

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7644777号
(P7644777)

(45)発行日 令和7年3月12日(2025.3.12)

(24)登録日 令和7年3月4日(2025.3.4)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	Z N A
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
請求項の数 19 (全265頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-564209(P2022-564209)	(73)特許権者	519288755	
(86)(22)出願日	令和3年4月22日(2021.4.22)		ドラゴンフライ セラピューティクス、	
(65)公表番号	特表2023-522972(P2023-522972 A)		インコーポレイテッド	
(43)公表日	令和5年6月1日(2023.6.1)		アメリカ合衆国02451マサチューセ	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/028701		ッツ州ウォルサム、サード・アベニュー	
(87)国際公開番号	WO2021/216916	(74)代理人	100145403	
(87)国際公開日	令和3年10月28日(2021.10.28)		弁理士 山尾 憲人	
審査請求日	令和6年4月17日(2024.4.17)	(74)代理人	100122301	
(31)優先権主張番号	63/013,834		弁理士 富田 憲史	
(32)優先日	令和2年4月22日(2020.4.22)	(74)代理人	100170520	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 笹倉 真奈美	
(31)優先権主張番号	63/033,161	(74)代理人	100221545	
(32)優先日	令和2年6月1日(2020.6.1)		弁理士 白江 雄介	
最終頁に続く		(72)発明者	ビゲロウ、ミッチェル	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質のための製剤、投薬量レジメン、及び製造工程

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

医薬製剤の調製用のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を製造する方法であって、前記方法が、前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞培養液から入手した前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む溶液に酢酸を加えることおよび前記溶液を30分～90分間インキュベートすることを含み、ここで前記酢酸が前記溶液の pH を pH 3.55～3.75 に調整及び維持し、及び

前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、免疫グロブリン断片結晶化可能（Fc）対の第1の Fc 領域及び第2の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、

前記 IL-12 の p40 及び p35 サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1の Fc 領域及び前記第2の Fc 領域に連結されるか、又は前記第2の Fc 領域及び前記第1の Fc 領域に連結されており、

前記 p40 及び p35 サブユニットが、各々、前記 Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結されており、前記第1の Fc 領域及び前記第2の Fc 領域の CH3 ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、方法。

【請求項2】

前記酢酸が、前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む前記溶液に加えられ、および該溶液が60分間インキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記酢酸が、前記溶液のpHを3.65に調整及び維持する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現する前記CHO細胞培養液が、

- (a) 浮遊下に維持される；
- (b) バイオリクターにて7～21日間培養される；
- (c) バイオリクターにて14日間培養される；および／または
- (d) 深層ろ過によって回収され、CHO回収培地が得られる、

請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記深層ろ過が、DOHC及びXOHCフィルタからなる二段階使い捨て深層ろ過である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、前記CHO回収培地からプロテインAキャプチャクロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む溶液を得ることによって前記CHO回収培地から精製される、請求項4又は5に記載の方法。

【請求項7】

前記プロテインAキャプチャクロマトグラフィーが、

プロテインA樹脂をpH7.5の20mMトリスおよび150mM NaClで平衡化させること；

前記CHO回収培地を前記プロテインA樹脂にロードすること；

前記ロードされたプロテインA樹脂をpH7.5の20mMトリスおよび150mM NaClで洗浄すること；

前記ロードされたプロテインA樹脂をpH5.4の50mM酢酸塩で洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH3.7の50mM酢酸塩および100mM アルギニンで前記プロテインA樹脂から溶出させること、及び280nm UVで1.25AU/cm上昇から開始して1.25AU/cm下降で終了するまで収集することを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記プロテインA樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液に前記酢酸が0.5Mの濃度で加えられ、前記酢酸が前記溶液のpHを60分間にわたってpH3.65に酸性化し、続いて2Mトリスを加えることにより前記溶液をpH5.2に中和する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記溶液の酸性化及び中和に続いて、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液が0.2µmフィルタに通される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記プロテインA樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ろ過した溶液が、XOSP深層ろ過に通される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記混合モードクロマトグラフィーが、

混合モードクロマトグラフィーカラムをpH5.2の50mM酢酸塩で平衡化させること；

XOSP深層ろ過に通した前記溶液を前記混合モードクロマトグラフィーカラムにロードすること；

前記ロードした混合モードクロマトグラフィーカラムをpH5.2の50mM酢酸塩で洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH5.2の50mM酢酸塩および250mM NaClで前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出させること、及び280nm

10

20

30

40

50

m UVで0.625 AU/cm上昇から開始して1.50 AU/cm下降で終了するまで収集すること

を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むこの前記溶液を0.2 μmフィルタに通す、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、

陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50 mMトリスで平衡化させること；

前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出した前記ろ過した溶液を前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂にロードすること；

前記ロードした陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50 mMトリスで洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH7.4の50 mMトリス及びpH7.4の50 mMトリス、0.5 M NaClのグラジエントで前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出させること、及び280 nm UVで2.5 AU/cm上昇から開始して4.5 AU/cm下降で終了するまで収集すること

を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液が、0.2 μmフィルタに通される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ろ過した溶液が、前置フィルタ、公称20 nmフィルタ、及び0.2 μm膜でナノろ過される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ナノろ過した溶液が限外ろ過され、及びダイアフィルトレーションされる、請求項15に記載の方法であって、前記限外ろ過及びダイアフィルトレーションが、

限外ろ過システムをpH7.4の50 mMトリスおよび265 mM NaClで平衡化させること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ナノろ過した溶液を5.0 g/Lの濃度に濃縮すること；

少なくとも7ダイアボリュームのpH6.5の20 mMクエン酸塩を使用して緩衝液を交換して、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むナノろ過した溶液を得ること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ダイアフィルトレーションした溶液を11.0 g/Lの濃度に濃縮すること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む濃縮された溶液をpH6.5の20 mMクエン酸塩で5 g/L～10 g/Lの濃度に希釈すること；及び

pH6.5の20 mMクエン酸塩、18% (w/v) スクロース、3% (w/v) マンニトール、および0.03% (w/v) ポリソルベート80を加えることにより、20 mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、および0.01% (w/v) ポリソルベート80中の前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記限外ろ過／ダイアフィルトレーション保持溶液の最終濃度を実現することを含む、方法。

【請求項17】

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記限外ろ過した／ダイアフィルトレーションした溶液を0.2 μm膜に通して、バルク原薬が得られる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

10

20

30

40

50

前記バルク原薬が、pH 6.5の20mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、及び0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む0.2 µmフィルタでろ過した緩衝液中に、80%薬物製品溶液となるように希釈される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記バルク原薬又は前記80%薬物製品溶液が、pH 6.5の20mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、及び0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む0.2 µmフィルタでろ過した緩衝液中に、1mg/mLの前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与用濃度となるように希釈される、請求項17又は18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2020年4月22日に出願された米国仮特許出願第63/013,834号明細書、及び2020年6月1日に出願された米国仮特許出願第63/033,161号明細書に対する優先権及びその利益を主張するものであり、これらの各々は、本明細書によって全体として参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

本願と共に提出されたASCIIテキストファイル（ファイル名：3338__259PC03__Seqlisting__ST25.txt；サイズ：946,336バイト；及び作成日：2021年4月21日）の電子的に提出された配列表の内容は、全体として参照により本明細書に援用される。

【0003】

本開示は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の医薬製剤及び投薬量レジメン、並びに癌の治療のためのかかるタンパク質の使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

生理活性のあるタンパク質は、概ね生体内半減期が短いという欠点を有する。この欠点を解決するため、それをPEG（ポリエチレングリコール）などとコンジュゲートするか、又はそれを抗体Fc（結晶化可能断片）領域に融合する試みがなされている。2つ以上の異なるサブユニットで構成されるタンパク質は、2つ以上の異なるサブユニットがタンパク質複合体を形成して生理活性を呈するというものであり、これを野生型Fcドメインに融合させると、Fc融合タンパク質形態を調製することができ、Fcは本質的にホモ二量体であるため、これはホモ二量体を形成し得る。2つ以上の異なるサブユニットで構成されるタンパク質は、2つ以上の異なるサブユニットがタンパク質複合体を形成して生理活性を呈するというものであり、これはまた、IgG1のみならず、IgG2、IgG3及びIgG4などの他のアイソタイプ抗体にも由来するヘテロ二量体Fc領域に融合させると、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を形成することもできる。このように、2つ以上の異なるサブユニットで構成される、且つ2つ以上のサブユニットがタンパク質複合体を形成することによって生理活性を呈するタンパク質の1つ以上のサブユニットをヘテロ二量体Fc変異体領域の末端に融合させると、改良されたFc融合タンパク質形態を形成することができる。

【0005】

Fcヘテロ二量体化は、Fcの2つの異なるCH3ドメインに遺伝子工学によって突然変異を誘導することにより、これらの2つのFc断片が、天然に存在する抗体に極めて類似した三次構造を有しながらも、最小限の配列変異を持つヘテロ二量体を形成することになるような技術である（例えば、特許文献1を参照のこと）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】米国特許第7,695,936号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本開示に記載される本発明は、Fc融合タンパク質形態を改良するための設計を提供し、ここでは様々な長さのリンカーを導入するか、又はFcのCH2及びCH3ドメインに突然変異を導入することにより、ヘテロ二量体タンパク質の2つのサブユニットが、異なるヘテロ二量体ドメインを有する2つのFcドメインに結び付けられている。本開示に記載される更なる本発明は、かかるタンパク質の医薬製剤、かかるタンパク質及び製剤の作製方法、並びにかかるタンパク質を使用した癌の治療方法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、概して、IL12サブユニットを含むある種のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む医薬製剤、かかるタンパク質及び医薬製剤の調製工程に関する。また、局所進行又は転移性固形腫瘍などの癌の治療にかかるヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び医薬製剤を使用するための投薬量レジメンも提供される。

【0009】

従って、一態様において、本明細書には、第1の抗体Fcドメインポリペプチドと多サブユニットサイトカインの第1のサブユニットとを含む第1のポリペプチド、及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドと多サブユニットサイトカインの第2の異なるサブユニットとを含む第2のポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質、クエン酸塩、糖、糖アルコール、及び非イオン性界面活性剤を含む、pH6.0~7.0の医薬製剤であって、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドが、各々、ヘテロ二量体化を促進する異なる突然変異を含み、及び多サブユニットサイトカインの第1のサブユニット及び第2の異なるサブユニットが互いに結合している、医薬製剤が提供される。一部の実施形態において、第1及び／又は第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、Fcのエフェクター機能を低減する1つ以上の突然変異を含む。

20

【0010】

一部の実施形態において、医薬製剤中のクエン酸塩の濃度は約10mM~約30mMである。特定の実施形態において、医薬製剤中のクエン酸塩の濃度は約20mMである。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖の濃度は約3%~約12%(w/v)である。特定の実施形態において、医薬製剤中の糖の濃度は約6%(w/v)である。特定の実施形態において、糖は二糖である。特定の実施形態において、二糖はスクロースである。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖アルコールの濃度は約0.5%~約6%(w/v)である。特定の実施形態において、医薬製剤中の糖アルコールの濃度は約1%(w/v)である。特定の実施形態において、糖アルコールは単糖に由来する。特定の実施形態において、糖アルコールはマンニトールである。

30

【0011】

一部の実施形態において、医薬製剤中の非イオン性界面活性剤の濃度は約0.005%~約0.02%(w/v)である。特定の実施形態において、医薬製剤中のポリソルベート80の濃度は約0.01%(w/v)である。特定の実施形態において、非イオン性界面活性剤はポリソルベートである。特定の実施形態において、ポリソルベートはポリソルベート80である。

40

【0012】

一部の実施形態において、pHは約6.1~約6.9である。特定の実施形態において、pHは約6.2~約6.8である。特定の実施形態において、pHは約6.3~約6.7である。一部の実施形態において、pHは約6.4~約6.6である。特定の実施形態において、pHは約6.5である。

50

【0013】

一部の実施形態において、医薬製剤は、水を更に含む。特定の実施形態において、水は、USP注射用水である。

【0014】

一部の実施形態において、医薬製剤は、約1 g/L～約10 g/Lのバルク濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約2 g/L～約8 g/Lのバルク濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約4 g/L～約6 g/Lのバルク濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約5 g/Lのバルク濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

10

【0015】

一部の実施形態において、医薬製剤は、約0.5 g/L～約1.5 g/Lの投与用濃度のタンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約0.75 g/L～約1.25 g/Lの投与用濃度のタンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約1 g/Lの投与用濃度のタンパク質を含む。

【0016】

一部の実施形態において、製剤は、2℃～8℃の温度で保存するように設計される。一部の実施形態において、医薬製剤は澄明な無色の溶液であり、目に見える粒子状物質を含まない。

【0017】

一部の実施形態において、製剤は、示差走査型蛍光定量法により測定したとき、約60℃より高い、約61℃より高い、約62℃より高い、約63℃より高い、約64℃より高い、約65℃より高い、又は約66℃より高い T_{m1} ；及び／又は約70℃より高い、約71℃より高い、約72℃より高い、約73℃より高い、約74℃より高い、約75℃より高い、約76℃より高い、又は約77℃より高い T_{m2} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する。特定の実施形態において、製剤は、約67.0℃の T_{m1} 及び約77.3℃の T_{m2} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する。特定の実施形態において、 T_{m1} 及び／又は T_{m2} によって定義されたとおりの、医薬製剤の熱安定性プロファイルは、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約2℃未満又は約1℃未満しか変化しない。

20

30

【0018】

一部の実施形態において、製剤は、示差走査型蛍光定量法により測定したとき、約60℃より高い、約61℃より高い、約62℃より高い、約63℃より高い、約64℃より高い、約65℃より高い、約66℃より高い、又は約67℃より高い T_{agg} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する。特定の実施形態において、 T_{agg} によって定義されたとおりの、医薬製剤の熱安定性プロファイルは、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約2℃未満又は約1℃未満しか変化しない。

【0019】

一部の実施形態において、医薬製剤を5℃で1週間インキュベートした後、医薬製剤のpHは、約0.2又は約0.1のpH値より大きく変化しない。一部の実施形態において、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートした後、医薬製剤のpHは、約0.2又は約0.1のpH値より大きく変化しない。

40

【0020】

一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約15 nm未満、約14 nm未満、約13 nm未満、又は約12 nm未満のZ平均流体力学直径を有する。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約11.6 nmのZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、医薬製剤

50

を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約20nm未満、約19nm未満、約18nm未満、約17nm未満、約16nm未満、又は約15nm未満のZ平均流体力学直径を有する。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約14.4nmのZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約20nm未満、約19nm未満、約18nm未満、約17nm未満、又は約16nm未満のZ平均流体力学直径を有する。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約15.3nmのZ平均流体力学直径を有する。

【0021】

一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、又は約0.27未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.26である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、約0.27未満、又は約0.26未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.25である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.40未満、約0.35未満、又は約0.34未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.33である。

【0022】

一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、又は約99%超である。特定の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約99.0%である。

【0023】

一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約75%超、約80%超、約81%超、約82%超、約83%超、約84%超、又は約85%超である。特定の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約85.2%である。

【0024】

一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、又は約98%超である。特定の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約98.9%である。

【0025】

別の態様において、本開示は、それを必要としている対象に、医薬製剤を単回用量療法として投与することを含む方法を提供する。

【0026】

別の態様において、本開示は、それを必要としている対象に、複数回用量療法で、用量間に少なくとも3週間又は用量間に少なくとも4週間の間隔を置いて医薬製剤を投与する

10

20

30

40

50

ことを含む方法を提供する。一部の実施形態において、医薬製剤は、対象に3週間に1回投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、対象に4週間に1回投与される。特定の実施形態において、医薬製剤は、対象に6週間に1回投与される。

【0027】

一部の実施形態において、本方法は、対象に病勢進行、許容できない毒性が現れた場合、又は対象が離脱基準を満たした場合、複数回用量療法を中止することを更に含む。一部の実施形態において、複数回用量療法の間に対象に完全奏効（CR）が見られた場合、完全奏効の確認後少なくとも12ヵ月間にわたって複数回用量療法が更に投与される。特定の実施形態において、複数回用量療法の総継続期間は、24ヵ月以下である。特定の実施形態において、総治療継続期間は、24ヵ月より長い。

【0028】

一部の実施形態において、医薬製剤は皮下注射によって投与される。

【0029】

一部の実施形態において、医薬製剤は、対象の体重を基準として、約 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $1.75\mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬量でヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供するのに十分な量で対象に投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、対象の体重を基準として、約 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.40\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.60\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.80\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.00\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.40\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約 $1.75\mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬量でヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供するのに十分な量で対象に投与される。特定の実施形態において、医薬製剤は、対象の体重を基準として、 $0.00\mu\text{g}/\text{kg}$ より多く約 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ より少ない投薬量でヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供するのに十分な量で対象に投与される。特定の実施形態において、医薬製剤は、対象の体重を基準として、約 $1.75\mu\text{g}/\text{kg}$ より多い投薬量でヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供するのに十分な量で対象に投与される。

【0030】

一部の実施形態において、対象は癌を有する。特定の実施形態において、対象は局所進行又は転移性固形腫瘍を有する。特定の実施形態において、対象における癌の存在は、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（Response Evaluation Criteria for Solid Tumors: RECIST）、第1.1版を使用して確認される。特定の実施形態において、癌は、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、膀胱癌、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌（RCC）、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、及びトリプルネガティブ乳癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、癌は、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、膀胱癌、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌（RCC）、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、及びトリプルネガティブ乳癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、対象は抗PD-1不応性である。

【0031】

一部の実施形態において、対象は黒色腫を有する。特定の実施形態において、対象は、過去に抗PD-1抗体で少なくとも6週間治療されたことがある。特定の実施形態において、対象は、抗PD-1抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも4週間後に病勢進行を確認されている。特定の実施形態において、病勢進行は、放射線学的又は臨床的所見によって確認される。特定の実施形態において、対象が、BRAF活性化突然変異を含む腫瘍を有する場合、対象は、過去にBRAF阻害薬で治療されたことがある。

10

20

30

40

50

【0032】

一部の実施形態において、対象はRCCを有する。特定の実施形態において、RCCは明細胞を有する。特定の実施形態において、患者は、過去に抗PD-1/PD-L1抗体及び／又は抗血管内皮成長因子療法で治療されたことがある。特定の実施形態において、対象は、過去に3ライン以下の療法を受けたことがある。

【0033】

一部の実施形態において、対象は尿路上皮癌を有する。特定の実施形態において、対象は局所進行又は転移性尿路移行上皮癌を有する。特定の実施形態において、対象は、過去に白金含有レジメンを含む単回治療で治療されたことがあり、且つ白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内のX線所見進行再発を示している。特定の実施形態において、対象は、過去に2ライン以下の療法を受けたことがある。特定の実施形態において、対象は、過去に単独療法としての又は白金ベースの化学療法と組み合わせたチェックポイント阻害薬（例えば、抗PD-1又は抗PD-L1抗体）療法を受けたことがない。

10

【0034】

一部の実施形態において、医薬製剤は対象に単独療法として投与される。

【0035】

一部の実施形態において、医薬製剤は対象に組み合わせ療法として投与される。

【0036】

一部の実施形態において、本方法は、抗PD-1抗体を対象に投与することを更に含む。特定の実施形態において、抗PD-1抗体はペンブロリズマブである。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは静脈内投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、200mgの用量で投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブの投与は、本医薬製剤の各投与よりも前に行われる。特定の実施形態において、本医薬製剤は、ペンブロリズマブの投与完了後1時間以内に投与される。

20

【0037】

特定の実施形態において、抗PD-1抗体はニボルマブである。特定の実施形態において、ニボルマブは静脈内投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、約480mgの用量で投与される。特定の実施形態において、ニボルマブの投与は、医薬製剤の各投与よりも前に行われる。特定の実施形態において、本医薬製剤は、ニボルマブの投与完了後1時間以内に投与される。

30

【0038】

一部の実施形態において、組み合わせ療法は、黒色腫、NSCLC、SCLC、RCC、古典的ホジキンリンパ腫、HNCC、尿路上皮癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、及び食道癌からなる群から選択される癌の治療用である。一部の実施形態において、組み合わせ療法は、黒色腫、NSCLC、SCLC、RCC、古典的ホジキンリンパ腫、HNCC、尿路上皮癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、及び前立腺癌からなる群から選択される癌の治療用である。一部の実施形態において、癌は黒色腫である。一部の実施形態において、黒色腫は切除不能である。一部の実施形態において、癌は結腸直腸癌である。一部の実施形態において、結腸直腸癌は高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)又はミスマッチ修復機構欠損転移性(dMMR)結腸直腸癌である。

40

【0039】

一部の実施形態において、本方法は、外科的介入を実施することにより、対象の癌細胞を溶解させ、腫瘍を除去し、又は腫瘍を減量させることを更に含む。特定の実施形態において、外科的介入は、凍結療法を含む。特定の実施形態において、外科的介入は、温熱療法を含む。特定の実施形態において、外科的介入は、対象に放射線療法を投与することを含む。特定の実施形態において、放射線療法は、体幹部定位放射線療法(SBRT)である。

【0040】

一部の実施形態において、本方法は、対象にNK細胞標的療法を投与することを更に含む。特定の実施形態において、対象には、多特異性結合タンパク質が投与される。一部の

50

実施形態において、本方法は、対象にキメラ抗原受容体療法を投与することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、対象にサイトカイン療法を投与することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、対象に自然免疫系アゴニスト療法を投与することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、対象に化学療法を投与することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、対象に標的抗原療法を投与することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、対象に腫瘍溶解性ウイルス療法を投与することを更に含む。

【0041】

別の態様において、本開示は、医薬製剤の投与を受けている対象において毒性を検出する方法であって、対象の血中のC反応性タンパク質（CRP）濃度を測定することを含む方法を提供し、ここで医薬製剤は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含み、及びヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、対象の血中のCRP濃度が閾値CRP濃度よりも高い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクがあると同定され；及び対象の血中のCRP濃度が閾値C反応性タンパク質濃度とほぼ同じであるか、又はそれより低い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクはないと同定される。特定の実施形態において、対象の血中のCRP濃度が閾値CRP濃度よりも高い場合、本医薬製剤の投与が中断されるか、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が用量を下げて投与されるか、又は対象における製剤の毒性効果を低減し若しくは緩和するための治療上の措置が講じられる。

【0042】

本明細書に記載される医薬製剤又は方法の一部の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、ヒトIgG1 Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、多サブユニットサイトカインは、ヒトIL12である。特定の実施形態において、ヒトIgG1 Fcドメインポリペプチドは、Fcのエフェクター機能を低減する1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、EU番号付け方式に従い番号付けして、L234A、L235A又はL235E、G237A、P329A、A330S、及びP331Sから選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、突然変異L234A、L235A、及びP329Aを含む。特定の実施形態において、多サブユニットサイトカインの第1のサブユニットは、IL12のp40サブユニットであり、多サブユニットサイトカインの第2のサブユニットは、IL12のp35サブユニットである。本医薬製剤又は本方法の特定の実施形態において、多サブユニットサイトカインの第1のサブユニットは配列番号127のアミノ酸配列を含み、多サブユニットサイトカインの第2のサブユニットは配列番号128のアミノ酸配列を含む。本医薬製剤又は本方法の特定の実施形態において、多サブユニットサイトカインの第2のサブユニットは、配列番号108のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインに融合している。本医薬製剤又は本方法の特定の実施形態において、第1の抗体Fcドメインは、突然変異L234A、L235A、P329A、Y349C、K360E、及びK409Wを含み、第2の抗体Fcドメインは、突然変異L234A、L235A、P329A、Q347R、S354C、D399V、及びF405Tを含む。本医薬製剤又は本方法の特定の実施形態において、第1の抗体Fcドメインは配列番号215のアミノ酸配列を含み、第2の抗体Fcドメインは配列番号216のアミノ酸配列を含む。本医薬製剤又は本方法の特定の実施形態において、第1の抗体Fcドメインペプチドは配列番号290のアミノ酸配列を含み、第2の抗体Fcドメインペプチドは配列番号291

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列を含む。

【0043】

別の態様において、本明細書には、医薬製剤を含む1つ以上の容器を含むキットが提供され、ここで医薬製剤は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質並びにIL-12のp40及びp35サブユニット（IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む）と；薬学的に許容可能な担体とを含み、及び1つ以上の容器は、合計で約0.1mg～約2mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、1つ以上の容器は、合計で約0.5mg～約2mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、1つ以上の容器は、合計で約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、本キットは、約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む1つの容器を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は凍結乾燥製剤又は液体製剤である。特定の実施形態において、医薬製剤は、1mLの容積で供給される液体製剤である。

10

【0044】

別の態様において、本開示は、癌の治療用医薬の製造におけるヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用を提供し、ここで医薬は、1つ以上の容器に入った約0.5g/L～約1.5g/Lのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む液体医薬製剤として製造され、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、液体医薬製剤は、約1.0g/Lのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

20

【0045】

別の態様において、本明細書には、癌の治療用医薬の製造におけるヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用が提供され、ここで医薬は、1つ以上の容器に入った約0.1mg～約2mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む液体医薬製剤として製造され、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、液体医薬製剤は、1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬は、1つの容器に入っている。一部の実施形態において、ここで各容器には、1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質が入っている。特定の実施形態において、医薬は、3週間毎に1日目に対象に投与される。一部の実施形態において、医薬は、4週間毎に1日目に対象に投与される。一部の実施形態において、医薬は皮下投与される。一部の実施形態において、医薬は、約0.1mL～約1mLの容積で投与される。特定の実施形態において、医薬は、約1mLの容積で投与される。一部の実施形態において、医薬は、最大2ヵ所までの注射部位に投与される。特定の実施形態において、2回目の注射は、1回目の注射後10分以内に完了される。一部の実施形態において、医薬は、約0.05mg/kg～約1.75mg/kgの用量で投与される。特定の実施形態において、医薬は、約1mg/kgの用量で投与される。一部

30

40

50

の実施形態において、医薬は投与前に 0.9%生理食塩水（注射用塩化ナトリウム）及び 0.01%ポリソルベート 80 の溶液中に希釈される。

【0046】

別の態様において、本明細書には、その医薬製剤の調製用のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を製造する方法であって、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞培養液から入手したヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む溶液に酢酸を 30 分～90 分間加えることを含む方法が提供され、ここでは酢酸塩が溶液の pH を pH 3.55～3.75 に調整及び維持し、及びヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、免疫グロブリン Fc（断片結晶化可能）対の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、IL-12 の p40 及び p35 サブユニットは、別々に、それぞれ第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域に連結されるか、又は第 2 の Fc 領域及び第 1 の Fc 領域に連結され、p40 及び p35 サブユニットは、各々が、Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結され、第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域の CH3 ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、酢酸は、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む溶液に約 60 分間加えられる。特定の実施形態において、酢酸は、溶液の pH を約 3.65 に調整及び維持する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を発現する CHO 細胞培養液は、浮遊下に維持される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を発現する CHO 細胞培養液は、バイオリクターにて 7～21 日間培養される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を発現する CHO 細胞培養液は、バイオリクターにて 14 日間培養される。一部の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を発現する CHO 細胞培養液を深層ろ過によって回収すると、CHO 回収培地が生じる。特定の実施形態において、深層ろ過は、DOHC 及び XOHC フィルタからなる二段階使い捨て深層ろ過である。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を CHO 回収培地からプロテイン A キャプチャクロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製すると、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む溶液が生じる。

【0047】

一部の実施形態において、プロテイン A キャプチャクロマトグラフィーは、プロテイン A 樹脂を pH 7.5 の 20 mM トリス、150 mM NaCl で平衡化させること、CHO 回収培地をプロテイン A 樹脂にロードすること；ロードされたプロテイン A 樹脂を pH 7.5 の 20 mM トリス、150 mM NaCl で洗浄すること；ロードされたプロテイン A 樹脂を pH 5.4 の 50 mM 酢酸塩で洗浄すること；及びヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を pH 3.7 の 50 mM 酢酸塩、100 mM アルギニンでプロテイン A 樹脂から溶出させること、及び 280 nm UV によって 1.25 AU/cm 上昇から開始して 1.25 AU/cm 下降で終了するまで収集することを含む。特定の実施形態において、プロテイン A 樹脂から溶出したヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む溶液に酢酸が 0.5 M の濃度で加えられ、ここで酢酸は溶液の pH を 60 分間にわたって pH 3.65 に酸性化し、続いて 2 M トリスを加えることにより溶液を pH 5.2 に中和する。特定の実施形態において、溶液の酸性化及び中和に続いて、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含むこの溶液は、0.2 µm フィルタに通される。特定の実施形態において、プロテイン A 樹脂から溶出したヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含むこのろ過した溶液は、XOSP 深層ろ過に通される。

【0048】

一部の実施形態において、混合モードクロマトグラフィーは、混合モードクロマトグラフィーカラムを pH 5.2 の 50 mM 酢酸塩で平衡化させること；XOSP ろ過に通した溶液を混合モードクロマトグラフィーカラムにロードすること；ロードした混合モードクロマトグラフィーカラムを pH 5.2 の 50 mM 酢酸塩で洗浄すること；及びヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を pH 5.2 の 50 mM 酢酸塩、250 mM NaCl で混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出させること、及び 280 nm UV によって 0.6

25 AU/cm上昇から開始して1.50 AU/cm下降で終了するまで収集することを含む。特定の実施形態において、混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出したヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むこの溶液は、0.2 µmフィルタに通される。

【0049】

一部の実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーは、陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50 mMトリスで平衡化させること；混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出した過した溶液を陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂にロードすること；ロードした陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50 mMトリスで洗浄すること；及びヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH7.4の50 mMトリス及びpH7.4の50 mMトリス、0.5 M NaClのグラジエントで陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出させること、及び280 nm UVによって2.5 AU/cm上昇から開始して4.5 AU/cm下降で終了するまで収集することを含む。特定の実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出したヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む溶液は、0.2 µmフィルタに通される。特定の実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出したヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む過した溶液は、前置フィルタ、20 nm公称フィルタ、及び0.2 µm膜でナノろ過される。

【0050】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むナノろ過した溶液は、限外ろ過され、及びダイアフィルトレーションされ、ここで限外ろ過及びダイアフィルトレーションは、限外ろ過システムをpH7.4の50 mMトリス、265 mM NaClで平衡化させること；ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むナノろ過した溶液を約5.0 g/Lの濃度に濃縮すること；7ダイアボリウム、pH6.5の20 mMクエン酸塩を使用して緩衝液を交換すること；ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むダイアフィルトレーションした溶液を約11.0 g/Lの濃度に濃縮すること；ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む濃縮溶液をpH6.5の20 mMクエン酸塩で約5 g/L～約10 g/Lの濃度に希釈すること；及びpH6.5の20 mMクエン酸塩、18% (w/v) スクロース、3% (w/v) マンニトール、0.03% (w/v) ポリソルベート80を加えることにより、20 mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、0.01% (w/v) ポリソルベート80のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む限外ろ過 (ultrafiltration) /ダイアフィルトレーション保持溶液の最終濃度を実現することを含む。特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む限外ろ過した/ダイアフィルトレーションした溶液を0.2 µm膜に通してバルク原薬を生じさせる。

【0051】

一部の実施形態において、バルク原薬は、pH6.5の20 mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、及び0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む0.2 µmフィルタでろ過した緩衝液中に、80%薬物製品溶液となるように希釈される。特定の実施形態において、バルク原薬又は80%薬物製品は、pH6.5の20 mMクエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、及び0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む0.2 µmフィルタでろ過した緩衝液中に、1 mg/mLのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与用濃度となるように希釈される。

【0052】

チェックポイント阻害薬抗体による治療を少なくとも6週間受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を対象に投与することを含む方法、ここでヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc (断片結晶化可能) 対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又

10

20

30

40

50

は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬抗体は、抗プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）抗体である。特定の実施形態において、癌は黒色腫である。特定の実施形態において、黒色腫は切除不能又は転移性である。特定の実施形態において、対象は、抗PD-1抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも4週間後に病勢進行を有すると確認される。特定の実施形態において、対象は、抗PD-1抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも4週間後に病勢進行を有すると確認される。特定の実施形態において、病勢進行は、放射線学的又は臨床的所見によって確認される。

10

【0053】

別の態様において、本明細書には、チェックポイント阻害薬抗体又は抗血管内皮成長因子療法による治療を単独療法として、又は組み合わせで受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を対象に投与することを含む方法が提供され、ここでヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬抗体は、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体である。

20

【0054】

特定の実施形態において、癌は進行性腎細胞癌（RCC）である。特定の実施形態において、RCCは切除不能又は転移性である。特定の実施形態において、RCCは明細胞成分を有する。特定の実施形態において、対象は、過去に療法を3ライン以下だけ受けた。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬による治療を受けたことがない。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬は、単独療法としての、又は白金ベースの化学療法と組み合わせた抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体を含む。

30

【0055】

別の態様において、本明細書には、ただ1つの白金含有レジメンによる治療を受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を対象に投与することを含む方法が提供され、ここでヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12のp40及びp35サブユニットは、別々に、それぞれ第1のFc領域及び第2のFc領域に連結されるか、又は第2のFc領域及び第1のFc領域に連結され、p40及びp35サブユニットは、各々が、Fc領域のN末端又はC末端に連結され、第1のFc領域及び第2のFc領域のCH3ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、白金含有レジメンは、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、及びドキソルビシンから選択される薬剤と組み合わせた白金である。特定の実施形態において、癌は、局所進行又は転移性尿路移行上皮癌である。特定の実施形態において、尿路上皮癌には、腎盂、尿管、泌尿器尿路上皮、及び尿道からなる群の1つ以上が含まれる。特定の実施形態において、尿路上皮癌は手術不能である。特定の実施形態において、尿路上皮癌は、補助剤としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内のX線所見進行又は再発を伴い特徴付けられる。

40

【0056】

一部の実施形態において、尿路上皮癌は、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なさ

50

れる。特定の実施形態において、対象は、医薬製剤の投与前に、尿路上皮癌の治療のための療法（白金含有レジメンを含む）を2ライン以下だけ受けたことがある。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬（CPI）による治療を第一選択療法として受けたことがない。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬は、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体である。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬は単独療法であるか、又は白金ベースの化学療法との組み合わせである。

【0057】

一部の実施形態において、医薬製剤は、ペンブロリズマブと組み合わせて投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは3週間毎に1回投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、医薬製剤の投与前に投与される。特定の実施形態において、医薬製剤は、ペンブロリズマブの投与完了後1時間以内に投与される。一部の実施形態において、ペンブロリズマブは、200mgの用量で投与される。一部の実施形態において、ペンブロリズマブは静脈内投与される。一部の実施形態において、組み合わせは、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、及び子宮内膜癌からなる群から選択される癌の治療用である。一部の実施形態において、組み合わせは、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、及び子宮内膜癌からなる群から選択される癌の治療用である。

【0058】

一部の実施形態において、医薬製剤は、ニボルマブと組み合わせて投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、4週間毎に1回投与される。一部の実施形態において、ニボルマブは、医薬製剤の投与前に投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、ニボルマブの投与完了後1時間以内に投与される。一部の実施形態において、ニボルマブは、約480mgの用量で投与される。一部の実施形態において、ニボルマブは静脈内投与される。一部の実施形態において、組み合わせは、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、結腸直腸癌、肝細胞癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される癌の治療用である。一部の実施形態において、組み合わせは、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、結腸直腸癌、肝細胞癌、膀胱癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、及び前立腺癌からなる群から選択される癌の治療用である。一部の実施形態において、癌は黒色腫である。特定の実施形態において、黒色腫は切除不能又は転移性である。一部の実施形態において、癌は結腸直腸癌である。特定の実施形態において、結腸直腸癌は、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）又はミスマッチ修復機構欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌である。

【0059】

一部の実施形態において、医薬製剤は、3週間毎に1日目に対象に投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、4週間毎に1日目に対象に投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は皮下投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、約0.1mL～約1mLの容積で投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、約1mLの容積で投与される。一部の実施形態において、医薬製剤は、最大2ヵ所までの注射部位に投与される。特定の実施形態において、2回目の注射は、1回目の注射後10分以内に完了される。

【0060】

一部の実施形態において、医薬製剤は、約0.05mg/kg～約1.75mg/kgの用量で投与される。特定の実施形態において、医薬製剤は、約1mg/kgの用量で投

10

20

30

40

50

与される。一部の実施形態において、医薬製剤は投与前に 0.9%生理食塩水（注射用塩化ナトリウム）及び 0.01%ポリソルベート 80 の溶液中に希釈される。

【0061】

一部の実施形態において、癌の存在は、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（RECIIST）、第 1.1 版を使用して決定される。一部の実施形態において、完全奏効の確認が得られている対象は、打ち切り基準を満たさない限り、確認後少なくとも 12 ヶ月間にわたって医薬製剤で治療される。

【0062】

別の態様において、本明細書には、C 反応性タンパク質（CRP）の血中濃度がモニタされる対象を治療する方法であって、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を対象に投与することを含む方法が提供され、ここでヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、免疫グロブリン Fc（断片結晶化可能）対の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、IL-12 の p40 及び p35 サブユニットは、別々に、それぞれ第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域に連結されるか、又は第 2 の Fc 領域及び第 1 の Fc 領域に連結され、p40 及び p35 サブユニットは、各々が、Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結され、第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域の CH3 ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、対象の血中の CRP 濃度が閾値 CRP 濃度よりも高い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクがあると同定され；及び対象の血中の CRP 濃度が閾値 C 反応性タンパク質濃度とほぼ同じであるか、又はそれより低い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクはないと同定される。一部の実施形態において、対象の血中の CRP 濃度が閾値 CRP 濃度よりも高い場合、（1）医薬製剤の投与が中断されるか；（2）ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質が用量を下げて投与されるか；又は（3）対象における製剤の毒性効果を低減し又は緩和するための治療上の措置が講じられる。

【0063】

別の態様において、本明細書には、それを必要としている対象の癌を治療する方法であって、対象へのヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤の皮下投与を含む方法が提供され、ここでヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、免疫グロブリン Fc（断片結晶化可能）対の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、IL-12 の p40 及び p35 サブユニットは、別々に、それぞれ第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域に連結されるか、又は第 2 の Fc 領域及び第 1 の Fc 領域に連結され、p40 及び p35 サブユニットは、各々が、Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結され、第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域の CH3 ドメインは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含み；及び医薬製剤は、クエン酸塩；糖；糖アルコール；及び非イオン性界面活性剤を含み、及び製剤の pH は 5.5～7.0 である。

【0064】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域は、ヒト IgG1 Fc 領域である。一部の実施形態において、ヒト IgG1 Fc 領域は、Fc のエフェクター機能を低減する 1 つ以上の突然変異を含む。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域は、EU 番号付け方式に従い番号付けして、L234A、L235A 又は L235E、G237A、P329A、A330S、及び P331S から選択される 1 つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域は、各々が、突然変異 L234A、L235A、及び P329A を含む。

【0065】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の特定の実施形態において、IL12 の p40 サブユニットは配列番号 127 のアミノ酸配列を含み、IL-12 の p35 サブユ

10

20

30

40

50

ニットは配列番号 128 のアミノ酸配列を含む。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の特定の実施形態において、IL-12 の p35 サブユニットは、配列番号 108 のアミノ酸配列を含むリンカーによって第 2 の Fc 領域に融合される。一部の実施形態において、第 1 の Fc 領域は、突然変異 L234A、L235A、P329A、Y349C、K360E、及び K409W を含み、第 2 の Fc 領域は、突然変異 L234A、L235A、P329A、Q347R、S354C、D399V、及び F405T を含む。特定の実施形態において、第 1 の Fc 領域は配列番号 215 のアミノ酸配列を含み、第 2 の Fc 領域は配列番号 216 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、IL-12 の p40 サブユニットに連結された第 1 の Fc 領域は配列番号 290 のアミノ酸配列を含み、IL-12 の p35 サブユニットに連結された第 2 の Fc 領域は配列番号 291 のアミノ酸配列を含む。

10

【0066】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤は、(a) クエン酸塩；(b) 糖；(c) 糖アルコール；及び (d) 非イオン性界面活性剤を含み、更に製剤の pH は約 6.0 ～ 約 7.0 である。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のクエン酸塩の濃度は約 10 ～ 約 30 mM である。一部の実施形態において、医薬製剤中のクエン酸塩の濃度は約 20 mM である。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖の濃度は約 3% ～ 約 12% (w/v) である。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖の濃度は約 6% (w/v) である。一部の実施形態において、糖は二糖である。一部の実施形態において、二糖はスクロースである。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖アルコールの濃度は約 0.5% ～ 約 6% (w/v) である。一部の実施形態において、医薬製剤中の糖アルコールの濃度は約 1% (w/v) である。一部の実施形態において、糖アルコールは単糖に由来する。一部の実施形態において、糖アルコールはマンニトールである。

20

【0067】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中の非イオン性界面活性剤の濃度は約 0.005% ～ 約 0.02% (w/v) である。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のポリソルベート 80 の濃度は約 0.01% (w/v) である。一部の実施形態において、非イオン性界面活性剤はポリソルベートである。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、ポリソルベートはポリソルベート 80 である。一部の実施形態において、pH は約 6.1 ～ 約 6.9 である。一部の実施形態において、pH は約 6.2 ～ 約 6.8 である。一部の実施形態において、pH は約 6.3 ～ 約 6.7 である。一部の実施形態において、pH は約 6.4 ～ 約 6.6 である。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、pH は約 6.5 である。

30

【0068】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤は、水を更に含む。本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、水は、USP 注射用水である。

【0069】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤は、約 1 g/L ～ 約 10 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 2 g/L ～ 約 8 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 4 g/L ～ 約 6 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 5 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 0.5 g/L ～ 約 1.5 g/L の投与用濃度のタンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 0.75 g/L ～ 約 1.25 g/L の投与用濃度のタンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬製剤は、約 1 g/L の投与用濃度のタンパク質を含む。

40

50

【0070】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤は、 2°C ～ 8°C の温度で保存するように設計される。一部の実施形態において、医薬製剤は澄明な無色の溶液であり、目に見える粒子状物質を含まない。

【0071】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤は、示差走査型蛍光定量法により測定したとき、約 60°C より高い、約 61°C より高い、約 62°C より高い、約 63°C より高い、約 64°C より高い、約 65°C より高い、又は約 66°C より高い T_{m1} ；及び／又は約 70°C より高い、約 71°C より高い、約 72°C より高い、約 73°C より高い、約 74°C より高い、約 75°C より高い、約 76°C より高い、又は約 77°C より高い T_{m2} によって定義されるとおりの熱安定性プロファイルを有する。一部の実施形態において、製剤は、約 67.0°C の T_{m1} 及び約 77.3°C の T_{m2} によって定義されるとおりの熱安定性プロファイルを有する。

10

【0072】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、 T_{m1} 及び／又は T_{m2} によって定義されるとおりの、医薬製剤の熱安定性プロファイルは、医薬製剤を 50°C で1週間インキュベートしたとき、 5°C で1週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2°C 未満又は約 1°C 未満しか変化しない。一部の実施形態において、製剤は、示差走査型蛍光定量法により測定したとき、約 60°C より高い、約 61°C より高い、約 62°C より高い、約 63°C より高い、約 64°C より高い、約 65°C より高い、約 66°C より高い、又は約 67°C より高い T_{agg} によって定義されるとおりの熱安定性プロファイルを有する。一部の実施形態において、 T_{agg} によって定義されるとおりの、医薬製剤の熱安定性プロファイルは、医薬製剤を 50°C で1週間インキュベートしたとき、 5°C で1週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2°C 未満又は約 1°C 未満しか変化しない。

20

【0073】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤を 5°C で1週間インキュベートした後、医薬製剤の pH は、約 0.2 又は約 0.1 の pH 値より大きく変化しない。一部の実施形態において、医薬製剤を 50°C で1週間インキュベートした後、医薬製剤の pH は、約 0.2 又は約 0.1 の pH 値より大きく変化しない。

30

【0074】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、 25°C で動的光散乱法により測定したとき、約 15 nm 未満、約 14 nm 未満、約 13 nm 未満、又は約 12 nm 未満のZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約 11.6 nm のZ平均流体力学直径を有する。

【0075】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、医薬製剤を 50°C で2週間インキュベートした後、 25°C で動的光散乱法により測定したとき、約 20 nm 未満、約 19 nm 未満、約 18 nm 未満、約 17 nm 未満、約 16 nm 未満、又は約 15 nm 未満のZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約 14.4 nm のZ平均流体力学直径を有する。

