMARD、化学療法剤、放射線療法剤、または他の活性および補助薬剤がある。

40

#### 【0196】

本開示は、本開示の医薬組成物を含む投薬単位を意図する。このような投薬単位には、例えば、2 区画バイアルまたはシリンジを含めた一回用量または複数回用量バイアルまたはシリンジ、凍結乾燥形態での本開示の医薬組成物および他の再構成用希釈剤を含むバイアルまたはシリンジが挙げられる。複数回用量投薬単位は、例えば静脈内注入デバイスと結び付けるためのバッグまたはチューブであってもよい。

#### 【0197】

50

本開示は、単位用量または複数回用量容器、例えばバイアル中の医薬組成物、および本明細書に記載するように障害に罹患する患者に組成物を投与するための説明書セットを含むキットも意図する。

### 【0198】

本明細書中で言及する、全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、非特許刊行物、表、配列、ウェブページなどは、参照によってそれらの全容を本明細書に組み込む。以下の実施例は、本開示を制限するものではなく、例示することを目的とする。

### 【実施例】

#### 【0199】

##### Xceptor 配列

本明細書において、例示的 IL6 アンタゴニスト可変領域 (VL および VH) 結合配列 (配列番号 373 ~ 496) を開示する。さらに、TGF R2 外部ドメインおよび抗 IL6 x R 結合ドメインを含む例示的 Xceptor 融合タンパク質のアミノ酸配列および核酸発現力セットを開示する。アミノ末端に TGF R2 外部ドメインを有し、カルボキシ末端に抗 IL6 x R 結合ドメインを有する Xceptor 融合タンパク質は、本明細書において TRU (XB6) - 1019.1 および TRU (XB6) - 1019.2 と称ぶ (アミノ酸配列はそれぞれ配列番号 737 および 738 で示され、対応するヌクレオチド配列はそれぞれ配列番号 741 および 742 で提供される)。逆配向の、すなわちアミノ末端に抗 IL6 x R 結合ドメイン、カルボキシ末端に TGF R2 外部ドメインを有する Xceptor 融合タンパク質は、本明細書において、TRU (X6B) - 1019.1 および TRU (X6B) - 1019.2 と称される (アミノ酸配列はそれぞれ配列番号 735 および 736 で提供され、対応するヌクレオチド配列はそれぞれ配列番号 739 および 740 で提供される)。

##### 活性の実施例

本明細書に記載する様々な Xceptor 融合タンパク質を、以下に記載するように活性に関して試験した。以下の実施例で使用した略語は、他に指示がない限りは、以下の用語を含む：

PBS-T : PBS、pH 7.2 ~ 7.4 および 0.1% の Tween (登録商標) 作業バッファー : 1% の BSA を含む PBS-T

プロッキングバッファー : 3% の BSA を含む PBS-T

##### (実施例 1)

##### TGF 結合ドメイン

Fab 結合ドメインのファージライブラリーを、基本的に Hoeft ら (2005 年) Nature Biotechnol. 23 卷 : 344 頁に記載のように、TGF または IL6 x R 複合体のどちらかに特異的な結合ドメインに関してスクリーニングする。結合ドメインを、PCR 増幅によりクローニングする。簡潔にいうと、Fab ライブラリーのクローニング由来の VL および VH 領域を、PCR SuperMix (Invitrogen, San Diego, CA) およびオーバーラップを介して G4S リンカーを作り出す適切なプライマーを使用して、初期アニーリングを 56 度 9 サイクル、その後 62

度さらに 20 サイクルで増幅する。PCR 産物をアガロースゲルにおいて分離し、Qiaegen (Chatsworth, CA) PCR Purification カラムを使用して精製する。第 2 ラウンドのソーアイング反応は、モル当量の VL および VH 産物を、拡張バッファー (Expand buffer) および水と混合し、95 度 5 秒間変性させ、その後室温でゆっくり冷却する工程を含む。増幅のために、dNTP の混合物を Expand 酵素に加え、72 度 10 秒間インキュベートする。外部プライマーを加え (5' VH および 3' VL)、混合物を、62 度におけるアニーリングおよび 45 分間の伸長反応を 35 サイクル実施する。得られた 750 塩基対産物をゲル精製し、EcoRI および NotI を用いて消化し、プラスミド pD28 内にクローニングする。(より詳細には、米国特許出願公開第 2005/0136049 号および PCT 出願公開 WO 2007

10

20

30

40

50

/ 1 4 6 9 6 8 を参照されたい)。

【0200】

(実施例2)

ELISAによる、XCEPTORのIL6およびハイパーIL6への結合

ハイパーIL6(HIL6またはIL6xR)、組換えヒトIL6(rhIL6)およびヒト可溶性IL6Rの結合活性を、実質的に以下のように、例示的なXceptor TRU(XT6)-1002、1019、1025、1042、1058およびTRU(X6T)-1019(それぞれ、配列番号608、625、631、648、664および670)に関して試験した。これらのXceptorはそれぞれ、TNFRSF1B外部ドメインおよび抗IL6xR結合ドメインを含む。

10

HIL6およびIL6の結合

96ウェルプレートの個々のウェルに、PBS(pH7.2~7.4)中2μg/ml溶液のヤギ抗ヒトIgG-Fc(Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA)から100μlを加えた。このプレートにカバーをし、4で一晩インキュベートした。PBS(pH7.2~7.4)および0.1%Tween(登録商標)20(PBS-T)を用いて4回洗浄後、250μlのプロッキングバッファー(3%BSAまたは10%正常ヤギ血清を含有するPBS-T)を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で2時間(または4で一晩)インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、100μl/ウェルのXceptor TNFRSF1B:抗HIL6試料および300ng/mlから出発して、作業バッファーで3倍段階希釈したヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems、Minneapolis、MN)を、抗ヒトIgG-Fcコーティングプレートの2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中150pM溶液のヒトハイパーIL6または組換えヒトIL6から100μl/ウェルを2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中150ng/ml溶液の抗ヒトIL6-ビオチン(R&D Systems)から100μl/ウェルを加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中で1:4,000に希釈した100μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビシン(Zymed、San Francisco、CA)を加え、プレートにカバーをして、室温で30分間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて6回洗浄後、100μl/ウェルの3,3,5,5-テトラメチルベンジン(3,3,5,5-tetramentylbenzidine)(TMB)基質溶液(Pierce、Rockford、IL)を約3から5分間加え、その後、50μlの停止バッファー(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を450nmにおいて読み取った。

20

sIL6Rの結合

96ウェルプレートの個々のウェルに、PBS、pH7.2~7.4中2μg/ml溶液のヤギ抗ヒトIgG-Fc(ICN Pharmaceuticals、Costa Mesa、CA)から100μlを加えた。このプレートにカバーをし、4で一晩インキュベートした。PBS-Tを用いて4回洗浄後、250μlのプロッキングバッファー(3%BSAまたは10%正常ヤギ血清を含有するPBS-T)を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で2時間(または4で一晩)インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、それぞれ300ng/mlから出発して、作業バッファーで3倍段階希釈した、100μl/ウェルのXceptor TNFRSF1B:抗HIL6試料、陽性対照の抗ヒトIL-6R(R&D Systems、Minneapolis、MN)および陰性対照のヒトIgGまたはヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems)を、抗ヒトIgG-Fcコーティングプレートの2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを

30

40

50

、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中75pM溶液の組換えヒトsIL6(R&D Systems)から100μl/ウェルを2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中100ng/ml溶液の抗ヒトIL6-ビオチン(R&D Systems)から100μl/ウェルを加え、カバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中に1:4,000に希釈した100μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビシン(Zymed, San Francisco, CA)を加え、プレートにカバーをして、室温で30分間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて6回洗浄後、100μl/ウェルの3,3,5,5-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液(Pierce, Rockford, IL)を約3から5分間加え、その後、50μlの停止バッファー(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を450nmにおいて読み取った。

10

20

30

40

50

## 【0201】

図1A～1Cのデータは、全Xceptor融合タンパク質は、TNFRSF1B外部ドメインが融合タンパク質分子のアミノ末端にあっても、またはカルボキシ末端にあっても、HIL6と結合できることを実証している。さらに、これらのアッセイは、Xceptorタンパク質のうち2種だけがrhIL6と結合し(図1B)、sIL6Rと結合するものはなかった(図1C)ので、Xceptorタンパク質がIL6xR複合体に対して特異性を有することを示している。関連する研究において、Xceptor TRU(XT6)-1002およびSMIP TRU(S6)-1002は、非ヒト靈長類のMucaca mulatta由来のIL6と交差反応することが見出された。

## 【0202】

## (実施例3)

## ELISAによるXCEPTORのTNF-への結合

TNF-の結合活性を、実質的に以下のように、Xceptor TRU(XT6)-1002、1042、1058、1019およびTRU(X6T)-1019(それぞれ、配列番号608、648、664、625および670)に関して試験した。

## 【0203】

96ウェルプレートの個々のウェルに、PBS、pH7.2～7.4中2μg/ml溶液のヤギ抗ヒトIgG-Fc(ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA)から100μlを加えた。このプレートにカバーをし、4℃で一晩インキュベートした。PBS-Tを用いて4回洗浄後、250μlのプロッキングバッファーを各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で2時間(または4℃で一晩)インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、それぞれ300ng/mlから出発して、作業バッファーで3倍段階希釈した、100μl/ウェルのXceptor

TNFRSF1B:抗HIL6試料、陽性対照のEnbrel(登録商標)(エタネルセプト(etanercept))および組換えヒトTNFR2(TNFRSF1B)-Fcキメラ(R&D Systems, Minneapolis, MN)ならびに陰性対照のヒトIgGまたはヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems)を、抗ヒトIgG-Fcコーティングプレートの2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中2ng/ml溶液の組換えヒトTNF-(R&D Systems)から100μl/ウェルを2連のウェルに加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中200ng/ml溶液の抗ヒトTNF- -ビオチン(R&D Systems)から100μl/ウェルを加え、プレートにカバーをして、室温で約1から2時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中に1:1,000に希釈した100μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビシン(Jackson ImmunoResearch, West G

rove、PA)を加え、プレートにカバーをして、室温で30分間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて6回洗浄後、100μl/ウェルの3,3,5,5-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液(Pierce、Rockford、IL)を約3から5分間加え、その後、50μlの停止バッファー(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を450nmにおいて読み取った。

#### 【0204】

図2のデータは、被検全Xceptor融合タンパク質は、TNFRSF1B外部ドメインが融合タンパク質のアミノ末端にあっても、またはカルボキシ末端にあっても、TNF-と結合できることを示している。

#### 【0205】

##### (実施例4)

##### ELISAによるXCEPTORのデュアルリガンドの結合

TNF-への、およびIL6xR複合体への同時結合を、実質的に以下のように、Xceptor融合タンパク質TRU(XT6)-1006(配列番号612)に関して試験した。

#### 【0206】

96ウェルプレートの各ウェルに、100μlのヒトHIL-6溶液(PBS中5μg/ml、pH7.2~7.4)を加えた。このプレートにカバーをし、4で一晩インキュベートした。PBS-Tを用いて4回洗浄後、250μlのブロッキングバッファーを各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で2時間(または4で一晩)インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、300ng/mlから出発して、作業バッファーで3倍段階希釈した100μl/ウェルのXceptor TNFRSF1B: : HIL6試料をHIL-6コーティングプレートの2連のウェルに加えた。陰性対照は、ヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems、Minneapolis、MN)、Enbrel(登録商標)(etanercept)および作業バッファーだけを含んだ。このプレートにカバーをして、室温で1.5時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中2ng/mlの組換えヒトTNF- (R&D Systems Minneapolis、MN)から100μl/ウェルを加え、プレートにカバーをして、室温で1.5時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファー中200ng/mlの抗ヒトTNF- - ビオチン(R&D Systems)から100μl/ウェルを加え、プレートにカバーをして、室温で1.5時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて6回洗浄後、100μl/ウェルの3,3,5,5-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液(Pierce、Rockford、IL)を3から5分間加え、その後、50μlの停止バッファー(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を450nmにおいて読み取った。

#### 【0207】

図3のデータは、Xceptorタンパク質が、2種のリガンド(この場合、TNF-およびハイパーIL6)に同時に結合できることを実証している。

#### 【0208】

##### (実施例5)

##### ELISAによる、ハイパーIL6のGP130への結合のXCEPTORによるブロッキング

Xceptor融合タンパク質TRU(XT6)-1004、1006、1007、1008、1013および1019(それぞれ、配列番号610、612、613、614、619および625)による、ハイパーIL6(IL6xR)の可溶性gp130受容