40

【0076】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、 25°C で動的光散乱法により測定したとき、約 20 nm 未満、約 19 nm 未満、約 18 nm 未満、約 17 nm 未満、又は約 16 nm 未満のZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約 15.3 nm のZ

50

平均流体力学直径を有する。

【0077】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、又は約0.27未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.26である。

【0078】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、約0.27未満、又は約0.26未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.25である。

【0079】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.40未満、約0.35未満、又は約0.34未満である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.33である。

【0080】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、又は約99%超である。一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約99.0%である。一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、約75%超、約80%超、約81%超、約82%超、約83%超、約84%超、又は約85%超である。一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約85.2%である。

【0081】

本明細書に提供されるキット、使用、又は方法の一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、又は約98%超である。一部の実施形態において、ここで医薬製剤の純度プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約98.9%である。

【0082】

要約すれば、本発明は、多サブユニットタンパク質のヘテロ二量体Fc融合タンパク質コンストラクトを提供する。こうした融合タンパク質コンストラクトは、未変性／天然の多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期、生産時の収率の向上、保存時の安定性の亢進、及び／又は療法薬として使用したときの有効性の向上を呈し得る。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1-1】リンカーによって第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付いた多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと、別のリンカーによって第2の抗体Fcドメ

10

20

30

40

50

インポリペプチドに結び付いた多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとを含む例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の様々な特徴を図解し、ここでこれらのサブユニットは、2つのジスルフィド結合によって結び付いている。図1Aは、例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の種々の構成要素を示す一般的な概略図を示す。図1Bは、IL12サブユニットp40及びp35と、リンカーと、突然変異を有するFcドメインとを含む例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を示す。図1Cは、図1A又は図1Bのヘテロ二量体Fc融合タンパク質に存在し得る例示的突然変異を図解する概略図を示す。図1Dは、図1A、図1B、又は図1Cのヘテロ二量体Fc融合タンパク質に形成することのできる例示的ジスルフィド結合を図解する概略図を示す。

【図1-2】リンカーによって第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付いた多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと、別のリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付いた多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとを含む例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の様々な特徴を図解し、ここでこれらのサブユニットは、2つのジスルフィド結合によって結び付いている。図1Aは、例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の種々の構成要素を示す一般的な概略図を示す。図1Bは、IL12サブユニットp40及びp35と、リンカーと、突然変異を有するFcドメインとを含む例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を示す。図1Cは、図1A又は図1Bのヘテロ二量体Fc融合タンパク質に存在し得る例示的突然変異を図解する概略図を示す。図1Dは、図1A、図1B、又は図1Cのヘテロ二量体Fc融合タンパク質に形成することのできる例示的ジスルフィド結合を図解する概略図を示す。

【図2-1】CT26腫瘍細胞を接種し、組換えマウスIL-12 (rmIL-12) (図2A)、DF-mIL-12-Fc wt (図2B)、DF-mIL-12-Fc si (図2C)、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図2-2】CT26腫瘍細胞を接種し、組換えマウスIL-12 (rmIL-12) (図2A)、DF-mIL-12-Fc wt (図2B)、DF-mIL-12-Fc si (図2C)、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図3】CT26腫瘍細胞を接種し、rmIL-12、DF-mIL-12-Fc wt、DF-mIL-12-Fc si、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療したマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【図4-1】CT26腫瘍細胞を接種し、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4A)、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4B)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4C)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4D)、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図4-2】CT26腫瘍細胞を接種し、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4A)、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4B)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4C)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4D)、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図4-3】CT26腫瘍細胞を接種し、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4A)、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4B)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc wt (図4C)、0.1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL-12-Fc si (図4D)、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図5】CT26腫瘍細胞を接種し、1 µg rmIL-12とモル当量のDF-mIL

−12−Fc wt、1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療したマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。
 【図6−1】B16F10黒色腫細胞を接種し、rmIL−12（図6A）、DF−mIL−12−Fc wt（図6B）、DF−mIL−12−Fc si（図6C）、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図6−2】B16F10黒色腫細胞を接種し、rmIL−12（図6A）、DF−mIL−12−Fc wt（図6B）、DF−mIL−12−Fc si（図6C）、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

10

【図7】B16F10黒色腫細胞を接種し、rmIL−12、DF−mIL−12−Fc wt、DF−mIL−12−Fc si、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療したマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【図8−1】B16F10黒色腫細胞を接種し、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt（図8A）、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si（図8B）、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt（図8C）、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si（図8D）、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

20

【図8−2】B16F10黒色腫細胞を接種し、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt（図8A）、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si（図8B）、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt（図8C）、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si（図8D）、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図9】B16F10黒色腫細胞を接種し、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt、0.5 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc wt、0.1 μg rmIL−12とモル当量のDF−mIL−12−Fc si、又はmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療したマウスのカプラン・マイヤー生存曲線を示すグラフである。

30

【図10−1】HEK−Blue IL−12レポーターアッセイを使用した、DF−hIL−12−Fc si（DF IL−12−Fc）又は組換えヒトIL−12（rhIL−12）による治療に対するIL−12応答を示すグラフである。

【図10−2】DF−hIL−12−Fc si（DF IL−12−Fc）及びrhIL−12による治療に応答した末梢血単核球（PBMC）によるIFNγ産生を示すグラフである。

【図11】10 μg/kgの等モル量のDF−hIL−12−Fc si又は野生型rhIL−12の単回静脈内投与後のカニクイザルK2 EDTA血漿中におけるDF−hIL−12−Fc si、rhIL−12、及びIFNγの相対血漿濃度を示すグラフである。

40

【図12−1】図12A〜図12Bは、ナイーブBalb/cマウスにおけるrmIL−12（図12A）及びDF−mIL−12−Fc si（図12B）のPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Aは、ナイーブBalb/cマウスにおけるrmIL−12のPK/PDプロファイルを示し、図12Bは、ナイーブBalb/cマウスIL−12におけるDF−mIL−12−Fc siのPK/PDプロファイルを示す。血清中のIL−12及びIFNγレベルはELISAにより分析した。図12Cは、ナイーブBalb/cマウスにおける静脈内投与したDF−mIL−12−Fc siのPK/P

50

Dプロファイルを示すグラフである。図12Dは、ナীবBa lb/cマウスにおける腹腔内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Eは、ナীবBa lb/cマウスにおける皮下投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。平均血清レベルは平均値±SEMを表す。

【図12-2】図12A~図12Bは、ナীবBa lb/cマウスにおけるrmIL-12（図12A）及びDF-mIL-12-Fc si（図12B）のPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Aは、ナীবBa lb/cマウスにおけるrmIL-12のPK/PDプロファイルを示し、図12Bは、ナীবBa lb/cマウスIL-12におけるDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示す。血清中のIL-12及びIFN γ レベルはELISAにより分析した。図12Cは、ナীবBa lb/cマウスにおける静脈内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Dは、ナীবBa lb/cマウスにおける腹腔内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Eは、ナীবBa lb/cマウスにおける皮下投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。平均血清レベルは平均値±SEMを表す。

【図12-3】図12A~図12Bは、ナীবBa lb/cマウスにおけるrmIL-12（図12A）及びDF-mIL-12-Fc si（図12B）のPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Aは、ナীবBa lb/cマウスにおけるrmIL-12のPK/PDプロファイルを示し、図12Bは、ナীবBa lb/cマウスIL-12におけるDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示す。血清中のIL-12及びIFN γ レベルはELISAにより分析した。図12Cは、ナীবBa lb/cマウスにおける静脈内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Dは、ナীবBa lb/cマウスにおける腹腔内投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。図12Eは、ナীবBa lb/cマウスにおける皮下投与したDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイルを示すグラフである。平均血清レベルは平均値±SEMを表す。

【図13-1】DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。0.5 μ g アイソタイプ対照又は0.5 μ g DF-mIL-12-Fc si（図13A）、アイソタイプ対照又は抗PD-1（図13B）、及びアイソタイプ対照又はDF-mIL-12-Fc si/抗PD-1（図13C）によってマウスを腹腔内治療した。上記に指摘したとおり、動物にDF-mIL-12-Fc siを週1回及び抗PD-1を毎週2回注射した。腫瘍成長は60日間評価した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長曲線を示す。

【図13-2】DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。0.5 μ g アイソタイプ対照又は0.5 μ g DF-mIL-12-Fc si（図13A）、アイソタイプ対照又は抗PD-1（図13B）、及びアイソタイプ対照又はDF-mIL-12-Fc si/抗PD-1（図13C）によってマウスを腹腔内治療した。上記に指摘したとおり、動物にDF-mIL-12-Fc siを週1回及び抗PD-1を毎週2回注射した。腫瘍成長は60日間評価した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長曲線を示す。

【図14】DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの生存率及び体重を示すグラフである。アイソタイプ、DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1又はDF-mIL-12-Fc siと抗PD-1との組み合わせによってマウスを治療した。動物に0.5 μ g DF-mIL-12-Fc siを週1回及び200 μ g抗PD-1又はアイソタイプを毎週2回注射した。図14Aはカプラン・マイヤー生存曲線を示す。図14Bは、マウスの体重を平均値±標準偏差として示す。

10

20

30

40

50

【図15-1】DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99 Tr iNK ET、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。150 μ gアイソタイプ対照又は0.5 μ g DF-mIL-12-Fc si（図15A）、アイソタイプ対照又は150 μ g Tr iNK ET（図15B）、及びアイソタイプ対照又はDF-mIL-12-Fc si/Tr iNK ET（図15C）によってマウスを腹腔内治療した。上記に指摘したとおり、動物にDF-mIL-12-Fc siを週1回及びTr iNK ETを毎週3回注射した。腫瘍成長は72日間評価した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長曲線を示す。

【図15-2】DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99 Tr iNK ET、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。150 μ gアイソタイプ対照又は0.5 μ g DF-mIL-12-Fc si（図15A）、アイソタイプ対照又は150 μ g Tr iNK ET（図15B）、及びアイソタイプ対照又はDF-mIL-12-Fc si/Tr iNK ET（図15C）によってマウスを腹腔内治療した。上記に指摘したとおり、動物にDF-mIL-12-Fc siを週1回及びTr iNK ETを毎週3回注射した。腫瘍成長は72日間評価した。グラフは、個々のマウスの腫瘍成長曲線を示す。

10

【図16】DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99 Tr iNK ET、又はこれらの組み合わせで治療したB16F10腫瘍担持マウスの生存率及び体重を示すグラフである。アイソタイプ、DF-mIL-12-Fc si、Tr iNK ET、又はDF-mIL-12-Fc siとTr iNK ETとの組み合わせによってマウスを治療した。動物に0.5 μ g DF-mIL-12-Fc siを週1回及び150 μ g Tr iNK ET又はアイソタイプを毎週3回注射した。図16Aはカプラン・マイヤー生存曲線を示す。図16Bは、マウスの体重を平均+標準偏差として示す。

20

【図17】DF-mIL-12-Fc si/Tr iNK ET組み合わせ療法（n=3）で治療し、 2×10^5 個のB16F10黒色腫細胞を移植することによって再チャレンジした図15のB16F10腫瘍モデル実験からの完全奏効例（CR）マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図18-1】CT26腫瘍細胞を接種し、単回用量のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

30

【図18-2】CT26腫瘍細胞を接種し、毎週用量のDF-mIL-12-Fc si、mIgG2aアイソタイプ、又はrmIL-12を投与したマウスの体重±標準偏差を示すグラフである。

【図18-3】ナイーブであるか、又は過去にCT26腫瘍モデルにおいて単回用量のDF-mIL-12-Fc siを投与したとき完全奏効例（CR）であったかのいずれかの、再チャレンジした個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図19】CT26腫瘍細胞を接種し、毎週用量のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを腹腔内（IP）（図19A）又は皮下（SC）（図19B）のいずれかに投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図20】B16F10黒色腫細胞を接種し、単回用量のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

40

【図21】B16F10黒色腫細胞を接種し、毎週用量のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを腹腔内（IP）（図21A）又は皮下（SC）（図21B）のいずれかに投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図22】CT26腫瘍細胞を接種し、1 μ gのrmIL-12とモル当量の単回用量（図22A）又は毎週1回用量（図22B）のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを腹腔内に投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図23】CT26腫瘍細胞を接種し、毎週1回用量のDF-mIL-12-Fc siを皮下に投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図23Aは、CT2

50

6-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照又は1 μ g DF-mIL-12-Fc siのいずれかで（毎週）1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図23Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照又は2 μ g DF-mIL-12-Fc siのいずれかで（毎週）1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図24-1】B16F10腫瘍を担持するC57BL/6マウスにおけるDF-mIL-12-Fc siの単回投与後72時間の血液（左）及び腫瘍（右）試料中のIFN γ （図24A）、CXCL9（図24B）、及びCXCL10（図24C）レベルを示すグラフである。

【図24-2】B16F10腫瘍を担持するC57BL/6マウスにおけるDF-mIL-12-Fc siの単回投与後72時間の血液（左）及び腫瘍（右）試料中のIFN γ （図24A）、CXCL9（図24B）、及びCXCL10（図24C）レベルを示すグラフである。

【図25-1】1 μ g/kg（図25A）、2 μ g/kg（図25B）、又は4 μ g/kg（図25C）の単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるDF-hIL-12-Fc siの薬物動態を示す折れ線グラフである。2240、2241、2740、2741（図25A）；3240、3241、3740、3741（図25B）；4240、4241、4740、4741（図25C）は、個々のカニクイザル対象を表す。

【図25-2】1 μ g/kg（図25A）、2 μ g/kg（図25B）、又は4 μ g/kg（図25C）の単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるDF-hIL-12-Fc siの薬物動態を示す折れ線グラフである。2240、2241、2740、2741（図25A）；3240、3241、3740、3741（図25B）；4240、4241、4740、4741（図25C）は、個々のカニクイザル対象を表す。

【図26-1】単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 及びIP10/CXCL10の濃度を示す折れ線グラフである。図26A、図26C及び図26Eは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 濃度/発現レベルを示す。図26B、図26D及び図26Fは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIP10/CXCL10濃度/発現レベルを示す。1240、1740、2240、2241、2740、2741（図26A～図26B）；1240、1740、3240、3241、3740、3741（図26C、図26D、図26F）；1240、1740、4240、4241、4740、4741（図26E）は、個々のカニクイザル対象を表す。

【図26-2】単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 及びIP10/CXCL10の濃度を示す折れ線グラフである。図26A、図26C及び図26Eは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 濃度/発現レベルを示す。図26B、図26D及び図26Fは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIP10/CXCL10濃度/発現レベルを示す。1240、1740、2240、2241、2740、2741（図26A～図26B）；1240、1740、3240、3241、3740、3741（図26C、図26D、図26F）；1240、1740、4240、4241、4740、4741（図26E）は、個々のカニクイザル対象を表す。

【図26-3】単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 及びIP10/CXCL10の濃度を示す折れ線グラフである。図26A、図26C及び図26Eは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kg

gのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ 濃度／発現レベルを示す。図26B、図26D及び図26Fは、それぞれ、1 μ g/kg、2 μ g/kg、及び4 μ g/kgのDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIP10/CXCL10濃度／発現レベルを示す。1240、1740、2240、2241、2740、2741（図26A～図26B）；1240、1740、3240、3241、3740、3741（図26C、図26D、図26F）；1240、1740、4240、4241、4740、4741（図26E）は、個々のカニクイザル対象を表す。

【図27】乳癌細胞を接種し、毎週用量の単独療法（アイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc si、Doxil（登録商標）（化学療法）、又は10Gyでの照射）又は組み合わせ療法（Doxil（登録商標）又は放射線との組み合わせでのDF-mIL-12-Fc si）を投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

10

【図28-1】図28Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は抗PD-1抗体のいずれかで（隔週で）治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図28BはCT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は1 μ gのDF-mIL-12-Fc siの毎週の治療に加えた抗PD-1抗体のいずれかで（隔週で）治療したBalb/cマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図28-2】図28Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は抗PD-1抗体のいずれかで（隔週で）治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図28BはCT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は1 μ gのDF-mIL-12-Fc siの毎週の治療に加えた抗PD-1抗体のいずれかで（隔週で）治療したBalb/cマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

20

【図29】図29Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又はDF-mIL-12-Fc siのいずれかで（毎週）1回腫瘍内治療した個々のマウスにおける治療済み（Tr）腫瘍の腫瘍成長曲線を示すグラフである。図29Bは、図29Aに記載される個々のマウスの未治療（NT）CT26-Tyrp1腫瘍の腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【図30】図30Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照又は2 μ g DF-mIL-12-Fc siのいずれかで1回治療した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図30Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、2 μ g mIgG2aアイソタイプ対照、1 μ g DF-mIL-12-Fc si（毎週投与）、2 μ g DF-mIL-12-Fc si（毎週投与）、又は2 μ g DF-mIL-12-Fc si（1回）で治療した個々のマウスの平均腫瘍成長曲線を示すグラフである。

30

【図31-1】図31Aは、L234A、L235A、及びP329A突然変異（LALA PA）、又はL234A、L235A、及びP329G突然変異（LALAPG）を有するDF-hIL-12-Fc-siで処理したPBMCのPHA刺激後のIFN γ 産生を示すグラフである。図31Bは、LALAPA突然変異、又はLALAPG突然変異を有するDF-hIL-12-Fc-siの存在下又は非存在下における、フルオロフォアをコンジュゲートしたhIgG1によるTHP-1細胞への結合のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。

40

【図31-2】図31Aは、L234A、L235A、及びP329A突然変異（LALAPA）、又はL234A、L235A、及びP329G突然変異（LALAPG）を有するDF-hIL-12-Fc-siで処理したPBMCのPHA刺激後のIFN γ 産生を示すグラフである。図31Bは、LALAPA突然変異、又はLALAPG突然変異を有するDF-hIL-12-Fc-siの存在下又は非存在下における、フルオロフォアをコンジュゲートしたhIgG1によるTHP-1細胞への結合のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。

【図32】DF-hIL-12-Fc siの調製ステップを示す工程フロー図である。

【図33】DF-hIL-12-Fc siを含有する医薬製剤の調製ステップを示す工

50

程フロー図である。

【図34】図34Aは、異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの紫外・可視分光法(UV-Vis)計算濃度を示すグラフである。図34Bは、DF-IL-12-Fc siを含有する様々な医薬製剤のpHを示すグラフである。

【図35】DF-hIL-12-Fc siを含有する特定の医薬製剤を5℃(図35A)及び50℃(図35B)で1週間インキュベートした後の様々な製剤の外観の写真である。

【図36-1】5℃で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの平均 T_{m1} (図36A)及び T_{m2} (図36B)を示すグラフである。

10

【図36-2】50℃で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの平均 T_{m1} (図36C)及び T_{m2} (図36D)を示すグラフである。

【図36-3】5℃(図36E~図36F)及び50℃(図36G~図36H)で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの代表的な示差走査型蛍光定量法(DSF)融解曲線を示すグラフである。

【図36-4】5℃(図36E~図36F)及び50℃(図36G~図36H)で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの代表的な示差走査型蛍光定量法(DSF)融解曲線を示すグラフである。

20

【図37-1】5℃(図37A)及び50℃(図37B)で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの平均 T_{agg} を示すグラフである。

【図37-2】5℃(図37C~図37D)及び50℃(図37E~図37F)で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの代表的なDSF凝集曲線を示すグラフである。

【図37-3】5℃(図37C~図37D)及び50℃(図37E~図37F)で1週間インキュベートした後の様々な医薬製剤におけるDF-hIL-12-Fc siの代表的なDSF凝集曲線を示すグラフである。

【図38】5℃(図38A)及び50℃(図38B)で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siのUV-Vis計算濃度を示すグラフである。

30

【図39】5℃(図39A)及び50℃(図39B)で1週間インキュベートした後のDF-hIL-12-Fc siを含有する様々な医薬製剤のpHを示すグラフである。

【図40-1】5℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siのZ平均流体力学直径(図40A)及び多分散性指数(図40B)を示すグラフである。図40C~図40Dは、5℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの平均モノマー径及び平均モノマー率%Pdを示すグラフである。

【図40-2】5℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siのZ平均流体力学直径(図40A)及び多分散性指数(図40B)を示すグラフである。図40C~図40Dは、5℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの平均モノマー径及び平均モノマー率%Pdを示すグラフである。

40

【図40-3】図40E~図40Fは、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siのZ平均流体力学直径(図40E)及び多分散性指数(図40F)を示すグラフである。図40G~図40Hは、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの平均モノマー径(図40G)及び平均モノマー率%Pd(図40H)を示すグラフである。

50

【図40-4】図40E～図40Fは、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siのZ平均流体力学直径（図40E）及び多分散性指数（図40F）を示すグラフである。図40G～図40Hは、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの平均モノマー径（図40G）及び平均モノマー率%Pd（図40H）を示すグラフである。

【図40-5】図40I～40Jは、図40A～図40Dに記載されるデータの計算に使用した代表的な動的光散乱法（DLS）トレースを示す。図40K～図40Lは、図40E～図40Hに記載されるデータの計算に使用した代表的なDLSトレースを示す。

【図40-6】図40I～40Jは、図40A～図40Dに記載されるデータの計算に使用した代表的な動的光散乱法（DLS）トレースを示す。図40K～図40Lは、図40E～図40Hに記載されるデータの計算に使用した代表的なDLSトレースを示す。

【図41】サイズ排除クロマトグラフィー・高速液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）により測定したときの、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの%純度を示すグラフである。

【図42】キャピラリー電気泳動・ドデシル硫酸ナトリウム（CE-SDS）により測定したときの、50℃で1週間インキュベートした後の異なる緩衝液を含有する様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc siの%純度を示すグラフである。

【図43】図43Aは、異なる緩衝液及び賦形剤を含有する様々な医薬製剤中における1mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siのUV-Vis計算濃度を示すグラフである。図43Aを参照すると、1が緩衝液交換を表し；2が2～8℃を表し；3が50℃を表し；及び4が凍結／融解を表す。図43Bは、異なる緩衝液及び賦形剤を含有する様々な医薬製剤中10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siのUV-Vis計算濃度を示すグラフである。図43Bを参照すると：1が緩衝液交換を表し；2が2～8℃を表し；3が50℃を表し；及び4が凍結／融解を表す。

【図44-1】様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siの平均 T_{m1} （図44A及び図44B）及び T_{m2} （図44C及び図44D）を示すグラフである。

【図44-2】様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siの平均 T_{m1} （図44A及び図44B）及び T_{m2} （図44C及び図44D）を示すグラフである。

【図44-3】様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siの平均 T_{m1} （図44A及び図44B）及び T_{m2} （図44C及び図44D）を示すグラフである。

【図45-1】様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc-siの代表的なDSF融解曲線を示す。

【図45-2】様々な医薬製剤中のDF-hIL-12-Fc-siの代表的なDSF融解曲線を示す。

【図46-1】様々な医薬製剤中における1mg/mL（図46A）及び10mg/mL（図46B）のDF-hIL-12-Fc-siの平均 T_{agg} を示すグラフである。

【図46-2】様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siの代表的なDSF凝集曲線である。

【図46-3】様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siの代表的なDSF凝集曲線である。

【図47-1】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siのサイズ分布を示す代表的なDLSトレースを示す。

【図47-2】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF-hIL-12-Fc-siのサイズ分布を示す代表的なDLSトレースを示す。

10

20

30

40

50

【図48-1】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siのZ平均径（図48A～図48B）、多分散性指数（PDI）（図48C～図48D）、モノマー径（48E-48F）、及びモノマー%Pd（図48G～図48H）を示す。図48A～図48Hでは、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

【図48-2】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siのZ平均径（図48A～図48B）、多分散性指数（PDI）（図48C～図48D）、モノマー径（48E-48F）、及びモノマー%Pd（図48G～図48H）を示す。図48A～図48Hでは、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

10

【図48-3】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siのZ平均径（図48A～図48B）、多分散性指数（PDI）（図48C～図48D）、モノマー径（48E-48F）、及びモノマー%Pd（図48G～図48H）を示す。図48A～図48Hでは、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

【図48-4】異なるストレス条件に供された様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siのZ平均径（図48A～図48B）、多分散性指数（PDI）（図48C～図48D）、モノマー径（48E-48F）、及びモノマー%Pd（図48G～図48H）を示す。図48A～図48Hでは、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

20

【図49-1】異なるストレス条件に供した様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siの純度を示すグラフである。図49A～図49Bは、50℃でインキュベートした後の%Mainピークを示す。図49C～図49Dは、2～8℃でインキュベートした後又は凍結融解サイクル後の%Mainピークを示す。図49C～図49Dを参照すると、1が2～8℃を表し、及び2が凍結融解を表す。

【図49-2】異なるストレス条件に供した様々な医薬製剤中における1mg/mL及び10mg/mLのDF hIL-12-Fc-siの純度を示すグラフである。図49A～図49Bは、50℃でインキュベートした後の%Mainピークを示す。図49C～図49Dは、2～8℃でインキュベートした後又は凍結融解サイクル後の%Mainピークを示す。図49C～図49Dを参照すると、1が2～8℃を表し、及び2が凍結融解を表す。

30

【図50-1】高精度液体粒子（HIA）分析により測定したときの、異なるストレス条件に供したDF hIL-12-Fc-siを含有する様々な医薬製剤中における粒径別の粒子カウントを示すグラフである。図50A～図50Bは $\geq 2\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50C～図50Dは $\geq 5\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50E～図50Fは $\geq 10\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、及び図50G～図50Hは $\geq 25\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示す。図50A～図50Hを参照すると、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

【図50-2】高精度液体粒子（HIA）分析により測定したときの、異なるストレス条件に供したDF hIL-12-Fc-siを含有する様々な医薬製剤中における粒径別の粒子カウントを示すグラフである。図50A～図50Bは $\geq 2\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50C～図50Dは $\geq 5\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50E～図50Fは $\geq 10\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、及び図50G～図50Hは $\geq 25\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示す。図50A～図50Hを参照すると、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

40

【図50-3】高精度液体粒子（HIA）分析により測定したときの、異なるストレス条件に供したDF hIL-12-Fc-siを含有する様々な医薬製剤中における粒径別の粒子カウントを示すグラフである。図50A～図50Bは $\geq 2\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50C～図50Dは $\geq 5\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図50E～図50Fは $\geq 10\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、及び図50G～図50Hは $\geq 25\mu\text{m}$ 粒子のカウントを示す。図50A～図50Hを参照すると、1が2～8℃を表し、2が50℃を表し、及び3が凍結融解を表す。

50

0 μm 粒子のカウントを示し、及び図 50 G ~ 図 50 H は $\geq 25 \mu\text{m}$ 粒子のカウントを示す。図 50 A ~ 図 50 H を参照すると、1 が 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ を表し、2 が 50 $^{\circ}\text{C}$ を表し、及び 3 が凍結融解を表す。

【図 50 - 4】高精度液体粒子 (H I A C) 分析により測定したときの、異なるストレス条件に供した D F h I L - 1 2 - F c - s i を含有する様々な医薬製剤中における粒径別の粒子カウントを示すグラフである。図 50 A ~ 図 50 B は $\geq 2 \mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図 50 C ~ 図 50 D は $\geq 5 \mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、図 50 E ~ 図 50 F は $\geq 10 \mu\text{m}$ 粒子のカウントを示し、及び図 50 G ~ 図 50 H は $\geq 25 \mu\text{m}$ 粒子のカウントを示す。図 50 A ~ 図 50 H を参照すると、1 が 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ を表し、2 が 50 $^{\circ}\text{C}$ を表し、及び 3 が凍結融解を表す。

【図 51】D F h I L - 1 2 - F c - s i が単独療法として (図 51 A) 及びペンブロリズマブとの組み合わせ療法で (図 51 B) 使用されることになる第 1 相及び第 2 相の試験デザインを示す概略図である。

【図 52】D F h I L - 1 2 - F c - s i が単独療法として (図 52 A) 及びニボルマブとの組み合わせ療法で (図 52 B) 使用されることになる第 1 相及び第 2 相の試験デザインを示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0084】

本発明は、ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質、かかるタンパク質を含む医薬製剤、並びに癌の治療のための方法を含めた、かかるタンパク質及び医薬製剤を使用した治療法の改良を提供する。

【0085】

本発明の理解を助けるため、以下に多くの用語及び語句を定義する。

【0086】

用語「ある (a)」及び「ある (an)」は、本明細書で使用されるとき、「1 つ以上」を意味し、文脈上不適切でない限り、複数形を含む。

【0087】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」及び「患者」は、本明細書に記載される方法及び組成物によって治療されることになる生物を指す。かかる生物には、好ましくは、限定はされないが、哺乳類 (例えば、マウス、サル、ウマ科動物、ウシ亜科動物、ブタ、イヌ科動物、ネコ科動物など) が含まれ、より好ましくはヒトが含まれる。

【0088】

本明細書で使用されるとき、用語「有効量」は、有益な又は所望の結果 (例えば、所望の予防的又は治療的効果) を生じさせるのに十分な化合物 (例えば、本発明の化合物) の量を指す。有効量は、1 回以上の投与、適用又は投薬量で投与することができ、詳細な製剤又は投与経路に限定されることは意図されない。本明細書で使用されるとき、用語「治療すること」には、病態、疾患、障害などの改善をもたらす任意の効果、例えば、軽減、低減、調節、軽快若しくは除去、又はその症状の軽快が含まれる。

【0089】

本明細書で使用されるとき、用語「医薬製剤」は、活性薬剤と、組成物をインビボ又はエキソビボでの診断又は治療使用に特に好適なものにする不活性又は活性な担体との組み合わせを指す。

【0090】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容可能な担体」は、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルション (例えば、油 / 水又は水 / 油エマルションなど)、及び各種の湿潤剤など、標準的な医薬担体のいずれかを指す。組成物はまた、安定剤及び保存剤も含むことができる。担体、安定剤及び補助剤の例については、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975] を参照のこと。

【0091】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容可能な塩」は、対象への投与時に、本発明の化合物又はその活性代謝産物若しくは残渣を提供する能力のある本発明の化合物の任意の薬学的に許容可能な塩（例えば、酸又は塩基）を指す。当業者には公知のとおり、本発明の化合物の「塩」は、無機又は有機酸及び塩基に由来し得る。例示的酸としては、限定はされないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン2スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが挙げられる。本発明の化合物及びその薬学的に許容可能な酸付加塩を入手する際の間体として有用な塩の調製においては、シュウ酸など、それ自体は薬学的に許容可能でないにしろ、他の酸が利用されてもよい。

10

【0092】

例示的塩基としては、限定はされないが、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）水酸化物、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）水酸化物、アンモニア、及び式 NW_4^+ （式中、Wは $C_1 \sim 4$ アルキルである）の化合物などが挙げられる。

【0093】

例示的塩としては、限定はされないが、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩（*glucoheptanoate*）、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサノ酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パモン酸塩（*palmoate*）、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル化物、ウンデカン酸塩などが挙げられる。塩の他の例としては、 Na^+ 、 NH_4^+ 、及び NW_4^+ （式中、Wは $C_1 \sim 4$ アルキル基である）など、好適なカチオンと化合物化する本発明の化合物のアニオンが挙げられる。

20

【0094】

治療的使用には、本発明の化合物の塩は薬学的に許容可能であると企図される。しかしながら、薬学的に許容できない酸及び塩基の塩もまた、例えば、薬学的に許容可能な化合物の調製又は精製において、用途が見出され得る。

30

【0095】

本説明全体を通じて、組成物が特定の成分を有する、備える、又は含むと説明される場合、又は工程及び方法が特定のステップを有する、備える、又は含むと説明される場合、加えて、記載されている成分から本質的になる、又はそれからなる本発明の組成物があること、及び記載されている処理ステップから本質的になる、又はそれからなる本発明に係る工程及び方法があることが企図される。

【0096】

一般的な事項として、パーセンテージを指定する組成物は、特に指定されない限り重量基準である。更に、変数に定義が伴わない場合には、その変数の以前の定義が優先する。

40

【0097】

(a) タンパク質

本発明は、多サブユニットタンパク質のアミノ酸配列を含むFc融合タンパク質コンストラクトを提供する。これらの融合タンパク質コンストラクトは、未変性／天然の多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期、生産時の収率の向上、保存時の安定性の亢進、及び／又は療法薬として使用したときの有効性の向上を呈し得る。

【0098】

(i) IgG1 Fc融合タンパク質

一態様において、本発明は、第1の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドを含む第1のポリペプチドと、第1の抗体Fcドメインに結合した第2の抗体IgG1 Fcドメ

50

インポリペプチドを含む第2のポリペプチドとを含むヘテロ二量体IgG1Fc融合タンパク質を提供し、ここで第1のポリペプチドは、配列番号237又は配列番号6のアミノ酸配列を含むリンカーによって第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを更に含み；多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合され、及び多サブユニットタンパク質のこれらのサブユニットは互いに結合しており；配列番号237又は配列番号6のX₁がLを表し、及び／又は配列番号237又は配列番号6のX₂がLを表すとき、第1の抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドのうちの少なくとも一方は、ヘテロ二量体化を促進するためのQ347R突然変異を含む。

【0099】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号237又は配列番号6のアミノ酸配列からなる。

【0100】

特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、スペーサーペプチドを更に含む。特定の実施形態において、リンカーは、配列番号237又は配列番号6の配列と、スペーサーペプチドとを含む。

【0101】

特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号237又は配列番号6の配列と、スペーサーペプチドとを含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号237又は配列番号6のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーのアミノ酸配列は、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーのアミノ酸配列と同一である。

【0102】

見出し「スペーサーペプチド」の下に記載される任意のスペーサーペプチドを利用することができる。例えば、特定の実施形態において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120のいずれか1つに示されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、本明細書に開示されるスペーサーペプチドと、配列番号237又は配列番号6の配列を有するペプチドとからなるか、又はそれから本質的になる。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、本明細書に開示されるスペーサーペプチドと、配列番号237又は配列番号6の配列を有するペプチドとからなるか、又はそれから本質的になる。特定の実施形態において、

【0103】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号239又は配列番号9のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号239又は配列番号9のアミノ酸配列からなる。

【0104】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタン

10

20

30

40

50

パク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号239のアミノ酸配列を含む)。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、アミノ酸配列、配列番号239からなる。

【0105】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号10又は配列番号244のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号10又は配列番号244のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

10

【0106】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号10のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号10のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0107】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号238又は配列番号7のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合させるリンカーは、配列番号238又は配列番号7のアミノ酸配列からなる。

20

【0108】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号8又は配列番号241のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号8又は配列番号241のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

30

【0109】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号15又は配列番号242のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号15又は配列番号242のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0110】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号16又は配列番号243のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号16又は配列番号243のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

40

【0111】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号65又は配列番号245のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施

50

形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号65又は配列番号245のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0112】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号66又は配列番号246のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号66又は配列番号246のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

10

【0113】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号11又は配列番号240のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合させるリンカーは、配列番号11又は配列番号240のアミノ酸配列からなる。

【0114】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号12又は配列番号247のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号12又は配列番号247のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

20

【0115】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号67又は配列番号248のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号67又は配列番号248のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

30

【0116】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号68又は配列番号249のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号68又は配列番号249のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0117】

特定の実施形態において、Fcドメインポリペプチドは、IgG1 Fcのものである。一部の実施形態において、本発明のタンパク質は、第1の抗体Fcドメインポリペプチドと、第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含み、これらは両方とも、互いのヘテロ二量体化を促進する突然変異したIgG1 Fcドメインポリペプチドである。例えば、FcドメインがヒトIgG1のFcに由来する場合、Fcドメインは、ヒトIgG1抗体のアミノ酸234～332と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでもよく、Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、及びK439からなる群から選択される1つ以上の位置が異なり得る。

40

【0118】

50

一部の実施形態において、抗体定常ドメインは、ヒトIgG1抗体のアミノ酸234～332と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでもよく、Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D、及びK439Eからなる群から選択される1つ以上の置換が異なり得る。本明細書に開示されるFcドメイン又はヒンジ領域のアミノ酸位置は全て、EU付番に従い番号付けされる。

【0119】

一部の実施形態において、第1の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、K360E及びK409Wから選択される1つ以上の突然変異を含み、第2の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、Q347R、D399V、及びF405Tから選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、Q347R、D399V、及びF405Tから選択される1つ以上の突然変異を含み、第2の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、K360E及びK409Wから選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは突然変異K360E及びK409Wを含み、第2の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、突然変異Q347R、D399V、及びF405Tを含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは、突然変異Q347R、D399V、及びF405Tを含み、第2の抗体IgG1 Fcドメインポリペプチドは突然変異K360E及びK409Wを含む。

【0120】

一部の実施形態において、IgG1 Fcと本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドのFcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA、又はFcγRIIIB）又は補体成分（例えば、C1q）への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。かかる突然変異は、エフェクター機能を低減するのに有用である。例えば、本開示のタンパク質は、L234A及びL235A突然変異；L234A、L235A、及びP329A突然変異；L234A、L235A、及びP329G突然変異；又はL234A、L235E、G237A、A330S、及びP331S突然変異を含む。

【0121】

一部の実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々が突然変異P329G又はP329Aを含む第1の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドと第2の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドとを含む。具体的な実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々が突然変異P329Aを含む第1の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドと第2の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドとを含む。

【0122】

一部の実施形態において、第1のIgG1抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、A330S及びP331Sから選択される突然変異を持つ。一部の実施形態において、第1のIgG1抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、突然変異A330S及びP331Sを含有する。

【0123】

特定の実施形態において、IgG1 Fcモノマーの間に追加のジスルフィド結合が導

10

20

30

40

50

入され、これはヘテロ二量体の安定性を向上させる。例示的实施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットに融合した第1の抗体FcドメインポリペプチドがCH3ドメインにY349C置換を含み、これが、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットに融合した第2の抗体Fcドメインポリペプチド上にあるS354C置換とジスルフィド結合を形成する。或いは、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットに融合した第1の抗体FcドメインポリペプチドがCH3ドメインにS354C置換を含み、これが、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットに融合した第2の抗体Fcドメインポリペプチド上にあるY349C置換とジスルフィド結合を形成する。

【0124】

以下の表2に提供されるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドの任意のものを、以下の表1に提供されるIgG1ヒンジ配列の任意のもの（これは、本発明では、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットのタンパク質配列を第1のIgG1抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカー、又は追加のサブユニットを第2の異なるIgG1抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーの一部であるか、又はその全体である）と組み合わせて利用することができる。例示的IgG1ヒンジ-Fcドメインポリペプチドは、以下の表3に提供される。特定の実施形態において、Fc融合タンパク質の第1及び第2のポリペプチドは、それぞれ、配列番号212及び212；213及び214；215及び216；217及び218；214及び213；216及び215；又は218及び217のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、Fc融合タンパク質の第1及び第2のポリペプチドは、それぞれ、配列番号228及び228；229及び230；231及び232；233及び234；235及び236；230及び229；232及び231；234及び233；236及び235；228及び250；250及び228；250及び250；229及び252；252及び229；251及び230；230及び251；253及び232；232及び253；231及び254；254及び231；255及び234；234及び255；233及び256；256及び233；257及び236；236及び257；258及び235；又は235及び258のアミノ酸配列を含む。

【0125】

(ii) IgG4 Fc融合タンパク質

一態様において、本発明は、多サブユニットタンパク質の改良を提供する。一態様において、本発明は、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドを含む第1のポリペプチドと、第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結合した第2の異なる抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドを含む第2のポリペプチドとを含むヘテロ二量体IgG4 Fc融合タンパク質を提供し、ここで第1のポリペプチドは、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを更に含み；多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドに融合され、及び多サブユニットタンパク質のこれらのサブユニットは互いに結合しており；第1の抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する異なる突然変異を持つ。

【0126】

一部の实施形態において、ヘテロ二量体IgG4 Fc融合タンパク質内では、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号1のアミノ酸配列からなる。

【0127】

特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットのタンパク質配列を第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、スペーサーペプチドを更に含む。特定の実施形態において、リンカーは、配列番号1の配列とスペーサーペプチドとを含む。

【0128】

特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号1の配列と、スペーサーペプチドを含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号1のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーのアミノ酸配列は、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーのアミノ酸配列と同一である。

【0129】

見出し「スペーサーペプチド」の下に記載される任意のスペーサーペプチドを利用することができる。例えば、特定の実施形態において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、スペーサーペプチドは、配列番号107～120のいずれか1つに示されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態において、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、本明細書に開示されるスペーサーペプチドと配列番号1とからなるか、又はそれから本質的になる。特定の実施形態において、リンカーは、本明細書に開示されるスペーサーペプチドと配列番号1とからなるか、又はそれから本質的になる。特定の実施形態において、スペーサーペプチドは、第1のリンカー及び／又は第2のリンカーのN末端側にある。

【0130】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合させるリンカーは、配列番号2のアミノ酸配列からなる。

【0131】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号3のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号3のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0132】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号13のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号13のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0133】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号14のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号14のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0134】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質内で、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合させるリンカーは、配列番号4のアミノ酸配列からなる。

【0135】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号5のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号5のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0136】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号63のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号63のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

10

【0137】

一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号64のアミノ酸配列を含むリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、配列番号64のアミノ酸配列からなるリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0138】

特定の実施形態において、Fcドメインポリペプチドは、IgG4 Fcのものである。IgG4は、Fabアーム交換を起こして体内の他のIgG4抗体と対合し得る不安定な二量体である。特定の実施形態において、ヒンジ（これは、本発明では、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1のIgG4抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカー、又は追加のサブユニットを第2の異なるIgG4抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーの一部であるか、又はその全体である）の範囲内にS228P突然変異が導入され、これは、ヒンジ領域の安定性を増加させて、Fabアーム交換が起こる可能性を低減する。特定の実施形態において、Fcドメインポリペプチドモノマーの間に追加のジスルフィド結合が導入され、これは、ヘテロ二量体の安定性を向上させる。例示的実施形態において、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットに連結した第1の抗体Fcドメインポリペプチドは、CH3ドメインにY349C置換を含み、これは、第2の抗体Fcドメインポリペプチドに連結した多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットに連結した第2の抗体Fcドメインポリペプチド上にあるS354C置換とジスルフィド結合を形成する。或いは、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットに連結した第1の抗体Fcドメインポリペプチドは、CH3ドメインにS354C置換を含み、これは、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットに連結した第2の抗体Fcドメインポリペプチド上にあるY349C置換とジスルフィド結合を形成する。

20

30

【0139】

一部の実施形態において、本発明のタンパク質は、第1の抗体Fcドメインポリペプチドと、第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含み、これらは両方とも、互いのヘテロ二量体化を促進する突然変異したIgG4 Fcドメインポリペプチドである。

40

【0140】

一部の実施形態において、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、K360E、K370E、及びR409Wから選択される1つ以上の突然変異を含み、第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、E357N、Q347R、D399V、及びF405Tから選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異K370E及びR409Wを含み、第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異E357N、D399V、及びF405Tを含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異E357N、D399V、及びF405Tを含み、第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異K370E及びR409Wを含む。一

50

部の実施形態において、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異K360E及びR409Wを含み、第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異Q347R、D399V、及びF405Tを含む。一部の実施形態において、第1の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異Q347R、D399V、及びF405Tを含み、第2の抗体IgG4 Fcドメインポリペプチドは、突然変異K360E及びR409Wを含む。

【0141】

一部の実施形態において、IgG4 Fcと本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドにおけるFcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA、又はFcγRIIIB）又は補体成分（例えば、C1q）への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。かかる突然変異は、エフェクター機能を低減するのに有用である。例えば、本開示のタンパク質は、S228P及びL235E突然変異；S228P、L235E、及びP329A突然変異；又はS228P、L235E、及びP329G突然変異を含む。

【0142】

表2に提供されるIgG4抗体Fcドメインポリペプチドの任意のものを、表1に提供されるIgG4ヒンジ配列の任意のもの（これは、本発明では、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1のIgG4抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカー、又は多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の異なるIgG4抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けているリンカーの一部であるか、又はその全体である）と組み合わせて利用することができる。例示的IgG4ヒンジ-Fcドメインポリペプチドは、表3に提供される。特定の実施形態において、Fc融合タンパク質の第1及び第2のポリペプチドは、それぞれ、配列番号205及び205；206及び207；208及び209；210及び211；207及び206；209及び208；又は211及び210のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、Fc融合タンパク質の第1及び第2のポリペプチドは、それぞれ、配列番号219及び219；220及び221；222及び223；224及び225；226及び227；221及び220；223及び222；225及び224；又は227及び226のアミノ酸配列を含む。