10

20

30

40

50

体への結合のブロッキングを、実質的に以下のように試験した。

【0209】

96ウェルプレートの個々のウェルに、PBS、pH 7.2~7.4中0.25~0.5 μg/ml溶液のヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems, Minneapolis, MN)から100 μlを加えた。このプレートにカバーをし、4℃で一晩インキュベートした。PBS-Tを用いて4回洗浄後、250 μlのブロッキングバッファー(3%BSAまたは10%正常ヤギ血清を含有するPBS-T)を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で2時間(または4℃で一晩)インキュベートした。以下の試料を、50 μg/mlから出発して、作業バッファーで5倍段階希釈した:Xceptor TNFRSF1B:抗HIL6試料、陽性対照のヒトgp130-Fcキメラ(R&D Systems)および抗ヒトIL6R(R&D Systems)ならびに陰性対照抗ヒトIL6(R&D Systems)、ヒトIgGまたはEnbrel(登録商標)(etanercept)。等容量の段階希釈Xceptor試料を、ハイパーIL6(最終ハイパーIL6濃度が2.5 ng/ml)と混合し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、Xceptor/HIL6混合物、ヒトgp130-Fcキメラ、抗ヒトIL6R、抗ヒトIL6、ヒトIgGおよびEnbrel(登録商標)(etanercept)の段階希釈物を100 μl/ウェルで、ヒトgp130-Fcコーティングプレートの2連のウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で約1.5時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄後、作業バッファーで1:10,000に希釈した100 μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウスIgG-Fc(Pierce, Rockford, IL)を加え、プレートにカバーをして、室温で1時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて6回洗浄後、100 μl/ウェルの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液(Pierce)を約5から15分間加え、その後、50 μlの停止バッファー(1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を450 nmにおいて読み取った。

【0210】

図4のデータは、抗IL6×R結合ドメインを含有するXceptorタンパク質は、可溶性gp130がHIL6と結合することをブロックできることを実証している。

【0211】

(実施例6)

IL6誘導性細胞増殖およびハイパーIL6誘導性細胞増殖のXCEPTORによるブロッキング

TF-1細胞のIL6誘導性細胞増殖またはハイパーIL6(IL6×R)誘導性細胞増殖のブロッキングを、実質的に以下のように、Xceptor融合タンパク質TRU(XT6)-1011、1014、1025、1026、1002およびTRU(X6T)-1019(それぞれ、配列番号617、620、631、632、608および670)に関して試験した。

【0212】

96ウェル平底プレートの個々のウェルに、新鮮な成長培地(10%のFBS-RPMI 1640; 2 mMのL-グルタミン; 100単位/mlのペニシリン; 100 μg/mlのストレプトマイシン; 10 mMのHEPES; 1 mMのピルビン酸ナトリウム; および2 ng/mlのHu GM-CSF)中0.3 × 10<sup>6</sup>のTF-1細胞(ヒト赤白血病細胞)を、増殖アッセイに使用する1日前に加えた。その後、細胞を収穫し、アッセイ培地(GM-CSFを含まないことを除いて成長培地と同じで、サイトカイン非含有)を用いて2回洗浄し、次いでアッセイ培地に1 × 10<sup>5</sup>細胞/mlで再懸濁した。IL6活性のブロッキングに関して、目的のTNFRSF1B:抗-HIL6 Xceptorまたは抗体の段階希釈物を、固定濃度の組換えヒトIL6(rhIL6)(R&D Systems, Minneapolis, MN)またはハイパーIL6(HIL6)と一緒に、96ウェルプレート中で、37℃、5%CO<sub>2</sub>において1時間ブレインキュベートし

10

20

30

40

50

た。使用した対照は、ヒト Ig G；ヒト gp 130 - Fc キメラ (R & D Systems)；抗 hIL6 抗体 (R & D Systems)；および抗 - hIL6 R 抗体 (R & D Systems) を含んだ。プレインキュベーション期間後、 $1 \times 10^4$  細胞 (100  $\mu$ l 中) を各ウェルに加えた。TNFRSF1B : : hIL6、rhIL6 または hIL6 および細胞を含有する、全容量 200  $\mu$ l / ウェルの最終アッセイ混合物を、37、5% CO<sub>2</sub> において、72 時間インキュベートした。培養の最後の 4 から 6 時間の間に、<sup>3</sup>H - チミジン (アッセイ培地中 20  $\mu$ Ci / ml、25  $\mu$ L / ウェル) を加えた。細胞を UniFilter - 96GF/c プレートに回収し、とり込まれた <sup>3</sup>H - チミジンを、TopCount リーダー (Packard) を使用して決定した。データは、3 連の平均の cpm  $\pm$  SD として表す。プロッキングのパーセント = 100 - (試験物の cpm - 対照の cpm / 最大 cpm - 対照の cpm)  $\times$  100。 10

#### 【0213】

図 5 A および 5 B のデータは、全 Xceptor タンパク質は、TNFRSF1B 外部ドメインが融合タンパク質分子のアミノ末端にあっても、またはカルボキシ末端にあっても、IL6 またはハイパーIL6 により誘導される細胞増殖を、それぞれにまたは両方をプロックできることを実証している。

#### 【0214】

##### (実施例 7)

ELISA による、TNF - の TNFR への結合の XCEPTOR によるプロッキング Xceptor 融合タンパク質 TRU (XT6) - 1004、1006、1007、1008、1013 および 1019 (それぞれ、配列番号 610、612、613、614、619 および 625) による、TNF - の TNF 受容体への結合のプロッキングを、実質的に以下のように試験した。 20

#### 【0215】

96 ウェルプレートの個々のウェルに、PBS、pH 7.2 ~ 7.4 中 0.25 ~ 0.5  $\mu$ g / ml 溶液の組換えヒト TNFR2 - Fc キメラ (R & D Systems, Minneapolis, MN) から 100  $\mu$ l を加えた。このプレートにカバーをし、4 で一晩インキュベートした。PBS - T を用いて 4 回洗浄後、250  $\mu$ l のプロッキングバッファー (3% BSA または 10% 正常ヤギ血清を含有する PBS - T) を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で 2 時間 (または 4 で一晩) インキュベートした。以下の試料を、50  $\mu$ M ~ 250  $\mu$ M から出発して、作業バッファーで 5 倍段階希釈物を作製した：Xceptor TNFRSF1B : : 抗 hIL6 試料、陽性対照の Enbrel (登録商標) (etanercept) および抗 TNF - (R & D Systems) ならびに陰性対照のヒト gp 130 - Fc キメラ (R & D Systems) およびヒト Ig G。等容量の段階希釈 Xceptor 試料を、TNF - (最終 TNF - 濃度が 2.5 ng / ml) と混合し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを、PBS - T を用いて 3 回洗浄後、Xceptor / TNF - 混合物、Enbrel (登録商標) (etanercept)、抗 TNF - 、ヒト gp 130 - Fc キメラ、ヒト Ig G の段階希釈物を 100  $\mu$ l / ウェルで、組換えヒト TNFR2 - Fc コーティングプレートの 2 連のウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で約 1.5 時間インキュベートした。プレートを、PBS - T を用いて 5 回洗浄後、作業バッファー 中 200 ng / ml 溶液の抗ヒト TNF - - ビオチン (R & D Systems) から 100  $\mu$ l / ウェルを加え、プレートにカバーをして、室温で 1 から 2 時間インキュベートした。プレートを、PBS - T を用いて 5 回洗浄後、作業バッファーで 1 : 1,000 に希釈した 100  $\mu$ l / ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビシン (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) を加え、プレートにカバーをして、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを、PBS - T を用いて 6 回洗浄後、100  $\mu$ l / ウェルの 3,3,5,5 - テトラメチルベンジジン (TMB) 基質溶液 (Pierce, Rockford, IL) を約 3 から 5 分間加え、その後、50  $\mu$ l の停止バッファー (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) / ウェルを用いて反応を停止させた。各ウ 30 40 50

エルの吸光度を 450 nm において読み取った。

【0216】

図 6 のデータは、Xceptor タンパク質が、TNF- の TNF 受容体への結合をブロックし、TNFR-Fc によるブロッキングとおよそ同等であったことを示す。

【0217】

(実施例 8)

TNF- 誘導性細胞死滅の XCEPTOR によるブロッキング

TNF- 誘導性の L929 細胞の死滅のブロッキングを、実質的に以下のように、Xceptor 融合タンパク質 TRU (XT6) - 1011、1014、1025、1026、1002 および TRU (X6T) - 1019 (それぞれ、配列番号 617、620、631、632、608 および 670) に関して試験した。 10

【0218】

L929 マウス線維芽細胞 (ATCC、Manassas、VA) の懸濁液を、 $2 \times 10^5$  細胞 / ml の密度で培養培地 (10% FBS - RPMI 1640、2 mM の L-グルタミン、100 単位 / ml のペニシリン、100  $\mu$ g / ml ストレプトマイシンおよび 10 mM HEPES) 中に調製し、次いで、100  $\mu$ l を、96 ウェル平底の黒色プレートの個々のウェルに加え、37、5% CO<sub>2</sub> において一晩、加湿インキュベーター内でインキュベートした。アッセイ培地 (2% FBS を添加したことを除いて、培養培地と同じ) で段階的に希釈した Xceptor TNFRSF1B : : 抗 HIL6 試料を、等容量の組換えヒト TNF- (rhTNF- ; R&D Systems、Minneapolis、MN) と混合し、37、5% CO<sub>2</sub> において 1 時間、加湿インキュベーター内でインキュベートした。陽性対照 (すなわち、L929 細胞の TNF- 誘導性死滅をブロックする薬剤) は、Enbrel (登録商標) (etanercept)、rhTNFR2-Fc キメラ (R&D Systems、Minneapolis、MN) および抗 TNF- 抗体 (R&D Systems、Minneapolis、MN) を含んだ。陰性対照は、アッセイ培地単独 (TNF- は加えず) および抗体 hIgG (TNF- 添加) を含んだ。TNF- の活性を分析するために、L929 細胞から培養培地を取り除き、次いで個々のウェルに 50  $\mu$ l の TNF- / Xceptor または対照混合物および 50  $\mu$ l のアクチノマイシン D (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) (4  $\mu$ g / ml の新たに調製された作業溶液から) を加えた。その後、細胞を、37、5% CO<sub>2</sub> において 24 時間、加湿インキュベーター内でインキュベートした。細胞生存率を測定するために、個々のウェルに、100  $\mu$ l の ATP Lite 1 Step Reagent (PerkinElmer、Waltham、MA) を製造業者の指示書に従って加え、2 分間振とうし、次いで TopCount リーダー (Packard) を使用して発光を測定する。 20 30

【0219】

図 9 のデータは、全 Xceptor タンパク質は、TNFRSF1B 外部ドメインが融合タンパク質分子のアミノ末端にあっても、またはカルボキシ末端にあっても、このアッセイにおいて TNF- 誘導性の細胞死滅をブロックできることを実証している。 40

【0220】

(実施例 9)

ELISA による、XCEPTOR の TGF- への結合

TGF- の結合活性を、実質的に以下のように、Xceptor X6B および X8B に関して試験した。

【0221】

96 ウェルプレートの各ウェルに、PBS、pH 7.2 ~ 7.4 中 2  $\mu$ g / ml 溶液のヤギ抗ヒト IgG - Fc (ICN Pharmaceuticals、Costa Mesa、CA) から 100  $\mu$ l を加えた。このプレートにカバーをし、4 で一晩インキュベートした。PBS-T を用いて 4 回洗浄後、250  $\mu$ l のブロッキングバッファー (10% NGS 含有 PBS-T) を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温で 2 時間イ 50

ンキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて3回洗浄後、それぞれ作業バッファー(1%BSA含有PBS-T)で300ng/mlに希釈した、100μl/ウェルのXceptor TGF R2:抗HIL6試料、陽性対照の組換えヒトTGF RI - Fcキメラ(R&D Systems、Minneapolis、MN)および陰性対照の組換えヒトTNFR2(TNFRSF1B)-Fcキメラ(R&D Systems)を、抗ヒトIgG-Fcコーティングプレートの2連のウェルに加えた。プレートにカバーをして、室温で約1時間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファー(PBS/0.1%Tween20(PBS-T))を用いて5回洗浄後、4ng/mlから出発して、作業バッファーで2倍段階希釈した100μl/ウェルのTGF-1リガンド(R&D Systems)を加えた。プレートにカバーをして、室温で1時間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファーを用いて5回洗浄後、作業バッファー中200ng/ml溶液のビオチン化抗TGF-1(R&D Systems)から100μl/ウェルを加えた。プレートにカバーをして、室温で1時間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファーを用いて5回洗浄後、作業バッファー中で1:20,000に希釈した100μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン(Pierce Rockford、IL)を加え、プレートにカバーをして、室温で30分間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファーを用いて5回洗浄後、100μl/ウェルのQuantablu Fluorogenic Peroxidase Substrate溶液(Pierce、Rockford、IL; 9mlの基質溶液と1mlの過酸化物溶液を混合することによって調製した)を加え、プレートにカバーをして、室温で20分間インキュベートした。50μlのQuantablu Stop Solution/ウェルを用いて反応を停止させた。各ウェルの吸光度を325nmにおいて読み取った。  
10

#### 【0222】

図8のデータは、被検Xceptor融合タンパク質は、TGF R2外部ドメインが融合タンパク質のアミノ末端にあっても、またはカルボキシ末端にあっても、TGF-1と結合したことを示す。

#### 【0223】

##### (実施例10)

##### X C E P T O R 融合タンパク質の発現

293細胞における、本明細書に開示の特定のXceptor融合タンパク質の発現を、FreeStyle(商標)293 Expression System(Invitrogen、Carlsbad、CA)を使用して、製造業者の指示書に従って実施した。  
30

#### 【0224】

それぞれの30mlのトランスフェクションのために、28mlのFreeStyle(商標)293 Expression Medium中 $3 \times 10^7$ 細胞を使用した。トランスフェクション当日、細胞懸濁液の少量のアリコートを微小遠心管に移し、集塊をなす細胞の生存率および量を、トリパンブルー色素排除法を使用して決定した。この懸濁液を、45秒間激しくボルテックスにかけ細胞の集塊を壊し、細胞総数をCoulter Counterまたは血球計数器を使用して決定した。細胞の生存率は90%を上回った。所要の細胞を含有する振とうフラスコを、37のインキュベーター内のオービタルシェイカーに配置した。  
40

#### 【0225】

それぞれのトランスフェクション試料について、脂質-DNA複合体を以下のように調製した。30μgのプラスミドDNAを、Opti-MEM(登録商標)Iで全容量1mlに希釈し、緩やかに混合した。60μlの293fectin(商標)を、Opti-MEM(登録商標)Iで全容量1mlに希釈し、緩やかに混合し、室温で5分間インキュベートした。5分のインキュベーション後、希釈したDNAを希釈した293fectin(商標)に加え、全容量2mlを得、緩やかに混合した。得られた溶液を、室温で20  
50

~30分間インキュベートし、DNA-293fectin(商標)複合体を形成させた。

#### 【0226】

DNA-293fectin(商標)複合体をインキュベートする一方で、細胞懸濁液をインキュベーターから取り出し、適量の細胞懸濁液を、滅菌、使い捨ての125mlのErlenmeyer振とうフラスコに入れた。30mlのトランスフェクションのために、新鮮な、あらかじめ暖めておいたFreeStyle(商標)293 Expression Mediumを、全容量28mlまで加えた。

#### 【0227】

DNA-293fectin(商標)複合体のインキュベーション完了後、2mlのDNA-293fectin(商標)複合体を、振とうフラスコに加えた。2mlのOpti-MEM(登録商標)Iを、DNA-293fectin(商標)複合体の代わりに陰性対照のフラスコに加えた。各フラスコは、全容量30mlを含有し、最終細胞密度はおよそ $1 \times 10^6$ 生存細胞/mlであった。この細胞を、空气中8%CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気の37°のインキュベーターにおいて、125rpmで回転するオービタルシェイカーでインキュベートした。トランスフェクションのおよそ7日後に細胞を収穫し、組換えタンパク質の発現に関してアッセイした。

#### 【0228】

TNFRSF1B外部ドメインおよびTGF-RII外部ドメインを有するXceptor分子を、上記のように293細胞において発現させた。

#### 【0229】

##### (実施例11)

ELISAによる、Xceptorのリガンドへの結合

TNFRSF1B外部ドメインおよび、TWEAKR外部ドメイン、OPG外部ドメイン、TGF-RII外部ドメインまたはIL7R外部ドメインのいずれかを含むXceptor分子が、それぞれ、リガンドであるTWEAK、RANKL、TGF-またはIL7に結合する能力を、実質的に以下のように試験した。

#### 【0230】

マウスおよびヒトのリガンド(R&D Systems, Minnesota, MN)を、PBS中1μg/mlの濃度で、96ウェルプレートのウェルに加えた(100μl/ウェル)。プレートを、4°Cで一晩インキュベートした。PBS-Tを用いて5回洗浄後、250μlのプロッキングバッファー(3%BSA含有PBS-T)を各ウェルに加え、プレートにカバーをし、室温( RT )において2時間インキュベートした。300ng/mlから出発するXceptorの3倍段階希釈物を、作業バッファー(1%BSA含有PBS-T)で作製した。陰性対照として、無関係なXceptorを使用した。プレートを、RTで1時間インキュベートした。PBS-Tを用いて5回洗浄後、100μL/ウェルのHRPコンジュゲート抗ヒトIgG-Fc(作業バッファー中1:5000)を加え、プレートにカバーをし、RTで1時間インキュベートした。PBS-Tを用いて5回洗浄後、100μLのQuant-Blu基質(Pierce, Rockford, IL)を個々のウェルに加えた。このプレートを、RTにおいて10~30分間インキュベートし、蛍光を、325/420nmにおいて測定した。

#### 【0231】

結果を以下の表3に示す。TNFR×TGF-RIIのマウスTGF-への結合は試験しなかったが、マウスおよびヒトのTGF-は99%同一であることに留意されたい。

#### 【0232】

10

20

30

40

## 【表3】

表3 XCEPTORのリガンドへの結合

TNFR x R	リガンド	マウスリガンドの結合	ヒトリガンドの結合
TNFR x TWEAKR	TWEAK	+++	+++
TNFR x OPG	RANKL	+++	+++
TNFR x TGF $\beta$ RII	TGF $\beta$	相同	+++
TNFR x IL7R	IL7	ND	+

ND = 未実施

10

## (実施例12)

TGF - 1誘導性細胞増殖の阻害に関するXCEPTORによるブロッキング

IL4によるHT2細胞増殖に関するTGF - 1誘導性阻害のブロッキングを、Tsangら(Tsang, M.ら(1995年)Cytokine 7巻:389頁)により記載された方法を使用して、配列番号1236のXceptorに関して試験した。

## 【0233】

簡潔にいようと、96ウェルプレートにおいて、Xceptor TNFR: : TGF RII試料を、1ng/mlのヒトTGF - 1を含有する培養培地(RPMI、10%FCS、0.05mM - メルカプトエタノール)で段階希釈した; 100μl/ウェル。このプレートを、37、5%CO<sub>2</sub>において、加湿インキュベーター内で1.5時間インキュベートした。陰性対照は、無関係のxceptorタンパク質(TGF - 1添加)および培養培地(TGF - 1添加または無添加)を含んだ。陽性対照は、組換えTGF RII - Fcキメラ(R&D Systems, Minneapolis, MN)であった。インキュベーション後、15ng/ml mIL4(R&D Systems, Minneapolis, MN)を含有する培養培地100μl中1×10<sup>4</sup>のHT2細胞(ATCC, Manassas, VA)を各ウェルに加えた。その後、このプレートを、37、5%CO<sub>2</sub>において、加湿インキュベーター内で72時間インキュベートした。

## 【0234】

細胞生存率を測定することによってTGF - 1の活性を分析するために、100μlの培養培地を個々のウェルから取り除き、10μLのWST - 8試薬(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD)で置き換えた。このプレートを、37で2時間インキュベートし、個々のウェルの吸光度を450nmにおいて読み取った。

## 【0235】

図9のデータは、xceptorタンパク質が、IL4 - 媒介型HT2細胞増殖のTGF - 1による阻害をブロックしたことを示している。

## 【0236】

## (実施例13)

ハイパーIL6に対する結合特異性および他のGP130サイトカインに対する非結合

IL6ならびに、gp130サイトカインであるIL - 11、白血病抑制因子(LIF)、オンコスタチンM(OSM)およびカルディオトロピン - 1(CT - 1)によるTF - 1細胞増殖の誘導に対するXceptor融合タンパク質の効果を、実質的に以下のように試験した。

## 【0237】

96ウェル平底プレートの個々のウェルに、新鮮な成長培地(10%のFBS - RPMI 1640; 2mMのL - グルタミン; 100単位/mlのベニシリン; 100μg/mlのストレプトマイシン; 10mMのHEPES; 1mMのピルビン酸ナトリウム; および2ng/mlのHu GM - CSF)中0.3×10<sup>6</sup>のTF - 1細胞(ヒト赤白血病細胞)を、増殖アッセイに使用する1日前に加えた。細胞を収穫し、アッセイ培地(G

20

30

40

50

M - C S F を含まないことを除いて成長培地と同じ、サイトカイン非含有)を用いて2回洗浄し、次いでアッセイ培地に $1 \times 10^5$ 細胞 / m l で再懸濁した。L I F、O S M およびC T - 1 活性のブロッキングを試験するために、TNFSFR1B : : 抗H I L 6 × c e p t o r のTRU(X T 6) - 1 0 0 2 (配列番号6 0 8)、TRU(X T 6) - 1 0 1 9 (配列番号6 2 5)、TRU(X T 6) - 1 0 2 2 (配列番号6 2 8) およびTRU(X T 6) - 1 0 2 5 (配列番号6 3 1)の段階希釈物を、固定濃度の各g p 1 3 0 サイトカイン個々と一緒に、またはハイパーI L 6 (H I L 6)と一緒に、9 6 ウェルプレートにおいて、3 7 、5 % C O<sub>2</sub>において1時間ブレインキュベートした。ブレインキュベーション期間後、 $1 \times 10^4$ 細胞 (1 0 0 μ l 中)を各ウェルに加えた。TNFSFR1B : : H I L 6、g p 1 3 0 サイトカインまたはH I L 6、および細胞を含有する、全容量2 0 0 μ l / ウェルの最終アッセイ混合物を、3 7 、5 % C O<sub>2</sub>において、7 2 時間インキュベートした。培養の最後の4から6時間の間に、<sup>3</sup>H - チミジン(アッセイ培地中2 0 μ C i / m l、2 5 μ l / ウェル)を加えた。細胞をU n i F i l t e r - 9 6 G F / c プレートに回収し、とり込まれた<sup>3</sup>H - チミジンを、Top Counterリーダー (P a c k a r d) を使用して決定した。ブロッキングのパーセント = 1 0 0 - (試験c p m - 対照のc p m / 最大c p m - 対照のc p m) × 1 0 0。

10

## 【0 2 3 8】

結果は、x c e p t o r がI L 6 活性をブロックしたが、I L - 1 1、L I F、O S M またはC T - 1 をブロックしなかったことを示し(データ非掲載)、したがって、ハイパーI L 6 に結合したが、他の被検g p 1 3 0 サイトカインに対して効果を有さなかったことを示した。

20

## 【0 2 3 9】

(実施例14)

肝細胞における、S M I P およびX C E P T O R の、I L 6 Rへの結合

肝臓由来H e p G 2 細胞のI L 6 Rへの、TRU(S 6) - 1 0 0 2、TRU(X T 6) - 1 0 1 9 および抗I L 6 抗体h u - P M 1 の結合能力を以下のように試験した。

20

## 【0 2 4 0】

H e p G 2 細胞をF A C S バッファーで洗浄し、F A C S バッファー (P B S + 3 % F B S) 中 $2 \times 1 0^6$ 細胞 / m L に調整した。9 6 ウェルプレートのウェルに、5 0 μ L のこの溶液を加えた (1 0<sup>5</sup> 細胞 / ウェル)。プレートを、希釈した被検分子を加える用意ができるまで3 7 に保った。被検分子の段階希釈物をF A C S バッファーで調製し、2 × 作業ストックを得、細胞に加えるときにそれを1 × に希釈した。希釈した被検分子を細胞に加え (5 0 μ L / ウェル)、細胞を氷上で2 0 分間インキュベートした。I g G 全体 (w h o l e I g G) を対照として使用した。その後、細胞を、F A C S バッファーを用いて2回洗浄し、フィコエリトリンコンジュゲートヤギ抗ヒト抗体 (J a c k s o n L a b s; F A C S バッファーで1 : 2 0 0 希釈) に再懸濁した。暗所において氷上で2 0 分間インキュベート後、細胞を、F A C S バッファーを用いて2回洗浄し、2 0 0 μ l のP B S に再懸濁し、L S R I I (商標) フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s, S a n J o s e, C A) において読み取った。

30

## 【0 2 4 1】

図10に示すように、TRU(S 6) - 1 0 0 2 およびTRU(X T 6) - 1 0 2 9 は、基本的にH e p G 2 細胞とは結合しないことを示した。

40

## 【0 2 4 2】

(実施例15)