【0143】

（b）ジスルフィド結合

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとの間に天然のヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、IL-12のp35とp40とのサブユニット間に天然のヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。かかるタンパク質は、p35のC74とp40のC177との間に天然のジスルフィド結合を含む。

【0144】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとの間に人工的な又はエンジニアリングされたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、IL-12のp35とp40とのサブユニット間に人工的な又はエンジニアリングされたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。かかるタンパク質は、p35のV185Cとp40のY292Cとの間に人工的な又はエンジニアリングされたジスルフィド結合を含む。

【0145】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとの間に天然のヘテロ二量体ジスルフィド結合を含み、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとの間に人工的な又はエンジニアリングされたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。例えば、例示的実施形態において

、I L-12のp35とp40とのサブユニット間の天然のヘテロ二量体ジスルフィド結合、及びI L-12のp35とp40とのサブユニット間に人工的な又はエンジニアリングされたヘテロ二量体ジスルフィド結合を含む。かかるタンパク質は、p35のC74とp40のC177との間に天然のジスルフィド結合を含み、p35のV185Cとp40のY292Cとの間に人工的な又はエンジニアリングされたジスルフィド結合を含む。

【0146】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、天然のジスルフィド結合を取り除き、それを非天然の人工的な又はエンジニアリングされたジスルフィド結合に置き換えるようにエンジニアリングされる。例えば、例示的实施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、天然のC74がセリンに突然変異しているI L-12のp35と、天然のC177がセリンに突然変異しているI L-12のp40とを含み、そのためI L-12のp35とp40とのサブユニット間の天然のジスルフィド結合が取り除かれる。この突然変異I L-12には、2つの新規の突然変異、p35上のV185C及びp40上のY292Cが導入され、そのため非天然の人工的な又はエンジニアリングされたジスルフィド結合が導入される。

【0147】

(c) Fc融合ポリペプチドの成分の配列

本発明の例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、以下の表1～表2に記載されるIgG1又はIgG4 Fc変異体配列のいずれか1つ及び対応するリンカー配列のいずれか1つを含んで構築される。本発明の融合タンパク質コンストラクトは、未変性／天然の多サブユニットタンパク質と比較して長い血清半減期を付与し、生産時のタンパク質の収率を向上させ、保存時の安定性を亢進させ、及び／又は療法薬として使用したときの有効性を向上させることができる。

【0148】

以下の表2に提供されるIgG4抗体Fc変異体ドメインポリペプチドの任意のものを、以下の表1に提供されるIgG4ヒンジ配列の任意のものと組み合わせて利用することができる。同様に、以下の表2に提供されるIgG1抗体Fc変異体ドメインポリペプチドの任意のものを、以下の表1に提供されるIgG1ヒンジ配列の任意のものと組み合わせて利用することができる。例示的IgG1ヒンジ-Fcドメインポリペプチドは、以下の表3に提供される。

【0149】

【表1】

表1: リンカー変異体

ヒンジ	アミノ酸配列
IgG4 ヒンジコンセンサス	配列番号 1
IgG4 ヒンジ S228P	配列番号 2
IgG4 ヒンジ S228P/L235E	配列番号 4
IgG1 ヒンジコンセンサス	配列番号 6
IgG1 ヒンジ C220S	配列番号 7
IgG1 ヒンジ C220S/L234A/L235A	配列番号 9
IgG1 ヒンジ C220S/L234A/ L235E/G237A	配列番号 11
IgG1 ヒンジ ΔE216	配列番号 237
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S	配列番号 238
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S/L234A/L235A	配列番号 239
IgG1 ヒンジ ΔE216/C220S/L234A/L235E/G237A	配列番号 240

【0150】

【表 2】

表 2: IgG4 Fc 及び IgG1 Fc 野生型配列; 並びに例示的 IgG4 抗体 Fc 変異体及び IgG1 抗体 Fc 変異体配列 (アミノ酸置換を太字及び下線で指示する)

Fcドメイン	アミノ酸配列*
IgG4 Fc 野生型	配列番号 205
IgG4 Fc Y349C/K370E/R409W	配列番号 206
IgG4 Fc S354C/E357N/D399V/F405T	配列番号 207
IgG4 Fc Y349C/K360E/R409W	配列番号 208
IgG4 Fc Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 209
IgG4 Fc P329A/Y349C/K360E/R409W	配列番号 210
IgG4 Fc P329A/S354C/Q347R/D399V/F405T	配列番号 211
IgG1 Fc 野生型	配列番号 212
IgG1 Fc Y349C/K360E/K409W	配列番号 213
IgG1 Fc Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 214
IgG1 Fc P329A/Y349C/K360E/K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTE <u>N</u> QVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS <u>W</u> L TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG (配列番号 215)
IgG1 Fc P329A/Q347R/S354C/D399V/F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKAL <u>A</u> APIEKTISKAKGQPREP <u>R</u> VYTLP PCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLYSDGSF <u>T</u> LYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG (配列番号 216)
IgG1 Fc A330S/P331S/Y349C/K360E/ K409W	配列番号 217
IgG1 Fc A330S/P331S/Q347R/S354C/ D399V/F405T	配列番号 218

*これらのアミノ酸配列は、C 末端にリジン(K)を更に含み得る。

【 0 1 5 1 】

【表 3】

表 3: S228P 突然変異 IgG4 ヒンジ-Fc(野生型); 例示的 S228P 突然変異 IgG4 ヒンジ-Fc 変異体又はヒンジ部分-Fc 変異体; C220S 突然変異 IgG1 ヒンジ-Fc(野生型); 例示的 C220S 突然変異 IgG1 ヒンジ-Fc 変異体又はヒンジ部分-Fc 変異体

リンカー-Fc	アミノ酸配列*
IgG4 ヒンジ-Fc S228P	配列番号 219
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/Y349C/K370E/R409W	配列番号 220
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/S354C/E357N/D399V/ F405T	配列番号 221
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/Y349C/K360E/R409W	配列番号 222
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/Q347R/S354C/D399V/ F405T	配列番号 223
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/L235E/Y349C/K360E/ R409W	配列番号 224
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/L235E/S354C/Q347R/ D399V/ F405T	配列番号 225
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/L235E/P329A/Y349C/ K360E/R409W	配列番号 226
IgG4 ヒンジ-Fc S228P/L235E/ P329A/S354C/ Q347R/D399V/F405T	配列番号 227
IgG1 ヒンジ-Fc C220S	配列番号 228
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S	配列番号 250
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/Y349C/K360E/K409W	配列番号 229
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/Y349C/K360E/ K409W	配列番号 251
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/Q347R/S354C/D399V/ F405T	配列番号 230
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/Q347R/S354C/ D399V/F405T	配列番号 252
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235A/Y349C/ K360E/ K409W	配列番号 231
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235A/ Y349C/K360E/K409W	配列番号 253
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235A/Q347R/ S354C/D399V/F405T	配列番号 232
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235A/ Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 254
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235A/P329A/ Y349C/K360E/K409W	配列番号 233
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235A/ P329A/Y349C/K360E/K409W	配列番号 255
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235A/P329A/ Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 234
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235A/ P329A/Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 256
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235E/G237A/ A330S/P331S/Y349C/K360E/K409W	配列番号 235
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235E/ G237A/A330S/P331S/Y349C/K360E/ K409W	配列番号 257
IgG1 ヒンジ-Fc C220S/L234A/L235E/G237A/ A330S/P331S/Q347R/S354C/D399V/F405T	配列番号 236
IgG1 ヒンジ-Fc ΔE216/C220S/L234A/L235E/ G237A/A330S/P331S/Q347R/S354C/ D399V/F405T	配列番号 258

*これらのアミノ酸配列は、C 末端にリジン(K)を更に含み得る。

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4: 例示的ヘテロ二量体 Fc 融合ポリペプチドコンストラクト

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/置換
コンストラクト 101		
配列番号 2	配列番号 129	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

10

【 0 1 5 3 】

20

30

40

50

【表 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 3	配列番号 130	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 102		
配列番号 2	配列番号 131	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 132	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 103		
配列番号 4	配列番号 133	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 134	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 104		
配列番号 4	配列番号 135	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 136	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
コンストラクト 106		

【 0 1 5 4 】

【表 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/置換
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 137 又は 配列番号 259	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 138	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 107		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 139 又は 配列番号 260	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 140	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 108		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 141 又は 配列番号 261	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 142	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 110		
配列番号 11 又は 配列番号 240	配列番号 143 又は 配列番号 262	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 7】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 12	配列番号 144	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
コンストラクト 111		
配列番号 2	配列番号 145	IgG4 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 2	配列番号 146	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 112		
配列番号 2	配列番号 147	IgG4 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P;
配列番号 13	配列番号 148	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P;
コンストラクト 113		
配列番号 2	配列番号 149	IgG4Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 14	配列番号 150	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 114		

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 8】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 151 又は 配列番号 263	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 7	配列番号 152	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 115		
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 153 又は 配列番号 264	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 15	配列番号 154	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 116		
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 155 又は 配列番号 265	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 16	配列番号 156	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 117		
配列番号 8 又は 配列番号 241	配列番号 157 又は 配列番号 266	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 7	配列番号 158	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 118		

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 9】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 15 又は 配列番号 242	配列番号 159 又は 配列番号 267	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 15	配列番号 160	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 119		
配列番号 15 又は 配列番号 242	配列番号 161 又は 配列番号 268	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している)
配列番号 15	配列番号 162	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している)
コンストラクト 119-1		
配列番号 2	配列番号 163	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 164	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 119-2		
配列番号 2	配列番号 165	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 166	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【 0 1 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 10】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 119-3		
配列番号 4	配列番号 167	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 168	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 119-4		
配列番号 4	配列番号 169	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 170	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
コンストラクト 119-5		
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 171 又は 配列番号 269	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 172	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 119-6		

【0159】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 173 又は 配列番号 270	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 174	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 119-7		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 175 又は 配列番号 271	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 176	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S, V185C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 119-8		
配列番号 11 又は 配列番号 240	配列番号 177 又は 配列番号 272	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 12	配列番号 178	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S, V185C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 120		
配列番号 2	配列番号 179	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【 0 1 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 3	配列番号 180	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P;
コンストラクト 120-1		
配列番号 2	配列番号 181	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 182	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 120-2		
配列番号 4	配列番号 183	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 184	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 120-3		
配列番号 4	配列番号 185	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 186	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 120-4		
配列番号 7 又は 配列番号 238	配列番号 187 又は 配列番号 273	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 188	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 120-5		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 189 又は 配列番号 274	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 190	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 120-6		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 191 又は 配列番号 275	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 192	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 120-7		

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 11 又は 配列番号 240	配列番号 193 又は 配列番号 276	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 12	配列番号 194	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 121		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 195 又は 配列番号 277	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; p40 における追加の突然変異: IL-12 を安定化させるジスルフィド 結合を導入する Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 196	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; p35 における追加の突然変異: IL-12 を安定化させるジスルフィド 結合を導入する V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 122		
配列番号 9 又は 配列番号 239	配列番号 197 又は 配列番号 278	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然変 異 Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

【 0 1 6 3 】

【表 1 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 10	配列番号 198	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然 変異 V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 123		
配列番号 11 又は 配列番号 240	配列番号 199 又は 配列番号 279	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然 変異 Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 12	配列番号 200	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然 変異 V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

*これらのアミノ酸配列は、C 末端にリジン(K)を更に含み得る。

【0 1 6 4】

【表 1 6】

表 5: 例示的二量体 Fc 融合タンパク質

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 1		
配列番号 2	配列番号 17	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 18	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 2		
配列番号 2	配列番号 19	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 20	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【0 1 6 5】

【表 17】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 3		
配列番号 4	配列番号 21	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 22	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 4		
配列番号 4	配列番号 23	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 24	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
コンストラクト 5		
配列番号 4	配列番号 25	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G
配列番号 5	配列番号 26	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G

【0166】

10

20

30

40

50

【表 18】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 6		
配列番号 7	配列番号 27	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 28	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 7		
配列番号 9	配列番号 29	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 30	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 8		
配列番号 9	配列番号 31	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 32	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 9		
配列番号 9	配列番号 33	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A/L235A/P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

【0167】

10

20

30

40

50

【表 19】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 10	配列番号 34	IgG1Fc サイレント; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 10		
配列番号 11	配列番号 35	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
配列番号 12	配列番号 36	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S
コンストラクト 11		
配列番号 2	配列番号 37	IgG4 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 2	配列番号 38	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 12		
配列番号 2	配列番号 39	IgG4 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【0168】

10

20

30

40

50

【表 20】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 13	配列番号 40	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 13		
配列番号 2	配列番号 41	IgG4 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 14	配列番号 42	IgG4 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 14		
配列番号 7	配列番号 43	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 7	配列番号 44	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 15		
配列番号 7	配列番号 45	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 15	配列番号 46	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 16		
配列番号 7	配列番号 47	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

【0169】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 16	配列番号 48	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 17		
配列番号 8	配列番号 49	IgG1 Fc; (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 7	配列番号 50	IgG1 Fc; (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 18		
配列番号 15	配列番号 51	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 15	配列番号 52	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 19		
配列番号 15	配列番号 53	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している)
配列番号 15	配列番号 54	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している)
コンストラクト 19-1		
配列番号 2	配列番号 69	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【 0 1 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 3	配列番号 70	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 19-2		
配列番号 2	配列番号 71	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 72	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 19-3		
配列番号 4	配列番号 73	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 74	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 19-4		
配列番号 4	配列番号 75	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 76	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
コンストラクト 19-5		

【 0 1 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 4	配列番号 77	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G
配列番号 5	配列番号 78	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G
コンストラクト 19-6		
配列番号 7	配列番号 79	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 80	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 19-7		
配列番号 9	配列番号 81	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 82	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 19-8		
配列番号 9	配列番号 83	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

【 0 1 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 10	配列番号 84	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S, V185C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 19-9		
配列番号 9	配列番号 85	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 結合を低減する置換: L234A/L235A/P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 86	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S V185C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 19-10		
配列番号 11	配列番号 87	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: C177S, Y292C; (サブユニット間の天然のジスルフィド結合が欠失している); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 12	配列番号 88	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: C74S, V185C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 20		
配列番号 2	配列番号 55	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K370E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 56	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: E357N/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 20-1		
配列番号 2	配列番号 89	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
配列番号 3	配列番号 90	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P
コンストラクト 20-2		
配列番号 4	配列番号 91	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
配列番号 5	配列番号 92	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P 及び L235E
コンストラクト 20-3		
配列番号 4	配列番号 93	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A
配列番号 5	配列番号 94	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329A

【 0 1 7 4 】

【表 2 6】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
コンストラクト 20-4		
配列番号 4	配列番号 95	IgG4 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/R409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G
配列番号 5	配列番号 96	IgG4 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); Fab アーム交換を防止し、熱安定性を向上させる置換: S228P; FcγR 結合を低減する置換: S228P, L235E, P329G
コンストラクト 20-5		
配列番号 7	配列番号 97	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 8	配列番号 98	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 20-6		
配列番号 9	配列番号 99	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 100	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 20-7		

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 27】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 9	配列番号 101	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 102	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 20-8		
配列番号 9	配列番号 103	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 104	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329G; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 20-9		
配列番号 11	配列番号 105	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; p40 置換: Y292C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 12	配列番号 106	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; p35 置換: V185C (サブユニット間の天然のジスルフィド結合は 維持されている); FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 21		

【0176】

10

20

30

40

50

【表 28】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 9	配列番号 57	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; p40 における追加の突然変異: IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 58	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A; p35 における追加の突然変異: IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 22		
配列番号 9	配列番号 59	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然変異 Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
配列番号 10	配列番号 60	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 結合を低減する置換: L234A, L235A, P329A; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然変異 V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している
コンストラクト 23		
配列番号 11	配列番号 61	IgG1 (IL-12 p40); ヘテロ二量体化突然変異: K360E/K409W; ジスルフィド結合を安定化させる置換: Y349C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然変異 Y292C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

【0177】

10

20

30

40

50

【表 29】

リンカー配列	ヘテロ二量体 Fc 融合 タンパク質の 配列*	IgG タイプ (IL-12 サブユニット); 突然変異/ 置換
配列番号 12	配列番号 62	IgG1 (IL-12 p35); ヘテロ二量体化突然変異: Q347R/D399V/F405T; ジスルフィド結合を安定化させる置換: S354C; FcγR 及び C1q 結合を低減する置換: L234A, L235E, G237A, A330S, P331S; IL-12 を安定化させるジスルフィド結合を導入する追加の突然 変異 V185C; 上部ヒンジの C220 が S に突然変異している

*これらのアミノ酸配列は、C 末端にリジン(K)を更に含み得る。

【0178】

(d) IL-12 サブユニット

IL-12 は、p40 サブユニットと p35 サブユニットとを含む多サブユニットタンパク質である。成熟野生型 IL-12 p40 のアミノ酸配列は、以下の配列番号 127 に示される、GenBank アクセッション番号 NP_002178.2 のアミノ酸 23～328 である。成熟野生型 IL-12 p35 のアミノ酸配列は、以下の配列番号 128 に示される、GenBank アクセッション番号 NP_000873.2 のアミノ酸 57～253 である。本明細書で使用される p40 及び p35 のアミノ酸残基の番号付けは、成熟野生型タンパク質配列に対応する。本明細書で使用されるとき、IL-12 p40 サブユニットは、配列番号 127 と少なくとも 90% (例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99%) 同一のアミノ酸配列を含む。本明細書で使用されるとき、IL-12 p35 サブユニットは、配列番号 128 と少なくとも 90% (例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99%) 同一のアミノ酸配列を含む。

【0179】

前述の態様のうちのいずれか 1 つの特定の実施形態において、IL-12 の p40 及び p35 サブユニットは、それぞれ、配列番号 121 及び 122；127 及び 128；201 及び 202；203 及び 204；123 及び 124；又は 125 及び 126 のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、第 1 のポリペプチドは、IL-12 の p40 サブユニットのアミノ酸配列を含み、第 2 のポリペプチドは、IL-12 の p35 サブユニットのアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、第 1 のポリペプチドは、IL-12 の p35 サブユニットのアミノ酸配列を含み、第 2 のポリペプチドは、IL-12 の p40 サブユニットのアミノ酸配列を含む。

【0180】

特定の実施形態において、本開示は、第 1 の抗体 Fc ドメインポリペプチドを含む第 1 のポリペプチドと、第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドを含む第 2 のポリペプチドとを含むヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含み、ここで第 1 のポリペプチドは、リンカーによって第 1 の抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合した IL-12 の第 1 のサブユニットを更に含み；及び IL-12 の第 2 の異なるサブユニットが第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドに融合され、ここで IL-12 の第 1 及び第 2 の異なるサブユニットは互いに結合しており、第 1 の抗体 Fc ドメインポリペプチド及び第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドは、各々が、ヘテロ二量体化を促進する異なる突然変異を含有し、第 1 の抗体 Fc ドメインポリペプチド及び第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドは互いに結合しており、及び IL-12 の第 1 のサブユニットは、Y292C 置換を有する p40 サブユニットであり、IL-12 の第 2 の異なるサブユニットは、V185C 置換を有する p35 サブユニットである。特定の実施形態において、IL-12 の第 1 のサブユニット及び第 2 の異なるサブユニットは、それぞれ、配列番号 125 及び 126 のアミノ酸配列を含む。

【0181】

IL-12の第1のサブユニット及び第2の異なるサブユニットは、本明細書に開示されるいずれかのリンカーを介して抗体Fcドメインポリペプチドのいずれかに融合することができ、それにより、限定はされないが、表4に記載されるとおりのコンストラクト120、120-1、120-2、120-3、120-4、120-5、120-6、及び120-7、並びに表5に記載されるとおりのコンストラクト20、20-1、20-2、20-3、20-4、20-5、20-6、20-7、20-8、及び20-9を含む配列を有するFc融合タンパク質が形成される。

【0182】

特定の実施形態において、IL-12のp40サブユニットは、C177の置き換えを更に含み、IL-12のp35サブユニットは、C74の置き換えを更に含む。特定の実施形態において、IL-12のp40サブユニット中のC177はSによって置き換えられ、IL-12のp35サブユニット中のC74はSによって置き換えられる。特定の実施形態において、IL-12のp40及びp35サブユニットは、それぞれ、配列番号123及び124のアミノ酸配列を含む。

【0183】

IL-12の第1のサブユニット及び第2の異なるサブユニットは、本明細書に開示されるいずれかのリンカーを介して抗体Fcドメインポリペプチドのいずれかに融合することができ、それにより、限定はされないが、表4に記載されるとおりのコンストラクト119、119-1、119-2、119-3、119-4、119-5、119-6、119-7、及び119-8、並びに表5に記載されるとおりのコンストラクト19、19-1、19-2、19-3、19-4、19-5、19-6、19-7、19-8、19-9、及び19-10を含む配列を有するFc融合タンパク質が形成される。

【0184】

【表30】

表6: ヒトIL-12 p40 及び p35 アミノ酸配列

IL-12 p40	IL-12 p35
ヒト IL-12 p40 野生型 IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEED GITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC HKGGEVLSSHLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWLTITDITFSVKS SRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS (配列番号 127)	ヒト IL-12 p35 野生型 RNLFPVATPDPGMFCLHHSQNLRAVSNMLQKAR QTLEFYPCSTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCL SSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列番号 128)
ヒト IL-12 p40 C177S Y292C 配列番号 201	ヒト IL-12 p35 C74S V185C 配列番号 202
ヒト IL-12 p40 Y292C 配列番号 203	ヒト IL-12 p35 V185C 配列番号 204
ヒト IL-12 p40 Q56R 配列番号 121	ヒト IL-12 p35 E50V 配列番号 122
ヒト IL-12 p40 Q56R C177S Y292C 配列番号 123	ヒト IL-12 p35 E50V C74S V185C 配列番号 124
ヒト IL-12 p40 Q56R Y292C 配列番号 125	ヒト IL-12 p35 E50V V185C 配列番号 126

【0185】

(e) スペーサーペプチド

例示的スペーサーペプチド配列は表7に提供され、例示的完全長リンカー配列は表4及び表5に提供される。

【0186】

本発明の第1のポリペプチドの範囲内では、アミノからカルボキシルへの向きに、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットがリンカーを介して第1の抗体Fcドメインポリペプチド（例えば、IgG4抗体Fc変異体配列又はIgG1抗体Fc変異体配列、表2に開示されるとおり）に融合される。及び本発明の第2のポリペプチドの範囲内では、アミノからカルボキシルへの向きに、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットがリンカーを介して第2の抗体Fcドメインポリペプチド（例えば、IgG4抗体Fc変異体配列又はIgG1抗体Fc変異体配列、表2に開示されるとおり）に融合される。

【0187】

一部の実施形態において、本発明の多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットはリンカーを介して第1の抗体Fcドメイン配列に融合され、ここでリンカーは、スペーサーペプチドL₁と、配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239、又は240のアミノ酸配列とを含むか、又はそれからなる。一部の実施形態において、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、リンカーを介して第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合され、ここでリンカーは、スペーサーペプチドL₂と、配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239、又は240のアミノ酸配列とを含むか、又はそれからなる。

【0188】

特定の実施形態において、L₁及びL₂はペプチドリンカーであり、例えば、L₁及び／又はL₂は4～50アミノ酸残基を含む。特定の実施形態において、L₁は4～50アミノ酸残基からなる。特定の実施形態において、L₁は4～20アミノ酸残基からなる。特定の実施形態において、L₂は4～50アミノ酸残基からなる。特定の実施形態において、L₂は約4～20アミノ酸残基からなる。特定の実施形態において、L₁及びL₂は、各々独立に、約4～50アミノ酸残基からなる。特定の実施形態において、L₁及びL₂は、各々独立に、4～20アミノ酸残基からなる。

【0189】

一部の実施形態において、L₁及びL₂は、最適化された長さ及び／又はアミノ酸組成を有する。一部の実施形態において、L₁及びL₂は同じ長さであり、同じアミノ酸組成を有する。他の実施形態において、L₁及びL₂は異なる。

【0190】

特定の実施形態において、L₁は、L₂と等しいアミノ酸数である；特定の実施形態において、L₁は、L₂よりも長い（即ち、アミノ酸数が多い）；特定の実施形態において、L₁は、L₂よりも短い（即ち、少ないアミノ酸数）。

【0191】

特定の実施形態において、L₁及び／又はL₂は「短い」ものであり、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12アミノ酸残基からなる。従って、特定の例では、スペーサーペプチドは、約12アミノ酸残基以下からなる。0アミノ酸残基の場合、スペーサーペプチドはペプチド結合である。特定の実施形態において、L₁及び／又はL₂は「長い」ものであり、例えば、15、20又は25アミノ酸残基からなる。一部の実施形態において、スペーサーペプチドは、約3～約15個、例えば、8、9又は10個の隣接するアミノ酸残基からなる。L₁及びL₂のアミノ酸組成に関して、本発明のタンパク質の第1及び第2のポリペプチドに可動性を付与するが、第1及び第2の異なるサブユニットが互いに結合するのを妨げないとともに、プロテアーゼによる切断にも耐えるという特性を備えるペプチドが選択される。例えば、グリシン及びセリン残基は、概してプロテアーゼ耐性を提供する。多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239、又は240のアミノ酸配列に連結するのに好適な、及び／又は多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを配列番号1、2、4、6、7、9、11、237、238、239、又は240のアミノ酸配列に連結するのに適したスペーサーペプチドは、リンカーの一部として

10

20

30

40

50

、(GS)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GSGG)_n、(GSGGG)_n、及び
(GGGGG)_n配列(式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11
、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20である)を含み得る。一
部の実施形態において、L₁及び／又はL₂は、独立に、(GGGGG)₄(配列番号10
7)又は(GGGGG)₃(配列番号108)配列をリンカーの一部として含む。他の実
施形態において、L₁及び／又はL₂は、独立に、ペプチド配列を、表7に掲載されると
おりの、配列番号111、112、113、114、115、116、117、118、
119、及び120から選択される配列に示されるとおりの、リンカーの一部として含む
。一部の実施形態において、L₁及び／又はL₂は、独立に、配列番号108、配列番号
109、又は配列番号110である。

10

【0192】

【表31】

表7: リンカー

リンカー	配列番号
G/S リンカー	配列番号 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 及び 120

【0193】

特定の実施形態において、L₁は、リンカーの一部としての配列、配列番号108を含
み、L₂は、リンカーの一部として、配列番号109、又は配列番号110を含む。特定
の実施形態において、L₂は、リンカーの一部としての配列、配列番号108を含み、L₁
は、リンカーの一部として、配列番号109、又は配列番号110配列を含む。特定の実
施形態において、L₁は、リンカーの一部として、配列番号107、108、109、1
10、111、112、113、114、115、116、117、118、119、又
は120に示されるとおりの配列を含まない。

20

【0194】

特定の実施形態において、L₂のみが、リンカーの一部として、配列番号107、10
8、109、110、111、112、113、114、115、116、117、11
8、119、又は120に示されるとおりの配列を含む。特定の実施形態において、L₁
もL₂も、リンカーの一部として、配列番号107、108、109、110、111、
112、113、114、115、116、117、118、119、又は120に示さ
れるとおりの配列を含まない。

30

【0195】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1
のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドを含
み、ここでは配列番号118を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第1のサブ
ユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポ
リペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。本発明の一
部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブ
ユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドを含み、こ
こでは配列番号118を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブ
ユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポ
リペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。

40

【0196】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブ
ユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含
む第1のポリペプチドであって、配列番号118を含むリンカーが多サブユニットタンパ
ク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペ
プチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメ
インポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、追加のサブユニットが、配列番
号118を含まないリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられてい

50

る、第2のポリペプチドとを含む。

【0197】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号118を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号118を含むリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

10

【0198】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドを含み、ここでは配列番号109を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドを含み、ここでは配列番号109を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。

20

【0199】

本開示の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、配列番号109を含むリンカーを含み、このリンカーは、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けていて、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。

【0200】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号109を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の追加のサブユニットが、配列番号109を含まないリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

30

【0201】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号109を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号109を含むリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

40

【0202】

本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドを含み、ここでは配列番号110を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第1のサブ

50

ユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドを含み、ここでは配列番号110を含むリンカーが、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。

【0203】

本開示の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、配列番号110を含むリンカーを含み、このリンカーは、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットを第1の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けていて、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットを第2の抗体Fcドメインポリペプチド、例えばIgG4抗体のFcドメインポリペプチド又はIgG1抗体のFcドメインポリペプチドに結び付けている。

【0204】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号110を含むリンカーが多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号110を含まないリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

【0205】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号110を含まないリンカーが多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号110を含むリンカーで第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

【0206】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号110を含むリンカー配列が多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号109を含むリンカー配列で第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

【0207】

特定の実施形態において、本発明の一部のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットと第1の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第1のポリペプチドであって、配列番号109を含むリンカー配列が多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットをFcドメインポリペプチドに結び付けている、第1のポリペプチドと、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットと第2の抗体Fcドメインポリペプチドとを含む第2のポリペプチドであって、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットが、配列番号110を含むリンカー配列で第2の抗体Fcドメインポリペプチドに結び付けられている、第2のポリペプチドとを含む。

【0208】

(f) F cドメイン及びヘテロ二量体化を促進するための置換

本発明のタンパク質のアセンブリは、第1の抗体F cドメインポリペプチド（例えば、IgG4抗体F c変異体配列又はIgG1抗体F c変異体配列、表2に開示されるとおり）に融合した多サブユニットタンパク質の第1のサブユニット配列を含む第1のポリペプチドと、第2の抗体F cドメインポリペプチド（例えば、IgG4抗体F c変異体配列又はIgG1抗体F c変異体配列、表2に開示されるとおり）に融合した多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニット配列を含む第2のポリペプチドとを同じ細胞で発現させて、それが本発明に係るヘテロ二量体F c融合タンパク質のアセンブリにつながることで達成することができる。アセンブルしたタンパク質は、第1の抗体F cドメインポリペプチドと第2の抗体F cドメインポリペプチドとが互いに結合したヘテロ二量体F cドメインポリペプチドを有する。F cのヘテロ二量体の優先的なアセンブリの促進は、米国特許出願第13/494870号明細書、米国特許出願第16/028850号明細書、米国特許出願第11/533709号明細書、米国特許出願第12/875015号明細書、米国特許出願第13/289934号明細書、米国特許出願第14/773418号明細書、米国特許出願第12/811207号明細書、米国特許出願第13/866756号明細書、米国特許出願第14/647480号明細書、及び米国特許出願第14/830336号明細書に示されるとおり、各抗体重鎖定常領域のCH3ドメインにおける異なる突然変異の取込みによって達成することができる。例えば、突然変異は、ヒトIgG1をベースとするCH3ドメインに作られてもよく、第1の抗体F cドメインポリペプチド及び第2の抗体F cドメインポリペプチドの範囲内に、これらの2本の鎖が互いに選択的にヘテロ二量体化するのを許容する別個のアミノ酸置換対が取り込まれる。以下に例示するアミノ酸置換の位置は全て、KabattにあるとおりのEUインデックスに従い番号付けしている。

【0209】

一つのシナリオでは、第1の抗体F cドメインポリペプチド中のアミノ酸置換が、元のアミノ酸を、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）又はトリプトファン（W）から選択される大型のアミノ酸に置き換え、第2の抗体F cドメインポリペプチド中の少なくとも1つのアミノ酸置換が、元のアミノ酸を、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、又はバリン（V）から選択される小型のアミノ酸に置き換え、従って大型のアミノ酸置換（突起）が小型のアミノ酸置換（腔）の表面に嵌まり込む。例えば、一方の抗体F cドメインポリペプチドがT366W置換を取り込むことができ、他方が、T366S、L368A、及びY407Vを含む3つの置換を取り込むことができる。

【0210】

本発明の多サブユニットタンパク質の第1のサブユニット配列を含む第1のポリペプチド又は多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニット配列を含む第2のポリペプチドは、任意選択で、ヒンジ、CH2及びCH3ドメインをCH1ドメインと共に又はそれ無しで含むIgG定常領域など、抗体定常領域と少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%）同一のアミノ酸配列にカップリングすることができる。一部の実施形態において、定常領域のアミノ酸配列は、ヒトIgG1定常領域、IgG2定常領域、IgG3定常領域、又はIgG4定常領域など、ヒト抗体定常領域と少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%）同一である。一部の他の実施形態において、定常領域のアミノ酸配列は、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、又はウマなど、別の哺乳類由来の抗体定常領域と少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%）同一である。1つ以上の突然変異は、ヒトIgG1定常領域と比較すると、定常領域中に、例えば、Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394

、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411及び／又はK439において取り込まれてもよい。例示的置換としては、例えば、Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D、及びK439Eが挙げられる。

10

【0211】

特定の実施形態において、ヒトIgG1定常領域のCH1に取り込むことのできる突然変異は、アミノ酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171、及び／又はV173にあり得る。特定の実施形態において、ヒトIgG1定常領域のCκに取り込むことのできる突然変異は、アミノ酸E123、F116、S176、V163、S174、及び／又はT164にあり得る。

【0212】

アミノ酸置換は、以下の表8に示される置換セットから選択される可能性がある。

20

【0213】

【表32】

表8: アミノ酸置換

	第1の ポリペプチド	第2の ポリペプチド		第1の ポリペプチド	第2の ポリペプチド
セット1	S364E/F405A	Y349K/T394F	セット9	L368D/K370S	S364K
セット2	S364H/D401K	Y349T/T411E	セット10	L368E/K370S	S364K
セット3	S364H/T394F	Y349T/F405A	セット11	K360E/Q362E	D401K
セット4	S364E/T394F	Y349K/F405A	セット12	L368D/K370S	S364K/E357L
セット5	S364E/T411E	Y349K/D401K	セット13	K370S	S364K/E357Q
セット6	S364D/T394F	Y349K/F405A	セット14	F405L	K409R
セット7	S364H/F405A	Y349T/T394F	セット15	K409R	F405L
セット8	S364K/E357Q	L368D/K370S			

30

【0214】

或いは、アミノ酸置換は、以下の表9に示される置換セットから選択される可能性がある。

【0215】

【表33】

表9: アミノ酸置換

	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	K409W	D399V/F405T
セット2	Y349S	E357W
セット3	K360E	Q347R
セット4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

40

【0216】

或いは、アミノ酸置換は、以下の表10に示される置換セットから選択される可能性が

50

ある。

【0217】

【表34】

表 10: アミノ酸置換

	第 1 のポリペプチド	第 2 のポリペプチド
セット 1	T366K/L351K	L351D/L368E
セット 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
セット 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
セット 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
セット 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
セット 6	E356K/D399K	K392D/K409D

10

【0218】

或いは、各ポリペプチド鎖中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、表11から選択される可能性がある。

【0219】

【表35】

表 11: アミノ酸置換

第 1 のポリペプチド	第 2 のポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D 及び T411E

20

【0220】

或いは、少なくとも1つのアミノ酸置換は、以下の表12にある置換セットから選択される可能性があり、ここで第1のポリペプチド欄に指示される位置は、任意の公知の負電荷アミノ酸によって置き換えられ、第2のポリペプチド欄に指示される位置は、任意の公知の正電荷アミノ酸によって置き換えられる。

【0221】

【表36】

表 12: アミノ酸置換

第 1 のポリペプチド	第 2 のポリペプチド
K392, K370, K409, 又は K439	D399, E356, 又は E357

30

【0222】

或いは、少なくとも1つのアミノ酸置換は、以下の表13にあるセットから選択される可能性があり、ここで第1のポリペプチド欄に指示される位置は、正電荷アミノ酸によって置き換えられ、第2のポリペプチド欄に指示される位置は、任意の公知の負電荷アミノ酸によって置き換えられる。

【0223】

【表37】

表 13: アミノ酸置換

第 1 のポリペプチド	第 2 のポリペプチド
D399, E356, 又は E357	K409, K439, K370, 又は K392

40

【0224】

或いは、アミノ酸置換は、以下の表14にあるセットから選択される可能性がある。

【0225】

50

【表 38】

表 14: アミノ酸置換

第 1 のポリペプチド	第 2 のポリペプチド
T350V, L351Y, F405A, 及び Y407V	T350V, T366L, K392L, 及び T394W

【0226】

或いは、又は加えて、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質の構造的安定性は、第1又は第2のポリペプチド鎖のいずれか一方にS354Cを導入し、反対側のポリペプチド鎖にY349Cを導入して、これらの2つのポリペプチドの界面内に人工的ジスルフィド結合を形成することによって増加させてもよい。

10

【0227】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366位でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368及びY407から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0228】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368及びY407から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366位でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

20

【0229】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405、及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0230】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405、及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

30

【0231】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L351、D399、S400及びY407から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、N390、K392、K409及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

40

【0232】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、N390、K392、K409及びT411から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L351、D399、S400及びY407から選択される1つ以上の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0233】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q347、Y349、K360、及びK409から選択される1つ以上の位置でIgG1定

50

常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9 及び F 4 0 5 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 4】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9 及び F 4 0 5 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、K 3 6 0、Q 3 4 7 及び K 4 0 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 5】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9 及び K 4 3 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7 及び D 3 9 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 6】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7 及び D 3 9 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9 及び K 4 3 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 7】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 及び D 3 9 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 及び K 4 0 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 8】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 及び K 4 0 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 及び D 3 9 9 から選択される1つ以上の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 3 9】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と S 3 5 4 C 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と Y 3 4 9 C 置換が異なる。

【0 2 4 0】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と Y 3 4 9 C 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と S 3 5 4 C 置換が異なる。

【0 2 4 1】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と K 3 6 0 E 及び K 4 0 9 W 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と O 3 4 7 R、D 3 9 9 V 及び F 4 0 5 T 置換が異なる。

【0 2 4 2】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と O 3 4 7 R、D 3 9 9 V 及び F 4 0 5 T 置換異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列と K 3 6 0 E 及び K 4 0 9 W 置換が異なる。

【0243】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 W 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 S、T 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 置換が異なる。

【0244】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 S、T 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 6 6 W 置換が異なる。

10

【0245】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、及び Y 4 0 7 V 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、及び T 3 9 4 W 置換が異なる。

【0246】

一部の実施形態において、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、及び T 3 9 4 W 置換が異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、及び Y 4 0 7 V 置換が異なる。

20

【0247】

当業者は、タンパク質の作製及び／又は保存時、N末端グルタミン酸（E）又はグルタミン（Q）のサイクル処理によってラクタムが形成され得る（例えば、自然に、又は作製及び／又は保存時に存在する酵素によって触媒される）ことを理解するであろう。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列のN末端残基がE又はQである一部の実施形態において、本明細書では、E又はQがピログルタミン酸に置き換えられた対応するアミノ酸配列もまた企図される。

【0248】

当業者であれば、タンパク質作製及び／又は保存時、タンパク質のC末端リジン（K）が除去され得る（例えば、自然に、又は作製及び／又は保存時に存在する酵素によって触媒される）こともまた理解するであろう。このようなKの除去は、そのC末端にFcドメインを含むタンパク質で観察されることが多い。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列のC末端残基（例えば、Fcドメイン配列）がKである一部の実施形態において、本明細書では、Kが除去されている対応するアミノ酸配列もまた企図される。

30

【0249】

（g）エフェクター機能を低減するための突然変異

一態様において、本発明は、（a）第1の抗体Fcドメインポリペプチドと多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットとを含む第1のポリペプチド；及び（b）第2の抗体Fcドメインポリペプチドと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとを含む第2のポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供し、ここで第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、各々、ヘテロ二量体化を促進する異なる突然変異を含み、第1及び／又は第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、Fcのエフェクター機能を低減する1つ以上の突然変異を含み、及び第1のサブユニットと多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットとは互いに結合している。特定の実施形態において、Fcのエフェクター機能を低減する1つ以上の突然変異を含む本明細書に開示されるヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、エフェクター機能を低減する1つ以上のFc突然変異を持たないその対応物と比べて、腫瘍成長を阻害する活性の増加を示す。本明細書で企図される突然変異には、アミノ酸残基の置換、挿入、及び欠失が含まれる。本明細書に開示されるFcドメイン又はヒンジ領域のアミノ酸位置は全て、EU付番に従い番号付け

40

50

される。

【0250】

特定の実施形態において、第1及び／又は第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、Fcドメインポリペプチドが抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び／又は抗体依存性細胞食作用（ADCP）を誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含む。ADCC及びADCPは、典型的にはFc受容体によって媒介される。例えば、特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、ヒトIgG（例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、又はヒトIgG4）抗体配列である。Fcγ受容体（FcγR）とも称されるヒトIgGのFc受容体には、限定はされないが、活性化型Fcγ受容体FcγRI（CD64）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIIA（CD16又はCD16A）、及びFcγRIIIB（CD16B）、並びに抑制型Fcγ受容体FcγRIIB（CD32B）が含まれる。従って、一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドの活性化型FcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIIA、又はFcγRIIIB）への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドの抑制型FcγR（例えば、FcγRIIB）への結合を増加させる1つ以上の突然変異を含む。

【0251】

活性化型FcγRへの結合を低減する及び／又は抑制型FcγRへの結合を増加させるFc突然変異は、当該技術分野において公知である。例えば、ヒンジ及びFc領域内では、CD16結合はヒンジ領域及びCH2ドメインによって媒介される。例えば、ヒトIgG1内では、CD16との相互作用は、主に、アミノ酸残基Asp265～Glu269、Asn297～Thr299、Ala327～Ile332、Leu234～Ser239、及びCH2ドメインの炭水化物残基N-アセチル-D-グルコサミンに集中している（Sondermann et al., Nature, 406（6793）：267-273を参照のこと）。これらの既知のドメインに基づき、ファージディスプレイライブラリ又は酵母表面ディスプレイcDNAライブラリの使用によるなどして、CD16への結合親和性を増強又は低減するように突然変異を選択することができ、又は相互作用の既知の三次元構造に基づき設計することができる。

【0252】

Want et al., Protein Cell（2018）9（1）：63-73にレビューされているとおり、アミノ酸位置232～239、265～270、296～299、及び325～332を含む領域は、ヒトIgG1 Fcの結晶構造に応じて活性化型FcγR結合に関係があるとされている。Wang et al. はまた、ヒトIgG4抗体のL235E及びF234A／L235A突然変異、ヒトIgG1抗体のL234A／L235A突然変異、及びIgG抗体のN297突然変異（例えば、N297A、N297Q、N297G、又はN297D）が活性化型FcγR結合を低減することも開示している。米国特許第8,969,526号明細書に開示されるとおり、329位における突然変異（例えば、P329A、P329G、又はP329R）もまた、活性化型FcγR結合を低減する。活性化型FcγR結合に関係があるとされる更なるアミノ酸位置及び突然変異（例えば、E233P突然変異）が、米国特許第7,943,743号明細書及びIsaacs et al., J. Immunol.（1998）161：3862-69に開示されている。

【0253】

従って、特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、233、234、235、297、及び329位から選択される位置の1つ以上に突然変異（例えば、ヒトIgG1と比べたときの置換）を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異E233P；L234A（ヒトIgG1）又はF234A（ヒトIgG4）；L235A又はL235E；N297A、N297Q、N297G、又はN297D；及び／又はP329A、P329G、又はP3

29Rを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異L234A及びL235Aを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異L234A、L235A、及びP329Aを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異L235Eを含むヒトIgG4抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異L235E及びP329Aを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。

【0254】

特定の実施形態において、第1及び／又は第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、Fcドメインポリペプチドが補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含む。CDCは、典型的には補体成分(例えば、C1)によって媒介される。従って、特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドの補体成分(例えば、C1q)への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。

【0255】

C1qへの結合を低減するFc突然変異は、当該技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,648,260号明細書及び同第5,624,821号明細書に開示されるとおり、Fcの位置234、235、236、237、297、318、320、及び322位にあるアミノ酸残基は、C1q結合に関係があるとされている。Tao et al., J. Exp. Med. (1993) 178:661-667及びBrekke et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2542-47に開示されるとおり、331位の残基Proは、C1q結合に関係があるとされている。Idusogie et al., J. Immunol. (2000) 164:4178-84に開示されるとおり、Fcの270位(例えば、D270A)、322位(K322A)、329位(例えば、P329A)、及び331位(例えば、P331A、P331S、又はP331G)における突然変異は、C1q結合を低減した。