マウスにおけるI L 6 活性およびT N F の活性の、S M I P およびX C E P T O R によるブロッキング

本明細書に開示する、S M I P およびX c e p t o r 融合タンパク質の、マウスにおける血清アミロイドA (S A A) タンパク質のI L - 6 誘導性産生またはT N F 誘導性産生をブロックする能力を、下記のように試験した。S A A は、ヒトおよびマウスにおける主要な急性期タンパク質の1つである。血漿S A A レベルの長期的上昇が慢性炎症において

50

見出され、肝臓、腎臓および脾臓に影響を与えるアミロイドーシスをもたらす (Rienhoffら、(1990年) Mol. Biol. Med. 7巻: 287頁)。IL-6およびTNFは双方とも、単独で投与された場合SAAの誘導を示した (Benigniら、(1996年) Blood 87巻: 1851頁; Ramadoriら、(1988年) Eur. J. Immunol. 18巻: 1259頁)。

(a) ハイパーIL-6活性のブロッキング

雌のBALB/Cマウスに、0.2mlのPBSまたはPBS中のEnbrel (登録商標) (200μg)、TRU(S6)-1002 (200μg)もしくはTRU(XT6)-1002 (300μgまたは500μg)を、後眼窩に注入した。1時間後、このマウスに、0.2mlのPBSまたはPBS中2μgのヒトハイパーIL-6をIP注入した。マウス血清を、IP注入の2時間後および24時間後に採取した。SAAの血清濃度をELISAにより決定し、sgp130の濃度をLuminexに基づくマウス可溶性受容体アッセイにより決定した。図11および12に示すように、TRU(S6)-1002およびTRU(XT6)-1002は、sgp130およびSAA双方のハイパーIL-6誘導性発現をブロックした。

(b) TNF活性のブロッキング

雌のBALB/Cマウスに、0.2mlのPBSまたはPBS中のEnbrel (登録商標) (200μg)、TRU(S6)-1002 (200μg)もしくはTRU(XT6)-1002 (300μg)を、後眼窩に注入した。1時間後、このマウスに、0.2mlのPBSまたはPBS中0.5μgのマウスTNF- $\alpha$ をIP注入した。マウス血清を、IP注入の2時間後および24時間後に採取した。SAAの血清濃度をELISAにより決定し、sgp130の濃度をLuminexに基づくマウス可溶性受容体アッセイにより決定した。図13AおよびBに示すように、XceptorのTRU(XT6)-1002は、SAAのTNF- $\alpha$ 誘導性発現をブロックし、注入2時間後に観察されたSAAのレベルは、Enbrel (登録商標)で観察されるレベルと同様であった。

【0243】

(実施例16)

XCEPTORのin vivo活性

本明細書に記載のXceptor分子の治療効力を、下記のように疾患の動物モデルにおいて試験する。

(a) 多発性骨髄腫

Xceptor分子の活性を、2種の十分特徴付けられた多発性骨髄腫のマウスモデル、すなわち、5T2多発性骨髄腫 (5T2MM) モデルおよび5T33多発性骨髄腫 (5T33MM) モデルの少なくとも1種において試験する。5T33モデルにおいて、マウスを、腫瘍細胞の注入のときからXceptorにより処置する (予防モード)。5T2MMモデルにおいて、マウスを、疾患の発症から処置する (治療モード)。腫瘍の発達および新脈管形成に対する治療効果を、双方のモデルにおいて評価し、5T2MMモデルにおいて、骨に関する研究もまた実施する。

【0244】

骨髄腫の5TMMネズミモデルが始めにRadlらにより開発された (J. Immunol. (1979年) 122巻: 609頁; さらにRadlら、Am. J. Pathol. (1988年) 132巻: 593頁; Radl、J. Immunol. Today (1990年) 11巻: 234頁もまた参照されたい)。その臨床的特徴は、ヒトの疾患に非常に似ており、腫瘍細胞は骨髄に位置し、血清パラプロテイン濃度が疾患発症の尺度であり、新生血管形成は5T2MMおよび5T33MMモデルの双方において増加し (Van Valckenborgら、Am. J. Pathol. (1988年) 132巻: 593頁)、特定の系において明らかな溶骨性骨疾患が発症する。5T2MMモデルは、中程度の腫瘍成長および溶骨性骨病変の発達を含む。これらの病変は、網状骨容量の減少、骨ミネラル密度の減少、および破骨細胞数の増加を伴う (Croucherら、Blood (2001年) 98巻: 3534頁)。5T33MMモデルは、腫瘍の

10

20

30

40

50

取り込みがより迅速であり、骨髄に加えて、腫瘍細胞はさらに肝臓においても成長する (Vanderkerkenら、Br. J. Cancer (1997年) 76巻: 451頁)。

【0245】

5T2および5T33MMモデルは、広範囲にわたって特徴付けられている。特定のモノクローナル抗体は、5T2および5T33MMの双方のイディオタイプに対して産生されており (raised)、高い感度で、ELISAによる血清パラプロテインの検出を可能にし、ならびにFACS分析および組織切片の免疫染色の双方による腫瘍細胞の特異的染色を検出可能にする (Vanderkerkenら、Br. J. Cancer (1997年) 76巻: 451頁)。VH遺伝子の配列分析は、RT-PCRおよびノーザンプロット分析による細胞の検出を可能にする (Zhuら、Immunol. (1998年) 93巻: 162頁)。in vitroおよびin vivo実験の双方に使用できる5TMMモデルは、典型的なMM疾患を生じ、様々な方法が、骨髄中腫瘍量、血清パラプロテイン濃度、(微小血管密度を測定することによる)骨髄新脈管形成および(X線撮影、密度測定および組織形態測定の組合せによる)溶骨性骨病変の評価に利用できる。これらの後者のパラメーターの調査は、前臨床設定ならびに完全な同系微小環境において骨髄腫細胞の成長および生物学的研究における5TMMモデルの使用を可能にする。MM細胞それ自体を標的にする分子および骨髄の微小環境を標的とする分子の双方が研究できる。具体的には、5T33MMモデルが微小環境およびMM細胞それ自体の双方の研究に使用できるのに対して、一方、5T2MMモデルは、骨疾患を伴う骨髄腫の研究にもさらに使用できる。

10

20

30

【0246】

本明細書に開示のXceptor分子の予防効力を研究するために、C57BL/KaLwRijマウスに、 $2 \times 10^6$ の5T33MM細胞およびXceptorを0日目に注入する。28日目にマウスを犠牲にし、腫瘍の発達を、血清パラプロテイン濃度および(抗イディオタイプ抗体を用いたフローサイトメトリーによって、または細胞標本によって決定される)単離骨髄細胞における腫瘍細胞の割合を決定することによって評価する。脾臓および肝臓の重量を決定し、さらなる分析のためにこれらの器官を4%ホルムアルデヒドで固定する。骨試料は、パラフィン切片のCD31免疫染色および微小血管密度の定量を含むさらなる処理のために固定する。

【0247】

本明細書に開示のXceptor分子の治療効力を研究するために、マウスに、5T2MM細胞を0日目に注入し、検出可能なレベルの血清パラプロテインの存在によって決定されるような疾患の発症後に、Xceptorを投与する。Xceptorの投与後およそ5週間後にマウスを犠牲にし、腫瘍の発達を予防的研究のために上記のように評価する。さらに、骨分析を、骨の病変の数および海綿質面積を決定するためにX線を使用して、ならびに破骨細胞の数を評価するためにTRAP染色を使用して、実施する。

(b) 関節リウマチ

本明細書に開示のXceptor分子の治療効力を、関節リウマチ(RA)の2種のネズミモデル、すなわちコラーゲン誘発関節炎(CIA)およびグルコース-6-リン酸イソメラーゼ(G6PI)モデルの少なくとも1種において試験する。これらのモデルの各々は、RAにおける治療薬の特定のクラスの効力の予測にとって有用であることが、他者によって示されている (Holmdahl (2000年) Arthritis Res. 2巻: 169頁; Holmdahl (2006年) Immunol. Lett. 103巻: 86頁; Holmdahl (2007年) Methods Mol. Med. 136巻: 185頁; McDevitt (2000年) Arthritis Res. 2巻: 85頁; KamradtおよびSchubert (2005年) Arthritis Res. Ther. 7巻: 20頁を参照されたい)。

40

(i) CIAモデル

CIAモデルは、関節炎の発症機序および免疫学的根拠に関する、関節炎の最もよく特

50

徴付けられたマウスモデルである。さらに、CIAモデルは、最も広範囲に使用されるRAのモデルであって、患者において疾患を阻害する薬剤の能力を予測するためには完全ではないけれども、RAの潜在的な新規の治療薬を調査する場合、多数の人に選択されるモデルであると考えられる (Jirholt, J.ら (2001年) *Arthritis Res.* 3巻: 87~97頁; Van den Berg, W. B. (2002年) *Curr. Rheumatol. Rep.* 4巻: 232~239頁; Rosloniec, E. (2003年) *Collagen-Induced Arthritis. In Current Protocols in Immunology*, Colig andら編、John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ)。

## 【0248】

CIAモデルにおいて、関節炎は、完全フロイントアジュバント(CFA)中のコラーゲンII(CII)を用いた雄DBA/1マウスの免疫によって誘導される。具体的には、マウスに、21日前にCFA中のCIIを皮内/皮下注入し、0日目に不完全フロイントアジュバント(IFA)中のCIIを追加免疫する。マウスは、CII/CFAにより免疫化されたマウスのサブセット(0%から10%)は、追加免疫をしなくても0日目の当日またはその周辺において関節炎の徴候を現わす。CII/CFAにより免疫化されたマウスのサブセット(0%から10%)は、追加免疫をしなくても0日目の当日またはその周辺において関節炎の徴候を現わし、実験からは除外される。一部のCIA実験において追加免疫を省き、その代わりにマウスを、CII/CFAによる免疫後21日から開始する、Xceptorまたは対照での処置を行なう(すなわち、最初の処置の日が0日目である)。

## 【0249】

予防計画および/または治療計画において、マウスを、Xceptor、ビヒクル(PBS)または陰性対照もしくは陽性対照を用いて処置する。予防的処置は0日目に開始し、対照(未処置)マウスにおける疾患のピークを通して続ける。治療的処置は、大部分のマウスが関節炎の軽度の徴候を示したときに開始する。関節炎のCIAモデルおよびG6PI誘発性モデルの双方において優れた効力を有することが示されたEnbrel(登録商標)を、陽性対照として使用する。実験毎に収集したデータは、関節炎の臨床的スコアおよび累積発現率を含む。CIAモデルにおける関節炎の臨床的徴候を、以下の表4に示すような0から4のスケールを使用して採点する。

## 【0250】

## 【表4】

表4

スコア	観察結果
0	明らかな腫れおよび発赤なし
1	1から3本の指の腫れ/発赤
2	3本を超える指の発赤および/または腫れ、足にまで広がる軽度の腫れ、腫れたまたは発赤した足首、あるいは前足の軽度の腫れ/発赤
3	軽度から中程度の発赤を伴う足の腫れ
4	足全体において極度な発赤および腫れ

## (ii) G6PIモデル

G6PIモデルにおいて、関節炎は、アジュバント中のG6PIを用いたDBA/1マウスの免疫により誘導される (Kamradt, T. および D. Schubert (2005年) *Arthritis Res. Ther.* 7巻: 20~28頁; Schubert, D. ら (2004年) *J. Immunol.* 172巻: 4503~4509頁; Bockermann, R. ら (2005年) *Arthritis Res. Ther.* 7巻: R1316~1324頁; Iwanami, K. ら (2008年) *Arthritis Rheum.* 58巻: 754~763頁; Matsumoto, I. ら (2008年) *Arthritis Res. Ther.* 10巻: R66頁)。G6PIは、実質的に体内の全ての細胞に存在する酵素であり、免疫により関節特異的

10

20

30

40

50

疾患を誘発する理由は公知ではない。CTL4-Ig、TNFアンタゴニスト（例えばEnbrel（登録商標））および抗IL6受容体モノクローナル抗体などのいくつかの薬剤が、G6PIモデルにおいて関節炎の発達を阻害することが示されている。

【0251】

雄DBA/1マウスを、関節炎を誘発するために、完全フロイントアジュvant（CFA）中G6PIを用いて免疫する。具体的には、マウスに、CFA中G6PIを0日目に皮内／皮下注入し、免疫の数日以内に関節炎の臨床的徴候が現れる。上述のCIAモデルでのように、マウスを、予防計画および／または治療計画において、Xceptor、ビヒクル（PBS）または陰性対照もしくは陽性対照を用いて処置する。予防的処置は0日目に開始し、対照マウスにおける疾患のピークを通して続ける。治療的処置は、大部分のマウスが関節炎の軽度の徴候を示したときに開始する。関節炎のCIA誘導性モデルおよびG6PI誘発性モデルの双方において優れた効力を有することを示したEnbrel（登録商標）を、陽性対照として使用する。各実験において収集したデータは、関節炎の臨床的スコアおよび累積発現率を含む。G6PIモデルにおける関節炎の臨床的徴候を、CIAモデルに対して用いたスケールと同様のスケールを使用して採点する。