【0256】

従って、特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、234、235、236、237、270、297、318、320、322、329、及び331位から選択される位置の1つ以上に突然変異(例えば、ヒトIgG1と比べたときの置換)を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異G237A、A330S、P331S、及び／又はP329Aを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異G237A、A330S、及びP331Sを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、突然変異P329Aを含むヒトIgG1抗体Fcドメインポリペプチドである。

【0257】

ADCC及び／又はADCPを低減する突然変異及びCDCを低減する突然変異は、組み合わせることができる。特定の実施形態において、第1及び／又は第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、FcドメインポリペプチドがADCC及び／又はADCPを誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含み、更に、FcドメインポリペプチドがCDCを誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、FcドメインポリペプチドがADCC及び／又はADCPを誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含み、更に、FcドメインポリペプチドがCDCを誘導する能力を低減する1つ以上の突然変異を含む。

【0258】

一部の実施形態において、IgG4 Fcと本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク

10

20

30

40

50

質は、第1及び／又は第2のポリペプチドにおけるFcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA、又はFcγRIIIB）又は補体成分（例えば、C1q）への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。かかる突然変異は、エフェクター機能を低減するのに有用である。例えば、本開示のタンパク質は、S228P及びL235E突然変異；S228P、L235E、及びP329A突然変異；又はS228P、L235E、及びP329G突然変異を含むことができる。

【0259】

一部の実施形態において、IgG1 Fcとの本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1及び／又は第2のポリペプチドにおけるFcγR（例えば、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA、又はFcγRIIIB）又は補体成分（例えば、C1q）への結合を低減するため1つ以上の突然変異を含む。かかる突然変異は、エフェクター機能を低減するのに有用である。例えば、本開示のタンパク質は、L234A及びL235A突然変異；L234A、L235A、及びP329A突然変異；L234A、L235A、及びP329G突然変異；又はL234A、L235E、G237A、A330S、及びP331S突然変異を含むことができる。

【0260】

一部の実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、各々が突然変異P329G又はP329Aを持つ第1の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドと第2の抗体IgG4又はIgG1 Fcドメインポリペプチドとを含む。

【0261】

一部の実施形態において、第1の抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、A330S及びP331Sから選択される突然変異を持つ。

【0262】

一部の実施形態において、第1の抗体Fcドメインポリペプチド及び第2の抗体Fcドメインポリペプチドは、各々が、突然変異A330S及びP331Sを持つ。

【0263】

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第1のポリペプチドでは、多サブユニットタンパク質の第1のサブユニットは、第1のリンカーによって第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第2のポリペプチドでは、多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニットは、第2のリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。かかる使用に好適なリンカーのアミノ酸配列は、見出し「IgG4コンストラクト」及び「IgG1コンストラクト」の下に記載される。第1及び／又は第2のポリペプチドにおける使用に好適な更なるリンカー配列としては、限定はされないが、野生型IgG（例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、又はヒトIgG4）ヒンジ配列及びその突然変異体形態が挙げられる。例えば、特定の実施形態において、第1及び第2のリンカーは、各々が、アミノ酸配列ESKYGP P C P P C P A P E F X G G（式中、XはL又はEである）（配列番号280）又はSKYGP P C P P C P A P E F X G G（式中、XはL又はEである）（配列番号281）を含む。特定の実施形態において、第1及び第2のリンカーは、各々が、配列番号282又は配列番号283のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、第1及び第2のリンカーは、各々が、配列番号284又は配列番号285のアミノ酸配列を含む。

【0264】

（h）血清半減期

本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、治療的使用に好適な薬物動態特性を有する。例えば、特定の実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、少なくとも約50時間の血清半減期を有する。特定の実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、少なくとも約100時間の血清半減期を有する。

【0265】

特定の実施形態において、対象への静脈内投与の50時間後、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質の血清濃度は、前記対象における投与後1時間の本発明のタンパク質の血清濃度の少なくとも10%である。

【0266】

特定の実施形態において、本発明に係るヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、Fcドメインポリペプチドに融合していない多サブユニットタンパク質よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%長い血清半減期を有する。特定の実施形態において、本発明に係る多サブユニットタンパク質のタンパク質配列を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、Fcドメインポリペプチドに融合していない多サブユニットタンパク質よりも少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、又は20倍長い血清半減期を有する。

10

【0267】

(i) 腫瘍の貯留性

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、任意選択で、腫瘍部位におけるタンパク質の貯留性を増強する更なる特徴を取り込むことができる。例えば、本発明の特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメイン、及び／又はヒアルロン酸結合ドメインを更に含む。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍に（例えば、腫瘍細胞の表面、腫瘍の細胞周囲マトリックス、又は腫瘍の細胞外マトリックスに）存在する1つ以上のプロテオグリカン（例えば、当該技術分野において公知のプロテオグリカン、例えば、Loz

20

z o e t a l . , M a t r i x B i o (2 0 1 5) 4 2 : 1 1 - 5 5 ; 及び N i k i t o v i c e t a l . , F r o n t i e r s i n E n d o c r i n o l o g y (2 0 1 8) 9 : 6 9 に開示されるとおりのもの) に結合するプロテオグリカン結合ドメインを更に含む。特定の実施形態において、コラーゲン結合ドメインは、腫瘍に（例えば、腫瘍細胞の表面、腫瘍の細胞周囲マトリックス、又は腫瘍の細胞外マトリックスに）存在する1つ以上のコラーゲンに結合する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍に存在する1つ以上のヒアルロン酸に結合するヒアルロン酸 (h a c i d) 結合ドメインを更に含む。かかるヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍における貯留性の亢進を示し、より低い用量及び／又は頻度で対象の腫瘍内に投与され得る。

【0268】

30

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、腫瘍に（例えば、腫瘍細胞の表面、腫瘍の細胞周囲マトリックス、又は腫瘍の細胞外マトリックスに）特異的に発現する1つ以上のプロテオグリカンに結合する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるコラーゲン結合ドメインは、腫瘍に（例えば、腫瘍細胞の表面、腫瘍の細胞周囲マトリックス、又は腫瘍の細胞外マトリックスに）特異的に発現する1つ以上のコラーゲンに結合する。かかるヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、投与後に（例えば、静脈内、皮下、又は肺内投与後に）腫瘍において濃縮されて、亢進した腫瘍貯留性を有してもよく、ひいては、より低い用量及び／又は頻度での投与が可能となる。

【0269】

40

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、シンデカン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (C S P G 4) 、ベータグリカン、ホスファカン、グリピカン、パールカン、アグリリン、コラーゲン（例えば、IX、XII、XV、又はXVII型コラーゲン）、ヒアレクタン、アグレカン、バーシカン、ニューロカン、ブレビカン、及び小分子ロイシンリッチプロテオグリカン (S L R P) から選択される1つ以上のプロテオグリカンに結合するプロテオグリカン結合ドメインを更に含む。癌に関係があるとされているプロテオグリカンとしては、限定はされないが、コラーゲン、シンデカン（例えば、シンデカン-1又はシンデカン-2）、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン（例えば、グリピカン-1又はグリピカン-3）、パールカン、バーシカン、ブレビカン、及びSLPR（例えば、デコリン、バイグリカン、アスポリン

50

、フィブロモジュリン (fibrodulin)、及びルミカン) が挙げられる。従って、特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、シンデカン (例えば、シンデカン-1又はシンデカン-2)、セルグリシン、CSPG4、ベータグリカン、グリピカン (例えば、グリピカン-1又はグリピカン-3)、パールカン、パーシカン、プレビカン、及びSLPRから選択される1つ以上のプロテオグリカンに結合する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、デコリン、バイグリカン、アスポリン、フィブロモジュリン (fibrodulin)、及びルミカンから選択される1つ以上のSLPRに結合する。

【0270】

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質に含まれるプロテオグリカン結合ドメインは、タンパク質 (例えば、抗体又はその抗原結合断片)、ペプチド (例えば、プロテオグリカン結合タンパク質又はその変異体の一部分)、アプタマー、小分子、又はこれらの組み合わせであり得る。プロテオグリカン結合ドメインはまた、当該技術分野においても公知である。例えば、シンデカン結合ドメインについては、米国特許第6,566,489号明細書、同第8,647,828号明細書、及び同第10,124,038号明細書；米国特許出願公開第2009/0297479号明細書；及び国際公開第2018199176A1号パンフレットに開示されている。CSPG4結合ドメインについては、米国特許第9,801,928号明細書及び同第10,093,745号明細書；及び米国特許出願公開第2016/0032007号明細書、同第2017/0342151号明細書、及び同第2018/0072811号明細書に開示されている。β-グリカン結合ドメインについては、米国特許第7,455,839号明細書に開示されている。グリピカン結合ドメインについては、米国特許第7,919,086号明細書、同第7,776,329号明細書、同第8,680,247号明細書、同第8,388,937号明細書、同第9,260,492号明細書、同第9,394,364号明細書、同第9,790,267号明細書、同第9,522,940号明細書、及び同第9,409,994号明細書；米国特許出願公開第2004/0236080号明細書、同第2011/0123998号明細書、同第2018/0244805号明細書、同第2018/0230230号明細書、及び同第2018/0346592号明細書；欧州特許第2270509号明細書；及び国際公開第2017053619A1号パンフレット、同第2018026533A1号パンフレット、同第2018165344A1号パンフレット、及び同第2018199318A1号パンフレットに開示されている。パールカン結合ドメインについては、米国特許出願第10,166,304号明細書に開示されている。デコリン結合ドメインについては、米国特許第6,517,838号明細書及び国際公開第2000021989A1号パンフレット、同第2000077041A2号パンフレット、及び同第2000078800A2号パンフレットに開示されている。

【0271】

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、コラーゲン結合ドメインを更に含む。コラーゲンは、脊椎動物に少なくとも28種類の異なる型が同定されているタンパク質のクラスである。Fang et al., Tumor Biol. (2014) 35:2871-82 and Xiong et al., J. Cancer Metasta. Treat. (2016) 2:357-64に開示されるとおり、各コラーゲン型が、その独自の構造特性及び分布パターンを有する。限定はされないが、Col3A1、Col5A2、Col6、Col7A1、Col15A1、Col19A1、及びCol22A1を含め、様々なコラーゲン型が、癌に関係があるとされている。コラーゲン結合ドメインは、タンパク質 (例えば、抗体又はその抗原結合断片)、ペプチド (例えば、コラーゲン結合タンパク質又はその変異体の一部分)、アプタマー、小分子、又はこれらの組み合わせであり得る。コラーゲン結合ドメインは当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,788,966号明細書、同第5,587,360号明細書、同第5,851,794号明細書、同第5,741,670号明細書、同第

10

20

30

40

50

5, 849, 701号明細書、同第6, 288, 214号明細書、同第6, 387, 663号明細書、同第6, 908, 994号明細書、同第7, 169, 902号明細書、同第7, 488, 792号明細書、同第7, 820, 401号明細書、同第8, 956, 612号明細書、同第8, 642, 728号明細書、及び同第8, 906, 649号明細書、及び米国特許出願公開第2007/0161062号明細書、同第2009/0142345号明細書、及び同第2012/0100106号明細書に開示されている。

【0272】

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、ヒアルロン酸結合ドメインを更に含む。ヒアルロン酸結合ドメインは、タンパク質（例えば、抗体又はその抗原結合断片）、ペプチド（例えば、ヒアルロン酸結合タンパク質又はその変異体の一部分）、アプタマー、小分子、又はこれらの組み合わせであり得る。ヒアルロン酸結合ドメインは当該技術分野において公知であり、例えば米国特許第6, 864, 235号明細書、同第8, 192, 744号明細書、同第8, 044, 022号明細書、同第8, 163, 498号明細書、同第8, 034, 630号明細書、同第9, 217, 016号明細書、同第9, 795, 686号明細書、及び同第9, 751, 919号明細書、及び米国特許出願公開第2002/0055488号明細書及び同第2007/0259380号明細書に開示されている。

【0273】

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメイン、及び／又はヒアルロン酸結合ドメインは、存在する場合、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の任意の位置にあってよい。例えば、特定の実施形態において、IL-12サブユニットが抗体FcドメインポリペプチドのN末端側に位置する場合、本明細書に開示されるとおりのプロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメイン、及び／又はヒアルロン酸結合ドメインは、第1の抗体FcドメインポリペプチドのC末端に融合されてもよく、及び／又は第2の抗体FcドメインポリペプチドのC末端に融合されてもよい。特定の実施形態において、IL-12サブユニットが抗体FcドメインポリペプチドのC末端側に位置する場合、本明細書に開示されるとおりのプロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメイン、及び／又はヒアルロン酸結合ドメインは、第1の抗体FcドメインポリペプチドのN末端に融合されてもよく、及び／又は第2の抗体FcドメインポリペプチドのN末端に融合されてもよい。

【0274】

プロテオグリカン結合ドメイン、コラーゲン結合ドメイン、及び／又はヒアルロン酸結合ドメインは、存在する場合、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の残りの部分にリンカーを介して融合されてもよい。特定の実施形態において、プロテオグリカン結合ドメインは、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の残りの部分にペプチドリナーを介して融合される。特定の実施形態において、ペプチドリナーは、本明細書に開示されるスペーサーペプチドを含む。

【0275】

例示的ヘテロ二量体Fc融合タンパク質

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む。特定の実施形態において、配列番号290及び配列番号291を含む本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第1の抗体FcドメインポリペプチドのCH3ドメインにY349C突然変異を含み、第2の抗体FcドメインポリペプチドのCH3ドメインにS354C突然変異を含む。特定の実施形態において、配列番号290及び配列番号291を含む本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、それぞれのFcドメインポリペプチド配列に、Fcドメイン間でのヘテロ二量体化を促進するための異なる突然変異を含む。

【0276】

特定の実施形態において、第1のポリペプチド配列は、K360E及びK409W置換

を含む第1の抗体Fcドメインポリペプチド（ヒトIgG1）配列を含む。特定の実施形態において、第2のポリペプチド配列は、Q347R、D399V、及びF405T置換を含む第2の抗体Fcドメインポリペプチド（ヒトIgG1）配列を含む。特定の実施形態において、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドアミノ酸配列は、エフェクター機能を低減するための1つ以上の突然変異を含む。特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、L234A、L235A、及びP329A突然変異を含む。

【0277】

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第1のポリペプチド（配列番号290）では、ヒトIL-12のp40サブユニットは、第1のアミノ酸配列を含む第1のリンカーによって第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合され、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第2のポリペプチド（配列番号291）では、ヒトIL-12のp35サブユニットは、第2のアミノ酸配列を含む第2のリンカーによって第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合される。

【0278】

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

【化1】

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAA
EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPKPNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTW
STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEW
ASVPCSPKSSDKTHTCPFCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPFSRDELTEHQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (配列番号290)

【0279】

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

【化2】

RNLFPVATPDPMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTST
VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT
MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL
HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPFCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号291)

【0280】

それぞれ、アミノ酸配列の配列番号290及び配列番号291によって表される第1及び第2のポリペプチドは、配列番号290の第1の抗体Fcドメインポリペプチド（ヒトIgG1）のCH3ドメインにあるY349C突然変異配列（太字及び下線）及び配列番号291の第2の抗体Fcドメインポリペプチド（ヒトIgG1）のCH3ドメインにあるS354C突然変異配列（太字及び下線）に起因してジスルフィド結合を形成し、これがヘテロ二量体Fc融合タンパク質に安定性を付与する（Fcの番号付けは、EU方式に従う）。

【0281】

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の2つのFcドメインポリペプチド間のヘテロ二量体化を促進するため、配列番号290の第1の抗体Fcドメインポリペプチド配列（ヒトI

g G 1) は C H 3 ドメインに K 3 6 0 E 及び K 4 0 9 W 置換を含み、配列番号 2 9 1 の第 2 の異なる F c ドメインポリペプチド配列 (ヒト I g G 1) は、C H 3 ドメインに Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V、及び F 4 0 5 T 置換を含む (F c の番号付けは、E U 方式に従う)。
【0282】

配列番号 2 9 0 及び配列番号 2 9 1 の第 1 の抗体 F c ドメインポリペプチド配列及び第 2 の異なる F c ドメインポリペプチド配列 (ヒト I g G 1) はまた、エフェクター機能を低減するための L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 A (L A L A P A) 突然変異も含む。

【0283】

このヘテロ二量体 F c 融合タンパク質は、本明細書では D F - h I L - 1 2 - F c s i と称される。

【0284】

(j) 調製及び作製方法

本発明のタンパク質は、当業者に周知の組換え D N A 技術を用いて作ることができる。例えば、第 1 の抗体 F c ドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第 1 のサブユニット配列を含む第 1 のポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列を第 1 の発現ベクターにクローニングすることができ；第 2 の抗体 F c ドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第 2 の異なるサブユニット配列を含む第 2 のポリペプチドをコードする第 2 の核酸配列を第 2 の発現ベクターにクローニングすることができ；及び第 1 及び第 2 の発現ベクターを宿主細胞へと共に安定にトランスフェクトすることにより、多量体タンパク質を作製することができる。

【0285】

タンパク質の最も高い収率を実現するため、異なる比率の第 1 及び第 2 の発現ベクターを調べて、宿主細胞へのトランスフェクションに最適な比率を決定することができる。トランスフェクション後、限界希釈、E L I S A、F A C S、顕微鏡法、又は C l o n e p i x など、当該技術分野で公知の方法を用いて、細胞バンク作成用に単クローンを単離することができる。

【0286】

クローンは、バイオリアクタースケールアップ及び本発明のタンパク質の発現の維持に好適な条件下で培養することができる。タンパク質は、遠心、深層ろ過、細胞溶解、均質化、凍結融解、アフィニティー精製、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、及び混合モードクロマトグラフィーを含めた、当該技術分野で公知の方法を用いて単離し、及び精製することができる。

【0287】

(i) 原薬調製

一部の実施形態において、本開示のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質、例えば D F h I L 1 2 - F c s i は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞で作製される。特定の実施形態において、本開示のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質、例えば D F h I L 1 2 - F c s i は、C H O 細胞で浮遊培養下に (例えば、振盪フラスコ内で) 作製される。特定の実施形態において、C H O 細胞のバイアルを解凍し、2 回以上継代した後に、タンパク質が作製される (例えば、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回)。特定の実施形態において、C H O 細胞のバイアルを解凍し、4 回継代した後に、タンパク質が作製される。特定の実施形態において、4 回目の継代の C H O 細胞を使用して、第 1 のバイオリアクターの培養液が接種される。特定の実施形態において、第 1 のバイオリアクターは、約 4 0 L、約 4 5 L、約 5 0 L、約 5 5 L、又は約 6 0 L の容積を有する。特定の実施形態において、第 1 のバイオリアクターは、約 5 0 L の容積を有する。特定の実施形態において、第 1 のバイオリアクターの培養液からの C H O 細胞を使用して、生産バイオリアクターの培養液が接種される。特定の実施形態において、生産バイオリアクターは、約 1 8 0 L、約 1 8 5 L、約 1 9 0 L、約 1 9 5 L、約 2 0 0 L、約 2 0 5 L、約 2 1 0 L、約 2 1 5 L、又は約 2 2 0 L の容積を有する。特定の実施形態において、生産バ

イオリアクターの最終的な培養液容積は約180Lである。特定の実施形態において、CHO細胞は、L-グルタミン（例えば、6mM L-グルタミン）を補足した成長培地で成長させる。特定の実施形態において、CHO細胞は、約37℃の温度で成長させる。特定の実施形態において、培養条件は、（例えば、グルコースに関して、乳酸塩に関して、pHに関して）毎日モニタされる。

【0288】

一部の実施形態において、生産バイオリアクターは、空気及び酸素を補足することによって培養液中の溶存酸素を調節する。一部の実施形態において、生産バイオリアクターは、二酸化炭素ガス及び／又は炭酸ナトリウムベースを加えることによってpHを調節する。一部の実施形態において、生産バイオリアクターは、目標細胞生存率に達するまで細胞密度及び生存率に関して毎日採取検査される。特定の実施形態において、目標細胞生存率は、約 1.0×10^6 生細胞/mL、約 1.1×10^6 生細胞/mL、約 1.2×10^6 生細胞/mL、約 1.3×10^6 生細胞/mL、約 1.4×10^6 生細胞/mL、約 1.5×10^6 生細胞/mL、約 1.6×10^6 生細胞/mL、約 1.7×10^6 生細胞/mL、約 1.8×10^6 生細胞/mL、約 1.9×10^6 生細胞/mL、又は約 2.0×10^6 生細胞/mLである。特定の実施形態において、目標細胞生存率は約 1.4×10^6 生細胞/mL超である。特定の実施形態において、目標細胞生存率に達した後、培養液回収のため温度を約37℃から約33℃にシフトさせる。特定の実施形態において、培養液は、生存率が約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%より高くなったときに回収される。特定の実施形態において、培養液は、生存率が約85%より高くなったときに回収される。特定の実施形態において、培養条件は、培養期間中毎日（例えば、グルコースに関して、乳酸塩に関して、pHに関して）モニタされる。特定の実施形態において、DF hIL12-Fc siの力価が、約8日目（例えば、6日目、7日目、8日目、9日目、又は10日目）から開始して、培養液中にてモニタされる。特定の実施形態において、培養液には、栄養供給濃縮物、濃縮グルコース溶液、及び／又は消泡剤が補足される。一部の実施形態において、細胞は、約7～約21日間、約8～約20日間、約9～約19日間、約10～約18日間、約11～約17日間、約12～約16日間、又は約11～約15日間にわたって培養される。特定の実施形態において、細胞は、約14日間にわたって培養される。

【0289】

一部の実施形態において、生産バイオリアクターは、本開示のタンパク質、例えば、DF hIL12-Fc siの精製前に深層ろ過によって清澄化される。特定の実施形態において、清澄化には、DOHC及びXOHCフィルタからなる二段階使い捨て深層ろ過システムが使用される。特定の実施形態において、ろ過前、生産バイオリアクター温度を約18℃に調整し、溶存酸素設定値を約70%飽和度に増加させる。特定の実施形態において、回収フィルタを注射用水(WFI)でリンスし、次に緩衝液で平衡化させる。一部の実施形態において、細胞懸濁液を蠕動ポンプを使用して回収フィルタに通過させて、そのフィルタをフラッシュすることにより生成物を収集する。特定の実施形態において、圧力がモニタされ、約25psig未満（例えば、約25psig未満、約20psig未満、又は約15psig未満）に維持される。次にろ液は0.45/0.2µm膜でろ過され、例えば滅菌バッグに保存される。

【0290】

一部の実施形態において、本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質、例えばDF hIL12-Fc siの精製は、3段階のクロマトグラフィーステップ及び2段階のウイルス除去ステップを含むか、又はそれからなる。特定の実施形態において、3段階クロマトグラフィーステップは、プロテインAキャプチャークロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーを含むか、又はそれからなる。特定の実施形態において、本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質、例えばDF hIL12-Fc siを含む清澄化された回収液は、プロテインAキャプチャークロマトグラフィーによって（例えば、プロテインA樹脂カラムを使用して）捕捉される。特定の実

施形態において、プロテインAキャプチャクロマトグラフィーは、工程関連不純物（例えば、DNA、宿主細胞タンパク質）、培地添加剤を除去し、及び容積の減量を可能にする。特定の実施形態において、初めにプロテインA樹脂カラムを20mMトリス、150mM NaClを含むpH約7.5の緩衝液で平衡化する。特定の実施形態において、ロードした後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄して未結合の、又は緩く結合した不純物を除去する。特定の実施形態において、初回洗浄後、50mM酢酸塩を含むpH約5.4の緩衝液でカラムを2回目に洗浄する。特定の実施形態において、2回目洗浄によってpHを下げ、カラムを溶出用に調製する。特定の実施形態において、DF hIL12-Fc siは、50mM酢酸塩、100mMアルギニンを含むpH約3.7の緩衝液で溶出する。特定の実施形態において、DF hIL12-Fc siは、280nm UV波長によって1.25AU/cm上昇から開始して、次に1.25AU/cm下降で終了するまで収集する。特定の実施形態において、溶出液は1つのプールに収集し、各カラムサイクルは低pHウイルス不活性化によって個別に処理する。

【0291】

特定の実施形態において、ウイルス除去ステップは、低pH不活性化及びナノろ過を含む。特定の実施形態において、プロテインA溶出液を低pHでインキュベートすることにより、潜在的に存在する可能性のあるウイルスを不活性化させる。特定の実施形態において、溶出液のpHを酢酸、例えば0.5M酢酸で調整し、少なくとも30分間、少なくとも35分間、少なくとも40分間、少なくとも45分間、少なくとも50分間、少なくとも55分間、少なくとも60分間、少なくとも65分間、少なくとも70分間、少なくとも75分間、少なくとも80分間、少なくとも85分間、又は少なくとも90分間インキュベートする。特定の実施形態において、溶出液のpHを酢酸、例えば0.5M酢酸で調整し、少なくとも60分間インキュベートする。特定の実施形態において、酢酸はpHを約3.55~3.75、例えば、約3.60~3.70、又は約3.65に調整する。特定の実施形態において、酢酸はpHを約3.65に調整する。特定の実施形態において、低pHでのインキュベーション後、pHを例えばトリス塩基で、例えば2Mトリス塩基で上昇させる。特定の実施形態において、pHを約5.1、約5.2、又は約5.3の中性pHにまで上昇させる。特定の実施形態において、プロテインA溶出液を0.2µmろ過アセンブリに通してろ過する。特定の実施形態において、低pH不活性化はナノろ過よりも前に行われる。特定の実施形態において、ナノろ過は低pH不活性化よりも前に行われる。

【0292】

一部の実施形態において、ウイルス除去ステップの後、プールを中間デプスフィルタ、例えばXOSP中間デプスフィルタでろ過する。特定の実施形態において、DF hIL12-Fc siは、約500~約1000g/m²（例えば、約400~約1100g/m²、約450~約1050g/m²、約500~約1000g/m²）の範囲でロードされる。特定の実施形態において、混合モードクロマトグラフィー前に、XOSPプールの電気伝導率をpH約5.2の酢酸塩で、例えば50mM酢酸塩で6.0mS/cm未満に調整する。

【0293】

一部の実施形態において、混合モードクロマトグラフィーを実施することにより、高分子量（HMW）種を除去する。特定の実施形態において、カラムは、例えば、50mM酢酸塩を含むpH約5.2の緩衝液で平衡化させて、及びロードする。特定の実施形態において、ロードした後、カラムを、例えば、50mM酢酸塩及び250mM NaClを含むpH約5.2の緩衝液で洗浄する。特定の実施形態において、収集は280nm UV検出によって0.625AU/cm上昇から開始して、1.50AU/cm下降で終了する。特定の実施形態において、収集後、最終0.2µmフィルタを持つフィルタ列に各サイクル液を通過させる。

【0294】

一部の実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーを実施することにより、生

成物関連不純物（例えば、H M W種、低分子量（L M W）種）及び工程関連不純物を除去する。一部の実施形態において、各生成物ロットについて複数の陽イオン交換クロマトグラフィーサイクル（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回又はそれ以上のサイクル）を実施する。特定の実施形態において、サイクルは、例えば、50 mM トリスを含む pH 7.4 の緩衝液でプールし、希釈する。特定の実施形態において、プールされた試料は、塩基性溶液、例えばトリス、例えば2 M トリス塩基で約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、又は約7.7のpHに調整する。特定の実施形態において、プールされた試料は、約7.5のpHに調整する。特定の実施形態において、カラムは、50 mM トリスを含む pH 7.4 の緩衝液で平衡化させる。特定の実施形態において、溶出液は、50 mM トリスで約7.4のpH（緩衝液A）及び50 mM トリス及び0.5 M NaClで約7.4のpH（緩衝液B）のグラジエントを含む。特定の実施形態において、280 nm UV検出によって2.5 AU/cm上昇で開始して4.5 AU/cm下降で終了するまで、生成物収集を開始する。特定の実施形態において、収集後、最終0.2 µm フィルタを持つフィルタ列に各サイクル液を通過させる。

【0295】

一部の実施形態において、陽イオン交換クロマトグラフィーからサイクル液をナノろ過してウイルスを除去する。特定の実施形態において、初めに溶出液を前置フィルタ及び公称フィルタ（例えば、約20 nmの公称フィルタ）に通過させる。特定の実施形態において、このシステムを緩衝液、例えば、50 mM トリス及び265 mM NaClを含む pH 約7.4の緩衝液で平衡化させる。特定の実施形態において、ロードした後、このシステムを平衡化緩衝液、例えば、50 mM トリス及び265 mM NaClを含む約pH 7.4の緩衝液でリンスする。特定の実施形態において、ろ液を膜、例えば0.2 µm膜に通してろ過する。

【0296】

一部の実施形態において、ろ液を限外ろ過及びダイアフィルトレーション（UF/DF）にかける。特定の実施形態において、限外ろ過及びダイアフィルトレーションは、約20 kDa、約25 kDa、約30 kDa、約35 kDa、又は約40 kDaの分子量カットオフ膜を使用して実施する。特定の実施形態において、限外ろ過及びダイアフィルトレーションは、約30 kDaの分子量カットオフ膜を使用して実施する。特定の実施形態において、このシステムを、緩衝液、例えば、50 mM トリス及び265 mM NaClを含む pH 約7.4の緩衝液で平衡化させる。特定の実施形態において、ウイルスろ液プールを約5.0 g/Lの目標に濃縮する。特定の実施形態において、少なくとも7ダイアボリウム（例えば、7、8、又は9ダイアボリウム）の、20 mM クエン酸塩を含む pH 約6.5の緩衝液と緩衝液交換を実施する。一部の実施形態において、ダイアフィルトレーション後、約11.0 g/Lを目標とする第2の濃縮ステップを実施する。特定の実施形態において、この生成物をダイアフィルトレーション緩衝液で最終的な目標濃度の約7.5 g/Lに希釈する。

【0297】

一部の実施形態において、20 mM クエン酸塩、18% (w/v) スクロース、3% (w/v) マンニトール、0.03% (w/v) ポリソルベート80、pH 6.5ストック溶液を、原薬中20 mM クエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、0.01% (w/v) ポリソルベート80の最終濃度を目標としてUF/DFプールにスパイクする。

【0298】

特定の実施形態において、製剤化された保持液を例えば0.2 µm膜でろ過して最終的な原薬保存容器に入れる。特定の実施形態において、最終的な充填容積は約1.0 Lである。特定の実施形態において、最終的な原薬保存容器は、ポリプロピレン製の蓋付きの2 L ポリカーボネートボトルを含む。特定の実施形態において、各ボトルを無菌的に抜き取り検査し、表示を付し、及び-65℃未満（例えば、-65℃、-70℃、-75℃、-80℃、又はそれ以下）で凍結する。

【0299】

(ii) 薬物製品の調製

一部の実施形態において、本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質、例えばDF h IL12-Fc siを含む凍結原薬は、暗所下に約2～8℃で96時間超（例えば、96時間、120時間、144時間、168時間、又はそれ以上）にわたって解凍する。特定の実施形態において、20mMクエン酸塩、6%（w/v）スクロース、1%（w/v）マンニトール、0.01%ポリソルベート80（w/v）からなるpH6.0の緩衝液を調製する。特定の実施形態において、緩衝液は、固体クエン酸ナトリウム二水和物、クエン酸一水和物、スクロース、及びマンニトールを注射用水（WFI）に加え、溶解するまで混合することによって調製する。特定の実施形態において、薬物製品中のクエン酸塩は、固体クエン酸ナトリウム二水和物及び／又はクエン酸一水和物を含むか、又はそれからなる。一部の実施形態において、ポリソルベート80ストック溶液はWFI中に調製して緩衝液に加える。特定の実施形態において、緩衝液の許容pHは、約6.5±0.4（例えば、pH6.1、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、pH6.8、又はpH6.9）である。特定の実施形態において、緩衝液をWFIで希釈し、約6.5±0.4（例えば、pH6.1、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、pH6.8、又はpH6.9）の許容pH及び重量オスモル濃度に関して検査する。特定の実施形態において、緩衝液を膜、例えば0.2µm膜に通してろ過する。

10

【0300】

一部の実施形態において、原薬の重量を用いて目標バッチ容積を計算する。特定の実施形態において、カーboy（例えば、10Lカーboy）内の緩衝液に、計算したバッチ容積の約80%まで原薬を加え、混合する。特定の実施形態において、この80%薬物製品溶液を約6.5±0.3（例えば、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、又はpH6.8）の許容pH許容に関して試験する。特定の実施形態において、80%薬物製品溶液をタンパク質濃度に関して、280nmの吸光度により1.44L/（g×cm）の消衰係数を用いて試験する。

20

【0301】

一部の実施形態において、緩衝液成分は、約6.5のpHが生じるように設計する。特定の実施形態において、緩衝液ステップでは、pHを約6.5±0.4（例えば、pH6.1、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、pH6.8、又はpH6.9）の許容pHの範囲内に至らせるため、1N水酸化ナトリウム又は1N塩酸による滴定を実施し得る。特定の実施形態において、80%バルク薬物製品ステップでは、pHを約6.5±0.3（例えば、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、又はpH6.8）の許容pHの範囲内に至らせるため、1N水酸化ナトリウム又は1N塩酸による滴定を実施し得る。

30

【0302】

一部の実施形態において、本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質、例えばDF h IL12-Fc siの目標濃度は、約1mg/mLである。一部の実施形態において、タンパク質濃度は、許容判定基準1.0±0.2mg/mL（例えば、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL）として、280nmの吸光度によって確かめる。一部の実施形態において、試料を採取して、約6.5±0.3（例えば、pH6.2、pH6.3、pH6.4、pH6.5、pH6.6、pH6.7、又はpH6.8）の許容pH及び重量オスモル濃度を確認する。

40

【0303】

一部の実施形態において、化合物化したバルク薬物製品溶液をバイオバーデン低減のためフィルタ、例えば滅菌0.2µmフィルタに通過させて、カーboy、例えば10Lカーboyに入れ、滅菌ろ過及び充填まで保っておく。

【0304】

一部の実施形態において、各フィルタカプセルが0.45µmポリエーテルスルホン（

50

PES) プレフィルター膜及び $0.2\ \mu\text{m}$ PES 滅菌膜からなる連続した2つのフィルタカプセルにバルク薬物製品を通すことにより、ろ過を行う。特定の実施形態において、薬物製品をろ過し、充填特別室の制御下にあるグレードBエリアにて滅菌ディスポーザブル充填バッグに入れる。特定の実施形態において、滅菌フィルタカプセルは両方とも、WFIを使用した、許容判定基準を 3200 mbar 超とするろ過後の泡立ち点により、完全性に関して試験する。

【0305】

一部の実施形態において、バルク薬物製品溶液は、アクセス制限バリアシステム (restricted access barrier システム: RABS) のすぐ外側にあるディスポーザブルバッグから充填する。特定の実施形態において、製品は、バイアル、例えば、既製の2Rホウケイ酸I型バイアルに充填する。

【0306】

特定の実施形態において、バイアルを例えば滅菌 13 mm ゴムセラム栓で打栓し、 13 mm アルミシールを巻き締める。特定の実施形態において、バイアルの充填容積は、 $1.3\text{ mL} \pm 5\%$ (即ち、 $1.235\text{ mL} \sim 1.365\text{ mL}$) である。特定の実施形態において、バイアルを $2 \sim 8^\circ\text{C}$ の保存場所に移す。特定の実施形態において、バイアルは 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、又は 8°C で保存する。

【0307】

(k) 医薬製剤

本開示はまた、本明細書に記載されるタンパク質の有効量を含有する医薬組成物も特徴とする。この組成物は、種々の薬物送達システムでの使用向けに製剤化することができる。1つ以上の生理学的に許容可能な賦形剤又は担体もまた、適切な製剤となるように、組成物中に含めることができる。用語「賦形剤」は、本明細書で使用されるとき、所望の物理的又は化学的特性、例えば、pH、容量オスモル濃度、粘度、清澄性、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸着性、又は透過性を付与するために製剤に加えられる任意の非治療用薬剤を意味する。

【0308】

(i) 賦形剤及び pH

本発明の医薬製剤中の1つ以上の賦形剤は、緩衝剤を含む。用語「緩衝剤」は、本明細書で使用されるとき、水溶液に加えると、酸又はアルカリの添加時の、又は溶媒による希釈に伴う pH の変動から溶液を保護する能力を持つ1つ以上の成分を指す。リン酸緩衝液に加えて、グリシン酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン緩衝液などを使用することができ、その場合、ナトリウム、カリウム又はアンモニウムイオンが対イオンとして働き得る。

【0309】

特定の実施形態において、緩衝液又は緩衝系とは、pH $5.5 \sim 7.4$ の範囲と全面的に又は部分的に重複する緩衝作用範囲を有する少なくとも1つの緩衝液を含む。特定の実施形態において、緩衝液は、約 6.5 ± 0.5 の pKa を有する。特定の実施形態において、緩衝液は、クエン酸塩緩衝液を含む。具体的な実施形態において、クエン酸塩緩衝液は、クエン酸ナトリウム二水和物及びクエン酸一水和物を含む。特定の実施形態において、クエン酸塩は、約 $5 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $10 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $15 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $20 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $5 \sim 50\text{ mM}$ 、約 $10 \sim 50\text{ mM}$ 、約 $15 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $20 \sim 100\text{ mM}$ 、約 $5 \sim 25\text{ mM}$ 、約 $10 \sim 25\text{ mM}$ 、約 $15 \sim 25\text{ mM}$ 、約 $20 \sim 25\text{ mM}$ 、約 $5 \sim 20\text{ mM}$ 、約 $10 \sim 20\text{ mM}$ 、又は約 $15 \sim 20\text{ mM}$ の濃度で存在する。特定の実施形態において、クエン酸塩は、約 5 mM 、約 10 mM 、約 15 mM 、約 20 mM 、約 25 mM 、又は約 50 mM の濃度で存在する。特定の実施形態において、クエン酸塩は、 20 mM の濃度で存在する。

【0310】

本発明の医薬製剤は、 $6.0 \sim 7.0$ の pH を有し得る。例えば、特定の実施形態において、医薬製剤は、 $6.0 \sim 7.0$ (即ち、 6.5 ± 0.5)、 $6.1 \sim 6.9$ (即ち、

10

20

30

40

50

6.5±0.4)、6.2~6.8(即ち、6.5±0.3)、6.3~6.7(即ち、6.5±0.2)、6.4~6.6(即ち、6.5±0.1)、又は6.45~6.65(即ち、6.5±0.05)のpHを有する。特定の実施形態において、医薬製剤は、約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、又は約7.0のpHを有する。特定の実施形態において、医薬製剤は、6.5のpHを有する。科学的な丸め規則に基づき、6.45以上6.55以下のpHは6.0と丸める。

【0311】

特定の実施形態において、医薬製剤の緩衝系は、6.5±0.2のpHで10~25mMのクエン酸塩を含む。特定の実施形態において、医薬製剤の緩衝系は、6.5±0.2のpHで20mMのクエン酸塩を含む。特定の実施形態において、医薬製剤の緩衝系は、6.5±0.05のpHで10~25mMのクエン酸塩を含む。特定の実施形態において、医薬製剤の緩衝系は、6.5±0.05のpHで20mMのクエン酸塩を含む。

【0312】

本発明の医薬製剤中の1つ以上の賦形剤は、糖又は糖アルコールを更に含む。糖及び糖アルコールは、医薬製剤中で熱安定剤として有用である。特定の実施形態において、医薬製剤は、糖、例えば、単糖(例えば、グルコース、キシロース、又はエリスリトール)、二糖(例えば、スクロース、トレハロース、マルトース、又はガラクトース)、又はオリゴ糖(例えば、スタキオース)を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、スクロースを含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、糖アルコールを含む、例えば、単糖に由来する糖アルコール(例えば、マンニトール、ソルビトール、又はキシリトール)、二糖に由来する糖アルコール(例えば、ラクチトール又はマルチトール)、又はオリゴ糖に由来する糖アルコール。具体的な実施形態において、医薬製剤は、マンニトールを含む。

【0313】

製剤中に含まれる糖又は糖アルコールの量は、製剤が使用される具体的な状況及び意図される目的に応じて変わり得る。特定の実施形態において、医薬製剤は、0%w/v~約12%w/v、約1%w/v~約11%w/v、約2%w/v~約10%w/v、約3%w/v~約9%w/v、約3%w/v~約12%w/v、約4%w/v~約8%w/v、又は約5%w/v~約7%w/vの糖又は糖アルコールを含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、0%w/v~約2%w/v、約0.5%w/v~約1.5%w/v、約0.6%w/v~約1.4%w/v、約0.7%w/v~約1.3%w/v、約0.8%w/v~約1.2%w/v、又は約0.9%w/v~約1.1%w/vの糖又は糖アルコールを含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約0%w/v、約0.5%w/v、約1%w/v、約2%w/v、約3%w/v、約4%w/v、約5%w/v、約6%w/v、約7%w/v、約8%w/v、約9%w/v、又は約10%w/vの糖又は糖アルコールを含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約6%w/vの糖又は糖アルコール(例えば、スクロース)を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約1%w/vの糖又は糖アルコール(例えば、マンニトール)を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約6%w/vの糖又は糖アルコール(例えば、スクロース)及び約1%w/vの第2の糖又は糖アルコール(例えば、マンニトール)を含む。

【0314】

本明細書に開示される医薬製剤中の1つ以上の賦形剤は、界面活性剤を更に含む。用語「界面活性剤」は、本明細書で使用されるとき、疎水性部分(例えば、アルキル鎖)及び親水性部分(例えば、カルボキシル及びカルボキシレート基)の両方を持つ界面活性分子を指す。界面活性剤は、医薬製剤中で、治療用タンパク質の凝集を低減するために有用である。医薬製剤中での使用に好適な界面活性剤は、概して非イオン性界面活性剤であり、限定はされないが、ポリソルベート類(例えば、ポリソルベート20又は80)；ポロキサマー類(例えば、ポロキサマー188)；ソルビタンエステル類及び誘導体；トリトン(Triton)；ラウリル硫酸ナトリウム(sodium laurel sulfate)；オクチルグルコシドナトリウム(sodium octyl glycoside)

；ラウリルスルホベタイン (sulfobetaine)、ミリスチルスルホベタイン (sulfobetaine)、リノレイルスルホベタイン (sulfobetaine)、又はステアリルスルホベタイン (sulfobetaine)；ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン又はステアリルサルコシン；リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、又はセチルベタイン；ラウリン酸アミドプロピルベタイン、コカミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピル (palmidopropyl) ベタイン、又はイソステアラミドプロピルベタイン (例えば、ラウロアミドプロピル (lauroamidopropyl))；ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピル (palmidopropyl) ジメチルアミン、又はイソステアラミドプロピルジメチルアミン；ココイルメチルタウリン酸ナトリウム、又はメチルオレイルタウリン酸二ナトリウム；及びMONAQUATTMシリーズ (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.)、ポリエチレングリコール、ポリプロピルグリコール (polypropyl glycol)、及びエチレン・プロピレングリコール共重合体 (例えば、プルロニック (Pluronic)、PF68等) が挙げられる。特定の実施形態において、界面活性剤はポリソルベートである。特定の実施形態において、界面活性剤はポリソルベート80である。

【0315】

本発明の医薬製剤中に含まれる非イオン性界面活性剤の量は、製剤の所望される具体的な特性、並びに製剤の使用が意図される詳細な状況及び目的に応じて異なり得る。特定の実施形態において、医薬製剤は、0.005%～約0.5%、約0.005%～約0.2%、約0.005%～約0.1%、約0.005%～約0.05%、約0.005%～約0.02%、約0.005%～約0.01%、約0.01%～約0.5%、約0.01%～約0.2%、約0.01%～約0.1%、約0.01%～約0.05%、又は約0.01%～約0.02%の非イオン性界面活性剤 (例えば、ポリソルベート80) を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約0.005%、約0.01%、約0.02%、約0.03%、約0.04%、約0.05%、約0.06%、約0.07%、約0.08%、約0.09%、約0.1%、約0.15%、約0.2%、約0.25%、約0.3%、約0.35%、約0.4%、約0.45%、又は約0.5%の非イオン性界面活性剤 (例えば、ポリソルベート80) を含む。

【0316】

本発明の医薬製剤は、増量剤又は保存剤など、1つ以上の他の物質を更に含み得る。「増量剤」は、凍結乾燥混合物に質量を加える化合物であり、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する (例えば、開放気孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの作製が容易となる)。具体例となる増量剤としては、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコール及びソルビトールが挙げられる。本発明の凍結乾燥製剤は、かかる増量剤を含有し得る。保存剤は、細菌作用を低減し、例えば、複数回使用 (複数回投与) 製剤の作製が容易となり得る。

【0317】

(ii) 例示的製剤

特定の実施形態において、本発明の医薬製剤は、pH 6.0～7.0で、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質、クエン酸塩、糖 (例えば、スクロース)、糖アルコール (例えば、マンニトール)、及びポリソルベート (例えば、ポリソルベート80) を含む。

【0318】

特定の実施形態において、医薬製剤は、pH 6.5～7.5で、0.5～1.5 mg/mLのヘテロ二量体Fc融合タンパク質、10～30 mMのクエン酸塩、4% w/v～8% w/vの糖 (例えば、スクロース)、0.5% w/v～1.5% w/vの糖アルコール (例えば、マンニトール)、及び0.005%～0.05%のポリソルベート (例えば、ポリソルベート80) を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、pH 6.0～7.0で、0.5～1.5 mg/mLのヘテロ二量体Fc融合タンパク質、20 mMのクエン

酸塩、6%w/vの糖（例えば、スクロース）、0.5%w/v～1.5%w/vの糖アルコール（例えば、マンニトール）、及び0.01%のポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、pH6.3～6.7で、0.5～1.5mg/mLのヘテロ二量体Fc融合タンパク質、20mMのクエン酸塩、6%w/vの糖（例えば、スクロース）、1%w/vの糖アルコール（例えば、マンニトール）、及び0.01%のポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、pH6.45～6.55で、0.5～1.5mg/mLのヘテロ二量体Fc融合タンパク質、20mMのクエン酸塩、6%w/vの糖（例えば、スクロース）、1%w/vの糖アルコール（例えば、マンニトール）、及び0.01%のポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）を含む。

10

【0319】

(iii) ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び製剤の安定性

本発明の医薬製剤は、高度な安定性を呈する。医薬製剤は、製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が規定の条件下での保存後に許容できる程度の物理的特性、化学構造、及び／又は生物学的機能を保持しているとき、安定している。特定の実施形態において、医薬製剤は澄明な液体であり、目に見える粒子状物質を含まない。特定の実施形態において、熱安定性は、5℃、50℃で、凍結融解サイクル後に（例えば、5回の凍結融解サイクル後に）試験する。

【0320】

安定性は、規定の温度で規定の時間長さにわたって保存した後に未変性のコンホメーションを保持している製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の割合を決定することにより測定し得る。未変性のコンホメーションにあるタンパク質の割合は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー、SEC-HPLC）によって決定することができ、ここでは未変性のコンホメーションにあるタンパク質は、凝集していないか（高分子量画分に溶出する）、又は分解している（低分子量画分に溶出する）。特定の実施形態において、2～8℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、又は約99%超のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が未変性コンホメーションを有する。特定の実施形態において、凍結融解後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、又は約99%超のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が未変性コンホメーションを有する。特定の実施形態において、50℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約75%超、約76%超、約77%超、約78%超、約79%超、約80%超、約81%超、約82%超、約83%超、約84%超、又は約85%超のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が未変性コンホメーションを有する。特定の実施形態において、2～8℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、約0.9%未満、又は約1%未満のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が高分子量複合体を形成する（即ち、未変性タンパク質よりも高い分子量を有する）。特定の実施形態において、50℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、又は約1%未満のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が高分子量複合体を形成する（即ち、未変性タンパク質よりも高い分子量を有する）。特定の実施形態において、凍結融解後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、約0.9%未満、又は約1%未満のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が高分子量複合体を形成する（即ち、未変性タンパク質よりも高い分子量を有する）。特定の実施形態において、2～8℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したとき、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.3%未満、約0.4%未満、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、約0.9%未満、又は約1%未満のヘテロ二量体Fc融合

20

30

40

50

タンパク質が分解される（即ち、未変性タンパク質よりも低い分子量を有する）。特定の
実施形態において、50℃で2週間インキュベートした後、サイズ排除クロマトグラフィー
により決定したとき、約1%未満、約1.5%未満、約2%未満、約2.5%未満、又は
約3%未満のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が分解される（即ち、未変性タンパク質
よりも低い分子量を有する）。特定の実施形態において、凍結融解後、サイズ排除クロマ
トグラフィーにより決定したとき、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.3%未満、
約0.4%未満、約0.5%未満、約0.6%未満、約0.7%未満、約0.8%未満、
約0.9%未満、又は約1%未満のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が分解される（即ち
、未変性タンパク質よりも低い分子量を有する）。

【0321】

SEC-HPLCは、主ピークに占めるタンパク質、例えば、ヘテロ二量体Fc融合タ
ンパク質のパーセンテージにより、医薬製剤の純度の尺度を提供することができる。純度
プロファイルは、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピー
クの面積によって決定される。一部の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは
、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96
%超、約97%超、約98%超、又は約99%超である。特定の実施形態において、医薬
製剤の純度プロファイルは、約99.0%である。一部の実施形態において、医薬製剤の
純度プロファイルは、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、約75%超、約
80%超、約81%超、約82%超、約83%超、約84%超、又は約85%超である。
特定の実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、約85.2%である。一部の
実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、医薬製剤を5回の凍結融解サイク
ルに供した後、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%
超、約96%超、約97%超、約98%超であるか、又は約98.5%より高い。特定の
実施形態において、医薬製剤の純度プロファイルは、約98.9%である。

【0322】

安定性はまた、タンパク質溶液のパラメータを動的光散乱法によって決定することによ
っても測定し得る。Z平均値及び多分散性指数(PDI)値が、溶液中の平均粒径を指示
し、これらの測定値は、溶液中に凝集体が存在すると増加する。モノマー%Pd値は、検
出された異なるモノマーの広がり指示し、ここでは低い値ほど単分散溶液を指示し、こ
れは好ましい。DLSによって検出されるモノマー径は、主な集団がモノマーであることを
確認するにおいて、及び存在し得る任意の高次凝集体を特徴付けるために有用である。
特定の実施形態において、2~8℃で2週間インキュベートした後に、医薬製剤のZ平均
値は5%、10%、又は15%を超えて増加しない。特定の実施形態において、凍結融解
後、医薬製剤のZ平均値は2倍、3倍、4倍、又は5倍を超えて増加しない。特定の実施
形態において、医薬製剤のZ平均値は、50℃で2週間インキュベートした後、約10%
を超えて、約20%を超えて、約30%を超えて、約40%を超えて、約50%を超えて
、約60%を超えて、約70%を超えて、約80%を超えて、約90%を超えて、約10
0%を超えて、約150%を超えて、又は約200%超を超えて増加しない。一部の実施
形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、25℃で動的光散乱法
により測定したとき、約15nm未満、約14nm未満、約13nm未満、又は約12n
m未満のZ平均流体力学直径を有する。具体的な実施形態において、医薬製剤中のヘテロ
二量体Fc融合タンパク質は、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約11.6n
m未満のZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形態において、医薬製剤を50℃で2
週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、医薬製剤中のヘ
テロ二量体Fc融合タンパク質は、約20nm未満、約19nm未満、約18nm未満、
約17nm未満、約16nm未満、約15.5nm未満、約15nm未満、又は約14.5nm未
満のZ平均流体力学直径を有する。具体的な実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量
体Fc融合タンパク質は、約14.4nmのZ平均流体力学直径を有する。一部の実施形
態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、医薬製剤を5回の凍結融
解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約20nm未満、約

19 nm未満、約18 nm未満、約17 nm未満、約16.5 nm未満、約16 nm未満、又は約15.5 nm未満のZ平均流体力学直径を有する。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約15.3 nmのZ平均流体力学直径を有する。

【0323】

特定の実施形態において、医薬製剤のPDI値は、2～8℃で2週間インキュベートした後、約2倍、約3倍、約4倍、又は約5倍を超えて増加しない。特定の実施形態において、医薬製剤のPDI値は、凍結融解後、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、又は約6倍を超えて増加しない。特定の実施形態において、医薬製剤のPDI値は、50℃で2週間インキュベートした後、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、又は約6倍を超えて増加しない。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、約0.27未満、約0.26未満、又は約0.25未満である。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.26である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、約0.27未満、又は約0.26未満である。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.25である。一部の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.40未満、約0.35未満、又は約0.34未満である。特定の実施形態において、医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の多分散性指数は、約0.33である。

【0324】

安定性はまた、タンパク質溶液の熱安定性を示差走査型蛍光定量法(DSF)により決定することによっても測定し得る。DSFによれば、様々な試験条件下、例えば、緩衝液又はpHでのタンパク質の熱変性温度及び安定性の変化を定量化することが可能である。一部の実施形態において、DSFは、2つの熱アンフォールディング温度(融解温度としても知られる)、 T_{m1} 及び T_{m2} を提供する。特定の実施形態において、医薬製剤の T_{m1} は、約60℃より高い、約61℃より高い、約62℃より高い、約63℃より高い、約64℃より高い、約65℃より高い、又は約66℃より高い。特定の実施形態において、医薬製剤の T_{m1} は、約70℃より高い、約71℃より高い、約72℃より高い、約73℃より高い、約74℃より高い、約75℃より高い、約76℃より高い、又は約77℃より高い。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約67.0℃の T_{m1} 及び約77.3℃の T_{m2} によって定義される熱安定性プロファイルを有する。特定の実施形態において、 T_{m1} 及び/又は T_{m2} は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、2℃未満、1.5℃未満、又は1℃未満しか変化しない。具体的な実施形態において、 T_{m1} は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、1℃未満しか変化しない。具体的な実施形態において、 T_{m2} は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、1℃未満しか変化しない。

【0325】

一部の実施形態において、DSFは、タンパク質凝集が起こり始める温度、 T_{agg} を提供する。一部の実施形態において、医薬製剤の T_{agg} は、60℃より高い、約61℃より高い、約62℃より高い、約63℃より高い、約64℃より高い、約65℃より高い、約66℃より高い、又は約67℃より高い。特定の実施形態において、 T_{agg} は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、約2℃未満、1.5℃未満、又は約1℃未満しか変化しない。特定の実施形態において、 T_{agg} は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、

5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、約2℃未満、約1.5℃未満、又は約1℃未満しか変化しない。特定の実施形態において、T_{agg}は、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートしたとき、5℃で1週間インキュベートされる同じ医薬製剤と比較すると、約1℃未満しか変化しない。

【0326】

一部の実施形態において、医薬製剤の安定性の決定にpHが用いられる。一部の実施形態において、医薬製剤のpHは、医薬製剤を5℃で1週間インキュベートした後、約0.25、約0.2、約0.15、又は約0.1を超えるpH値の変化を示さない。特定の実施形態において、医薬製剤を5℃で1週間インキュベートした後、医薬製剤のpHは、約0.2又は約0.1のpH値より大きく変化しない。一部の実施形態において、医薬製剤のpHは、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートした後、約0.25、約0.2、約0.15、又は約0.1を超えるpH値の変化を示さない。特定の実施形態において、医薬製剤を50℃で1週間インキュベートした後、医薬製剤のpHは、約0.2又は約0.1のpH値より大きく変化しない。

【0327】

医薬製剤中のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の安定性を決定する例示的方法は、本開示の実施例24に記載される。

【0328】

(iv) 投薬形態

医薬製剤は、液体製剤又は凍結乾燥形態として調製及び保存することができる。特定の実施形態において、医薬製剤は澄明な無色の溶液であり、目に見える粒子状物質を含まない。特定の実施形態において、医薬製剤は、2～8℃（例えば、4℃）で保存される液体製剤、-20℃以下で保存される凍結製剤、又は-65℃以下で保存される凍結製剤である。製剤中には、凍結乾燥保護剤として糖及び／又は糖アルコールが使用される。

【0329】

医薬品としての使用前に、医薬製剤は、投与経路に好適な水性担体中に希釈され、又は再構成され得る。他の例示的担体としては、滅菌注射用水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンゲル溶液、又はデキストロース溶液が挙げられる。例えば、医薬製剤が投与に向けて調製されるとき、医薬製剤は0.9%塩化ナトリウム（NaCl）溶液中に希釈され得る。具体的な実施形態において、医薬製剤、医薬製剤は、0.01%ポリソルベート80を含む0.9%塩化ナトリウム（NaCl）溶液中に希釈される。特定の実施形態において、希釈された医薬製剤は等張性であり、皮下注射による投与に好適である。

【0330】

医薬製剤は、保存に好適な濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約0.1～約2mg/mL、約0.2～約1.8mg/mL、約0.3～約1.7mg/mL、約0.4～約1.6mg/mL、約0.5～約1.5mg/mL、約0.6～約1.4mg/mL、約0.7～約1.3mg/mL、約0.8～約1.2mg/mL、又は約0.9～約1.1mg/mLの濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約0.1mg/mL、約0.2mg/mL、約0.3mg/mL、約0.4mg/mL、約0.5mg/mL、約0.6mg/mL、約0.7mg/mL、約0.8mg/mL、約0.9mg/mL、約1mg/mL、約2mg/mL、約2.5mg/mL、約3mg/mL、約3.5mg/mL、約4mg/mL、約4.5mg/mL、約5mg/mL、又は約10mg/mLの濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

【0331】

特定の実施形態において、医薬製剤は、約1g/L～約10g/L、約2g/L～約8g/L、約4g/L～約6g/L、又は約5g/Lのバルク濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約1g/L、約2g/L、約3g/L、約4g/L、約5g/L、約6g/L、約7g/L、約8g/L、約9g/L

、又は約 10 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約 5 g/L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約 0.5 g/L ～ 約 2 g/L、約 0.75 g/L ～ 約 1.5 g/L、又は約 0.9 g/L ～ 約 1.1 g/L の投与濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約 0.5 g/L、約 0.6 g/L、約 0.7 g/L、約 0.8 g/L、約 0.9 g/L、約 1 g/L、約 1.1 g/L、約 1.2 g/L、約 1.3 g/L、約 1.4 g/L、約 1.5 g/L、又は約 2 g/L の投与濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約 1 g/L の投与濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。
【0332】

10

特定の実施形態において、医薬製剤は、容器（例えば、バイアル、バッグ、ペン、又はシリンジ）に包装される。特定の実施形態において、製剤は、凍結乾燥製剤又は液体製剤であってもよい。特定の実施形態において、容器内のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の量は、単回用量としての投与に好適である。特定の実施形態において、容器内のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の量は、複数回用量での投与に好適である。特定の実施形態において、医薬製剤は、約 0.1 ～ 約 10 mg の量のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約 0 ～ 約 2 mg、約 0.2 ～ 約 1.8 mg、約 0.3 ～ 約 1.7 mg、約 0.4 ～ 約 1.6 mg、約 0.5 ～ 約 1.5 mg、約 0.6 ～ 約 1.4 mg、約 0.7 ～ 約 1.3 mg、約 0.8 ～ 約 1.2 mg、又は約 0.9 ～ 約 1.1 mg の量のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、医薬製剤は、約 0.1 mg、約 0.2 mg、約 0.3 mg、約 0.4 mg、約 0.5 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 3 mg、約 4 mg、約 5 mg、又は約 10 mg の量のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む。具体的な実施形態において、医薬製剤は、約 1 mg の量のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質、例えば、DF-hIL-12-Fc si を含む。

20

【0333】

(l) 投薬量レジメン及び治療的使用

別の態様において、本開示は、癌の治療方法であって、それを必要としている対象に、初期3週間治療サイクルの1日目に本明細書に開示されるヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質（例えば、DF-hIL-12-Fc si）を投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、初期3週間治療サイクルの1日目に限り対象に投与される。

30

【0334】

特定の実施形態において、本方法は、それを必要としている対象に、初期3週間治療サイクルの1日目にヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を抗PD-1抗体、例えば、ペンブロリズマブと組み合わせて投与することを含む。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質及び抗PD-1抗体は、初期3週間治療サイクルの1日目に限り対象に投与される。特定の実施形態において、PD-1抗体の投与は、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の投与よりも前に行われる。

【0335】

特定の実施形態において、本方法は、対象に、初期治療サイクル後、1つ以上の後続の3週間治療サイクルでヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を投与することを更に含み、ここでヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、各後続の治療サイクルの1日目に投与される。後続の治療サイクルは、対象がヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の投与を3週間に1回又は4週間に1回受けるものであり、対象に一定レベルのヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を維持するように設計される。特定の実施形態において、対象は、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の投与を3週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、又は6週間に1回受ける。特定の実施形態において、対象は、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質の投与を6週間に1回、即ち、1治療サイクルおきに1回受ける。特定の実施形態において、対象は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15回の後続の治療サイクルを受ける。特定の実施形態において、対象は、癌が退縮する（即

40

50

ち、完全奏効)まで後続の治療サイクルを受ける。特定の実施形態において、対象は、進行した(即ち、切除不能な又は転移性の)黒色腫を有する。特定の実施形態において、対象は、進行した(即ち、切除不能な又は転移性の)腎細胞癌を有する。

【0336】

特定の実施形態において、本方法は、初期治療サイクル後、1回以上の後続の3週間治療サイクルでヘテロ二量体Fc融合タンパク質を抗PD-1抗体、例えば、ペンブロリズマブと組み合わせて対象に投与することを更に含み、ここでヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び抗PD-1抗体は、各後続の治療サイクルの1日目に投与される。後続の治療サイクルは、対象がヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び抗PD-1抗体の投与を3週間に1回受けるものであり、対象に一定レベルのヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び抗PD-1抗体を維持するように設計される。特定の実施形態において、対象は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15回の後続の治療サイクルを受ける。特定の実施形態において、抗PD-1抗体の投与は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与よりも前に行われる。特定の実施形態において、対象は、癌が退縮する(即ち、完全奏効)まで後続の治療サイクルを受ける。特定の実施形態において、対象は、進行した(即ち、切除不能な又は転移性の)尿路上皮癌を有する。

【0337】

特定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の1用量以上は、0.01~約3 µg/kg、約0.01~約0.02 µg/kg、約0.01~約0.05 µg/kg、約0.05~約0.1 µg/kg、約0.05~約0.5 µg/kg、約0.05~約0.75 µg/kg、約0.05~約1 µg/kg、約0.05~約1.5 µg/kg、約0.05~約2 µg/kg、約0.05~約2.5 µg/kg、約0.05~約3 µg/kg、約0.1~約3 µg/kg、約0.1~約1 µg/kg、約0.5~約1 µg/kg、約0.1~約2 µg/kg、約0.5~約2 µg/kg、約0.1~約0.5 µg/kg、約0.1~約0.25 µg/kg、約0.2~約1 µg/kg、約0.2~約2 µg/kg、約1~約1.2 µg/kg、約1~約1.5 µg/kg、約1~約2 µg/kg、約1~約2.5 µg/kg、約0.5~約2.5 µg/kg、約1~約3 µg/kg、又は約0.5~約3 µg/kgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の1用量以上は、約0.01 µg/kg、約0.02 µg/kg、約0.03 µg/kg、約0.04 µg/kg、約0.05 µg/kg、約0.1 µg/kg、約0.15 µg/kg、約0.2 µg/kg、約0.25 µg/kg、約0.3 µg/kg、約0.35 µg/kg、約0.4 µg/kg、約0.45 µg/kg、約0.5 µg/kg、約0.6 µg/kg、約0.7 µg/kg、約0.8 µg/kg、約0.9 µg/kg、約1 µg/kg、約1.2 µg/kg、約1.25 µg/kg、約1.3 µg/kg、約1.4 µg/kg、約1.5 µg/kg、約1.75 µg/kg、約2 µg/kg、約2.5 µg/kg、約3 µg/kg、約4 µg/kg、又は約5 µg/kgからなる群から選択される量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

【0338】

特定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の用量の各々が、0.01~約3 µg/kg、約0.01~約0.02 µg/kg、約0.01~約0.05 µg/kg、約0.05~約0.1 µg/kg、約0.05~約0.5 µg/kg、約0.05~約0.75 µg/kg、約0.05~約1 µg/kg、約0.05~約1.5 µg/kg、約0.05~約2 µg/kg、約0.05~約2.5 µg/kg、約0.05~約3 µg/kg、約0.1~約3 µg/kg、約0.1~約1 µg/kg、約0.5~約1 µg/kg、約0.1~約2 µg/kg、約0.5~約2 µg/kg、約0.1~約0.5 µg/kg、約0.1~約0.25 µg/kg、約0.2~約1 µg/kg、約0.2~約2 µg/kg、約1~約1.2 µg/kg、約1~約1.5 µg/kg、約1~約2 µg/kg、約1~約2.5 µg/kg、約0.5~約2.5 µg/kg、約1~約3 µg/kg、又は約0.5~約3 µg/kgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特

定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の用量の各々が、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される同じ量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

【0339】

特定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の用量の各々が、0.01～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約0.5～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、初期及び後続の治療サイクル中の用量の各々は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される同じ量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

【0340】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は皮下投与される。例えば、特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は皮下注射により、例えば、プレフィルドペン又はプレフィルドシリンジで投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約0.1 mL、約0.2 mL、約0.3 mL、約0.4 mL、約0.5 mL、約0.6 mL、約0.7 mL、約0.8 mL、約0.9 mL、約1 mL、約1.1 mL、又は約1.2 mLの容積で投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、約1 mLの容積で投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、最大2カ所の注射部位に（例えば、1カ所の注射部位、又は2カ所の注射部位に）投与される。具体的な実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、単回注射で投与される。具体的な実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、2回の注射で投与される。具体的な実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は2回の注射で投与され、2回目の注射は、1回目の注射後10分以内に完了される。

【0341】

特定の実施形態において、抗PD-1抗体、例えば、ペンブロリズマブは、静脈内投与される。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与よりも前に静脈内投与される。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、ヘテ

10

20

30

40

50

口二量体Fc融合タンパク質の投与の1時間前以内（例えば、5分、10分、15分、20分、25分、30分、35分、40分、45分、50分、55分、1時間前）に静脈内投与される。特定の実施形態において、PD-1抗体は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与と同時に静脈内投与される。

【0342】

本明細書に開示されるヘテロ二量体Fc融合タンパク質又は医薬製剤で治療し得る癌の種類としては、限定はされないが、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、膀胱癌、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌（RCC）、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、又はトリプルネガティブ乳癌が挙げられる。特定の実施形態において、癌は固形腫瘍である。特定の実施形態において、癌は局所進行又は転移性固形腫瘍である。特定の実施形態において、癌は黒色腫である。特定の実施形態において、癌は腎細胞癌である。特定の実施形態において、癌は尿路上皮膀胱癌である。特定の実施形態において、対象は、疾患の臨床的又は放射線学的エビデンスを有する。特定の実施形態において、対象は、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（RECIST）、第1.1版によって決定したとき、測定可能な疾患を有する。特定の実施形態において、本明細書に開示される医薬製剤は、単独療法として投与される。特定の実施形態において、本明細書に開示される医薬製剤は、組み合わせ療法として投与される。特定の実施形態において、完全奏効の確認が得られている対象（CR）は、打ち切り基準を満たさない限り、確認後少なくとも12ヵ月間にわたって医薬製剤で治療される。特定の実施形態において、複数回用量療法の総継続期間は、24ヵ月以下（例えば、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、12ヵ月、18ヵ月、24ヵ月）である。特定の実施形態において、複数回用量療法の総継続期間は24ヵ月を超える。

【0343】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法によって治療される対象は、進行性黒色腫を有する。特定の実施形態において、対象は、抗PD-1抗体による治療を少なくとも6週間にわたって受けており、病勢進行が確認されている。特定の実施形態において、対象はBRAF活性化変異を有し、BRAF阻害薬の投与を受けており、最終ラインの治療後に病勢進行を有する。特定の実施形態において、病勢進行は、放射線学的又は臨床的所見によって確認される。特定の実施形態において、対象はBRAF活性化変異を有しない。

【0344】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法によって治療される対象は、進行腎明細胞癌（RCC）を有する。特定の実施形態において、対象は明細胞成分を有する。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬、例えば抗PD-1/PD-L1抗体、又はVEGF療法による治療を単独療法として受けたことがある。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬、例えば抗PD-1/PD-L1抗体及びVEGF療法による治療を組み合わせで受けたことがある。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬、例えば抗PD-1/PD-L1抗体、及び白金系化学療法による治療を組み合わせで受けたことがある。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬、例えば抗PD-1/PD-L1抗体による治療を受けたことがない。特定の実施形態において、対象は、過去に3ラインを超える療法を受けたことがある。

【0345】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法によって治療される対象は、進行尿路上皮癌を有する。特定の実施形態において、進行尿路上皮癌は、転移性又は切除不能である。特定の実施形態において、対象は、尿路上皮（限定はされないが、腎盂、尿管、尿路上皮、及び尿道を含む）の組織学的又は細胞学的に確認された局所進行又は転移性移行上皮癌を有する。特定の実施形態において、対象は、ただ1つの白金含有レジメン（例えば、白金+別の薬剤、例えば、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ド

キソルピシン等)を受けたことがある。一部の実施形態において、対象は、手術不能局所進行性又は転移性尿路上皮癌に対する白金含有レジメンを1つしか受けたことがなく、補助薬としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内のX線所見進行を伴うか、又は再発を伴う。特定の実施形態において、対象は、チェックポイント阻害薬(CPI)(例えば、抗PD-1又は抗PD-L1)による治療を単独療法として、又は白金ベースの化学療法との組み合わせで受けたことがない。特定の実施形態において、対象は2ライン以下の選択療法を受けたことがある。特定の実施形態において、尿路上皮癌は、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なされる。

【0346】

一部の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01~約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01~約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01~約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05~約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1~約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1~約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5~約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1~約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5~約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1~約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1~約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2~約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2~約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1~約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1~約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1~約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1~約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5~約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1~約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約0.5~約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与を含む。特定の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される用量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与を含む。特定の実施形態において、投与される用量は、対象の体重を基準とする。特定の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、抗PD-1抗体、例えばペンブロリズマブ又はニボルマブを投与することを更に含む。

【0347】

一部の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0~約2mg、約0.2~約1.8mg、約0.3~約1.7mg、約0.4~約1.6mg、約0.5~約1.5mg、約0.6~約1.4mg、約0.7~約1.3mg、約0.8~約1.2mg、又は約0.9~約1.1mgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、又は約10mgからなる群から選択される量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、抗PD-1抗体、例えばペンブロリズマブ又はニボルマブを投与することを更に含む。具体的な実施形態において、癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、200mgの抗PD-1抗体、例えば、ペンブロリズマブ又はニボルマブを投与することを更に含む。

【0348】

一部の実施形態において、進行性黒色腫を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長

を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約0.5～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、進行性黒色腫を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される用量で投与される。

10

20

【0349】

一部の実施形態において、進行性黒色腫を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0～約2mg、約0.2～約1.8mg、約0.3～約1.7mg、約0.4～約1.6mg、約0.5～約1.5mg、約0.6～約1.4mg、約0.7～約1.3mg、約0.8～約1.2mg、又は約0.9～約1.1mgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、進行性黒色腫を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、又は約10mgからなる群から選択される量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

30

【0350】

一部の実施形態において、進行RCCを有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約0.5～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、進行RCCを有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.

40

50

2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される用量で投与される。

【0351】

一部の実施形態において、進行RCCを有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0～約2mg、約0.2～約1.8mg、約0.3～約1.7mg、約0.4～約1.6mg、約0.5～約1.5mg、約0.6～約1.4mg、約0.7～約1.3mg、約0.8～約1.2mg、又は約0.9～約1.1mgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、進行RCCを有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、又は約10mgからなる群から選択される量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

10

【0352】

一部の実施形態において、進行尿路上皮癌を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.01～約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1～約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5～約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約0.5～約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、進行尿路上皮癌を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からなる群から選択される用量で投与される。

20

30

【0353】

一部の実施形態において、進行尿路上皮癌を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0～約2mg、約0.2～約1.8mg、約0.3～約1.7mg、約0.4～約1.6mg、約0.5～約1.5mg、約0.6～約1.4mg、約0.7～約1.3mg、約0.8～約1.2mg、又は約0.9～約1.1mgの量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、進行尿路上皮癌を有する対象の癌を治療する方法又は腫瘍成長を阻害する方法における使用のための薬物送達製剤は、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、又は約10mgからなる群から選択される量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む。

40

【0354】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、その癌の治療のための療法を過去に受けたことがない。特定の実施形態において、本明細書に開

50

示される方法により治療される対象は、その癌の治療のための化学療法又は免疫療法を過去に受けたことがない。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、過去に療法（例えば、化学療法又は免疫療法）を受けたことがあるが、過去の療法にもかかわらず、引き続き癌の進行が認められる。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、過去に療法（例えば、化学療法又は免疫療法）を受けた後に癌の退縮が認められたが、後に癌の再発が認められた。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、過去の療法（例えば、化学療法又は免疫療法）に不耐容である。

【0355】

特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、実施例 26 及び 29 に記載される臨床試験コホート（例えば、用量漸増コホート、用量拡大コホート、黒色腫コホート、腎細胞癌コホート、尿路上皮癌コホート、又はペンブロリズマブ又はニボルマブとの組み合わせ療法コホート）の組入れ基準を全て満たしている。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法により治療される対象は、実施例 26 及び 29 に記載される除外基準のいずれにも該当しない。

【0356】

本明細書に開示されるヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、単独療法として、又は 1 つ以上の療法との組み合わせで使用することができる。特定の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、本明細書に開示される投薬量レジメンに従い単独療法として使用される。他の実施形態において、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、1 つ以上の療法と組み合わせて使用され、ここでヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質は、本明細書に開示される投薬量レジメンに従い投与され、1 つ以上の療法は、特定の癌を有する特定の対象の治療に好適であることが公知の投薬量レジメンに従い投与される。特定の実施形態において、本明細書に開示される治療方法は、一次病巣の外科的切除の補助療法として使用される。特定の実施形態において、一次病巣の外科的介入は、対象の癌細胞を溶解させること、腫瘍を除去すること、又は腫瘍を減量することを含む。

【0357】

ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と組み合わせて使用し得る例示的治療用薬剤としては、例えば、放射線照射、マイトマイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ビンクリスチン、エトポシド、クラドリビン、ミトブロニトール、メトトレキサート、ドキソルビシン、カルボコン、ペントスタチン、ニトラクリン、ジノスタチン、セトロレリクス、レトロゾール、ラルチトレキセド、ダウノルビシン、ファドロゾール、フォテムスチン、サイマルファシン、ソブゾキサン、ネダプラチン、シタラビン、ビカルタミド、ビノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリプチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトレチナート、イソトレチノイン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、プトシン、カルモフル、ラゾキサン、シゾフィラン、カルボプラチン、ミトラクトール、テガフル、イホスファミド、プレドニムスチン、ピシバニール、レバミゾール、テニポシド、インプロスルファン、エノシタビン、リスリド、オキシメトロン、タモキシフェン、プロゲステロン、メピチオスタン、エピチオスタノール、ホルメスタン、インターフェロン- α 、インターフェロン- 2α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ (IFN- γ)、コロニー刺激因子-1、コロニー刺激因子-2、デニロイキンジフチトクス、インターロイキン-2、黄体形成ホルモン放出因子及びそのコグネイト受容体への結合に差を呈し得るか、又は血清半減期が増加若しくは減少した前述の薬剤の変種が挙げられる。

【0358】

癌の治療において組み合わせ療法の一部として使用し得る別の薬剤クラスは、免疫チェックポイント阻害薬である。例示的免疫チェックポイント阻害薬には、(i) 細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (CTLA4)、(ii) プログラム細胞死タンパク質 1 (PD1)、(iii) PDL1、(iv) LAG3、(v) B7-H3、(vi) B7-H4、及び (vii) TIM3 のうちの 1 つ以上を阻害する薬剤が含まれる。CTLA4 阻害薬

10

20

30

40

50

イピリムマブは、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）により黒色腫の治療用に承認されている。

【0359】

癌の治療において組み合わせ療法の一部として使用し得る更に他の薬剤は、非チェックポイント標的を標的とするモノクローナル抗体薬剤（例えば、ハーセプチン）及び非細胞傷害性薬剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害薬）である。

【0360】

更に他のカテゴリーの抗癌剤には、例えば：（i）ALK阻害薬、ATR阻害薬、A2A拮抗薬、塩基除去修復阻害薬、Bcr-Ablチロシンキナーゼ阻害薬、ブルトンチロシンキナーゼ阻害薬、CDC7阻害薬、CHK1阻害薬、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子、DNA-PK阻害薬、DNA-PK及びmTORの両方の阻害薬、DNMT1阻害薬、DNMT1阻害薬+2-クロロデオキシアデノシン、HDAC阻害薬、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害薬、IDO阻害薬、JAK阻害薬、mTOR阻害薬、MEK阻害薬、MEK阻害薬、MTH1阻害薬、PARP阻害薬、ホスホイノシチド3-キナーゼ阻害薬、PARP1及びDHODHの両方の阻害薬、プロテアソーム阻害薬、トポイソメラーゼ-II阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬、VEGFR阻害薬、及びWEE1阻害薬から選択される阻害薬；（ii）OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25、又はICOSのアゴニスト；及び（iii）IL-12、IL-15、GM-CSF、及びG-CSFから選択されるサイトカインが含まれる。

【0361】

特定の実施形態において、単回用量又はそれ以上のヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質（例えば、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む）で治療される癌は、転移性癌である。特定の実施形態において、転移性癌は、局所、限局、又は遠隔転移性癌である。特定の実施形態において、単回又は複数回用量のヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質（例えば、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む）は、発生源の臓器又は組織の原発性癌でない及び／又は治療レジメンの直接的な標的でない遠隔の癌をアブスコパル効果によって治療する。特定の実施形態において、ヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質のアブスコパル効果は、放射線照射及び／又は化学療法を含む治療計画の間に、及び／又はその後に亢進する。特定の実施形態において、単回又は複数回用量のヘテロ二量体IL-12-Fc融合タンパク質（例えば、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む）は、例えば、患者の血清及び／又は腫瘍におけるIFN γ 、CXCL9、及び／又はCXCL10の発現の増加によって決定される全身性の抗腫瘍応答を誘導することによって患者の癌を治療する。

【0362】

組み合わせ療法

本発明の別の態様は、組み合わせ療法を提供する。本明細書に記載されるヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む医薬製剤は、癌の治療に追加の治療用薬剤と組み合わせて使用することができる。

【0363】

特定の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）は、癌と診断された対象を治療するため組み合わせ療法として投与される。特定の実施形態において、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、肝細胞癌、白血病、肺癌、リンパ腫、中皮腫、黒色腫、骨髄腫、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵癌、腎細胞癌（RCC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、脳癌、肉腫、神経芽細胞腫、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、メルケル細胞癌、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、トリ

プルネガティブ乳癌、又は頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）である。特定の実施形態において、癌は結腸癌である。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、結腸癌と診断された対象に組み合わせ療法として投与される。特定の実施形態において、癌は黒色腫である。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、黒色腫と診断された対象に組み合わせ療法として投与される。特定の実施形態において、癌は乳癌である。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、乳癌と診断された対象に組み合わせ療法として投与される。

【0364】

一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）は、進行悪性腫瘍の治療に、細胞傷害性化学療法；放射線療法；CTLA-4、PD-1、PD-L1、又はTGFB β など、抗腫瘍免疫応答に関わる分子を標的とする抗体；ADCCによって腫瘍関連抗原に作用する抗体；任意選択で、PD-1又はPD-L1を標的とする抗体と組み合わせて投与される、NKG2D、CD16、及び腫瘍関連抗原に結合する多重特異性抗体；テラーメイドの癌ワクチン；腫瘍溶解性癌ワクチン；及びPD-1又はPD-L1を標的とする抗体と組み合わせて投与されるテラーメイドのワクチンから選択される別の治療用薬剤と組み合わせて使用される。

【0365】

一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）は、悪性腫瘍（例えば、進行悪性腫瘍）の治療に、限定はされないが、NK標的化療法（例えば、CAR-NK療法）、抗体療法、チェックポイント阻害薬療法、追加のサイトカイン療法、自然免疫系アゴニスト療法、化学療法、標的薬療法、放射線療法、養子NK療法、幹細胞移植（SCT）療法、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法、T細胞受容体（TCR）改変療法、多特異性結合タンパク質（TriNKET）、細胞老化を誘導する薬剤、及びワクチン及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法を含めた別の療法と組み合わせて使用される。一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、悪性腫瘍（例えば、進行悪性腫瘍）の治療に、NK標的化療法（例えば、CAR-NK療法）、抗体療法、チェックポイント阻害薬療法、追加のサイトカイン療法、自然免疫系アゴニスト療法、化学療法、標的薬療法、放射線療法、養子NK療法、幹細胞移植（SCT）療法、アゴニスト抗体、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法、T細胞受容体（TCR）改変療法、多特異性結合タンパク質（TriNKET）、細胞老化を誘導する薬剤、及びワクチン及び／又は腫瘍溶解性ウイルス療法から選択される2つ以上の追加の療法と組み合わせて使用される。

【0366】

一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）は、完全に切除することのできる局所進行悪性腫瘍の治療に、癌ワクチン又はPD-1又はPD-L1を標的とする抗体と組み合わせて使用される。

【0367】

本発明のタンパク質はまた、一次病巣の外科的切除の補助療法としても使用することができる。

【0368】

本発明のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）及び追加の治療用薬剤の量並びに相対的な投与タイミングは、所望の組み合わせ治療効果が実現するように選択されてもよい。例えば、かかる投与を必要としている患者に組み合わせ療法を投与したとき、その組み合わせ中の治療用薬剤、治療用薬剤を含む医薬製剤、又は治療用薬剤を含む医薬組成物は、例えば、逐次的に、並行して、一緒に、同時になど、いずれの順序で投与されてもよい。更に、例えば、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、追加の治療用薬剤がその予防効果又は治療効果を発揮している最中

に投与されてもよく、又は逆もまた同様である。

【0369】

本明細書に開示されるとおり、本発明の方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）と追加の治療用薬剤との組み合わせの共投与を含む。本明細書に開示されるとおり、本発明の方法は、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤との組み合わせの共投与を含む。

【0370】

「共投与される」は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）と追加の治療用薬剤とが同時に与えられる方法、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤とが逐次的に与えられる方法、及びヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤とのいずれか一方、又はその両方が間欠的に又は継続的に与えられる方法、又は同時、逐次的、間欠的及び／又は継続的の任意の組み合わせを包含する。間欠的にはまた、ある薬剤の第1の投与と、次にそのまさしく同じ薬剤の後の時点での別の投与も含まれるため、当業者は、間欠的投与が必ずしも逐次的と同じでないことを認識するであろう。更に、間欠投与は、ある薬剤の第1の投与に、その第1の薬剤が再び投与される前に異なる薬剤の投与が割り込むことを実を含むため、当業者は、間欠投与にはまた、一部の実施形態において逐次投与も包含されることを理解する。更に、当業者にはまた、継続投与が、静脈内点滴（静脈内注入）又は栄養管等を含めた幾つもの経路によって達成され得ることも公知であろう。

【0371】

更に、及びより一般的な言い回しでは、用語「共投与される」は、対象へのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の個別の投与と追加の治療用薬剤の個別の投与とが任意の時間フレームの中で重複するありとあらゆる方法を包含する。

【0372】

対象へのヘテロ二量体Fc融合タンパク質又は追加の治療用薬剤の投与頻度は、当該技術分野においてQnd又はqndとして公知であり、ここではnが、当該薬剤の連続する投与についての日数単位の頻度である。例えば、Q3dであれば、3日に1回の薬剤の投与であり得る。特定の実施形態において、本方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方、又はこれらの任意の組み合わせをQ1d、Q2d、Q3d、Q4d、Q5d、Q6d、Q7d、Q8d、Q9d、Q10d、Q14d、Q21d、Q28d、Q30d、Q90d、Q120d、Q240d、又はQ365dで対象に投与することを含む。

【0373】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤のいずれか一方又はその両方は、間欠的に投与される。特定の実施形態において、本方法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質又は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方を、投与間に少なくとも10分間、15分、20分、30分、40分、60分、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、18時間、24時間、36時間、48時間、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、3週間、又は4週間の遅延を置いて対象に投与することを含む。特定の実施形態において、遅延を置いた投与は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤の一方、又はその両方、又はこれらの任意の組み合わせが約10分～約365日の所与の期間にわたって継続的に投与され、次に約10分～約30日の所与の期間にわたって投与されないようなパターンに従う。

【0374】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその任意の組み合わせは、他方が継続的に与えられている間に間欠的に投与される。特定の実施形態において、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の組み合わせは、第2の有効量の追加の治療用薬剤と逐次的に投与される。

【0375】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤とは、同時に投与される。特定の実施形態において、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の組み合わせは、第2の有効量の追加の治療用薬剤と逐次的に投与される。かかる実施形態において、組み合わせはまた「共投与される」とも言われ、これは、この用語に、対象が両方の成分に組み合わせで曝露されるありとあらゆる方法が含まれるためである。しかしながら、かかる実施形態は、組み合わせがただ1つの製剤又は組成物だけで与えられることに限定されない。一定の間隔で送達するには、一定の濃度のヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び追加の治療用薬剤がより有利であるということであってもよく、そのため、第1の有効量及び第2の有効量は、投与下の製剤に応じて変化し得る。

10

【0376】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び追加の治療用薬剤は、同時に又は逐次的に投与される。特定の実施形態では、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、第2の有効量の追加の治療用薬剤の後に逐次的に投与される。特定の実施形態では、第2の有効量の追加の治療用薬剤が、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の後に逐次的に投与される。

【0377】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、IL-12サブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質）と追加の治療用薬剤との組み合わせは、1つの製剤で投与される。特定の実施形態において、組み合わせは2つの組成物で投与され、ここでは第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質が第2の有効量の追加の治療用薬剤の製剤と別個の製剤で投与される。特定の実施形態において、組み合わせは2つの組成物で投与され、ここではヘテロ二量体Fc融合タンパク質の第1の有効量が第2の有効量の追加の治療用薬剤の製剤と別個の製剤で投与される。特定の実施形態において、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第2の有効量の追加の治療用薬剤の後に逐次的に投与される。特定の実施形態において、第2の有効量の追加の治療用薬剤は、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の後に逐次的に投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び追加の治療用薬剤が投与され；続いてヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤との両方が、少なくとも24時間にわたって間欠的に投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び追加の治療用薬剤は、重複のない隔日のスケジュールで投与される。

20

30

【0378】

特定の実施形態において、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第2の有効量の追加の治療用薬剤の4時間以上後に投与される。特定の実施形態において、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、第2の有効量の追加の治療用薬剤の10分以上、15分以上、20分以上、30分以上、40分以上、60分以上、1時間以上、2時間以上、4時間以上、6時間以上、8時間以上、10時間以上、12時間以上、24時間以上、2日以上、4日以上、6日以上、8日以上、10日以上、12日以上、14日以上、21日以上、又は30日以上後に投与される。特定の実施形態において、第2の有効量の追加の治療用薬剤は、第1の有効量のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の10分以上、15分以上、20分以上、30分以上、40分以上、60分以上、1時間以上、2時間以上、4時間以上、6時間以上、8時間以上、10時間以上、12時間以上、24時間以上、2日以上、4日以上、6日以上、8日以上、10日以上、12日以上、14日以上、21日以上、又は30日以上後に投与される。

40

【0379】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方は、静脈内、皮下、皮膚、経口、筋肉内、及び腹腔内からなる群から選択される経路によって投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方は、静脈内に投与される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び／又

50

は追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方、又はこれらの任意の組み合わせは、経口的に投与される。