（c）多発性囊胞腎

Xceptor融合タンパク質の、多発性囊胞腎の治療における効力（好ましくは、本明細書に開示したように、TNFアンタゴニストおよびTGFアンタゴニストを含有する）を、Gattoneら、Nat. Med.（2003年）9巻：1323～6頁；Torressら、Nat. Med.（2004年）10巻：363～4頁；Wangら、J. Am. Soc. Nephrol.（2005年）16巻：846～851頁；およびWilson（2008年）Curr. Top. Dev. Biol. 84巻：311～50頁に記載されたように、ネズミモデルにおいて試験する。

【0252】

配列番号1～1255は、添付の配列リストに提示する。添付の配列リストに使用した、シンボル「n、」を含むヌクレオチド配列のコードは、WIPO Standard ST.25（1998）、付録2、表1に一致する。

【図2】

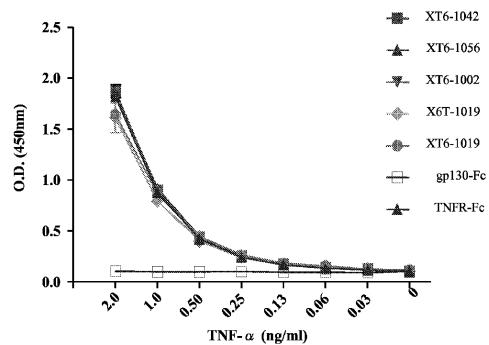


Fig. 2

【図8】

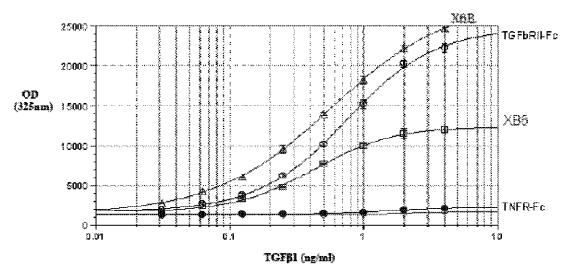


Fig. 8

【図 1 A】

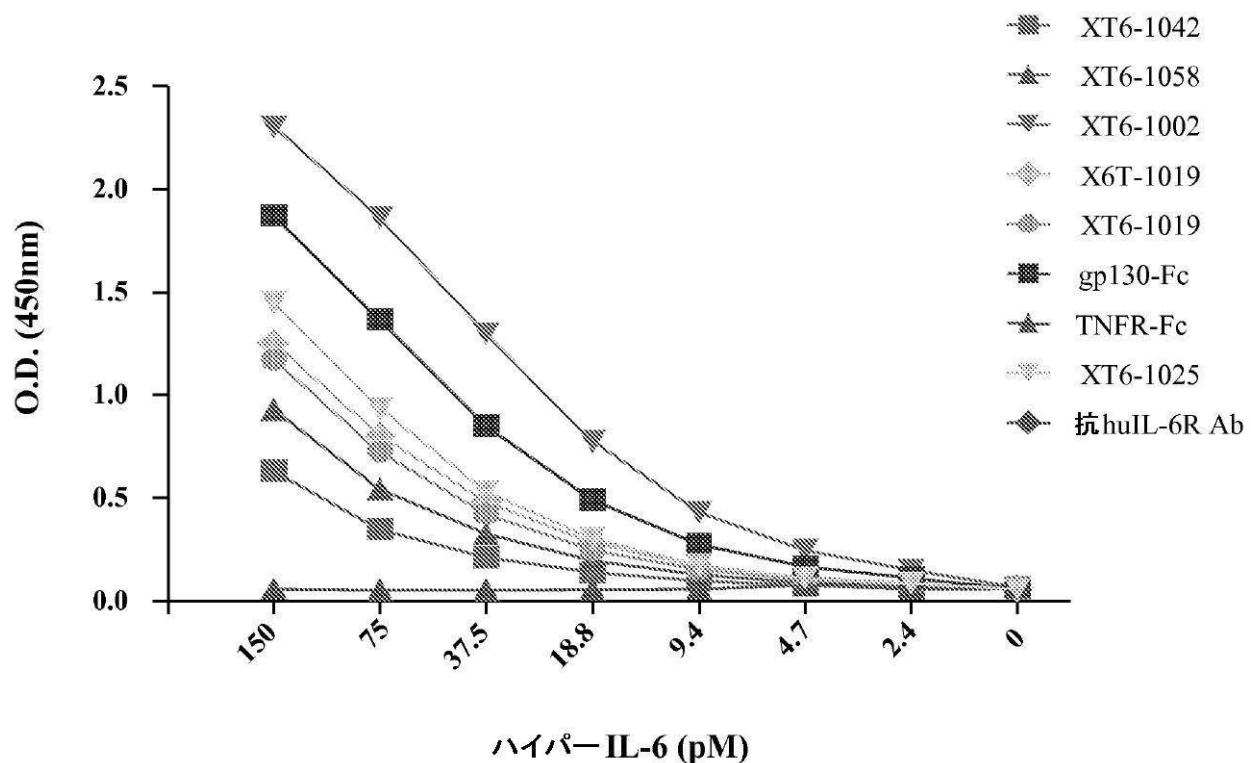


Fig. 1A

【図 1 B】

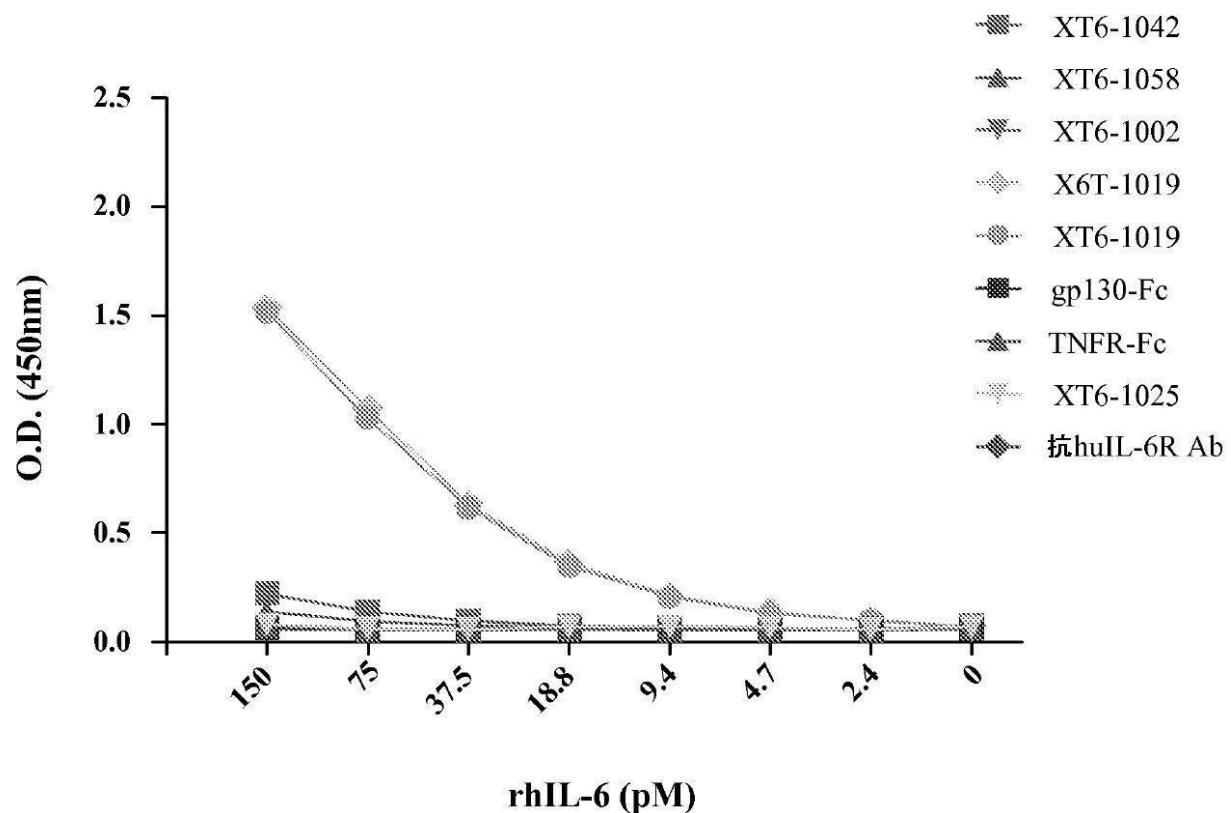
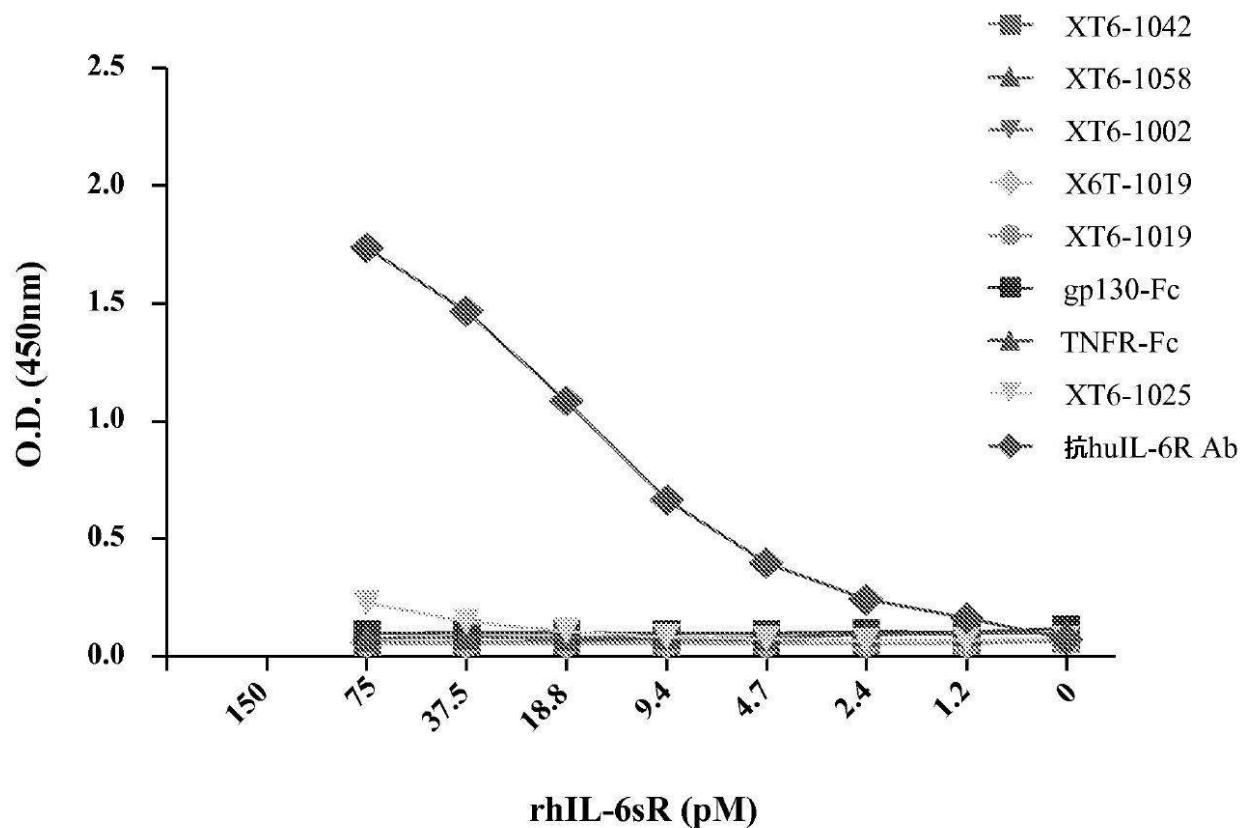