【0380】

当業者によれば、本開示の単位用量形態は、同じ又は異なる物理的形態で、即ち、カプセル又は錠剤で経口的に、及び／又は静脈内注入で液体によるなどして投与されてもよいことが理解される。更に、投与毎の単位用量形態が、詳細な投与経路によって異なってもよい。ヘテロ二量体Fc融合タンパク質及び追加の治療用薬剤のいずれか一方、又はその両方、その組み合わせについて、幾つかの様々な投薬形態が存在し得る。医学的状態が異なれば、異なる投与経路が必要となり得るため、本明細書に記載される組み合わせの同じ成分は、組成及び物理的形態の点ではまさしく似たものであってよく、しかしその状態を軽減するためには、異なる方法で、恐らくは異なるタイミングで与えられる必要があり得る。例えば、持続する悪心、特に嘔吐を伴うものなどの状態は、経口投薬形態の使用が困難となり得るため、そのような場合には、代わりに、又は同様に、吸入、頬側、舌下、又は坐薬経路による、恐らくは過去に又は今後使用される他の投薬形態と同一のものでさえある、別の単位用量形態で投与することが必要になり得る。具体的な投薬形態は、化学安定性又は薬物動態のように様々な要因に関する問題があり得るのと同じく、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と追加の治療用薬剤との特定の組み合わせの要件であり得る。

10

【0381】

(i) NK標的化療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法はNK標的化療法と組み合わせられる。例えば、ある実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、NKp46を標的とする治療用薬剤と共投与される。特定の実施形態において、NKp46を標的とする治療用薬剤はまた、CD16、1つ以上の腫瘍関連抗原、又はこれらの組み合わせにも結合する。NKp46を標的とする例示的治療用薬剤については、米国特許出願公開第20170198038A1号明細書（本明細書においてあらゆる目的から参照により援用される）に更に詳細に記載されている。

20

【0382】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、二重及び三重特異性キラーエンゲージャー（BiKE及びTriKE）療法、例えばNK細胞を標的とするBiKE及びTriKE療法と組み合わせられる。BiKE及びTriKEは、目的の各抗体の可変領域の単一の重鎖（VH鎖）及び軽鎖（VL鎖）で構築される。VH及びVLドメインは、解離を防ぐため、短い可動性のポリペプチドリンカーによってつながり合わされる。BiKE及びTriKEについては、米国特許出願公開第20180282386A1号明細書及び同第20180258396A1号明細書（本明細書においてあらゆる目的から参照により援用される）に更に詳細に記載されている。BiKE及びTriKEは、NK細胞に特異的な結合ドメインを持ち得る。

30

【0383】

特定の実施形態において、BiKE及びTriKE療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせる使用することにより、高リスク骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、全身性肥満細胞症、又は肥満細胞性白血病を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、BiKE及びTriKE療法は、3つの1週間治療ブロックの単回コースとして投与される。特定の実施形態において、治療ブロックは、4連続の24時間持続注入（約96時間）と、それに続く72時間の休息を含む。特定の実施形態において、BiKE及びTriKE療法は、5µg/kg/日、10µg/kg/日、25µg/kg/日、50µg/kg/日、100µg/kg/日、又は200µg/kg/日の用量で投与される。特定の実施形態において、BiKE及びTriKE療法は、少なくとも5µg/kg/日、少なくとも10µg/kg/日、少なくとも25µg/kg/日、少なくとも50µg/kg/日、少なくとも100µg/kg/日、又は少なくとも200µg/kg/日の用量で投与される。特定の実施形態において、BiKE及びTriKE療法は、少なくとも1µg/kg/日の用量で投

40

50

与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、少なくとも $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、少なくとも $200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、少なくとも $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、少なくとも $1000\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $1000\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $1\sim 200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $5\sim 200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $1\sim 500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $1\sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $5\sim 500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、 $5\sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、最大耐用量で投与される。特定の実施形態において、B i K E及びT r i K E療法は、最大耐用量未満で投与される。

【0384】

(i i) 多特異性結合タンパク質(「T r i N K E T」)療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体F c融合タンパク質療法を、(a) N K G 2 Dに結合する第1の抗原結合部位；(b) 腫瘍関連抗原に結合する第2の抗原結合部位；及び(c) C D 1 6、又はC D 1 6に結合する第3の抗原結合部位に結合するのに十分な抗体F cドメイン又はその一部分(「T r i N K E T」)を含む多特異性結合タンパク質(例えば、国際公開第2019/157332号パンフレット(この明細書に記載される多特異性結合タンパク質に関する内容は、参照によって本明細書に援用される)に記載される様々なN K G 2 D結合剤と腫瘍関連抗原結合部位とを含む多特異性結合タンパク質)を含む療法と組み合わせることにより、癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。例示的腫瘍関連抗原としては、限定はされないが、H E R 2、C D 2 0、C D 3 3、B細胞成熟抗原(B C M A)、E p C A M、C D 2、C D 1 9、C D 2 5、C D 3 0、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 2、C D 7 0、C L L 1/C L E C 1 2 A、F L T 3、E G F R/E R B B 1、I G F 1 R、H E R 3/E R B B 3、H E R 4/E R B B 4、M U C 1、c M E T、S L A M F 7、P S C A、M I C A、M I C B、T R A I L R 1、T R A I L R 2、M A G E - A 3、B 7. 1、B 7. 2、C T L A 4、H L A - E、及びP D - L 1が挙げられる。

【0385】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体F c融合タンパク質療法は、体重を基準とする用量の多特異性結合タンパク質を含む療法と組み合わせられる。例えば、体重を基準とする多特異性結合タンパク質の用量は、約 $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、例えば、約 $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.01\mu\text{g}\sim 1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $0.1\mu\text{g}\sim 1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim 50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\mu\text{g}\sim$

約10 μ g/kg体重、約10 μ g～約100mg/kg体重、約10 μ g～約50mg/kg体重、約10 μ g～約10mg/kg体重、約10 μ g～約1mg/kg体重、約10 μ g～約100 μ g/kg体重、約10 μ g～約50 μ g/kg体重、約50 μ g～約100mg/kg体重、約50 μ g～約50mg/kg体重、約50 μ g～約10mg/kg体重、約50 μ g～約1mg/kg体重、約50 μ g～約100 μ g/kg体重、約100 μ g～約100mg/kg体重、約100 μ g～約50mg/kg体重、約100 μ g～約10mg/kg体重、約100 μ g～約1mg/kg体重、約1mg～約100mg/kg体重、約1mg～約50mg/kg体重、約1mg～約10mg/kg体重、約10mg～約100mg/kg体重、約10mg～約50mg/kg体重、約50mg～約100mg/kg体重などである。

10

【0386】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1日、1週間、1ヵ月又は1年に1回以上、又は更には2～20年に1回与えられる用量の多特異性結合タンパク質を含む療法と組み合わせられる。当業者は、体液中又は組織中における標的を設定可能なコンストラクト又は複合体の測定された滞留時間及び濃度に基づいて用量投与反復率を容易に推定することができる。多特異性結合タンパク質の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、腔内、カテーテルを通じた灌流によるか、又は直接的な病巣内注射による可能性がある。これは、毎日1回以上、毎週1回以上、毎月1回以上、及び毎年1回以上投与されてもよい。

【0387】

20

(iii) キメラ抗原受容体(CAR)療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法はCAR療法と組み合わせられる。用語「キメラ抗原受容体」又は或いは「CAR」は、少なくとも細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子に由来する機能性のシグナル伝達ドメイン(本明細書では「一次シグナル伝達ドメイン」とも称される)を含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む組換えポリペプチドコンストラクトを指す。

【0388】

従って、特定の実施形態において、CARは、腫瘍関連抗原に結合する細胞外抗原結合部位と、膜貫通ドメインと、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。特定の実施形態において、CARは、少なくとも1つの共刺激分子に由来する1つ以上の機能性のシグナル伝達ドメイン(「共刺激シグナル伝達ドメイン」とも称される)を更に含む。

30

【0389】

一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合scFvドメイン)と、膜貫通ドメインと、一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合scFvドメイン)、膜貫通ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインと一次シグナル伝達ドメインとを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。特定の実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメイン(例えば、腫瘍関連抗原結合scFvドメイン)と、膜貫通ドメインと、2つの共刺激シグナル伝達ドメインと一次シグナル伝達ドメインとを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。一実施形態において、CARは、細胞外抗原結合ドメインとして重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む腫瘍関連抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、少なくとも2つの共刺激シグナル伝達ドメインと一次シグナル伝達ドメインとを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。

40

【0390】

膜貫通ドメインに関して、様々な実施形態において、CARは、CARの細胞外ドメイ

50

ンに融合されている膜貫通ドメインを含むように設計される。一実施形態において、膜貫通ドメインは、CAR中のドメインの1つと天然に会合しているものである。一部の例では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるため、かかるドメインが同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することが回避されるように選択され、又はアミノ酸置換によって修飾されてもよい。別の実施形態において、膜貫通ドメインは、CAR T細胞表面上にある別のCARとホモ二量体化する能力を有する。別の実施形態において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じCAR T細胞中に存在する未変性結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小限に抑えるように修飾又は置換されてもよい。

【0391】

膜貫通ドメインは、任意の天然に存在する膜結合型又は膜貫通型タンパク質に由来し得る。一実施形態において、膜貫通領域は、CARが標的に結合すると常に細胞内ドメインにシグナルを送る能力を有する。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、TCR α 鎖、TCR β 鎖、TCR ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、及びCD154からなる群から選択される1つ以上のタンパク質の膜貫通領域を含む。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、及びNKG2Cからなる群から選択される1つ以上のタンパク質の膜貫通領域を含む。

【0392】

細胞外腫瘍関連抗原結合ドメイン (例えば、腫瘍関連抗原結合scFvドメイン) は、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結び付いていてもよい。限定はされないが、ヒトIgヒンジ (例えば、IgG4ヒンジ、IgDヒンジ)、Gly-Serリンカー、(G4S)₄リンカー、KIR2DS2ヒンジ、及びCD8 α ヒンジを含め、種々のヒンジを利用することができる。

【0393】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが置かれている免疫細胞の特殊化した機能 (例えば、T細胞の細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性) のうちの少なくとも1つの活性化に関与する。従って、本明細書で使用されるとき、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、且つ細胞が特殊化した機能を実施するように導くタンパク質の一部分を指す。通常は細胞内シグナル伝達ドメイン全体を利用し得るが、多くの場合、必ずしも鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインのランケットされた一部分が使用されるという点で、かかるランケットされた一部分がエフェクター機能シグナルを伝達する限りは、インタクトな鎖の代わりにそうした一部分が使用されてもよい。このように、用語の細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの任意のランケットされた一部分を含むことが意図される。

【0394】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン（即ち、刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメイン）と、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメイン（即ち、少なくとも1つの共刺激分子に由来する機能性シグナル伝達ドメイン）とを含む。

【0395】

本明細書で使用されるとき、用語「刺激分子」は、免疫細胞、例えば、T細胞、NK細胞、又はB細胞が発現する分子であって、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部の側面について刺激する形で免疫細胞の活性化を調節する1つ以上の細胞質シグナル伝達配列を提供する分子を指す。一実施形態において、このシグナルは、例えば、TCR/CD3複合体がペプチドの負荷を有するMHC分子に結合することにより惹起され、それが、限定はされないが、増殖、活性化、分化などのT細胞応答の媒介につながるような一次シグナルである。

10

【0396】

刺激する形で作用する一次シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフ又はITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを持つものであり得る。本開示において特に有用な細胞質シグナル伝達配列を持つITAMの例としては、CD3ζ、共通FcRγ（FCER1G）、FcγRIIa、FcRβ（FcεR1b）、CD3γ、CD3delta、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10、及びDAP12に由来するものが挙げられる。一実施形態において、任意の1つ以上のCARの一次シグナル伝達ドメインは、CD3-ζに由来する細胞質シグナル伝達配列を含む。

【0397】

一部の実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、4-1BB、及び／又はCD3-ζの機能性シグナル伝達ドメインである。ある実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ、共通FcRγ（FCER1G）、FcγRIIa、FcRβ（FcεR1b）、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10、及び／又はDAP12の機能性シグナル伝達ドメインを含む。詳細な実施形態において、一次シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体複合体と会合しているζ鎖の機能性シグナル伝達ドメインである。

20

【0398】

本明細書で使用されるとき、用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドに特異的に結合して、それによって、限定はされないが増殖など、T細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上にあるコグネイト結合パートナーを指す。共刺激分子は、リンパ球が抗原に対して効率的に応答するために必要な、抗原受容体又はそのリガンド以外の細胞表面分子である。かかる分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1、CD11a/CD18）、CD2、CD7、CD258（LIGHT）、NKG2C、B7-H3、及びCD83と特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。かかる共刺激分子の更なる例としては、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、Nkp80（KLRF1）、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP LG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/C

30

40

50

b p、及びCD83と特異的に結合するリガンドが挙げられる。一部の実施形態において、CARの共刺激シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載される共刺激分子の機能性シグナル伝達ドメイン、例えば、OX40、CD27、CD28、CD30、CD40、PD-1、CD2、CD7、CD258、NKG2C、B7-H3、CD83に結合するリガンド、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS及び4-1BB (CD137)、又はこれらの任意の組み合わせである。

【0399】

本明細書で使用されるとき、用語「シグナル伝達ドメイン」は、二次メッセンジャーを生成するか、又はかかるメッセンジャーに応答することによってエフェクターとして機能することにより、定義付けられたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するため細胞内の情報を伝達することによって作用するタンパク質の機能部分を指す。

【0400】

CARの細胞質シグナル伝達部分内にある細胞質シグナル伝達配列は、ランダムに、又は指定の順番で、互いに連結されてもよい。任意選択で、例えば2～10アミノ酸長の、短いオリゴペプチドリンカー又はポリペプチドリンカーが、この連結を形成し得る。

【0401】

(iv) 抗体療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を抗体療法と組み合わせることにより、癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。

【0402】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、抗HER2抗体又は抗HER2抗体プラットフォーム（例えば、抗HER2結合ドメインを含む二重特異性若しくは三重特異性抗体、抗HER2抗体-薬物コンジュゲート、又は抗HER2 CAR）など、抗HER2結合ドメインを含む療法と組み合わせられる。抗HER2抗体としては、限定はされないが、トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標）-Roche/Genentech; Kanjinti-Amgen）、ペルツズマブ（PERJETA（登録商標）-Roche/Genentech）、及びMGAH22（米国特許第8,802,093号明細書（本明細書においてあらゆる目的から参照により援用される）に詳細に記載される）が挙げられる。抗HER2抗体プラットフォームとしては、限定はされないが、エルツマキシマブ（REXOMUN（登録商標）-Creative Biolabs）及びトラスツズマブエムタンシン（ado-トラスツズマブエムタンシン/T-DM1; KADCYLA（登録商標）-Roche/Genentech）が挙げられる。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせる使用することにより、癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、静脈内注入によって投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、1mg/kg/日、2mg/kg/日、3mg/kg/日、4mg/kg/日、5mg/kg/日、6mg/kg/日、7mg/kg/日、8mg/kg/日、9mg/kg/日、10mg/kg/日の用量で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、少なくとも1mg/kg/日、少なくとも2mg/kg/日、少なくとも3mg/kg/日、少なくとも4mg/kg/日、少なくとも5mg/kg/日、少なくとも6mg/kg/日、少なくとも7mg/kg/日、少なくとも8mg/kg/日、少なくとも9mg/kg/日、少なくとも10mg/kg/日の用量で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、1mg/kg/日未満の用量で投与される。

【0403】

特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせる使用することにより、乳癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象、例えば、転移性HER2過剰発現乳癌と診断された対象が治療さ

10

20

30

40

50

れる。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 4 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 4 mg/kg/日 で静脈内注入によって90分かけて投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 2 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 2 mg/kg/日 で静脈内注入によって30分かけて投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 4 mg/kg/日 の初期用量で投与され、次に続いて毎週 2 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 4 mg/kg/日 の初期用量で投与され、次に続いて毎週 2 mg/kg/日 で52週間投与される。

【0404】

特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、胃癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象、例えば、転移性HER2過剰発現胃癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 8 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 8 mg/kg/日 で静脈内注入によって90分かけて投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 6 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 6 mg/kg/日 で静脈内注入によって30～90分かけて投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 8 mg/kg/日 の初期用量で投与され、次に続いて毎週 6 mg/kg/日 で投与される。特定の実施形態において、抗HER2結合ドメイン療法は、 8 mg/kg/日 の初期用量で投与され、次に続いて毎週 6 mg/kg/日 で52週間投与される。

【0405】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、抗CD20抗体又は抗CD20抗体プラットフォーム（例えば、抗CD20結合ドメインを含む二重特異性又は三重特異性抗体、抗CD20抗体-薬物コンジュゲート、又は抗CD20 CAR）など、抗CD20結合ドメインを含む療法と組み合わされる。抗CD20抗体としては、限定はされないが、リツキシマブ（RITUXAN（登録商標）-Roche/Genentech）、オクレリズマブ（OCREVUS（登録商標）-Roche/Genentech）、オビヌツズマブ（GAZYVA（登録商標）-Roche/Genentech）、オフアツムマブ（ARZERRA（登録商標）-Novartis）、及びベルツズマブが挙げられる。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、静脈内注入によって投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 100 mg/m^2 、 200 mg/m^2 、 300 mg/m^2 、 400 mg/m^2 、 500 mg/m^2 、 600 mg/m^2 、 700 mg/m^2 、 800 mg/m^2 、 900 mg/m^2 、又は 1000 mg/m^2 の用量で投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 375 mg/m^2 の用量で投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、少なくとも 100 mg/m^2 、少なくとも 200 mg/m^2 、少なくとも 300 mg/m^2 、少なくとも 400 mg/m^2 、少なくとも 500 mg/m^2 、少なくとも 600 mg/m^2 、少なくとも 700 mg/m^2 、少なくとも 800 mg/m^2 、少なくとも 900 mg/m^2 、又は少なくとも 1000 mg/m^2 の用量で投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 400 mg/m^2 未満の用量で投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 375 mg/m^2 未満の用量で投与される。

【0406】

特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、非ホジキンリンパ腫（NHL）を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において

10

20

30

40

50

、抗CD20結合ドメイン療法は、 $375\text{mg}/\text{m}^2$ の用量でIV注入によって投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 未満の用量でIV注入によって投与される。

【0407】

特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、慢性リンパ球性白血病（CLL）を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、初回サイクルにおいて $375\text{mg}/\text{m}^2$ の用量でIV注入によって投与され、追加の2～6サイクルにおいて1サイクル当たり $500\text{mg}/\text{m}^2$ の用量でIV注入によって投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 未満の用量でIV注入によって投与される。この抗CD20結合ドメインとヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法との組み合わせは、フルダラビン及びシクロホスファミド（FC）と組み合わせて使用することができる。

10

【0408】

特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、関節リウマチ（RA）を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、2回の 1000mg 用量として、用量間を2週間離して、IV注入によって投与される。特定の実施形態において、抗CD20結合ドメイン療法は、2回の 1000mg 用量として、用量間を2週間離して、IV注入によって最長24週間まで投与される。特定の実施形態において、この抗CD20結合ドメインとヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法との組み合わせは、メトトレキサートと共投与される。

20

【0409】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、アゴニスト抗体を含む抗体療法を含む療法と組み合わせられる。特定の実施形態において、アゴニスト抗体は、抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体、又は抗CD27抗体である。特定の実施形態において、アゴニスト抗体は二重特異性抗体である。特定の実施形態において、アゴニスト抗体は、抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体、又は抗CD27抗体から選択される2つ以上の抗原結合ドメインを含む多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。具体例となる例は、ウトミルマブ（Pfizer）など、4-1BB及びCD137を標的とする二重特異性アゴニスト抗体である。

30

【0410】

（v）チェックポイント阻害薬療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、チェックポイント阻害薬療法と組み合わせることができる。遮断又は阻害の標的となり得る具体例となる免疫チェックポイント分子としては、限定はされないが、CTLA-4、4-1BB（CD137）、4-1BBL（CD137L）、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4（CD2分子ファミリーに属し、全てのNK、 $\gamma\delta$ 、及びメモリーCD8+（ $\alpha\beta$ ）T細胞に発現する）、CD160（別名BY55）、及びCGEN-15049が挙げられる。免疫チェックポイント阻害薬には、CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160、及びCGEN-15049のうちの1つ以上に結合して、その活性を遮断又は阻害する抗体、若しくはその抗原結合断片、又は他の結合タンパク質が含まれる。具体例となる免疫チェックポイント阻害薬としては、ニボルマブ（nivolumab）（抗PD-1；OPDIVO（登録商標）-BMS）、AMP224（抗PD-1；NCI）、ペンブロリズマブ（抗PD-1；MK-3475/KEYTRUDA（登録商標）-Merck）、ピジリズマブ（抗PD-1抗体；CT-011-Teva/Cur

40

50

e Tech)、アテゾリズマブ(抗PD-L1; TECENTRIQ(登録商標) - Roche/Genentech)、デュルバルマブ(抗PD-L1; MEDI4736/IMFINZI(登録商標) - Medimmune/AstraZeneca)、アベルマブ(抗PD-L1; BAVENCIO(登録商標) - Pfizer)、BMS-936559(抗PD-L1-BMS)、イピリムマブ(抗CTLA-4; YERVOY(登録商標) - BMS)、トレメリムマブ(抗CTLA-4; Medimmune/AstraZeneca)、リリルマブ(抗KIR; BMS)、モナリズマブ(抗NKG2A; Innate Pharma/AstraZeneca)、BY55(抗CD160)、抗OX40、抗TIM3、及び抗LAG3が挙げられる。

【0411】

特定の実施形態において、本発明の方法は、抗PD-1抗体を対象に投与することを更に含む。多くの抗PD-1抗体が治療目的で開発されており、例えば、Gong et al., (2018) J. Immunother Cancer (2018) 6:8に記載されている。特定の実施形態において、抗PD-1抗体はペンブロリズマブである。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、様々な経路で、例えば、静脈内に、皮下に、筋肉内に、又は腹腔内に投与することができる。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは静脈内投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、約100mg、約125mg、約150mg、約175mg、約200mg、約225mg、約250mg、約275mg、約300mg、又は約400mgの用量で投与することができる。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、約200mgの用量で3週間毎に投与される。特定の実施形態において、ペンブロリズマブは、約400mgの用量で6週間毎に投与される。特定の実施形態において、初期治療サイクルの1日目に約200mgのペンブロリズマブが投与される。特定の実施形態において、対象が1回以上の後続の治療サイクルを受ける場合、後続の治療サイクルでは、初回の後続治療サイクルの1日目から開始して200mgのペンブロリズマブが3週間に1回投与される。一部の実施形態において、ペンブロリズマブの投与は、医薬製剤の各投与よりも前に行われてもよく、医薬製剤の各投与と同時にあってもよく、又は医薬製剤の各投与の後に行われてもよい。特定の実施形態において、ペンブロリズマブの投与は、医薬製剤の各投与よりも前に行われる。一部の実施形態において、医薬製剤は、ペンブロリズマブの投与の完了後約10分、約20分、約30分、約40分、約50分、約1時間、約1.5時間、約2時間、約2.5時間、約3時間、約3.5時間、約4時間、約4.5時間、又は約5時間以内に投与することができる。特定の実施形態において、医薬製剤は、ペンブロリズマブの投与完了後1時間以内に投与される。

【0412】

一部の実施形態において、ペンブロリズマブと組み合わせて投与される医薬製剤は、黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、及び子宮内膜癌からなる群から選択される癌の治療用である。

【0413】

特定の実施形態において、抗PD-1抗体はニボルマブである。特定の実施形態において、ニボルマブは、様々な経路で、例えば、静脈内に、皮下に、筋肉内に、又は腹腔内に投与することができる。特定の実施形態において、ニボルマブは静脈内投与される。一部の実施形態において、ニボルマブ(nivolumab)は、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、約500mg、約520mg、約540mg、約560mg、約580mg、又は約600mgの用量で投与することができる。特定の実施形態において、ニボルマブは、約240mgの用量で投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、約240mgの用量で約2週間に1回投与される。特定の実施形態において、ニ

ボルマブは、約360mgの用量で投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、約360mgの用量で約3週間に1回投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、約480mgの用量で投与される。特定の実施形態において、ニボルマブは、約480mgの用量で約4週間に1回投与される。一部の実施形態において、ニボルマブの投与は、医薬製剤の各投与よりも前に行われてもよく、医薬製剤の各投与と同時であってもよく、又は医薬製剤の各投与の後に行われてもよい。特定の実施形態において、ニボルマブの投与は、医薬製剤の各投与よりも前に行われる。一部の実施形態において、医薬製剤は、ニボルマブの投与の完了後約10分、約20分、約30分、約40分、約50分、約1時間、約1.5時間、約2時間、約2.5時間、約3時間、約3.5時間、約4時間、約4.5時間、又は約5時間以内に投与することができる。特定の実施形態において、医薬製剤は、ニボルマブの投与完了後1時間以内に投与される。一部の実施形態において、ニボルマブと組み合わせて投与される医薬製剤は、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、結腸直腸癌、肝細胞癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される癌の治療用である。特定の実施形態において、癌は黒色腫である。特定の実施形態において、黒色腫は切除不能又は転移性である。一部の実施形態において、癌は結腸直腸癌である。特定の実施形態において、結腸直腸癌は、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）又はミスマッチ修復機構欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌である。

【0414】

特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、静脈内注入によって投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、静脈内注入によって30分かけて投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、3週間毎に投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、又は約1000mgの用量で投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、200mgの用量で投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、少なくとも100mg、少なくとも200mg、少なくとも300mg、少なくとも400mg、少なくとも500mg、少なくとも600mg、少なくとも700mg、少なくとも800mg、少なくとも900mg、又は少なくとも1000mgの用量で投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法は、200mg未満の用量で投与される。特定の実施形態において、チェックポイント阻害薬療法をヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と組み合わせて使用することにより、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、膀胱癌（bladder cancer）、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌（RCC）、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、及びトリプルネガティブ乳癌を有すると分かっている、又はそれを有する疑いがある対象が治療される。

【0415】

（vi）追加のサイトカイン療法

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上の追加のサイトカイン療法、1つ以上のケモカイン療法、又はこれらの組み合わせと組み合わされる。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上の追加のサイトカイン療法と組み合わされる。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上のケモカイン療法と組み合わされる。一部の実施形態において、サイトカイン療法は、炎症誘発性サイトカイン、Th1サイトカイン、又はTh2サイトカインを含む。一部の実施形態において、サイトカイン療法は、組換えヒトサイトカイン又はケモカインを含む。

【0416】

一部の実施形態において、サイトカイン療法には、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21及びIL-22）であるサイトカインが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン療法には、成長因子（例えば、腫瘍壊死因子（TNF）、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGF及びPDGF）であるサイトカインが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン療法は、抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及びTGF）を含む。

【0417】

一部の実施形態において、ケモカイン療法には、炎症誘発性ケモカイン（例えば、GRO- α 、GRO-b、LIX、GCP-2、MIG、IP10、I-TAC、及びMCP-1、RANTES、エオタキシン、SDF-1、及びMIP3a）が含まれる。一部の実施形態において、ケモカイン療法には、ケモカイン受容体が含まれる。一部の実施形態において、ケモカイン療法には、CXCケモカイン受容体（例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、及びCXCR7）、CCケモカイン受容体（例えば、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、及びCCR11）、CX3Cケモカイン受容体（例えば、CX3CR1）、又はXCケモカイン受容体（例えば、XCR1）が含まれる。一部の実施形態において、ケモカイン療法は、Gタンパク質連結型膜貫通受容体を含む。

【0418】

一部の実施形態において、サイトカイン療法は、IL-12シグナル伝達と相乗作用するサイトカイン療法を含む。一部の実施形態において、サイトカイン療法は、IL-2サイトカイン又はその誘導体を含む。一部の実施形態において、IL-2療法は、アルデスロイキン（プロロイキン（Proleukin）-Prometheus Therapeutics）である。一部の実施形態において、IL-2療法及び／又はアルデスロイキンは静脈内投与される。一部の実施形態において、サイトカイン療法は、IL-15サイトカイン又はその誘導体を含む。一部の実施形態において、IL-15療法は、ALT-803（Altos Bioscience）又はNKTR-255（Nektar）である。一部の実施形態において、IL-15療法、NKTR-255、及び／又はALT-803は皮下投与される。一部の実施形態において、ケモカイン療法は、CXCL9ケモカイン、CXCL10ケモカイン、又はその誘導体を含む。

【0419】

一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、サイトカイン又はケモカインを対象に投与することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、組換えサイトカイン又はケモカインを対象に投与することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、サイトカイン又はケモカインを産生するように細胞を操作することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、サイトカイン又はケモカインを産生するように細胞をエキソピボ、インピトロ、又はインピボで操作することが含まれる。

【0420】

一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス（例えば、Tatsis et al., Adenoviruses, Molecular Therapy (2004) 10, 616-629を参照のこと）、限定はされないが、第2世代、第3世代又はハイブリッド第2／第3世代レンチウイルス及び特異的細胞型又は受容体を標的とするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルスを含めたレンチウイルス（例えば、Hu et al., Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev. (2011) 239 (1): 45-61, Sak

10

20

30

40

50

uma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational*, *Biochem J.* (2012) 443 (3): 603–18、Cooper et al., *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter*, *Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682–690、Zufferey et al., *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In vivo Gene Delivery*, *J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873–9880を参照のこと)、又は米国特許第5,173,414号明細書; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5: 3251–3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4: 2072–2081 (1984); Hermonat et al., *PNAS* 81: 6466–6470 (1984); 及び Samulski et al., *J. Virol.* 63: 0382–0388 (1989) に更に詳細に記載されるとおりのアデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターなど、ウイルスベクターベースの送達プラットフォームを使用してサイトカイン又はケモカインを産生するように細胞を操作することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、LNP、リポソーム、又はエキソソームを使用してサイトカイン又はケモカインを産生するように細胞を操作することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、ヌクレアーゼベースのゲノム編集システム(例えば、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)ファミリー、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、及びホーミングエンドヌクレアーゼ(HE)ベースのゲノム編集システム又はその誘導体)を使用するなど、ゲノム編集を使用してサイトカイン又はケモカインを産生するように細胞を操作することが含まれる。一部の実施形態において、サイトカイン又はケモカイン療法には、電気穿孔を使用してサイトカイン又はケモカインを産生するように細胞を操作することが含まれる。

【0421】

(vii) 自然免疫系アゴニスト療法

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上の自然免疫系アゴニストと組み合わせられる。

【0422】

一部の実施形態において、自然免疫系アゴニストは、Toll様受容体(TLR)アゴニストを含む。一部の実施形態において、TLRアゴニストは、TLR1/2、TLR2/6、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR7/8、又はTLR9アゴニストを含む。一部の実施形態において、TLR2/6アゴニストは、細菌リポタンパク質又はPam2CSK4などの誘導体など、リポタンパク質を含む。一部の実施形態において、TLR1/2アゴニストは、リポタンパク質を含む。一部の実施形態において、TLR3アゴニストは、リントトリモド(AMPLIGEN(登録商標)–Hemispherex Biopharma)又はポリIC-LC(例えば、HILTONOL(登録商標))など、dsRNA類似体を含む。一部の実施形態において、TLR4アゴニストは、リポ多糖(LPS、別名エンドトキシン)又はリポDなどの誘導体を含む。一部の実施形態において、TLR7アゴニストは、ssRNA又は誘導体又はイミダゾキノリン誘導体、限定はされないが、レシキモド(別名R848)、イミキモド(ZYCLARA(登録商標)、Aldara–Medicis)、及びガーディキモドなどを含む。一部の実施形態において、TLR7アゴニストはまた、イミキモド又はMedi-9197(AstraZeneca/MedImmune)など、TLR8アゴニストでもある。一部の実施形態において、TLR9アゴニストは、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)又はSD-101(Dynavax)を含む。

【0423】

一部の実施形態において、自然免疫系アゴニストは、インターフェロン遺伝子（STING）アゴニストの刺激薬を含む。一部の実施形態において、STINGアゴニストは、サイクリックジヌクレオチド（CDN）を含む。一部の実施形態において、CDNは、サイクリックジAMP、サイクリックジGMP、又はサイクリックGMP-AMP（cGAMP）を含む。一部の実施形態において、STINGアゴニストは、cGASを刺激する核酸（例えば、DNA又はRNA）を含む。一部の実施形態において、STINGアゴニストは、ADU-S100（別名MIW815-Aduro/Novartis）である。

【0424】

（viii）化学療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上の化学療法と組み合わされる。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の化学療法と組み合わせることにより、癌と診断された対象が治療される。化学療法剤の例としては、アルデスロイキン、アルボシジブ、アンチネオプラストンAS2-1、アンチネオプラストンA10、抗胸腺細胞グロブリン、アミホスチン三水合物、アミノカンプトテシン、三酸化ヒ素、βアレチン、Bcl-2ファミリータンパク質阻害薬ABT-263、ABT-199、BMS-345541、ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））、ブリオスタチン1、ブスルファン、カルボプラチン、campath-1H、CC-5103、カルムスチン、酢酸カスポファンギン、クロファラビン、シスプラチン、クラドリビン（LEUSTARIN（登録商標））、クロラムブシル（LEUKERAN（登録商標））、クルクミン、シクロスポリン、シクロホスファミド（シロキサン（Cylloxan）、エンドキサン（Endoxan）、エンドキサナ（Endoxana）、シクロスチン（Cyclostin））、シタラビン、デニロイキンジフチトクス、デキサメタゾン、DT PACE、ドセタキセル、ドラスタチン10、ドキソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、ADRIBLASTINE（登録商標）、塩酸ドキソルビシン、エンザスタウリン、エポエチンアルファ、エトポシド、エベロリムス（RAD001）、フェンレチニド、フィルグラスチム、メルファラン、メスナ、フラボピリドール、フルダラビン（FLUDARA（登録商標））、ゲルダナマイシン（17-AAG）、イホスファミド、塩酸イリノテカン、イクサベピロン、レナリドマイド（REVLIMID（登録商標））、CC-5013）、リンホカイン活性化キラー細胞、メルファラン、メトトレキサート、ミトキサントロン塩酸塩、モテクサフィンガドリニウム、ニコフェノール酸モフェチル、ネララビン、オブリメルセン（GENASENSE（登録商標））オバトクラックス（GX15-070）、オブリメルセン、オクトレオチド酢酸塩、ω-3脂肪酸、オキサリプラチン、パクリタキセル、PD0332991、PEG化リポソームドキソルビシン塩酸塩、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン（Pentostatin）（NIPENT（登録商標））、ペリホシン、プレドニゾロン、プレドニゾン、R-ロスコビチン（SELICILIB（登録商標））、CYC202）、組換えインターフェロンアルファ、組換えインターロイキン-12、組換えインターロイキン-11、組換えflt3リガンド、組換えヒトトロネボエチン、リツキシマブ、サルグラモストム、シルデナフィルクエン酸塩、シンバスタチン、シロリムス、ステリルスルホン類、タクロリムス、タネスピマイシン、テムシロリムス（CC1-779）、サリドマイド、治療用同種異系リンパ球、チオテパ、ティピファニブ、VELCADE（登録商標）（BORTEZOMIB（登録商標））又はPS-341）、ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））、硫酸ピンクリスチン、ピノレルビン二酒石酸塩、ポリノスタット（SAHA）、及びFR（フルダラビン、リツキシマブ）、CHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、プレドニゾン）、CVP（シクロホスファミド、ピンクリスチン及びプレドニゾン）、FCM（フルダラビン、シクロホスファミド、ミトキサントロン）、FCR（フルダラビン、シクロホスファミド、リツキシマブ）、ハイパーCVAD（多分割シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキソルビシン、デキサメタゾン、メトトレキサート、シタラビン）、ICE（イホスファミド、カルボプラチン及びエトポシド）、MCP（ミトキサントロン、クロラムブシル、及びプレドニゾロン）、R-CHO

10

20

30

40

50

P（リツキシマブ＋CHOP）、R－CVP（リツキシマブ＋CVP）、R－FCM（リツキシマブ＋FCM）、R－ICE（リツキシマブ－ICE）、及びR－MCP（R－MCP）が挙げられる。

【0425】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の化学療法と組み合わせることにより、結腸癌、直腸癌、又は結腸直腸癌（CRC）と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、化学療法は、FOLFOX（5－FU、ロイコボリン、及びオキサリプラチン／エロキサチン（Eloxatin））、FOLFIRI（ロイコボリン、5－FU、及びイリノテカン／カンプトサル（Campotosar））、FOLFOXIRI（ロイコボリン、5－FU、オキサリプラチン、及びイリノテカン）、CapeOx（カペシタビン及びオキサリプラチン）、5－FUとロイコボリンの共投与、カペシタビン（XELODA（登録商標））単独、又はトリフルリジン及びチピラシル（LONSURF（登録商標））を含む。特定の実施形態において、化学療法は、VEGF標的薬剤、例えば、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標））、ziv－アフリベルセプト（ZALTRAP（登録商標））、ラムシルマブ（CYRAMZA（登録商標））、又はレゴラフェニブ（STIVARGA（登録商標））など、又はEGFR標的薬剤、例えば、セツキシマブ（ERBITUX）又はパニツムマブ（VECTIBIX（登録商標））などを含む。特定の実施形態において、化学療法は、FOLFOX、FOLFIRI、FOLFOXIRI、CapeOx、5－FUとロイコボリンの共投与、カペシタビン単独、及びトリフルリジン／チピラシルをVEGF標的薬剤又はEGFR標的薬剤と併せたものから選択される化学療法を共投与する。

【0426】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の化学療法と組み合わせることにより、乳癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、化学療法は、ドキソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、ペグ化リポソームドキソルビシン、エピルビシン（ELLENCE（登録商標））、パクリタキセル（タキソール（Taxol））、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、アルブミン結合パクリタキセル（ABRAXANE（登録商標））、5－フルオロウラシル（5－FU）、シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））、カルボプラチン（PARAPLATIN（登録商標））、シスプラチン、ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））、カペシタビン（XELODA）、ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））、イクサベピロン（IXEMPRA（登録商標））、又はエリブリン（HALAVEN）を含む。特定の実施形態において、化学療法は、ドキソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、ペグ化リポソームドキソルビシン、エピルビシン（ELLENCE（登録商標））、パクリタキセル（タキソール（Taxol））、ドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、アルブミン結合パクリタキセル（ABRAXANE（登録商標））、5－フルオロウラシル（5－FU）、シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））、カルボプラチン（PARAPLATIN（登録商標））、シスプラチン、ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））、カペシタビン（XELODA（登録商標））、ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））、イクサベピロン（IXEMPRA（登録商標））、及びエリブリン（HALAVEN（登録商標））から選択される2つ以上の化学療法の組み合わせを含む。

【0427】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の化学療法と組み合わせることにより、黒色腫／皮膚癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、化学療法は、ダカルバジン（別名DTIC）、テモゾロミド、nab－パクリタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、又はビンブラスチンを含む。

【0428】

（ix）標的薬剤療法

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、1つ以上の標的薬剤と組み合わせられる。一般に、標的薬剤は、癌に関連する標的など、特異的分子標的に作用する。標的薬剤は、標準的化学療法とは、標準的化学療法があらゆる急速に分裂する正常細胞及び癌性細胞に作用する点で区別される。標的薬剤としては、限定はされないが、ホルモン療法、シグナル伝達阻害薬、遺伝子発現調節薬、アポトーシス誘導薬、血管新生阻害薬、免疫療法、毒素送達分子（例えば、抗体薬物-コンジュゲート）、及びキナーゼ阻害薬が挙げられる。特定の実施形態において、標的薬剤は、受容体作動薬又はリガンドを含む。

【0429】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の標的薬剤と組み合わせることにより、結腸癌、直腸癌、又は結腸直腸癌（CRC）と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、標的薬剤は、セツキシマブ（ERBITUX（登録商標））、パニツムマブ（VECTIBIX（登録商標））、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標））、ziv-アフリベルセプト（ZALTRAP（登録商標））、レゴラフェニブ（STIVARGA（登録商標））、ラムシルマブ（CYRAMZA（登録商標））、ニボルマブ（OPDIVO（登録商標））、又はイピリムマブ（YERVOY（登録商標））を含む。

【0430】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の標的薬剤と組み合わせることにより、乳癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、標的薬剤は、エベロリムス（AFINITOR（登録商標））、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標））、フルベストラント（FASLODEX（登録商標））、アナストロゾール（ARIMIDEX（登録商標））、エキセメスタン（AROMASIN（登録商標））、ラパチニブ（TYKERB（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））、ペルツズマブ（PERJETA（登録商標））、ado-トラスツズマブエムタンシン（KADCYLA（登録商標））、パルボシクリブ（IBRANCE（登録商標））、リボシクリブ（KISQALI（登録商標））、ネラチニブマレイン酸塩（NERLYNX（商標））、アベマシクリブ（VERZENIO（商標））、オラパリブ（LYNPARZA（商標））、アテゾリズマブ（TECENTRIQ（登録商標））、又はアルペリシブ（PIQRAY（登録商標））を含む。

【0431】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の標的薬剤と組み合わせることにより、黒色腫／皮膚癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、標的薬剤は、ビスモデギブ（ERIVEDGE（登録商標））、ソニデギブ（ODOMZO（登録商標））、イピリムマブ（YERVOY（登録商標））、ベムラフェニブ（ZELBORAF（登録商標））、トラメチニブ（MEKINIST（登録商標））、ダブラフェニブ（TAFINLAR（登録商標））、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA（登録商標））、ニボルマブ（OPDIVO（登録商標））、コビメチニブ（COTELLIC（商標））、アリトレチノイン（PANRETIN（登録商標））、アベルマブ（BAVENCIO（登録商標））、エンコラフェニブ（BRAFTOVI（商標））、ビメチニブ（MEKTOVI（登録商標））、又はセンプリマブ-rwlc（LIBTAYO（登録商標））を含む。

【0432】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、受容体作動薬又はリガンド療法と組み合わせられる。特定の実施形態において、受容体作動薬又はリガンド療法は、アゴニスト抗体を含む。特定の実施形態において、受容体作動薬又はリガンド療法は、4-1BBL又はCD40Lなど、受容体リガンドを含む。

【0433】

(x) 放射線療法

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、放射線療法と組み合わせられる。特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰、又はヨウ素¹³¹など、放射性同位体粒子と組み合わせられる。組み合わせ療法の例としては、限定はされないが、ヨウ素¹³¹トシツモマブ（BEXXAR（登録商標））、イットリウム⁹⁰イブリツモマブチウキセタン（ZEVALLIN（登録商標））、及びBEXXAR（登録商標）とCHOPが挙げられる。特定の実施形態において、放射線療法は、外照射放射線療法（EBRT）、内照射放射線療法（小線源照射療法）、腔内照射放射線療法、組織内小線源療法、放射線塞栓療法、少分割放射線療法、術中放射線療法（IORT）、3次元原体放射線療法、定位手術的照射（SRS）、又は体幹部定位放射線療法（SBRT）を含む。

10

【0434】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の照射療法と組み合わせることにより、結腸癌、直腸癌、又は結腸直腸癌（CRC）と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、放射線療法は、外照射放射線療法（EBRT）、内照射放射線療法（小線源照射療法）、腔内照射放射線療法、組織内小線源療法、又は放射線塞栓療法を含む。

【0435】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の照射療法と組み合わせることにより、乳癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、放射線療法は、外照射放射線療法、少分割放射線療法、術中放射線療法（IORT）、又は3次元原体放射線療法を含む。

20

【0436】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を1つ以上の照射療法と組み合わせることにより、黒色腫／皮膚癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、放射線療法は、定位手術的照射（SRS；例えば、ガンマナイフ又は線形加速器を使用する）又は体幹部定位放射線療法（SBRT）を含む。

【0437】

（xi）ワクチン及び腫瘍溶解性ウイルス療法

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、特異的免疫応答、例えば、腫瘍特異的免疫応答を生じさせる能力のある1つ以上の免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物又は腫瘍溶解性ウイルスと組み合わせられる。

30

【0438】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は、ワクチン組成物と組み合わせられる。ワクチン組成物は、典型的には、標的とされる腫瘍に特異的な複数の抗原及び／又はネオ抗原を含む。ワクチン組成物はまた、ワクチンとも称され得る。

【0439】

一部の実施形態において、ワクチン組成物は、アジュバント及び／又は担体を更に含む。一部の実施形態において、ワクチン組成物は、T細胞にペプチドを提示する能力のあるタンパク質などの担体又は樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞と会合している。一部の実施形態において、担体は、そこに抗原又はネオ抗原を会合させる能力のある足場構造、例えばポリペプチド又は多糖である。

40

【0440】

一般に、アジュバントは、ワクチン組成物に混入させると抗原又はネオ抗原に対する免疫応答が増加し、又は他の点で変化する任意の物質である。任意選択で、アジュバントは共有結合的又は非共有結合的にコンジュゲートされる。アジュバントが抗原に対する免疫応答を増加させる能力は、典型的には、免疫介在性反応の大幅な又は実質的な増加、又は疾患症状の低減に現れる。例えば、体液性免疫の増加は、典型的には、抗原に対して産生される抗体の力価の大幅な増加に現れ、T細胞活性の増加は、典型的には、細胞増殖、又は細胞傷害性、又はサイトカイン分泌の増加に現れる。アジュバントはまた、例えば、主に体液性応答又はTh応答を主に細胞性の応答、又はTh応答に変化させることにより、

50

免疫応答も改変し得る。好適なアジュバントとしては、限定はされないが、1018 ISS、ミョウバン、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870、893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOM ATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTelベクター系、PLGマイクロパーティクル、レシキモド、SRL172、ビロソーム及び他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、βグルカン、Pam3Cys、サポニンに由来するAquilaのQS21スティミュロン（Aquila Biotech、Worcester, Mass., USA米国）、マイコバクテリア抽出物及び合成細菌細胞壁模倣物、及び他の所有権のあるアジュバント、例えば、RibidiのDetox、Quil又はSuperfosなどが挙げられる。不完全フロイント又はGM-CSFなどのアジュバントが有用である。樹状細胞に特異的な幾つかの免疫学的アジュバント（例えば、MF59）及びその調製については、過去に記載されている（Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1): 18-27; Allison AC; Dev Biol Stand. 1998; 92: 3-11）。サイトカインもまた使用することができる。幾つかサイトカインが、リンパ系組織への樹状細胞遊走に影響を与えること（例えば、TNF-α）、Tリンパ球に効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速させること（例えば、GM-CSF、IL-1及びIL-4）（米国特許第5,849,589号明細書（全体として参照により本明細書に具体的に援用される））及び免疫アジュバントとして作用すること（例えば、IL-12）（Gabrilovich DI, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996(6): 414-418）と直接関連付けられている。一部の実施形態において、アジュバントは、CpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、アジュバントは、TLRアゴニストを含む。

【0441】

有用なアジュバントの他の例としては、限定はされないが、化学的に修飾されたCpG（例えば、CpR、Idera）、ポリ（I:C）（例えば、polyi:CI2U）、非CpG細菌DNA又はRNA並びに免疫活性小分子及び抗体、例えば、シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セレコキシブ、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ（sorafenib）、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、ZD2171、AZD2171、イピリムマブ、トレメリムマブ、及びSC58175が挙げられ、これらは治療的に、及び／又はアジュバントとして作用し得る。アジュバント及び添加剤の量及び濃度は、当業者が過度の実験を行うことなく容易に決定することができる。更なるアジュバントとしては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスチム）など、コロニー刺激因子が挙げられる。

【0442】

一部の実施形態において、ワクチン組成物は、2つ以上の異なるアジュバントを含む。一部の実施形態において、ワクチン組成物は、上記のいずれか又はそれらの組み合わせを含む任意のアジュバント物質を含む。また、ワクチン及びアジュバントは、一緒に又は別個に任意の適切な順序で投与し得ることも企図される。

【0443】

一部の実施形態において、担体（又は賦形剤）が、アジュバントと独立に存在する。一部の実施形態において、担体の機能は、分子量を増加させること、活性又は免疫原性を増加させること、安定性を付与すること、生物学的活性を増加させること、又は血清半減期を増加させることである。一部の実施形態において、担体は、T細胞へのペプチドの提示を助ける。一部の実施形態において、担体は、当業者に公知の任意の好適な担体、例えば

タンパク質又は抗原提示細胞を含む。キャリアータンパク質の例としては、限定はされないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清タンパク質、例えば、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、チログロブリン又はオボアルブミンなど、免疫グロブリン、又はホルモン、例えばインスリンなど又はパルミチン酸が挙げられる。ヒトの免疫化には、担体は、概して、ヒトにとって許容できる安全な、生理学的に許容可能な担体である。しかしながら、破傷風トキソイド及び／又はジフテリア (*diphtheria*) 毒素は好適な担体である。或いは、担体は、デキストラン、例えば、*Sephacrose*であってもよい。

【0444】

一部の実施形態において、ワクチンは、ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス (例えば、Tatsis et al., *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629を参照のこと)、又は限定はされないが、第2世代、第3世代又はハイブリッド第2／第3世代レンチウイルス及び特異的細胞型又は受容体を標的とするように設計された任意の世代の組換えレンチウイルスを含めたレンチウイルス (例えば、Hu et al., *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239 (1): 45-61、Sakuma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443 (3): 603-18、Cooper et al., *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690、Zufferey et al., *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In vivo Gene Delivery, J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880を参照のこと) など、ウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームを含む。一般に、宿主への導入時、感染細胞は抗原又はネオ抗原を発現し、それによってペプチドに対する宿主免疫 (例えば、CTL) 応答を引き出す。

【0445】

上述のウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング容量に応じて、一部の実施形態では、ワクチン組成物は1つ以上のウイルスベクターを含む。一部の実施形態において、ウイルスベクターは、非突然変異型配列が隣接している配列、リンカーによって隔てられている配列、又は細胞内コンパートメントを標的とする1つ以上の配列が前にある配列を含む (例えば、Gros et al., *Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, Nat Med.* (2016) 22 (4): 433-8、Stronen et al., *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, Science.* (2016) 352 (6291): 1337-41、Lu et al., *Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, Clin Cancer Res.* (2014) 20 (13): 3401-10を参照のこと)。免疫化プロトコルにおいて有用なワクシニアベクター及び方法については、例えば、米国特許第4, 722, 848号明細書に記載されている。別のベクターは、BCG (カルメット・ゲラン桿菌) である。BCGベクターについては、Stover et al. (*Nature* 351: 456-460 (1991)) に記載されている。当業者

10

20

30

40

50

には、本明細書の記載から、ネオ抗原の治療的投与又は免疫化に有用な多種多様な他のワクチンベクター、例えば、サルモネラ・チフィ (*Salmonella typhi*) ベクターなどが明らかであろう。

【0446】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は腫瘍溶解性ウイルス療法と組み合わせられる。一般に、腫瘍溶解性ウイルスは、主に癌細胞に感染してそれを死滅させるように操作されたウイルスである。一部の実施形態において、癌細胞を死滅させる腫瘍溶解性ウイルスに加えて、腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞に対する免疫応答を誘導する。

【0447】

特定の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法を腫瘍溶解性ウイルス療法と組み合わせることにより、黒色腫／皮膚癌と診断された対象が治療される。特定の実施形態において、腫瘍溶解性ウイルスは、タリモジーン・ラハーパレブベック (IMLYGIC (登録商標))、別名T-VECを含む。一部の実施形態において、IL-12のサブユニットを含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、腫瘍溶解性ウイルス (例えば、タリモジーン・ラハーパレブベック (IMLYGIC (登録商標)) 又はT-VEC) と組み合わせて癌 (例えば、進行悪性腫瘍) の治療に使用される。

【0448】

(xii) 外科的介入

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は外科的介入と組み合わせられ、ここでは異常組織 (例えば、腫瘍) が外科的に除去される。一部の実施形態において、腫瘍は対象の身体からメス又は他の鋭利な用具を用いて切り出され、腫瘍及び／又は周囲組織が切り取られることになる。一部の実施形態では、レーザーを用いて異常組織 (例えば、腫瘍) が切り取られる。一部の実施形態において、外科的介入には、異常組織 (例えば、腫瘍) を曝露することにより異常組織の細胞を死滅させるか、又は放射線照射及びある種の化学療法薬に対する細胞の感受性を高めるハイパーサーミア治療の使用が含まれ得る。一部の実施形態において、外科的介入には、ある種の薬物を光によって活性化させることにより癌細胞を死滅させる光線力学療法の使用が含まれ得る。外科的介入には、観血的手術又は最小侵襲手術が関わり得る。一部の実施形態において、外科的介入を用いると、腫瘍全体を除去し、腫瘍を減量し、又は癌症状を緩和することができる。

【0449】

一部の実施形態において、外科的介入は、対象においてヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法の投与前に実施することができる。他の実施形態において、外科的介入は、対象においてヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と並行して実施することができる。他の実施形態において、外科的介入は、対象においてヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法後に実施することができる。

【0450】

(xiii) 凍結療法

一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法は凍結療法 (別名凍結アブレーション又は凍結手術) と組み合わせられる。一部の実施形態において、凍結療法は、異常組織 (例えば、腫瘍) を破壊する液体窒素又はアルゴンガスを適用することによって患者に投与される。一部の実施形態において、対象の体内にある腫瘍向けに、クライオプローブを使用して凍結療法を投与することができ、及び超音波又はMRIなどのイメージング手技を用いると、クライオプローブをガイドし、及び／又は標的組織の凍結をモニタリングすることができる。

【0451】

一部の実施形態において、凍結療法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法前に患者に投与することができる。他の実施形態において、凍結療法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法と並行して患者に投与することができる。他の実施形態において、凍結療法は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質療法後に対象に投与することができる。

【0452】

特定の実施形態において、本明細書に開示される治療方法は、疾患応答又は対象若しくは患者の生存の向上をもたらす。例えば、特定の実施形態において、疾患応答は、完全奏効、部分奏効、又は病勢安定である。特定の実施形態において、生存の向上は、無増悪生存（PFS）又は全生存の向上である。向上（例えば、PFSの向上）は、本開示の治療の開始前の期間と比べて決定することができる。BTC（例えば、進行BTC、転移性BTC）、即ち胆道腫瘍療法に対する疾患応答（例えば、完全奏効、部分奏効、又は病勢安定）及び患者生存（例えば、PFS、全生存）を決定する方法は、当該技術分野の常法であり、本明細書で企図される。一部の実施形態において、疾患応答は、治療されている患者を患部（例えば、胸郭入口の上方部から恥骨結合までの範囲を入れた胸部／腹部及び骨盤）の造影コンピュータ断層撮影法（CT）又は磁気共鳴画像法（MRI）に供した後に、RECIST 1.1に基づき判定される。

10

【0453】

一部の実施形態において、生物学的活性を評価するため、免疫活性化のバイオマーカーが測定される。特定の実施形態において、細胞パラメータ、例えば、免疫表現型タイピング（IPT）について末梢血単核球（PBMC）がフローサイトメトリーにより評価される。特定の実施形態において、可溶性因子、例えば、血清試料中のサイトカイン及びケモカインが評価される。特定の実施形態において、C反応性タンパク質（CRP）の血清レベルが評価され、毒性が決定される。特定の実施形態において、対象の血中のCRP濃度が閾値CRP濃度よりも高い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクがあると同定される。特定の実施形態において、対象の血中のCRP濃度が閾値C反応性タンパク質濃度とほぼ同じであるか、又はそれより低い場合、対象は、薬物有害反応を発症するリスクはないと同定される。具体的な実施形態において、対象の血中のCRP濃度が閾値CRP濃度よりも高い場合、医薬製剤の投与が中断される；ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が用量を下げて投与されるか；又は対象における製剤の毒性効果を低減し若しくは緩和するための治療上の措置が講じられる。

20

【0454】

特定の実施形態において、エキソビボIL12応答アッセイを用いて活性が評価され、ここではPBMCが収集されてエキソビボ刺激を受け、続いてIFN γ 産生が分析される。特定の実施形態において、循環腫瘍（ct）デオキシリボ核酸（DNA）が評価されてもよい。特定の実施形態において、治療前及び治療後生検の組織由来バイオマーカーが判定され、例えば、臨床的有効性と分析したマーカーとの間の可能性のある相関が調査される。特定の実施形態において、PD-L1発現レベルが、例えば、市販のキット（例えば、Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx）を使用して決定される。特定の実施形態において、T細胞浸潤アッセイ時にCD3が陽性かどうか免疫組織化学（IHC）により決定される。特定の実施形態において、腫瘍浸潤白血球（例えば、CD8 T細胞、CD4 T細胞、Treg、NK細胞、マクロファージ [M1/2プロファイル]）の頻度及び／又は局在性がIHC又は免疫蛍光顕微鏡法（IF）により決定される。一部の実施形態において、遺伝子発現プロファイルが実施される。一部の実施形態において、ファーマコゲノミクスが実施される。

30

40

【0455】

(m) キット

DF hIL12-Fc siの製剤は、凍結乾燥製剤又は液体製剤として調製される。凍結乾燥製剤の調製には、フリーズドライしたDF hIL12-Fc siが滅菌され、使い捨てのガラスバイアルに保存される。次に数本のかかるガラスバイアルが、癌又は腫瘍と診断された対象へとある用量を送達するためのキットに包装される。

【0456】

一態様において、本開示は、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約0.6mg、約0.7mg、約0.8mg、約0.9mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg

50

g、又は約10mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の製剤が入った1つ以上の容器をまとめて含むキットを提供する。特定の実施形態において、本開示は、約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の製剤が入った1つ以上の容器をまとめて含むキットを提供する。特定の実施形態において、本開示は、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質の製剤が入った1つ以上の容器をまとめて含むキットを提供する

【0457】

特定の実施形態において、製剤は、液体製剤として調製及び包装され、約0.5mg/バイアル～約1.5mg/バイアル（例えば、約0.5mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.1mg/バイアル）として保存される。特定の実施形態において、製剤は液体製剤であり、約1mg/バイアルとして保存される。

【0458】

特定の実施形態において、製剤は凍結乾燥製剤として調製及び包装され、約0.5mg/バイアル～約1.5mg/バイアル（例えば、約0.5mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.5mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.6mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.7mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.8mg/バイアル～約1.1mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.5mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.4mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.3mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.2mg/バイアル、約0.9mg/バイアル～約1.1mg/バイアル）として保存される。特定の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、製剤は凍結乾燥製剤であり、約1mg／バイアルとして保存される。

【0459】

特定の実施形態において、容器にはまとめて、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約0.6mg、約0.7mg、約0.8mg、約0.9mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg、約12mg、約15mg、約20mg、約21mg、約24mg、約25mg、約27mg、約30mg、約35mg、約36mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約70mg、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mg、又は約100mgの本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、DF hIL12-Fc si）が入っている。特定の実施形態において、容器には、約1mgの本開示のヘテロ二量体Fc融合タンパク質（例えば、DF hIL12-Fc si）が入っている。特定の実施形態において、容器には、配列番号290のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、配列番号291のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドとを含む約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質が入っている。

10

【0460】

特定の実施形態において、容器内の製剤は凍結乾燥製剤であってもよい。特定の実施形態において、容器内の製剤は液体製剤であってもよい。

【0461】

特定の実施形態において、製剤は、好適な数のバイアルを含むキットに詰められてもよい。薬物投与に関する情報が含まれてもよく、それは承認済みの提出書類に従うものである。キットは、温度制御装置でモニタされる輸送用低温容器（2℃～8℃）で出荷されてもよい。

20

【0462】

製剤は、使用時まで2℃～8℃で保存されてもよい。製剤のバイアルは無菌で非パイロジェニックであってもよく、静菌保存剤は含有しなくてもよい。

【0463】

上記の説明は、本発明の複数の態様及び実施形態を説明している。本特許出願は、それらの態様及び実施形態のあらゆる組み合わせ及び並べ替えを具体的に企図する。

【実施例】

30

【0464】

以上で本発明が概して説明されたが、単に本発明の特定の態様及び実施形態の説明のために含まれるに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない以下の例を参照すると、本発明は一層容易に理解されるであろう。

【0465】

実施例1－調製方法

本発明のタンパク質は、典型的には、組換えDNA技術を用いて作られる。一例示的実施形態において、第1の抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第1のサブユニット（ヒトIL-12のp40サブユニット）を含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列を、第1の発現ベクター（pET-pSURE-Puro）にクローニングした；第2の抗体Fcドメインポリペプチドに融合した多サブユニットタンパク質の第2の異なるサブユニット（ヒトIL-12のp35サブユニット）を含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配列を、第2の発現ベクター（pET-pSURE-Puro）にクローニングした；及び第1及び第2の発現ベクターを一緒に宿主細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）に安定にトランスフェクトすることにより、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を作製した。

40

【0466】

第1の発現ベクターによってコードされる例示的アミノ酸配列を配列番号292に示す。第1の発現ベクターは、Y349C突然変異を含むヒトIgG1 Fc配列に融合したヒトIL-12のp40サブユニットを含む第1のポリペプチドをコードした。第1のポ

50

リペプチドはまた、ヘテロ二量体化を促進するK360E及びK409W突然変異、並びにエフェクター機能を低減するLALAPA (L234A、L235A、及びP329A) 突然変異も含んだ。配列番号292では、リーダー配列を斜体で示し、ヒトIL-12のp40サブユニット配列に下線を付し、及び突然変異を太字で示す。

【化3】

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCIWELKKDVYVVVELDWYPDAPGEMVVLTC
CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL
SH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDOKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS
TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECOEDSAC
PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ
VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQVGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR
KNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISK
AKGQPREPQVCTLPSSRDELLENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG (配列番号292)

10

【0467】

第2の発現ベクターからコードされる例示的アミノ酸配列を配列番号293に示す。第2の発現ベクターは、S354C突然変異を含むヒトIgG1Fc配列に融合したヒトIL-12のp35サブユニットを含む第2のポリペプチドをコードした。第2のポリペプチドはまた、ヘテロ二量体化を促進するQ347R、D399V、及びF405T突然変異、並びにエフェクター機能を低減するLALAPA (L234A、L235A、及びP329A) 突然変異も含んだ。配列番号293では、リーダー配列を斜体で示し、ヒトIL-12のp35サブユニット配列に下線を付し、及び突然変異を太字で示す。

20

【化4】

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSN
MLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE
TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKR
QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAP
IEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG (配列番号293)

30

【0468】

タンパク質の最も高い収率を実現するため、異なる比率の第1及び第2の発現ベクターを調べて、宿主細胞へのトランスフェクションに最適な比率を決定する。トランスフェクション後、限界希釈、ELISA、FACS、顕微鏡法、又はClonepixなど、当該技術分野で公知の方法を用いて、細胞バンク作成用に単クローンを単離することができる。

40

【0469】

クローンは、バイオリアクタースケールアップ及びタンパク質の発現の維持に好適な条件下で培養する。タンパク質は、遠心、深層ろ過、細胞溶解、均質化、凍結融解、アフィニティー精製、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、及び混合モードクロマトグラフィーを含めた、当該技術分野で公知の方法を用いて単離し、及び精製する。

【0470】

実施例2-C T 26腫瘍モデルにおけるサイレントなFcドメインポリペプチドと融合し

50

た I L - 1 2 による腫瘍抑制

本例は、組換えマウス I L - 1 2 (r m I L - 1 2) の 2 つの I L - 1 2 - F c 融合コンストラクトがマウス結腸癌モデルにおいて腫瘍進行を制御する相対的な能力について記載する。本例で使用した 2 つの I L - 1 2 - F c 融合変異体は、野生型マウス I g G 2 a F c ドメインポリペプチドの N 末端に融合した野生型マウス I L - 1 2 p 4 0 及び p 3 5 サブユニットを含む m I L - 1 2 - F c 野生型 (D F - m I L - 1 2 - F c w t) 、及び突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、及び P 3 2 9 G を有するマウス I g G 2 a F c ドメインポリペプチドの N 末端に融合した野生型マウス I L - 1 2 p 4 0 及び p 3 5 サブユニットを含む m I L - 1 2 - F c サイレント (D F - m I L - 1 2 - F c s i) であった。タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す：

m I L - 1 2 - p 4 0 - m I g G 2 A - E W (D F - m I L - 1 2 - F c w t の第 1 の鎖)

【化 5】

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS
GKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKN
KTFKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASL
SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYS
TSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRI
QRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSS
CSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI
LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
PEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
DGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号
286)

m I L - 1 2 - p 3 5 - m I g G 2 A - R V T (D F - m I L - 1 2 - F c w t の第 2 の鎖)

【化 6】

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKCLKHYSCTAEDIDHEDITR
DQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMTLCLGSI
YEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGET
LRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGGGGSG
GGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI
LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPRVYVLP
PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL
VSDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号287)

m I L - 1 2 - p 4 0 - m I g G 2 A - E W - L A L A P G (D F - m I L - 1 2 - F c s i の第 1 の鎖)

【化 7】

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGS
GKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKN
KTFKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASL
SAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYS
TSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRI
QRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSS
CSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI
LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
PEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
DGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号
288)

m I L - 1 2 - p 3 5 - m I g G 2 A - R V T - L A L A P G (D F - m I L - 1 2 - F c s i の第 2 の鎖)

【化 8】

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITR
DQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMTLCLGSI
YEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGET
LRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGGGGSG
GGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIV
TCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPI
QHGDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPRVVYLPPPEEE
MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLVSDGSYT
MYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (配列番号
289)

10

【0471】

簡潔に言えば、 10^6 個のCT26-Ty rp 1結腸癌細胞をBalb/cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍容積が 270mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ のrmIL-12、 $1\mu\text{g}$ rmIL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc wt、 $1\mu\text{g}$ rmIL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si、又は $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照で週1回腹腔内治療した。腫瘍成長は60日間評価した。

20

【0472】

図2A～図2Cに示されるとおり、IL-12（図2A）及びDF-mIL-12-Fc wt（図2B）は一部のマウスで腫瘍進行を効率的に制御したが、ロバストな腫瘍退縮を誘導し、100%の完全腫瘍退縮が生じたのは、DF-mIL-12-Fc siのみであった（図2C）。更に、DF-mIL-12-Fc si療法の治療によって全生存が大幅に延びた—治療したマウスの100%が60日目になおも生存していた一方、アイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc wt、及びIL-12で治療したマウスの生存期間中央値は、それぞれ、27日、33日、及び46日であった（図3）。

【0473】

次に、腫瘍進行の制御における異なる用量のDF-mIL-12-Fc wt及びDF-mIL-12-Fc siを比較した。簡潔に言えば、 10^6 個のCT26-Ty rp 1結腸癌細胞をBalb/cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍容積が 300mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ 又は $0.1\mu\text{g}$ rmIL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc wt、又は $1\mu\text{g}$ 又は $0.1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc siで週1回腹腔内治療した。腫瘍成長は55日間評価した。

30

【0474】

図4A～図4Dに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc wtによる治療は一部のマウスで腫瘍進行の低減につながり、 $1\mu\text{g}$ rmIL-12モル当量の用量の2例のマウスでは完全退縮につながったが（図4A）、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量の用量では腫瘍抑制は認められなかった（図4C）。対照的に、 $1\mu\text{g}$ IL-12モル当量の用量のDF-mIL-12-Fc si治療では100%の完全腫瘍退縮が生じ（図4B）、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量の低い用量でも腫瘍成長のロバストな遅延が誘導された（図4D）。 $1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc wtで治療したマウスの生存期間中央値は32日で、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで治療したマウスの生存期間中央値である34日と同様であったことから、DF-mIL-12-Fc siは、その野生型変異体の10倍高い効力があることが示唆される（図5）。DF-mIL-12-Fc wtは、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量の用量では効率的でなく、アイソタイプ治療群と同じ24日の生存期間中央値を示した。

40

50

【0475】

次に、DF-mIL-12-Fc siの異なる投与経路についてのインビボ有効性を比較した。簡潔に言えば、 10^6 個のCT26-Tyrp1結腸癌細胞をBalb/cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍容積が 270mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si又はモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照によって腹腔内又は皮下のいずれかで週1回治療した。腫瘍成長は60日間にわたって評価した。

【0476】

図19A～図19Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内投与（図19A）及び皮下投与（図19B）は両方とも、ロバストな腫瘍退縮を誘導し、100%の完全腫瘍退縮が生じた。このように、様々な投与経路を用いたDF-mIL-12-Fc si治療が、有効性を実証した。

10

【0477】

実施例3-B16F10腫瘍モデルにおけるサイレントなFcドメインポリペプチドと融合したIL-12による腫瘍抑制

本例は、マウス黒色腫モデルにおけるDF-mIL-12-Fc wt及びDF-mIL-12-Fc siの相対的な腫瘍進行制御能力について記載する。簡潔に言えば、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をC57BL/6マウスに皮下注射した。腫瘍接種後8日目、腫瘍容積が 250mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（ $n=10$ ）に無作為化し、 $0.5\mu\text{g}$ のIL-12、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc wt、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si、又は $0.5\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した。腫瘍成長は32日間評価した。

20

【0478】

図6A～図6Cに示されるとおり、試験したIL-12-Fcコンストラクトの各々が腫瘍進行を遅延させたが、DF-mIL-12-Fc siが最も効率的に腫瘍成長を制御した。DF-mIL-12-Fc siで治療したマウスの生存期間中央値は29日であり、これは、それぞれ16日、26日、及び22日であったアイソタイプ対照、DF-mIL-12-Fc wt、及びIL-12で治療したマウスの生存期間中央値よりも長かった（図7）。

30

【0479】

次に、腫瘍進行の制御における異なる用量のDF-mIL-12-Fc wt及びDF-mIL-12-Fc siを比較した。簡潔に言えば、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をC57BL/6マウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後8日目、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $0.5\mu\text{g}$ 又は $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc wt、又は $0.5\mu\text{g}$ 又は $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで週1回腹腔内治療した。腫瘍成長は30日間評価した。

【0480】

図8A～図8Dに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siは、いずれの用量においても、腫瘍成長の抑制の点でDF-mIL-12-Fc wtよりも優れていた。更に、各用量で、DF-mIL-12-Fc wtで治療したマウスの生存期間中央値は20日であった。対照的に、 $0.1\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで治療したマウスの生存期間中央値は21日であり、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12モル当量のDF-mIL-12-Fc siで治療したマウスの生存期間中央値は28日であった（図9）。これらの結果から、高用量（ $0.5\mu\text{g}$ IL-12モル当量）のDF-mIL-12-Fc siでは、その野生型対応物又はアイソタイプ対照と比較してマウスの生存が大幅に増加したことが実証された。

40

【0481】

50

次に、DF-mIL-12-Fc si 治療の単回用量投与を先述の毎週の治療と比較した。簡潔に言えば、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をC57BL/6マウスに皮下注射した。腫瘍接種後8日目、腫瘍容積が 200mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群 ($n=10$) に無作為化し、 $0.5\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si 又はモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照で週1回治療した。腫瘍成長は39日間評価した。

【0482】

図20に示されるとおり、単回用量のDF-mIL-12-Fc si によって100%のマウスに腫瘍増殖の低減が生じ、但し毎週の投与と比較すると、腫瘍増殖はより早く起こった(図6C)。加えて、マウスは一過性の体重減少を実証したが、これは初回用量後に限られた(データは示さず)。従って、単回用量のDF-mIL-12-Fc si は、治療が難しい腫瘍モデルで初期有効性を実証したが、このモデルでは、続く毎週の投与が、腫瘍増殖の遅延に一層良好である。

10

【0483】

次に、DF-mIL-12-Fc si の異なる投与経路についてのインビボ有効性を比較した。簡潔に言えば、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をC57BL/6マウスに皮下注射した。腫瘍接種後7日目、腫瘍容積が 260mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群 ($n=10$) に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si 又はモル当量のmIgG2aアイソタイプ対照によって腹腔内又は皮下のいずれかで週1回治療した。腫瘍成長は40日間評価した。

20

【0484】

図21A～図21Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc si の腹腔内投与(図21A)及び皮下投与(図21B)は両方とも、100%のマウスに腫瘍退縮を誘導した。このように、様々な投与経路を用いたDF-mIL-12-Fc si 治療が、有効性を実証した。

【0485】

実施例4-DF-hIL-12-Fc wt及びrhIL-12のインビトロ効力

rhIL-12と比較したDF-hIL-12-Fc si の効力について、インビトロバイオアッセイを用いて評価した。

【0486】

HEK-Blue IL-12レポーターアッセイを用いてIL-12効力を評価した。IL-12R+HEK-Blueレポーター細胞(InvivoGen)を培養液から回収し、培養培地中 1×10^6 細胞/mLに調整した。DF-hIL-12-Fc si (DF IL-12-Fc) 及び組換えヒトIL-12(rhIL-12; PeproTech)を培地に希釈した。 $100\mu\text{L}$ のPBMC懸濁液を $100\mu\text{L}$ の希釈した被験物質と混合し、48時間インキュベートした。上清を回収し、製造者の指示に従い、細胞からの分泌型胚性アルカリホスファターゼの測定により、レポーター細胞が安定に発現したIL-12受容体及びシグナル伝達成分の会合を検出した。簡潔に言えば、 $25\mu\text{L}$ の試料上清を $200\mu\text{L}$ のQUANT-Blue試薬と混合し、暗所下室温で10分間インキュベートした。次にSpectraMax i3xプレートリーダーによって 620nm

30

40

【0487】

図10Aに示されるとおり、IL-12R+HEKレポーター細胞によるSEAPの産生は、DF-hIL-12-Fc si 又はrhIL-12の濃度の増加に伴い増加した。HEK-Blueレポーターアッセイにおける測定されたIL-12応答は、調べた濃度ではDF-hIL-12-Fc si とrhIL-12との間で同等であった。

【0488】

次に、ヒトPBMCからのIFN γ 産生を定量化することにより、IL-12効力を評価した。ヒト末梢血バフィーコートから密度勾配遠心法を用いてPBMCを単離し、培養培地中 1×10^6 細胞/mLに調整した。DF-hIL-12-Fc si 及び組換えヒ

50

トIL-12 (rhIL-12) を培地に希釈した。100 μ L のPBMC懸濁液を100 μ L の希釈した被験物質と混合し、48時間インキュベートした。上清を回収し、ヒトIFN- γ ELISA MAXキット (BioLegend) を使用してIFN γ を定量化した。IFN γ ELISAプレートの発色後、それをSpectraMax i3x機器を用いて450 nmで読み取り、540 nmのバックグラウンドを差し引いた。サンプルウェル内のIFN γ 含有量は、アッセイ検量線から試料読取り値を補間することによって近似した。

【0489】

図10Bに示されるとおり、ヒトPBMCをDF-hIL-12-Fc si又はrhIL-12と共に培養し、同時に5 μ g/mLのPHAで処理してIFN γ 応答の大きさを増幅したとき、IFN γ 産生は増加した。IFN- γ 産生と、続くIL-12刺激は、調べた濃度ではDF-hIL-12-Fc siとrhIL-12との間で同等であった。

【0490】

従って、これらの2つの細胞型及び刺激条件によるEC50値には、1桁を超える差があったが、両方のアッセイでDF-hIL-12-Fc siとrhIL-12との同等の活性が実証されたことから、DF-hIL-12-Fc siコンストラクトの効力が未変性組換えヒトIL-12と同程度の効力を呈することが示唆される。

【0491】

実施例5-DF-hIL-12-Fc si又はrhIL-12の静脈内注入後のサル血漿中におけるIL-12、DF-hIL-12-Fc si及びIFN γ 濃度

カニクイザルにおいて、DF-hIL-12-Fc si又はrhIL-12の静脈内注入後に薬力学(PD)及び薬物動態(PK)を評価した。

【0492】

カニクイザルにDF-hIL-12-Fc si及び組換えヒトIL-12を10 μ g/kgでIV注入によって投与した。

【0493】

Quantikine ELISAヒトIL-12 p70イムノアッセイキットに基づきイムノアッセイを用いてDF-hIL-12-Fc si及びヒトIL-12を検出した：このアッセイは定量的サンドイッチ酵素イムノアッセイ技法を利用するものであった。ヒトIL-12 p70に特異的なモノクローナル抗体を固相捕捉として使用し、検出は、抗体HRPタグ付加レポーターを使用して達成した。rhIL-12又はDF-hIL-12-Fc si参照標準品でスパイクした標準物質及びQCを、試験試料と共にマイクロタイタープレートのウェルにピペティングし、試料中に存在する任意のIL-12 p70を固相上の固定化した抗体によって結合させた。未結合の物質を洗い流し、ウェルにヒトIL-12 p70に特異的な酵素結合ポリクローナル抗体を加えた。未結合の抗体-酵素試薬を洗い流し、各ウェルにTMB基質を加えた。結果として起こった酵素反応により青色の産物が生じ、これが酸停止液を加えると黄色に変わった。各ウェルで測定される色の強度は、初期段階で結合したrhIL-12又はDF-hIL-12-Fc siの量に正比例する。データ収集ソフトウェア、SoftMax Pro Enterpriserのバージョン4.6を備えるSpectraMaxマイクロプレートリーダーの540 nmを基準として、プレートを450 nmで読み取った。データをテキストファイルに変換し、Watson LIMS v. 7.2.0.02にインポートし/処理した。重み付け係数を1とするロジスティック(自動推定)曲線当てはめを用いて回帰を実行した。

【0494】

イムノアッセイ(メソスケールディスカバリー(MSD)-ELISA様のイムノアッセイ)もまた用いてDF-hIL-12-Fc siを検出し、このアッセイは、未処理のMSDマイクロタイタープレートをサル吸着ヤギ抗ヒトIgGでコートすること、及び室温でインキュベートすることを伴う。プレートを洗浄し、ブロックし、洗浄し、試験試料と共に、DF-hIL-12-Fc si参照標準品でスパイクした検量線用及び品質

10

20

30

40

50

管理用試料とインキュベートした。このインキュベーション後、プレートを洗浄し、プレートに一次検出抗体としてビオチン抗ヒトIL-12/IL-23 p40を加えた。もう一回の洗浄ステップ後、ストレプトアビジンコンジュゲートSulfo-Tagを二次検出抗体として加えた。プレートの最終回の洗浄を行い、プレートにMSD Read Buffer Tを加え、MSD Sector Imager S600を使用してプレートを読み取った。未加工のMSDデータをテキストファイルにエクスポートし、次にそれを、Envigoにてカスタム設計されたプログラム化したExcelスプレッドシートを使用してWatsonLIMS互換ファイルに変換した。WatsonLIMSソフトウェア v. 7. 2. 0. 02にてデータをインポートし、回帰を行った。

【0495】

カニクイザル血漿中のNHP炎症誘発性バイオマーカーの相対的定量測定に、メソスケールディスクバリー方法を実施した。この方法 (method) は、カニクイザルK2 EDTA血漿 (サル血漿と称される) 中の炎症誘発性パネル1バイオマーカー: IFN γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、及びIL-10の相対的定量測定に、サンドイッチイムノアッセイ手順を使用するものであった。この方法は、V-PLEX及びV-PLEX Plus用のMSD非ヒト霊長類 (NHP) キット、カタログ番号K15056D-1、K15056D-2、K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6に基づいている。この方法は、カニクイザルと反応するヒト捕捉抗体及び検出抗体を利用する。このキットは、96ウェルマルチスポットプレートの各ウェルにおける独立した十分に画成されたスポット上に捕捉抗体を予めコートしてあるプレートを提供する。プレートをサル血漿試料とインキュベートし、洗浄し、次に、電気化学発光 (ECL) 標識 (MSD SULFO-TAG) とコンジュゲートしている検出抗体 (各分析物に特異的) とインキュベートした。試料中の分析物が、ワーキング電極表面に固定化した捕捉抗体に結合する; 結合した分析物による検出抗体の動員により、サンドイッチが完成する。プレートを洗浄し、MSD Read Bufferを加えることにより、電気化学発光 (electrochemiluminescence) (ECL) に適切な化学的環境を作り出した。プレートをMSD Sector Imager 600 (SI600) 機器にロードし、そこでプレート電極に電圧を印加すると、捕捉された標識が光を放出した。この機器は、放出された光の強度を相対発光単位 (RLU) で測定して試料中の分析物の相対的定量測定値を提供する。未加工のRLUデータをテキストファイルにエクスポートし、次にそれを、Envigoにてカスタム設計されたプログラム化したExcelスプレッドシートを使用してWatsonLIMS互換ファイルに変換した。続いてWatsonLIMSソフトウェア v. 7. 2. 0. 02にてデータをインポートし、回帰を行った。

【0496】

図11は、IV投与後の時間の経過に伴うDF-hIL-12-Fc si及び組換えヒトIL-12の相対血漿濃度を示す。このデータは、DF-hIL-12-Fc si及びrhIL-12の濃度が、予想どおり、時間の経過に伴い低下したことを示している。しかしながら、DF-hIL-12-Fc siは、この時間経過にわたってrhIL-12と比較して半減期の延長及び全体的に多い曝露を実証した。

【0497】

図11はまた、IV投与後のサル血漿中のIFN γ (PD) の相対濃度も示している。このデータは、DF-hIL-12-Fc si及びrhIL-12の薬力学が、IFN γ 産生によって評価したとき、両方とも、IV投与後に活性を実証したことを示している。しかしながら、DF-hIL-12-Fc siは、rhIL-12と比較してより高いピーク活性及びより長い持続期間を実証した。

【0498】

実施例6-マウスサロゲートDF-mIL-12-Fc siの薬理特性評価

DF-mIL-12-Fc siと称される、半減期延長型マウスIL-12変異体の血清半減期及びインビボ薬力学を調べた。

【0499】

1 μ g IL-12に対応する等モル量のDF-mIL-12-Fc siを非腫瘍担持Balb/cマウスに静脈内注射し、PK/PD特性をIL-12と比較した。ナイーブBalb/c (n=6) に1 μ g DF-mIL-12-Fc si及びIL-12 (1 μ g IL-12と等モル) を静脈内注射した。注射後0.017、0.5、3、6、24、48、72、96、144及び219時間に血液を試料採取した。血清中のIL-12及びIFN γ レベルを先述のとおりELISAによって分析した。

【0500】

図12A及び図12Bに示され、表15に定量化されるとおり、DF-mIL-12-Fc siは、約30時間という長く続く血清半減期を示しており(図12B、DF-mIL-12-Fc si $T_{1/2}$ =29.85時間)、これはIL-12(図12A; IL-12 $T_{1/2}$ =6.05時間)の5倍の長さであった。半減期の延長に加えて、DF-mIL-12-Fc si媒介性IFN γ 産生(AUC=916654)もまた、IL-12と比較して長時間にわたった(AUC=20304)。

【0501】

次に、DF-mIL-12-Fc siの異なる投与経路についてのPK/PD特性を比較した。1 μ g IL-12に対応する等モル量のDF-mIL-12-Fc siを、単回用量として非腫瘍担持Balb/cマウスに静脈内、腹腔内、又は皮下投与によって注射し、記載するとおりのPK/PD特性を評価した。

【0502】

図12C～図12Eに示され、表16に定量化されるとおり、静脈内(図12C)、腹腔内(図12D)、又は皮下(図12E)投与では、いずれによっても、異なる投与経路間で同等のDF-mIL-12-Fc si媒介性IFN γ 産生が生じた。注目すべきことに、皮下投与では、より低いIL-12 C_{max} が生じた。従って、DF-mIL-12-Fc si投与の薬物動態特性(例えば、IL-12濃度)は、投与経路に応じて異なったが、薬力的特性(IFN γ 産生)は、長く続き、異なる経路間で比較的同等のままであった。

【0503】

【表39】

表 15: DF-mIL-12-Fc si 及び rmIL-12 の薬理特性

	IL-12					IFN γ
	$T_{1/2}$	スパン	T_{max}	C_{max}	AUC	AUC
rmIL-12	6.05	9.15	0.13	358.65	999.81	20304
DF-mIL-12-Fc	29.85	6.92	0.19	258.20	5636.49	916654

【0504】

【表40】

表 16: IV、IP、及び SC による DF-mIL-12-Fc si の薬理特性

	$T_{1/2}$	スパン	T_{max}	C_{max}	AUC
静脈内	31.5	6.4	0.2	257.2	5985.6
腹腔内	34.70	5.19	N/A	75.09	3964.21
皮下	37.5	4.1	36.0	23.1	1938.1

【0505】

実施例7-B16F10マウスモデルにおけるDF-mIL-12-Fc siとPD-1遮断との組み合わせ

DF-mIL-12-Fc siとPD-1遮断との組み合わせ療法を実施して、樹立B16F10腫瘍で抗腫瘍免疫応答を増幅し得るかどうかを分析した。

【0506】

C57BL/6マウスに、マウスの側腹部へと 10^6 個のB16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後8日目、マウスを無作為化した（各群 $n=10$ ）。平均腫瘍容積が約 245mm^3 に達したとき、 $0.5\mu\text{g}$ アイソタイプ対照、 $0.5\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si、 $200\mu\text{g}$ 抗PD-1クローンRMP1-14、又はDF-mIL-12-Fc si/抗PD-1の組み合わせによってマウスを腹腔内治療した。動物にDF-mIL-12-Fc siを週1回及び抗PD-1を毎週2回注射した。腫瘍成長は60日間評価し、生存率及び体重をモニタした。

【0507】

図13A～図13Cに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc si単独の投与では腫瘍退縮が遅くなり（図13A）、及びPD-1単独では腫瘍成長に最小限の効果しか見られなかったが（図13B）、DF-mIL-12-Fc siをPD-1遮断と組み合わせると、腫瘍成長が更に遅くなり（図13C）、抗PD-1治療によってDF-mIL-12-Fc si治療に対する抗腫瘍応答が更に増幅されたことが示唆された。

10

【0508】

図14A及び図14Bに示されるとおり、アイソタイプの15日及び $200\mu\text{g}$ 抗PD-1治療マウスの17.5日と比較して、DF-mIL-12-Fc si療法による及びPD-1遮断との組み合わせでの全生存は延長され、29日（DF-mIL-12-Fc si単独療法）及び36日（組み合わせ）の生存期間中央値を示した（図14A）。注目すべきことに、高い奏効率にもかかわらず、DF-mIL-12-Fc si及び組み合わせ療法のレジメンはB16F10腫瘍担持マウスによって良好に忍容されるように見えた（図14B）。

20

【0509】

従って、DF-mIL-12-Fc siとPD-1遮断との組み合わせ療法は、いずれの治療単独と比較しても、有効性の向上を実証した。

【0510】

実施例8-B16F10マウスモデルにおけるDF-mIL-12-Fc siとmcfFAE-C26.99 Tr iNKETとの組み合わせ

DF-mIL-12-Fc siとmcfFAE-C26.99 Tr iNKETとの組み合わせ療法を実施して、樹立B16F10腫瘍で抗腫瘍免疫応答を増幅し得るかどうかを分析した。

30

【0511】

C57BL/6マウスに対し、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後7日目、マウスを無作為化した（各群 $n=10$ ）。腫瘍平均が 200mm^3 に達したとき、 $150\mu\text{g}$ アイソタイプ対照、又は $0.5\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si、 $150\mu\text{g}$ Tr iNKET、又は組み合わせDF-mIL-12-Fc si/Tr iNKETによってマウスを腹腔内治療した。腫瘍成長は60日間評価し、生存率及び体重をモニタした。

【0512】

図15Aに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siによる単独療法は、腫瘍成長の低下につながった。出発腫瘍容積が 200mm^3 での単剤としてのmcfFAE-C26.99 Tr iNKETによる治療によっては腫瘍進行は遅れなかった（図15B）。対照的に、DF-mIL-12-Fc siとmcfFAE-C26.99との組み合わせは、DF-mIL-12-Fc si単独と比較して抗腫瘍応答を更に亢進させ（図15C）、30%の完全奏効例（CR）（ $n=3$ ）が得られたことから、Tr iNKET治療がDF-mIL-12-Fc si治療に対する抗腫瘍応答を更に増幅させたことが示唆される

40

【0513】

図16Aに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc si療法による及びmcfFAE-C26.99 Tr iNKETとの組み合わせでの全生存は延長し、アイソタイプの16日及びTr iNKET治療マウスの17日と比較して、29日（DF-mIL-12

50

ー F c s i 単独療法) 及び 60 日 (T r i n K E T 組み合わせ) の生存期間中央値を示した。注目すべきことに、高い奏効率にもかかわらず、D F - m I L - 1 2 - F c s i 及び組み合わせ療法のレジメンは B 1 6 F 1 0 腫瘍担持マウスによって良好に忍容されるように見えた (図 1 6 B)。