Fig. 1B

【図 1 C】



*Fig. 1C*

【図3】

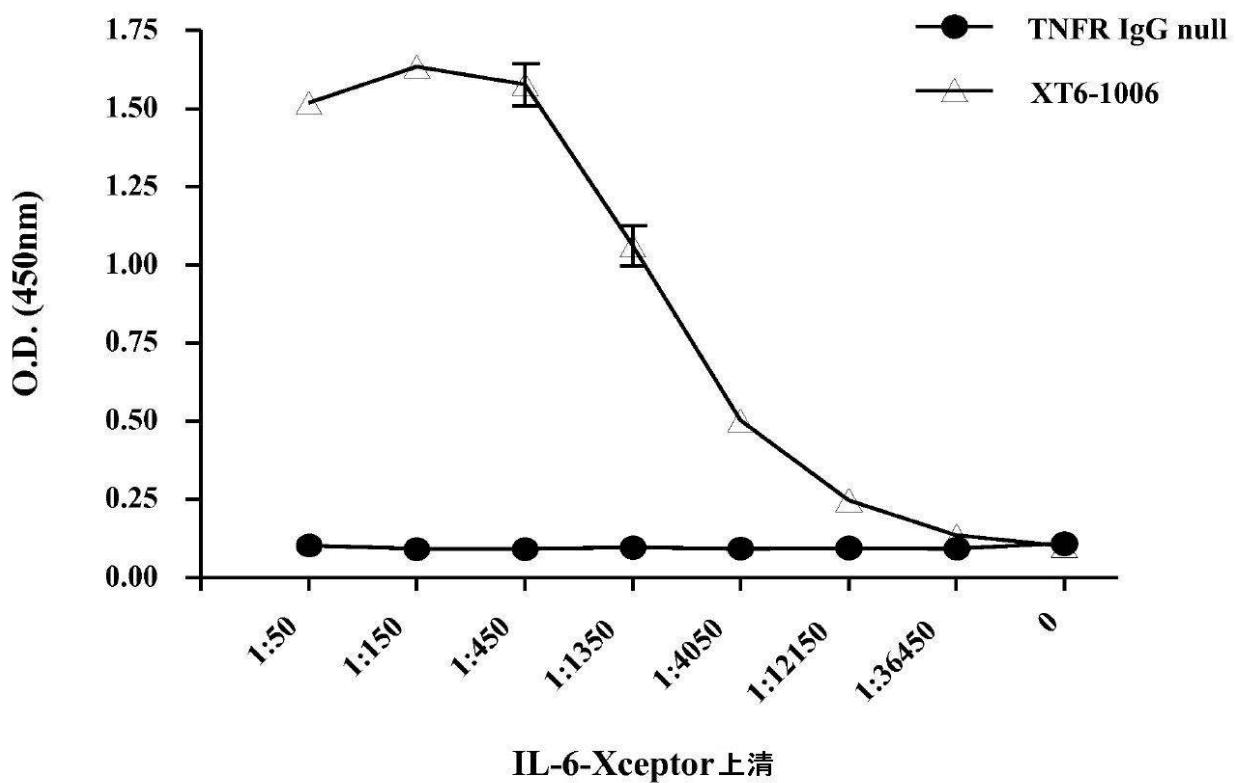


Fig. 3

【図4】

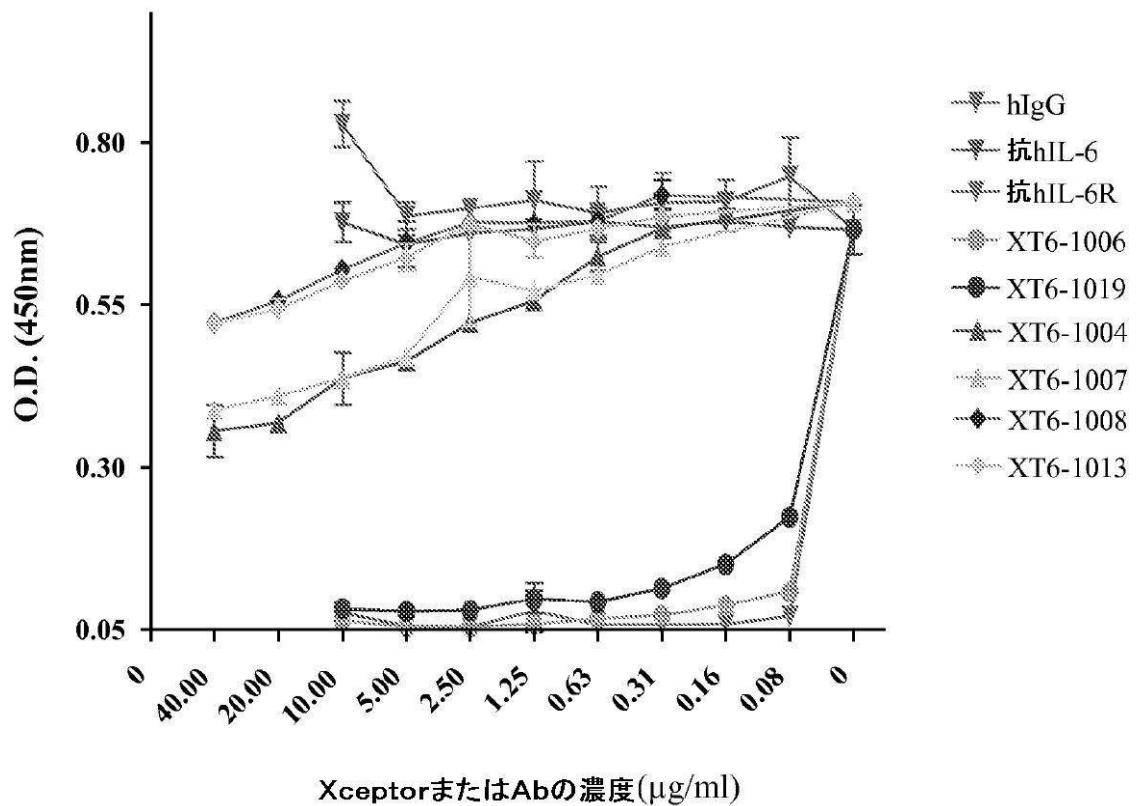


Fig. 4

【図 5 A】

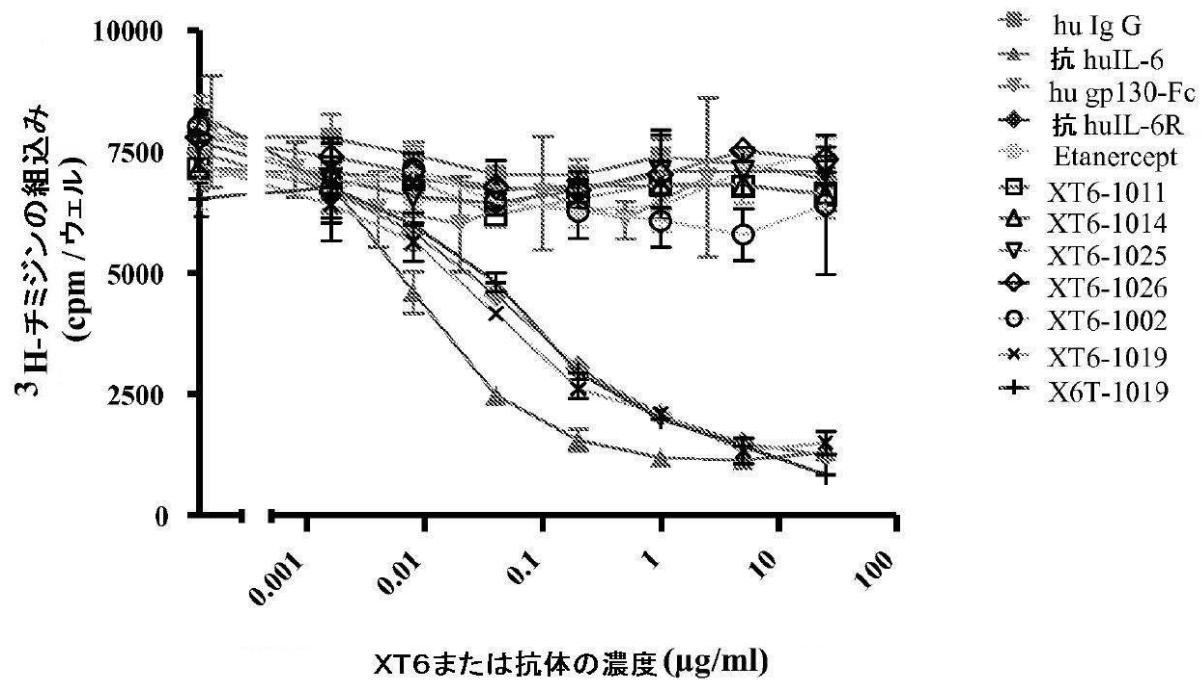


Fig. 5A

【図 5B】

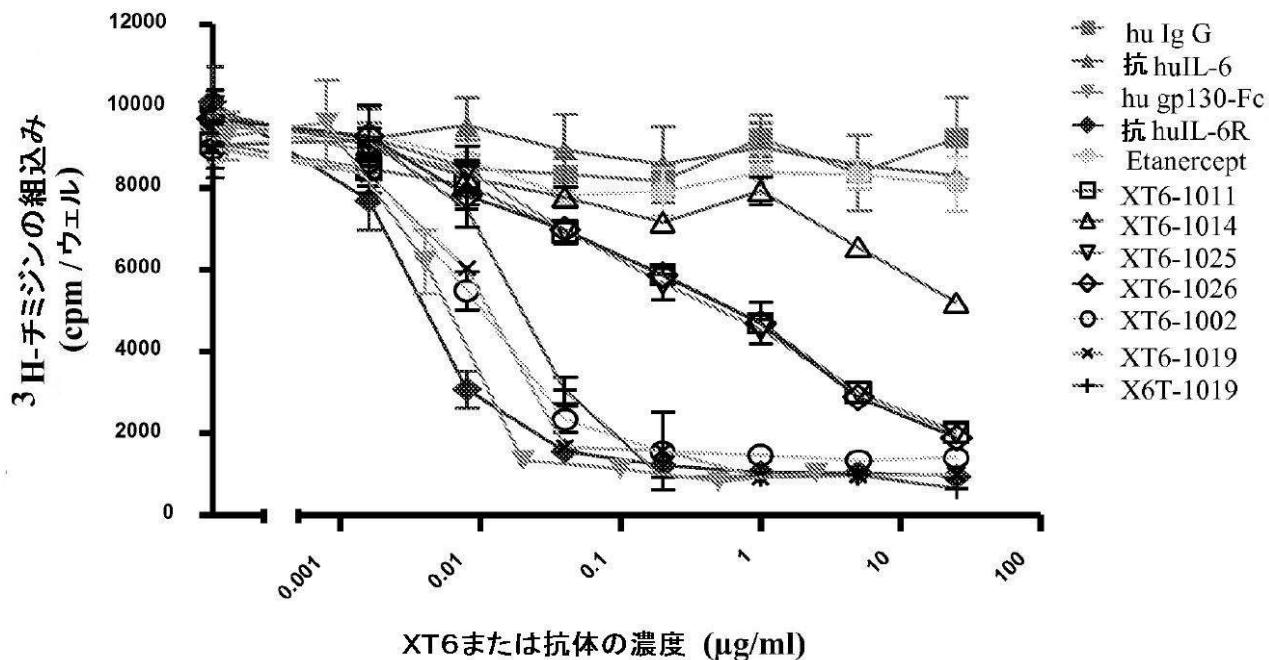


Fig. 5B

【図 6】

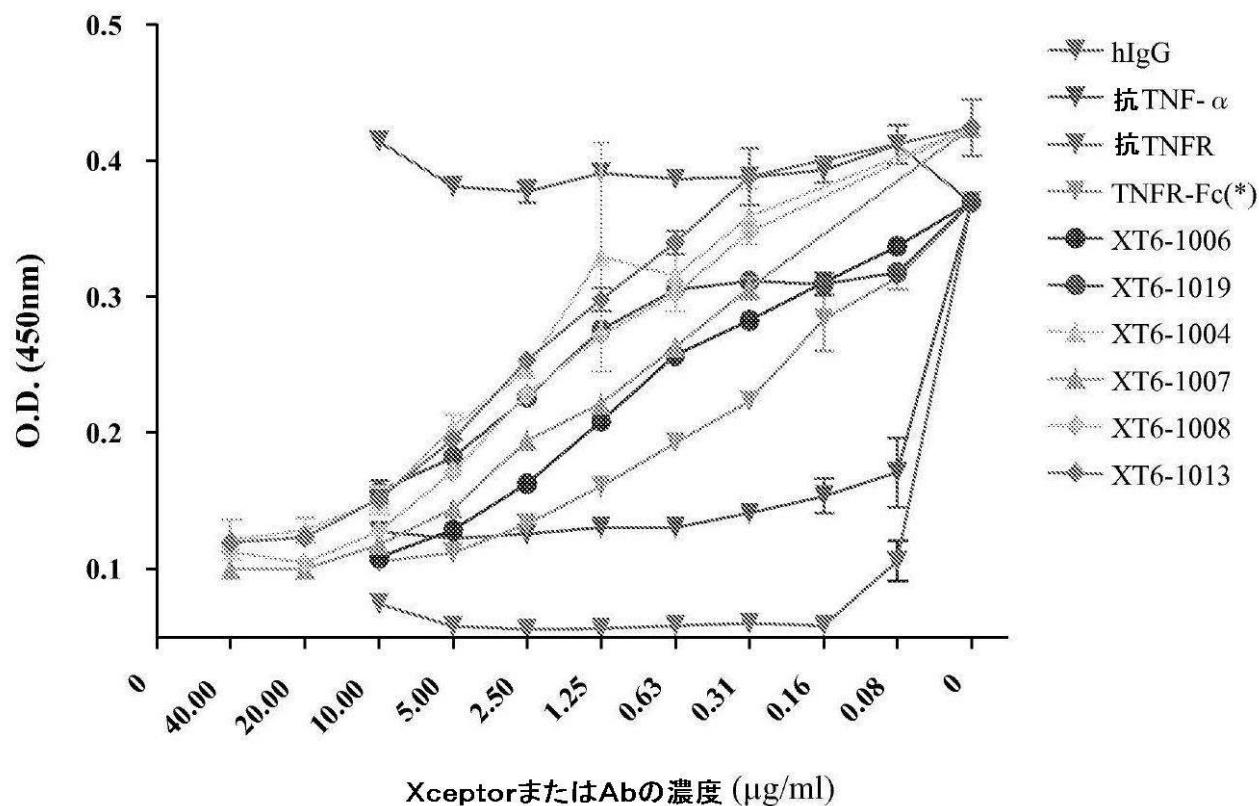


Fig. 6

【図 7】

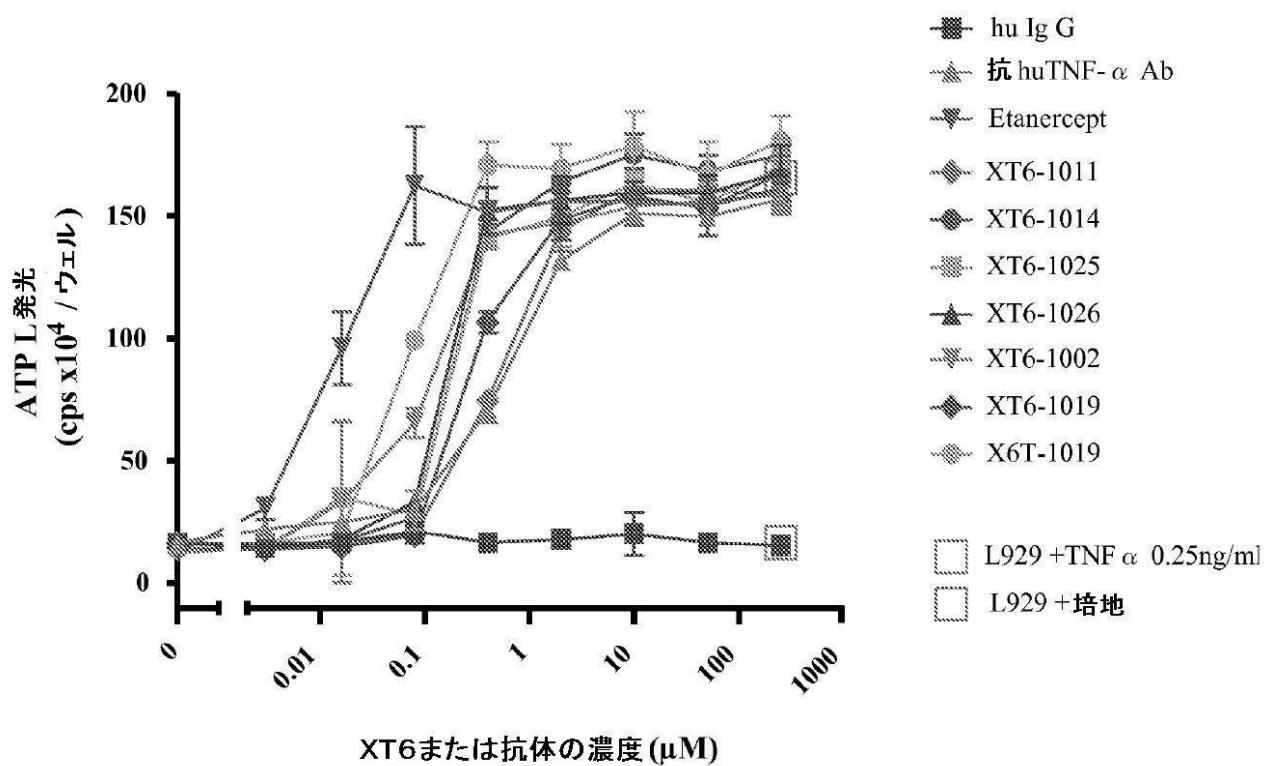


Fig. 7

【図9】

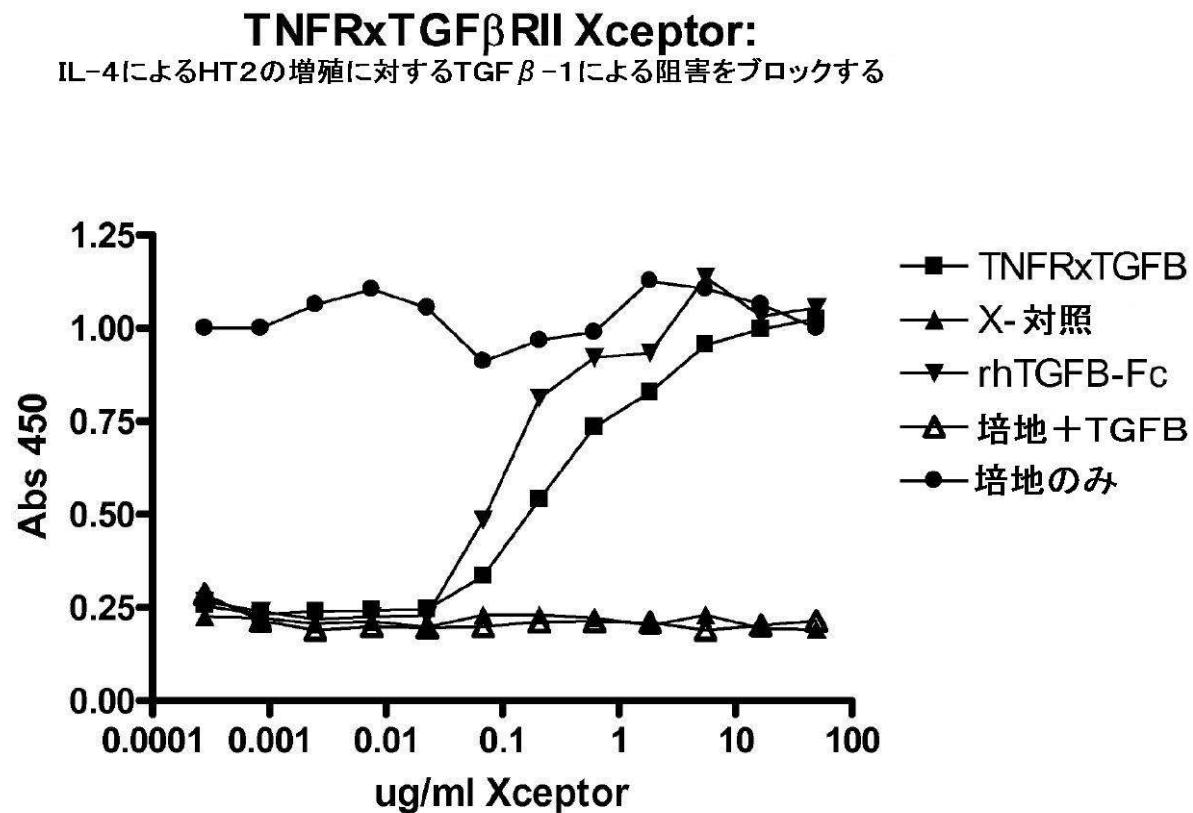


Fig. 9

【図 10】

## 抗IL6/IL6R分子のHepG2への結合

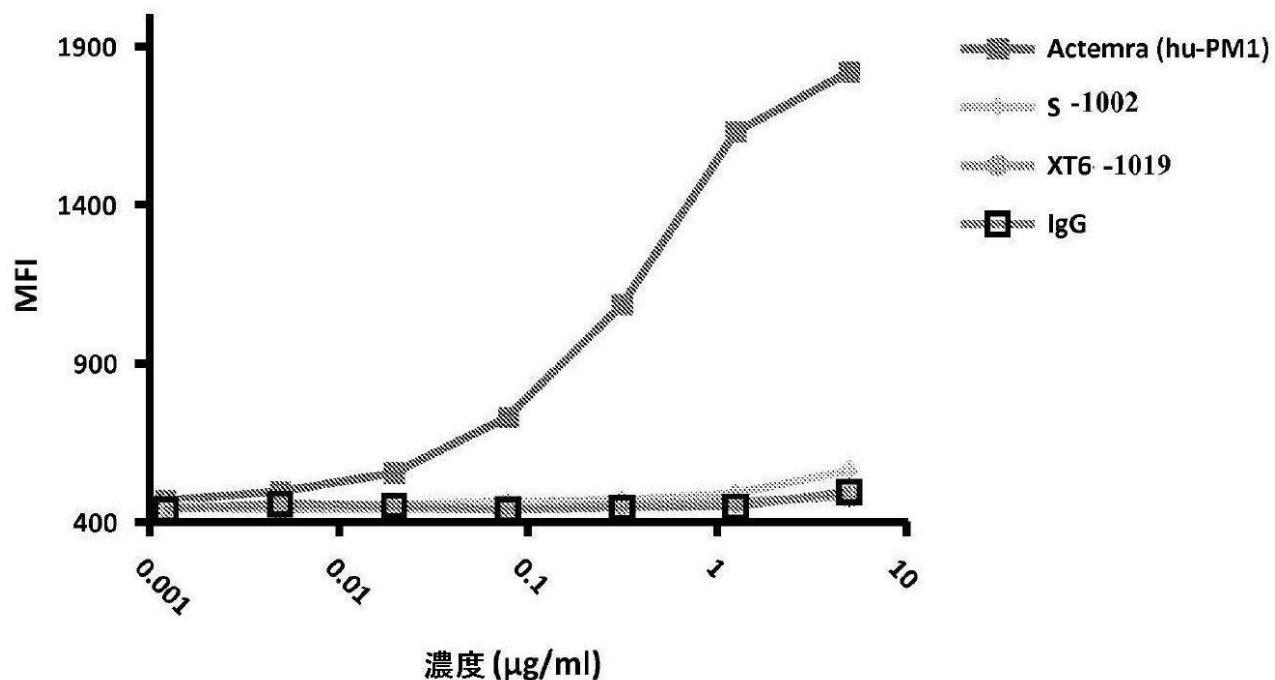
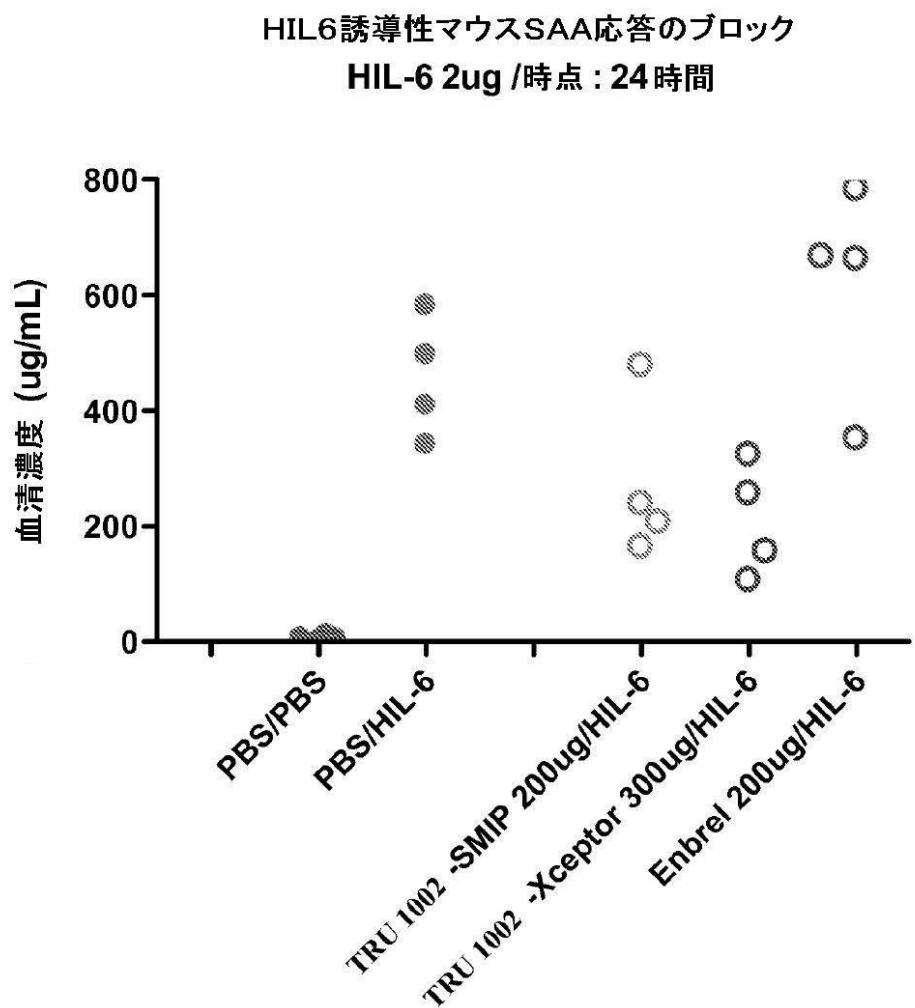


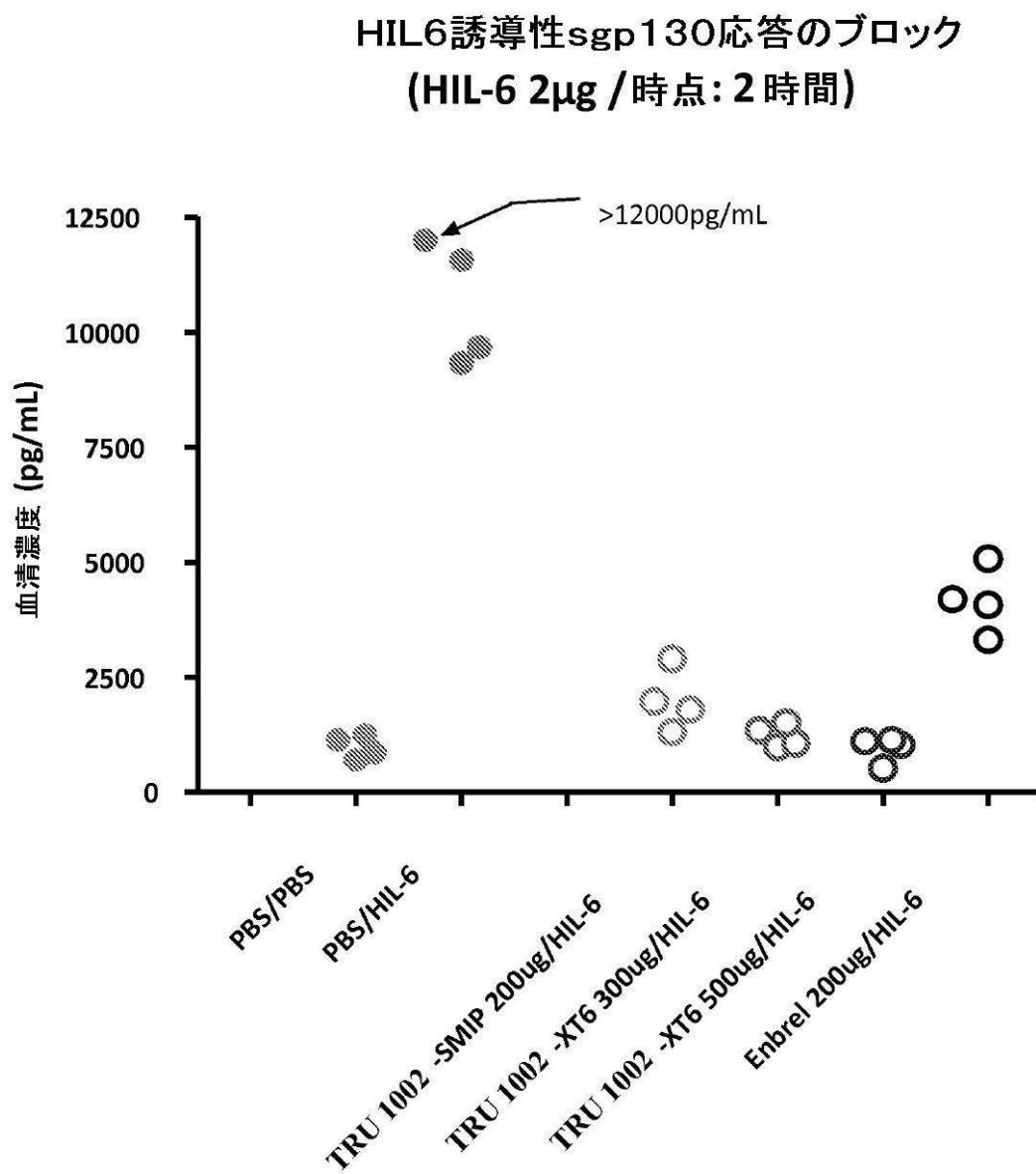
Fig. 10

【図 11】



*Fig. 11*

【図 12】



*Fig. 12*

【図 13】

mTNF $\alpha$ -誘導性マウスSAA応答のプロック  
(mTNF $\alpha$  0.5ug /時点 : 2時間)

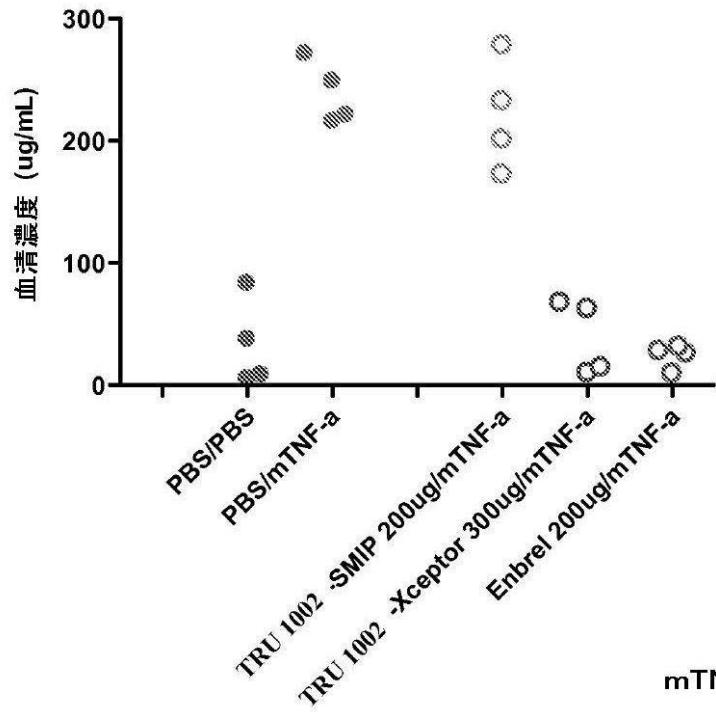
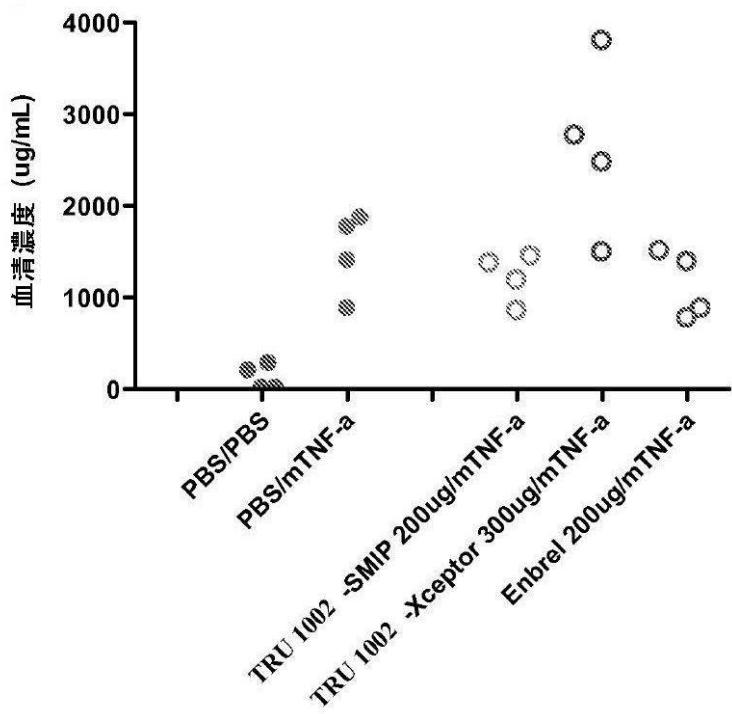


Fig. 13A

mTNF $\alpha$ -誘導性マウスSAA応答のプロック  
(mTNF- $\alpha$  0.5ug /時点 : 24時間)

Fig. 13B



【配列表】

2011526794000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年4月21日(2011.4.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2011526794000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/049616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N15/62 C07K14/715 C07K16/28 C07K16/24 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/146968 A (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; THOMPSON PETER ARMSTRONG [US]; LEDBETTER) 21 December 2007 (2007-12-21) the whole document	1,2,4, 8-12
Y	KOMESLI SYLVIANE ET AL: "Chimeric extracellular domain of type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF-beta antagonist" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 254, no. 3, June 1998 (1998-06), pages 505-513, XP002552921 ISSN: 0014-2956 the whole document	1-14
		1-14
		-/-

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the International search report

29 October 2009

11/11/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/049616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/028517 A (GEN HOSPITAL CORP [US]; LIN HERBERT Y [US]; DEL RE ELISABETTA [US]; SC) 31 March 2005 (2005-03-31) the whole document	1-14
Y	WO 2006/043972 A (AMPROTEIN CORP [US]; HUI MIZHOU [US]) 27 April 2006 (2006-04-27) the whole document	1-14
Y	WO 94/14467 A (GENENTECH INC [US]; ASHKENAZI AVI J [US]; WARD REBECCA H R [US]) 7 July 1994 (1994-07-07) SEQ ID NO 12	5,6
P,Y	WO 2009/023386 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; BRADY WILL) 19 February 2009 (2009-02-19) the whole document	1-14
Y	WO 2005/010049 A (LILLY CO ELI [US]; BRADLEY HEIDI MARIE [US]; KIKLY KRISTINE KAY [US];) 3 February 2005 (2005-02-03) the whole document	13,14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/049616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2007146968 A	21-12-2007	AU 2007257692 A1 CA 2654317 A1 CL 36232007 A1 EC SP099058 A EP 2041178 A2 KR 20090059104 A US 2009175867 A1		21-12-2007 21-12-2007 08-08-2008 27-02-2009 01-04-2009 10-06-2009 09-07-2009
WO 2005028517 A	31-03-2005	US 2007184052 A1		09-08-2007
WO 2006043972 A	27-04-2006	AU 2005296277 A1 BR P10516350 A CA 2583937 A1 EP 1799246 A1 JP 2008515970 T KR 20080022539 A		27-04-2006 02-09-2008 27-04-2006 27-06-2007 15-05-2008 11-03-2008
WO 9414467 A	07-07-1994	AT 173630 T AU 678429 B2 AU 5898894 A CA 2148907 A1 DE 69322289 D1 DE 69322289 T2 DK 695189 T3 EP 0695189 A1 ES 2126094 T3 IL 108007 A JP 3887011 B2 JP 8504817 T US 6558661 B1 US 2003012790 A1 US 2007020268 A1 ZA 9309577 A		15-12-1998 29-05-1997 19-07-1994 07-07-1994 07-01-1999 20-05-1999 09-08-1999 07-02-1996 16-03-1999 31-08-2005 28-02-2007 28-05-1996 06-05-2003 16-01-2003 25-01-2007 21-06-1995
WO 2009023386 A	19-02-2009	US 2009148447 A1		11-06-2009
WO 2005010049 A	03-02-2005	EP 1646655 A2		19-04-2006

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
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	
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 5/00	1 0 1

(31) 優先権主張番号 61/134,088  
 (32) 優先日 平成20年7月2日(2008.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/134,085  
 (32) 優先日 平成20年7月2日(2008.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/134,087  
 (32) 優先日 平成20年7月2日(2008.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/134,086  
 (32) 優先日 平成20年7月2日(2008.7.2)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/181,232  
 (32) 優先日 平成21年5月26日(2009.5.26)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S,K,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ロフクイスト, アラン キース  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 3 4 , カークランド, エヌ.イー. 1 3 0 ティーエイチ プレイス 9 4 2 2

(72) 発明者 バウム, ピーター ロバート  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, 3 4 ティーエイチ アベニュー エヌ.イー. 6 0 2 7

(72) 発明者 トンプソン, ピーター アームストロング  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 7 , ベルビュー, エヌ.イー. 3 0 ティーエイチ プレイス 1 4 0 7 5

(72) 発明者 ミシャー, リンダ  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 5 , シアトル, 1 0 ティーエイチ プレイス エヌ.イー. 1 0 6 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA63 CA01 CA09 CA10 CA11 CA20 DA02 EA04  
 GA11 HA01 HA11  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44  
 4C084 AA01 AA02 AA07 BA41 NA14 ZB261  
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 FA71