【0514】

これらの 3 例の完全奏効例 (上記に記載される実験及び図 1 5 C に提示されるデータによる C R) を、初回腫瘍接種の 7 2 日後に 2×10^6 個の B 1 6 F 1 0 黒色腫細胞で再チャレンジした。年齢対応ナীব C 5 7 B L / 6 マウスを対照群として使用した。初期 D F - m I L - 1 2 - F c s i / T r i n K E T 組み合わせ治療群からの 3 匹のマウス中 1 匹は無腫瘍のままであり、別のマウスは 9 5 日目から始まる腫瘍形成を示し、第 3 のマウスの腫瘍進行は年齢対照群と同様であったことから (図 1 7)、組み合わせ療法による免疫学的記憶の形成が示唆された。

10

【0515】

従って、D F - m I L - 1 2 - F c s i と T r i n K E T との組み合わせ療法は、いずれの治療単独と比較しても、マウス集団で完全な持続性のある応答を実証したことを含め、有効性の向上を実証した。

【0516】

実施例 9 - D F - m I L - 1 2 - F c s i による治療は、C T 2 6 腫瘍モデルにおいて完全な回復を促進する

本例は、C T 2 6 腫瘍を担持するマウスにおいて D F - m I L - 1 2 - F c s i による治療が回復を促進することを示している。

20

【0517】

簡潔に言えば、 10^6 個の C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌細胞を B a l b / c マウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後 1 4 日目、腫瘍容積が 270 mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群に無作為化し、 $1 \mu\text{g}$ r m I L - 1 2 と当量のモル用量の $1 \mu\text{g}$ の D F - m I L - 1 2 - F c s i 又は $1 \mu\text{g}$ の m I g G 2 a アイソタイプ対照を週 1 回腹腔内注射した。腫瘍成長は 6 0 日間評価した。初回腫瘍接種の 7 2 日後に、完全奏効例を 10^6 個の C T 2 6 細胞で再チャレンジした。年齢対応ナীব B a l b / C マウスを対照群として使用した。

【0518】

30

図 1 8 A は、C T 2 6 腫瘍細胞を接種し、単回用量の $1 \mu\text{g}$ の D F - m I L - 1 2 - F c s i 又は m I g G 2 a アイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図 1 8 B は、C T 2 6 腫瘍細胞を接種し、毎週用量の $1 \mu\text{g}$ の D F - m I L - 1 2 - F c s i 又は m I g G 2 a アイソタイプを投与した個々のマウスの体重を示すグラフである。図 1 8 C は、C T 2 6 腫瘍細胞の接種で再チャレンジした個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

【0519】

図 1 8 A ~ 図 1 8 B に示されるとおり、D F - m I L - 1 2 - F c s i を投与すると、m I g G 2 a アイソタイプと比較して口バストな腫瘍退縮が生じ、治療動物の体重に影響を及ぼす毒性は認められなかった。図 1 8 C に示されるとおり、初期 D F - m I L - 1 2 - F c s i 治療マウスは無腫瘍のままであったことから、D F - m I L - 1 2 - F c s i 治療による免疫学的記憶の形成が示唆される。

40

【0520】

実施例 10 - 腹腔内又は皮下送達した D F m I L - 1 2 - F c s i は、C T 2 6 腫瘍モデルにおいて腫瘍容積を低減するのに有効である

本例は、D F - m I L - 1 2 - F c s i の腹腔内又は皮下投与により、C T 2 6 腫瘍を担持するマウスにおいて 100 % の完全な回復が確実となることを示している。

【0521】

簡潔に言えば、 10^6 個の C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌細胞を B a l b / c マウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後 1 4 日目、腫瘍容積が 270 mm^3 に達したとき、マウ

50

スを異なる治療群に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回腹腔内注射するか、又は $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回皮下注射した。腫瘍成長は60日間を超えて評価した。

【0522】

図19Aは、CT26腫瘍細胞を接種し、腹腔内に送達される毎週用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図19Bは、CT26腫瘍細胞を接種し、皮下送達される毎週用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

10

【0523】

図19A～図19Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内送達又は皮下送達のいずれも、CT26腫瘍容積の低減に有効であった。

【0524】

実施例11-DF-mIL-12-Fc siの単回用量投与は、B16F10マウスモデルにおいて腫瘍容積を低減するのに有効である

本例は、単回用量のDF-mIL-12-Fc siが、B16F10黒色腫瘍を担持するマウスにおける腫瘍容積の低減に有効であることを示している。

【0525】

20

端的には、C57BL/6マウスに対し、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後7日目、マウスを無作為化した。腫瘍平均が 200mm^3 に達したとき、単回用量のアイソタイプ対照、又は $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siによってマウスを腹腔内治療した。腫瘍成長は50日間評価した。

【0526】

図20に示されるとおり、 μg のDF-mIL-12-Fc siの単回用量は、B16F10腫瘍担持マウスにおいて腫瘍容積を低減するのに有効である。

【0527】

実施例12-腹腔内又は皮下送達したDF-mIL-12-Fc siは、B16F10マウスモデルにおいて腫瘍容積を低減するのに有効である

30

本例は、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内又は皮下投与が、B16F10黒色腫瘍を担持するマウスにおいて100%の完全な回復につながったことを示している。

【0528】

簡潔に言えば、 10^6 個のB16F10黒色腫細胞をC57BL/6マウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種後7日目、マウスを無作為化した。腫瘍平均が 200mm^3 に達したとき、マウスに $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回腹腔内注射し、又は $1\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の $1\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回皮下注射した。腫瘍成長は40日間評価した。

【0529】

40

図21A～図21Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siの腹腔内送達又は皮下送達のいずれも、アイソタイプ対照と比較すると、B16F10腫瘍容積の低減に有効であった。

【0530】

実施例13-DF-mIL-12-Fc siは単回用量として効果的である

本例は、DF-mIL-12-Fc siが、単回用量として投与したときCT26腫瘍容積の低減に有効であり、及び反復投与で投与したとき、更に一層有効であることを示す。

【0531】

簡潔に言えば、 10^6 個のCT26-Ty rp1結腸癌細胞をBalb/cマウスの側

50

腹部に皮下注射した。腫瘍接種後14日目、腫瘍容積が 270 mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の単回用量の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\text{ }\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回腹腔内注射した。或いは、マウスに $1\text{ }\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又は $1\text{ }\mu\text{g}$ のmIgG2aアイソタイプ対照を週1回腹腔内注射した。腫瘍成長は60日間を超えて評価した。

【0532】

図22Aは、CT26腫瘍細胞を接種し、単回用量の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図22Bは、CT26腫瘍細胞を接種し、毎週用量の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc si又はmIgG2aアイソタイプを投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

10

【0533】

図18A及び図22Aに示されるとおり、単回用量の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siにより、mIgG2aアイソタイプと比較すると、腫瘍担持マウスの口バストな70%の完全な回復が生じた。しかしながら、図2C及び図22Bに示されるとおり、反復毎週投与の $1\text{ }\mu\text{g}$ のDF-mIL-12-Fc siでは、mIgG2aアイソタイプと比較すると、腫瘍担持マウスの100%の完全な回復が確実となった。図18Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siは反復投与であっても良好に忍容され、体重によって評価したとき、毒性は認められなかった。

20

【0534】

加えて、完全奏効例（CR）を反対側の側腹部において 5×10^5 個のCT26-Ty rp1結腸癌細胞で再チャレンジし、同じ腫瘍用量でチャレンジしたナイーブマウスと腫瘍進行を比較した。図18Cに示されるとおり、ナイーブマウスで腫瘍が成長した一方、完全奏効例の100%が、再チャレンジ後にも無腫瘍のままであった。従って、単回用量のDF-mIL-12-Fc siは、マウス集団で完全な、持続性のある応答を実証した。

【0535】

実施例14-単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおける薬物動態

30

ELISA様のイムノアッセイメソスケールディスカバリー（MSD）イムノアッセイ方法を利用して、カニクイザルにおいて $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25A）、 $2\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25B）、又は $4\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25C）のDF-hIL-12-Fc siの皮下注射後に薬物動態を決定した。簡潔に言えば、未処理のMSDマイクロタイタープレートにサル吸着ヤギ抗ヒトIgGをコートし、室温でインキュベートした。コーティング及びインキュベーション後、プレートを洗浄し、ブロックし、洗浄し、試験試料と共に、DF-hIL-12-Fc si参照標準品でスパイクした検量線用及び品質管理用試料とインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、プレートに一次検出抗体としてビオチン抗ヒトIL-12/IL-23 p40を加えた。もう一回の洗浄ステップの後、ストレプトアビジンコンジュゲートSulfo-Tagを二次検出抗体として加えた。プレートの最終回の洗浄を行った後、プレートにMSD read buffer Tを加えた。MSD Sector Imager S6000を使用してプレートを読み取った。

40

【0536】

図25A～図25Cは、DF-hIL-12-Fc siの $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25A）、 $2\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25B）、又は $4\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ （図25C）の単回皮下用量で治療したカニクイザルにおける薬物動態を示す折れ線グラフである。

【0537】

このデータは、DF-hIL-12-Fc si及びrhIL-12の濃度が、予想どおり、時間の経過に伴い低下したことを示しており、試験した全ての用量で同様の薬物動

50

態プロファイルであった。

【0538】

実施例15－単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるサイトカイン放出

カニクイザルにおいて $1\mu\text{g}/\text{kg}$ （図26A及び図26B）、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ （図26C及び図26D）、又は $4\mu\text{g}/\text{kg}$ （図26E及び図26F）のDF-hIL-12-Fc siを皮下注射した後のサイトカインの定量的測定について、MSDイムノアッセイキットを使用して決定した。この方法は、サンドイッチイムノアッセイキット（炎症誘発性パネル1バイオマーカー及びV-PLEX Plusケモカインパネル1 NHPキット）を使用して、カニクイザルK2 EDTA血漿（サル血漿と称される）中の炎症誘発性パネル1バイオマーカー：IFN γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、及びIL-10の相対的定量測定を行うものであった。この方法は、V-PLEX及びV-PLEX Plus用のMSD非ヒト霊長類（NHP）キット、カタログ番号K15056D-1、K15056D-2、K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6に基づいている。この方法は、カニクイザルと反応するヒト捕捉抗体及び検出抗体を利用する。このキットは、96ウェルマルチスポットプレートの各ウェル内の独立した十分に画成されたスポット上に捕捉抗体を予めコートしてあるプレートを提供する。プレートをサル血漿試料とインキュベートし、洗浄し、次に、電気化学発光（ECL）標識（MSD SULFO-TAG）とコンジュゲートしている検出抗体（各分析物に特異的）とインキュベートした。試料中の分析物が、ワーキング電極表面に固定化した捕捉抗体に結合する；結合した分析物による検出抗体の動員により、サンドイッチが完成する。プレートを洗浄し、MSD Read Bufferを加えることにより、電気化学発光（electrochemiluminescence）（ECL）に適切な化学的環境を作り出した。プレートをMSD Sector Imager 600（SI600）機器にロードし、そこでプレート電極に電圧を印加すると、捕捉された標識が光を放出した。この機器は、放出された光の強度を相対発光単位（RLU）で測定して試料中の分析物の相対的定量測定値を提供する。未加工のRLUデータをテキストファイルにエクスポートし、次にそれを、Envigoにてカスタム設計されたプログラム化したExcelスプレッドシートを使用してWatsonLIMS互換ファイルに変換した。続いてWatsonLIMSソフトウェア v. 7.2.0.02にてデータをインポートし、回帰を行った。

【0539】

図26A～図26Fは、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ （図29A及び図29B）、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ （図26C及び図26D）、又は $4\mu\text{g}/\text{kg}$ （図26E及び図26F）の単回皮下用量のDF-hIL-12-Fc siで治療したカニクイザルにおけるIFN γ （図26A、図26C、及び図26E）及びIP10/CXCL10（図26B、図26D、及び図26F）の濃度を示す折れ線グラフである。

【0540】

図26Aに示されるとおり、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ のDF-hIL-12-Fc siの単回皮下用量では、検出可能なレベルのIFN γ は生じなかった。 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $4\mu\text{g}/\text{kg}$ のDF-hIL-12-Fc siの皮下用量では、一部の動物にIFN γ レベルの増加が生じ、これは用量投与後4日目にピークに達した（図26C及び図26E）。 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 、及び $4\mu\text{g}/\text{kg}$ のDF-hIL-12-Fc siの皮下用量では、いずれもIP10/CXCL10レベルの上昇が生じ、これは用量投与後4日目にピークに達した（図26B、図26D、及び図26F）。

【0541】

実施例16－4T1同所性マウスモデルにおける放射線照射又は化学療法を用いたDF-mIL-12-Fc si組み合わせ療法

DF-mIL-12-Fc siの投与によって引き出される抗腫瘍活性を増幅することができるかどうかを示すため、放射線照射又は化学療法を用いた組み合わせ試験を実施

した。簡潔に言えば、B a l b / c マウスに 5×10^5 個の 4 T 1 - l u c 腫瘍細胞を乳房脂肪パッドに同所性に注射した。腫瘍接種後 14 日目、マウスを無作為化した（各群 $n = 10$ ）。マウスは、単独療法としてのアイソタイプ、D F - m I L - 1 2 - F c s i（両方とも $1 \mu g$ I L - 1 2 と等モル）、 $5 mg / kg$ D o x i l（登録商標）（化学療法）の静脈内、又は $10 Gy$ での照射、又は D o x i l（登録商標）若しくは放射線との組み合わせでの D F - m I L - 1 2 - F c s i のいずれかで皮下治療した。時間の経過に伴う腫瘍成長を評価した。図 27 は、乳癌細胞を接種し、単独療法としての毎週用量のアイソタイプ対照、D F - m I L - 1 2 - F c s i、D o x i l（化学療法）、又は $10 Gy$ での照射又は D o x i l（登録商標）若しくは放射線との組み合わせでの D F - m I L - 1 2 - F c s i を投与した個々のマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。グラフは、腫瘍成長の群平均 $\pm$ 標準誤差平均値を示す。

10

【0542】

図 27 に見られるとおり、D F - m I L - 1 2 - F c s i による単独療法はそれ自体、4 T 1 腫瘍担持マウスにおいて有効であったが、組み合わせ療法は抗腫瘍免疫応答を増幅し、 $10 \sim 30\%$ のマウスでの完全な腫瘍退縮につながった。

【0543】

実施例 17 - D F - m I L - 1 2 - F c s i は大型の P D - 1 遮断抵抗性 C T 2 6 結腸癌腫瘍に対する抗腫瘍有効性を媒介する

本例は、D F - m I L - 1 2 - F c s i が P D - 1 遮断抵抗性 C T 2 6 - T y r p 1 腫瘍に対する強力な抗腫瘍応答を引き出したかどうかを分析する。簡潔に言えば、B a l b / c マウスに 0.5×10^6 個の C T 2 6 - T y r p 1 腫瘍細胞を注射した。接種後に平均腫瘍容積が約 $120 mm^3$ に達したとき、9 日目にマウスを無作為化した。マウスを $200 \mu g$ アイソタイプ又は抗 P D - 1 抗体（毎週 2 回）のいずれかで治療した。図 28 A は、C T 2 6 - T y r p 1 腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は抗 P D - 1 抗体のいずれかで治療（隔週）した B a l b / c マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。17 日目、抗 P D - 1 で前治療した群（平均腫瘍容積が約 $800 mm^3$ ）を 2 つの治療群に更に分割した。群 1 は、毎週 2 回の P D - 1 遮断治療を受け続け、群 2 は、P D - 1 遮断（毎週 2 回）を D F - m I L - 1 2 - F c s i（毎週 $1 \mu g$ ）と共に受けた。図 28 B は、 $1 \mu g$ の D F - m I L - 1 2 - F c s i による毎週の治療と共に抗 P D - 1 抗体（隔週）で治療した抗 P D - 1 抗体による前治療のある B a l b / c マウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。

20

30

【0544】

図 28 A に示されるとおり、抗 P D - 1 単独療法は腫瘍進行を制御できなかった。しかしながら、図 28 B に示されるとおり、D F - m I L - 1 2 - F c s i を加えると、有効な腫瘍退縮が生じた。

【0545】

実施例 18 - 大型 C T 2 6 結腸癌腫瘍に対する D F - m I L - 1 2 - F c s i の局所治療はアブスコパル抗腫瘍応答を誘導する

本例は、D F - m I L - 1 2 - F c s i 治療がアブスコパル治療効果を誘導できるかどうかを示す。簡潔に言えば、B a l b / c の左側腹部（ 0.8×10^6 個の腫瘍細胞）及び右側腹部（ 0.4×10^6 個の腫瘍細胞）の両方に、C T 2 6 - T y r p 1 結腸癌細胞を皮下移植した。腫瘍接種後 13 日目、左の腫瘍には、 $0.1 \mu g$ アイソタイプ対照又は $0.1 \mu g$ D F - m I L - 1 2 - F c s i のいずれかを毎週 1 回、2 ~ 3 週間にわたって注射した。図 29 A は、C T 2 6 - T y r p 1 腫瘍細胞を接種し、アイソタイプ対照又は D F - m I L - 1 2 - F c s i のいずれかで（毎週）1 回治療した B a l b / c マウスにおける治療を受けた（T r）腫瘍の腫瘍成長曲線を示すグラフである。右の腫瘍は未治療のままとした（N T）。

40

【0546】

図 29 B は、C T 2 6 - T y r p 1 腫瘍細胞を接種した B a l b / c マウスにおける未治療の（N T）腫瘍の腫瘍成長曲線を示すグラフである。

50

【0547】

図29A～図29Bに示されるとおり、対照アイソタイプ治療腫瘍は、右部位及び左部位の両方で次第に成長した。図29A～図29Bに示されるとおり、DF-mIL-12-Fc siは、局所注入部位（図29A）及び遠隔の未治療腫瘍（図29B）に有効な抗腫瘍応答を引き起こしたことから、アブスコパル治療効果が指摘される。

【0548】

実施例19-DF-mIL-12-Fc siは大型CT26結腸癌腫瘍に対する抗腫瘍有効性を媒介する

本例は、突然変異L234A、L235A、及びP329Gを持つマウスIgG2a FcドメインポリペプチドのN末端に融合した野生型マウスIL-12 p40及びp35サブユニットを含むDF-mIL-12-Fc si（実施例2に考察される）が、大型の腫瘍容積に対して効果的であることを示す。

【0549】

大型CT26結腸癌腫瘍に対するDF-mIL-12-Fc si媒介性抗腫瘍有効性を試験した。簡潔に言えば、Balb/cマウスに 10^6 個のCT26-Tyrp1結腸癌細胞を皮下注射した。腫瘍接種後18日目、腫瘍容積が 800mm^3 に達したとき、マウスを異なる治療群（各群 $n=10$ ）に無作為化し、 $1\mu\text{g}$ 又は $2\mu\text{g}$ IL-12と当量のモル用量のDF-mIL-12-Fc si、又はモル当量のmIgG2aアイソタイプで1回又は毎週1回腹腔内治療した。

【0550】

腫瘍成長は65日間評価した。図23Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、 $2\mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照又は $1\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siのいずれかで（毎週）1回治療したBalb/cマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図23Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、 $2\mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照又は $2\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siのいずれかで（毎週）1回治療したBalb/cマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図30Aは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、 $2\mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照又は $2\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siのいずれかで1回治療したBalb/cマウスの腫瘍成長曲線を示すグラフである。図30Bは、CT26-Tyrp1腫瘍細胞を接種し、 $2\mu\text{g}$ mIgG2aアイソタイプ対照、 $1\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si（毎週投与）、 $2\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si（毎週投与）、又は $2\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc si（1回）で治療したBalb/cマウスの平均腫瘍成長曲線を示すグラフである。図23A、図23B、及び図30Aは、個々のマウスの腫瘍成長曲線を示す。図30Bは、腫瘍平均±標準誤差平均値を示す。

【0551】

図23A、図23B、及び図30Bに示されるとおり、毎週用量（ $1\mu\text{g}$ 又は $2\mu\text{g}$ ）のDF-mIL-12-Fc siは、腫瘍進行を効率的に制御し、100%のマウスがDF-mIL-12-Fc si治療に応答した。加えて、図30Aに示されるとおり、 $2\mu\text{g}$ DF-mIL-12-Fc siによる単回治療は腫瘍退縮を示し、100%の奏効率が生じた。この例に記載されるデータ及び図は、単回用量として投与したときに、DF-mIL-12-Fc siがより大型のCT26腫瘍容積の低減に有効であるのみならず、CT26腫瘍容積の低減にもまた有効であることを示している。

【0552】

実施例20-B16F10黒色腫に対するDF-mIL-12-Fc si治療は血清及び腫瘍におけるサイトカイン及びケモカインの産生を誘導する

本例は、DF-mIL-12-Fc si治療により、B16F10腫瘍を担持するC57BL/6マウスの血液及び腫瘍（tumor）におけるIFN γ 、CXCL9、及びCXCL10のレベルの上昇が生じたことを示す。簡潔に言えば、C57BL/6マウスに 10^6 個のB16F10黒色腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後7日目（平均腫瘍容積が 150mm^3 に達したとき）、マウスを無作為化した（各群 $n=8$ ）。アイソタイプ対

照、 $IL-12$ 、又は $1\mu g$ $IL-12$ と等モルの $DF-mIL-12-Fc$ によってマウスを腹腔内治療した。

【0553】

治療後72時間が経った後、血清及び腫瘍ライセートを調製し、マルチプレックス技術を用いて $IFN\gamma$ (図24A)、 $CXC19$ (図24B)、及び $CXC110$ (図24C) 発現に関して分析した。図31A～図31Cは、マウスの平均サイトカイン／ケモカインレベルを示す。

【0554】

図24A～図24Cに示されるとおり、単回用量の $0.5\mu g$ の $DF-mIL-12-Fc$ si により、血清中 (左側のパネル) 及び腫瘍内 (右側のパネル) における $IFN\gamma$ (図24A)、 $CXC19$ (図24B)、及び $CXC110$ (図24C) の発現の増加が生じた一方、 $IL-12$ 治療では効果はほとんど又は全くなかった。

【0555】

実施例21- $LALAPA$ 及び $LALAPG$ 突然変異を有する $DF-hIL-12-Fc$ si は同程度の $IFN\gamma$ 刺激活性を有し、 $Fc\gamma R$ 結合を無効にした

本例は、 $LALAPA$ ($L234A$ 、 $L235A$ 、及び $P329A$) 突然変異、又は $LALAPG$ ($L234A$ 、 $L235A$ 、及び $P329G$) 突然変異を有する $IgG1-Fc$ を含む $DF-hIL-12-Fc$ si の $IFN\gamma$ 刺激及び $Fc\gamma R$ 結合活性を示す。端的には、ヒトPBMCを $5\mu g/ml$ フィトヘマグルチニン (PHA) 及び $LALAPA$ 又は $LALAPG$ 突然変異を有する $DF-hIL-12-Fc-si$ の用量滴定液の両方と共に2日間培養した。2日間刺激した後、上清を回収し、 $IFN\gamma$ 含有量をELISAにより測定した。 $Fc\gamma R$ 結合活性を決定するため、高親和性 $Fc\gamma R$ $CD32$ 及び $CD64$ を発現するTHP-1細胞に結合したフルオロフォアコンジュゲート $hIgG1$ アイソタイプ抗体 ($83nM$) をフローサイトメトリーにより検出した。

【0556】

図31Aに示されるとおり、 $hIL-12-Fc-LALAPA$ 及び $hIL-12-Fc-LALAPG$ は、PHAと並行してPBMCからの $IFN\gamma$ 産生を刺激する能力が同程度であり、PHA単独で産生される量をはるかに上回る。

【0557】

図31Bに示されるとおり、16倍モル過剰の $hIL-12-Fc-wt$ ($1.3\mu M$) を混合物中に標識した $hIgG1$ アイソタイプ抗体と同時に含めると、恐らくは $IgG1$ 結合に関して $CD32$ 及び $CD64$ と競合するため、結合シグナルの実質的な低下が生じた。対照的に、同じ濃度で、 $hIL-12-Fc-LALAPA$ 又は $hIL-12-Fc-LALAPG$ のいずれとのインキュベーションによっても、検出可能な $IgG1$ アイソタイプ結合は生じなかったことから、両方のタンパク質とも、 $LALAPA$ 及び $LALAPG$ 突然変異に起因して $Fc\gamma R$ 会合が無効になったことが示唆される。

【0558】

実施例22: $DF-hIL12-Fc$ si の製造工程及び工程管理

$DF-hIL12-Fc$ si は、浮遊培養下のチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で発現させる。マスターセルバンク (MCB) からの細胞を使用して、動物成分不含の化学限定培地が入った振盪フラスコを接種する。次にこの細胞を使用して徐々に大きい容量の培養液を接種することにより、生産バイオリアクターの接種が可能となるまで細胞数を拡大する。

【0559】

生産バイオリアクターを流加培養方式で動作させて、 $DF-hIL12-Fc$ si タンパク質の発現を増加させる。約14日後、深層ろ過によって培養液を回収することにより細胞及び細胞デブリを取り出した後、初回精製にかける。プロテインAキャプチャークロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィー (CEX) を含む一連のクロマトグラフィー及びろ過ステップを用いて $DF-hIL12-Fc$ si をCHO回収培地から精製する。

10

20

30

40

50

【0560】

2回の特化した直交性ウイルス不活性化及び除去ステップー低pH不活性化及びナノろ過ーを含める。ウイルス不活性化ステップには、ろ過したDF hIL12-Fc si溶液に酢酸塩を加えてpHを約3.65に調整し、少なくとも60分間インキュベートすることが含まれた。

【0561】

最後に、DF hIL12-Fc siを濃縮し、20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール及び0.01% (w/v) ポリソルベート80の最終的な組成物に製剤化する。次に、製剤化された原薬を0.2µm膜でろ過してポリカーボネートボトルに入れた後、-65℃以下で保存する。DF hIL12-Fc si原薬製造工程の概略図を図32に提供する。

10

【0562】

バッチスケール及び定義

DF hIL12-Fc si MCBの単一のバイアルを1つの生産バイオリアクターに拡大し、各回収液を精製して1つの原薬ロットにする。

【0563】

細胞培養液及び上流製造工程

DF hIL12-Fc siの上流原薬製造工程を図33に示し、各単位操作の更なる詳細を提供する。

【0564】

20

振盪フラスコ継代

マスターセルバンクのバイアルを37℃の水浴中で解凍し、ピペットによって内容物をゆっくりと混合し、次に、6mM L-グルタミンを補足した予め平衡化させた成長培地 (Balanced CHO Growth Medium A, Irvine Scientific) が入った125mL振盪フラスコに加える。接種後に細胞数を取り、必要であれば、細胞密度を $0.30 \times 10^6 \sim 0.50 \times 10^6$ 生細胞/mLの目標値に希釈する。次にフラスコを温度及び%CO₂ (g) 制御付きインキュベーター内にあるオービタルシェーカーに置く。3日目、2継代目の前に細胞密度及び生存率を点検する。

【0565】

2継代目については、6mM L-グルタミンを補足した成長培地で500mL振盪フラスコを予め平衡化させる。次にフラスコを1継代目からの細胞で接種し、温度及び%CO₂ (g) 制御付きインキュベーター内にあるオービタルシェーカーに置く。細胞密度及び生存率を測定し、フォワードプロセッシング判定基準に適合した時点で、それらの細胞を使用して3継代目を接種する。

30

【0566】

3継代目については、3つの1000mL振盪フラスコを、6mM L-グルタミンを補足した成長培地で予め平衡化させる。次にフラスコを2継代目からの細胞で接種し、次に温度及び%CO₂ (g) 制御付きインキュベーター内にあるオービタルシェーカーに置く。細胞密度及び生存率を測定し、フォワードプロセッシング判定基準に適合した時点で、それらの細胞を使用して4継代目を接種する。

40

【0567】

4継代目については、4つの5000mL振盪フラスコを、6mM L-グルタミンを補足した成長培地で予め平衡化させる。次にフラスコを2継代目からの細胞で接種し、次に温度及び%CO₂ (g) 制御付きインキュベーター内にあるオービタルシェーカーに置く。細胞密度及び生存率を測定し、フォワードプロセッシング判定基準に適合した時点で、それらの細胞を使用して50L Wave バイオリアクターを接種する。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表17にまとめる。

【0568】

50

【表 4 1】

表 17: 振盪フラスコ継代 – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ設定値/範囲	工程内検査
継代1回目: 125 mL振盪フラスコ	30 mL作業容積; 36.5°C 5% CO ₂ (g); 120 rpm	生存細胞密度 生存率
継代2回目: 500 mL振盪フラスコ	150 mL作業容積; 36.5°C 5% CO ₂ (g); 120 rpm	生存細胞密度 生存率
継代3回目: 3×1000 mL振盪フラスコ	400 mL作業容積; 36.5°C 5% CO ₂ (g); 120 rpm	生存細胞密度 生存率
継代4回目: 4×5000 mL振盪フラスコ	1500 mL作業容積; 36.5°C 5% CO ₂ (g); 120 rpm	生存細胞密度 生存率

10

【0 5 6 9】

Wave バイオリアクター

50 L Wave Bioreactor (商標) プラットフォーム (GE Healthcare Life Sciences) をセットアップし、6 mM L-グルタミンを補足した成長培地 (Balanced CHO Growth Medium A, Irvine Scientific) を接種する。この培地は 36.5°C 及び 5% CO₂ (g) で予めコンディショニングし、次に 4 継代目からの培養液を接種する。バイオリアクターは、細胞密度及び生存率に関して毎日抜取り検査し、移し替えの細胞密度判定基準に達した時点で、この培養液を使用して 200 L 生産バイオリアクターを接種する。代謝産物濃度 (例えば、グルコース及び乳酸塩) 及び pH もまた、情報として毎日モニタする。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 18 にまとめる。

20

【0 5 7 0】

【表 4 2】

表 18: Wave バイオリアクター – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ設定値/範囲	工程内検査
Wave バイオリアクター	20 L 作業容積; 36.5°C; 5% CO ₂ (g)	生存細胞密度 生存率

30

【0 5 7 1】

生産バイオリアクター

200 L のディスポーザブルバイオリアクターをセットアップし、6 mM L-グルタミンを補足した成長培地を接種する。この培地は 37°C で予め平衡化させて、次に 50 L Wave バイオリアクターからの培養液を接種する。初回接種容積は約 130 L であり、最終的な培養液容積は約 180 L である。空気及び酸素を補足することにより溶存酸素を制御し、二酸化炭素ガス及び／又は炭酸ナトリウム塩基を加えることにより pH を制御する。生産バイオリアクターは、細胞密度及び生存率に関して毎日抜取り検査し、生存細胞密度が 1.4×10^6 生細胞/mL 以上になった時点で、温度設定値を 37°C から 33°C にシフトさせ、回収液判定基準に適合するまで 33°C に維持する。生存率が 85% 以下の生存率になるか、又は培養 14 日目になるか、いずれか早い方が到来したときに培養液を回収する。培養期間中は、代謝産物濃度 (例えば、グルコース及び乳酸塩) 及び DF h I L 12-F c s i 力価 (8 日目から開始) をモニタする。

40

【0 5 7 2】

培養 3 日目から開始して、13 日目まで栄養供給濃縮物を毎日加える。加えて、必要に応じて濃縮グルコース溶液を加えることにより、供給後のバイオリアクター内のグルコー

50

スの最低濃度を維持する。3日目から始めて、バイオリアクターに毎日消泡剤を加えることにより、泡の蓄積を最小限に抑える。回収当日、バイオリアクター培養液の試料を採取して、外来性作用因子の検査にかける。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表19にまとめる。

【0573】

【表43】

表19: 生産バイオリアクター – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ設定値/範囲	工程内検査
生産生物反応	130 L開始時作業容積 36.5 ± 0.5°C (温度シフト前) 6.75 – 7.05 pH (温度シフト前) 33.0 ± 0.5°C (温度シフト後) 6.80 – 7.20 pH (温度シフト後) 40%溶存酸素	生存細胞密度 生存率 マイコプラズマ 非宿主汚染 qPCRによるマウス微小ウイルス インビトロ外来性作用因子 透過電子顕微鏡法 DF hIL12-Fc si力価

【0574】

回収液清澄化

バイオリアクターは、深層ろ過によって清澄化して細胞及び調製時の細胞デブリを取り除き、更なる精製ステップにかける。清澄化には、DOHC及びXOHCフィルタからなる二段階使い捨て深層ろ過システムを使用する。ろ過の開始前、バイオリアクター温度を18°Cに調整し、溶存酸素設定値を70%飽和に増加させる。

【0575】

回収フィルタを注射用水(WFI)でリンスし、次に緩衝液で平衡化させる。細胞懸濁液を蠕動ポンプを使用して回収フィルタに通過させて、そのフィルタをフラッシュすることにより生成物を収集する。圧力をモニタし、15 psig以下に維持する。次にろ液を0.45 / 0.2 µm膜でろ過して滅菌バッグに入れる。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表20にまとめる。

【0576】

清澄化した回収液は、直ちに処理に取り掛からない限り、キャプチャクロマトグラフィーステップまで2～8°Cで保存する。

【0577】

【表44】

表20: 回収液清澄化 – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ設定値/範囲	工程内検査
清澄化	≤ 25 psig	プロテインA HPLCによるDF hIL12-Fc si濃度 バイオバーデン; エンドトキシン

【0578】

下流精製製造工程

DF hIL12-Fc siの下流原薬製造工程を図32に示し、各単位操作の更なる詳細を以下の文に提供する。下流精製は、3段階クロマトグラフィーステップ及び2段階の特化したウイルス除去ステップ、低pH不活性化及びナノろ過からなる。各工程中間体について、許容されるホールドタイム及び温度を確立するため、ホールドタイム試験が実施されている。

【0579】

プロテインAキャプチャクロマトグラフィー

清澄化した回収液は、A m s p h e r e 3 プロテインA (J S R L i f e S c i e n c e s) 樹脂で捕捉して工程関連不純物（例えば、DNA 及び宿主細胞タンパク質）、培地添加剤を除去し、後続の精製前の容積減量ステップとして働く。必要に応じて各ロットについて複数のサイクルを実施する。各ロード前に、初めに樹脂を 20 mM トリス、150 mM NaCl、pH 7.5 で平衡化させる。ロードした後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄して未結合の、又は緩く結合した不純物を除去し、次に 50 mM 酢酸塩、pH 5.4 による 2 回目の洗浄を実施して pH を下げ、カラムを溶出用に調製する。D F h I L 12 - F c s i は、50 mM 酢酸塩、100 mM アルギニン、pH 3.7 で溶出し、280 nm UV 波長によって 1.25 AU/cm 上昇で開始して、次に 1.25 AU/cm 下降で終了するまで収集する。溶出液を 1 つのプールに収集し、各カラムサイクルを低 pH ウイルス不活性化によって個別に処理する。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 21 にまとめる。

【0580】

【表 45】

表 21: プロテイン A キャプチャークロマトグラフィー – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
プロテインAキャプチャー クロマトグラフィー	20 - 33 g/L 樹脂; 15-25°C; 平衡化 pH: 7.5; 溶出pH: 3.7; ロード/洗浄 /溶出流量: 180 cm/hr	バイオバーデン エンドトキシン

【0581】

低 pH ウイルス不活性化

プロテインA 溶出液を低 pH でインキュベートして、潜在的に存在する可能性のあるウイルスを不活性化させる。キャプチャー溶出液の pH を必要に応じて 0.5 M 酢酸で調整し、最低でも 60 分の間インキュベートする。インキュベーション時間の終了後、不活性化したプールを 2 M トリス塩基で中和し、材料を 0.2 µm ろ過アセンブリに通過させる。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 22 にまとめる。

【0582】

【表 46】

表 22: 低 pH ウイルス不活性化 – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
低pHウイルス 不活性化	酸性化pH: 3.65 ± 0.05 pH 60-75分	バイオバーデン エンドトキシン
	中和pH: 5.2 ± 0.1; 15-25°C	

【0583】

X O S P 深層ろ過

ウイルス不活性化中和化 (V I N) プールを X O S P 中間デプスフィルタに通して処理することにより、工程関連不純物（例えば、宿主細胞タンパク質 (H C P)、宿主細胞 DNA) を除去する。このシステムを W F I でフラッシュした後、D F h I L 12 - F c s i を 500 ~ 1000 g/m² の範囲内でロードする。ロードした後、システムに 50 mM 酢酸塩、pH 5.2 のチェイサーを流して生成物のホールドアップの回収を完了する。続いて X O S P プール電気伝導率を 50 mM 酢酸塩 pH 5.2 で 6.0 mS/cm 以下に調整した後、最初のクロマトグラフィーステップにロードする。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 23 にまとめる。

【0584】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表 23: XOSP 深層ろ過

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
XOSP深層ろ過	500 – 1000 g/m ² ; ≤ 30 psig; 15-25°C 電気伝導率調整: ≤ 6.0 mS/cm	バイオバーデン エンドトキシン

【0 5 8 5】

混合モードクロマトグラフィー

Capto Adhere ImpRes (GE Healthcare) による混合モードクロマトグラフィーを結合-溶出モードで実施して、高分子量 (HMW) 種を除去する。XOSPろ液電気伝導率を上記に記載したとおり 50 mM 酢酸塩 pH 5.2 で 6.0 mS/cm 以下に調整し、必要に応じて複数のロードサイクルに分割する。ロード前、カラムを 50 mM 酢酸塩 pH 5.2 で平衡化させて、ロードする。ロードした後、カラムを 50 mM 酢酸塩 pH 5.2 で洗浄し、次に 50 mM 酢酸塩 250 mM NaCl pH 5.2 で溶出する。280 nm UV 検出によって 0.625 AU/cm 上昇で開始して 1.50 AU/cm 下降で終了するまで、収集を開始する。収集後、最終 0.2 μm フィルタを持つフィルタ列に各サイクル液を通過させる。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 24 にまとめる。

【0 5 8 6】

【表 4 8】

表 24: 混合モードクロマトグラフィー – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
混合モード クロマトグラフィー	ロード電気伝導率: 3.0 – 6.0 mS/cm; ロードpH: 5.1 – 5.3; 流量: 150 cm/hr 15-23.5 g/L 樹脂ロード 15-25°C	バイオバーデン エンドトキシン

【0 5 8 7】

陽イオン交換クロマトグラフィー

Eshmuno CPX 樹脂 (EMD Millipore) による陽イオン交換クロマトグラフィーを実施して、生成物関連不純物 (例えば、高分子量種、低分子量種) を除去するとともに、並びに更なる工程関連不純物も取り除く。必要に応じて各ロットにつき複数のサイクルを実施する。ロード前、Capto Adhere ImpRes サイクルをプールし、50 mM トリス、pH 7.4 緩衝液で希釈し、pH を 2 M トリス塩基で 7.50 ± 0.20 に調整する。カラムを 50 mM トリス、pH 7.4 で平衡化した後、希釈して pH を調整した Capto Adhere ImpRes プールをロードする。次にカラムを 50 mM トリス、pH 7.4 で洗浄し、次に 50 mM トリス、pH 7.4 (緩衝液 A) 及び 50 mM トリス、0.5 M NaCl、pH 7.4 (緩衝液 B) のグラジエントで溶出させる。

【0 5 8 8】

280 nm UV 検出によって 2.5 AU/cm 上昇で開始して 4.5 AU/cm 下降で終了するまで、生成物の収集を開始する。収集後、最終 0.2 μm フィルタを持つフィルタ列に各サイクル液を通過させる。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 25 にまとめる。

【0 5 8 9】

10

20

30

40

50

【表 49】

表 25: Eshmuno CPX – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
陽イオン交換 クロマトグラフィー	10-14 g/L樹脂; ロードpH: 7.50 ± 0.20 ; ロード/溶出流量: 200 cm/h 15-25°C	バイオバーデン エンドトキシン

【0590】

ナノろ過

ナノろ過を実施して、任意の潜在的に存在する可能性のあるウイルスをサイズを基準として除去する。Eshmuno CPX 溶出液を前置フィルタ (Viresolve Prefilter Pod、EMD Millipore) に通過させ、次に 20 nm 公称フィルタ (Viresolve Pro Modus、EMD Millipore) に通過させる。ロード前、このシステムを WFI でフラッシュし、50 mM トリス、265 mM NaCl、pH 7.4 で平衡化させる。ロードした後、このシステムを平衡化緩衝液でリンスしてシステムホールドアップを除去する。次にろ液を 0.2 µm 膜に通過させた後、次のステップにかける。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 26 にまとめる。

【0591】

【表 50】

表 26: ナノろ過 – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
ナノろ過	$\leq 500 \text{ L/m}^2$ ロード $\leq 30 \text{ psig}$ 15-25°C	バイオバーデン エンドトキシン フィルタ完全性試験

【0592】

限外ろ過及びダイアフィルトレーション (UF/DF)

Pellicon Ultracel D Screen 再生セルロース 30 kDa 分子量カットオフ膜を使用して限外ろ過及びダイアフィルトレーションを実施する。このステップは、DF hIL12-Fc si を濃縮し、意図した濃度で最終的な製剤緩衝液中に交換した後、最終ろ過し、及び瓶充填する。システムは、初めに 50 mM トリス、265 mM NaCl、pH 7.4 で平衡化させて、次にウイルスろ液プールを 5.0 g/L の目標値に濃縮する。次に最低 7 ダイアボリュームの 20 mM クエン酸塩、pH 6.5 で緩衝液交換を実施する。ダイアフィルトレーション後、11.0 g/L を目標に 2 回目の濃縮を実施し、次に生成物を 7.5 g/L の最終保持液目標濃度にダイアフィルトレーション緩衝液で希釈する。

【0593】

20 mM クエン酸塩、18% (w/v) スクロース、3% (w/v) マンニトール、0.03% (w/v) ポリソルベート 80、pH 6.5 ストック溶液を、原液中 20 mM クエン酸塩、6% (w/v) スクロース、1% (w/v) マンニトール、0.01% (w/v) ポリソルベート 80 の最終濃度を目標として UF/DF プールにスパイクする。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表 27 にまとめる。

【0594】

10

20

30

40

50

【表 5 1】

表 27: UF/DF – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
限外ろ過及び ダイアフィル レーション	≤ 250 g/m ² ロード; 12.0-18.0 psig 膜貫通圧7-9ダイアボリューム; 15-25°C	バイオバーデン エンドトキシン DF hIL12-Fc si濃度

【0 5 9 5】

原薬のろ過、瓶充填、及び保存

10

製剤化されたUF／DF保持液を0.2 μm膜でろ過し、最終的な原薬保存容器、ポリプロピレン製の蓋付きの2 Lポリカーボネートボトル（Nalgene Biotainer）に入れる。ろ過は、ISO 5／グレードAエリアで実施する。ろ過後、各ボトルを無菌的に抜き取り検査し、表示を付し、-65°C以下で凍結する。工程パラメータ範囲及び工程内検査を表28にまとめる。

【0 5 9 6】

【表 5 2】

表 28: ろ過、瓶充填、及びバルク原薬保存 – 工程パラメータ及び工程内検査

単位操作	パラメータ目標/範囲	工程内検査
ろ過、瓶充填、及び バルク原薬保存	1.0 L充填容積 ≤ -65°Cで保存	フィルタ完全性試験

20

【0 5 9 7】

実施例 23：DF hIL12-Fc siの製剤化、包装、及び保存

製造ステップ及び工程内管理（IPC）を指示するDF hIL12-Fc si薬物製品製造工程フロー図を図32に示す。ろ過及び充填は、ICHガイドライン及び医薬品適正製造基準（current Good Manufacturing Practices）に記載される適用規格に適合する無菌手順に従い実施する。

【0 5 9 8】

30

原薬の解凍

DF hIL12-Fc si原薬（DS）は、暗所下2～8°Cにて96時間以下で解凍する。DSの完全解凍は、ボトルの外観検査によって確認する。

【0 5 9 9】

目標バッチ容積の80％への希釈

20 mMクエン酸塩、6％（w／v）スクロース、1％（w／v）マンニトール、0.01％ポリソルベート80（w／v）、pH6.0からなる緩衝液を10 Lガラスカーボイに調製する。固体クエン酸ナトリウム二水和物、クエン酸一水和物、スクロース、及びマンニトールは秤量し、WFIに加え、溶解するまで混合する。ポリソルベート80ストック溶液は、WFI中に調製して緩衝液に加える。緩衝液のpHを検査する（許容判定基準6.5±0.4）。緩衝液をWFIで目標容積に希釈し、混合し、検査してpH（6.5±0.4）及び重量オスモル濃度を確認し、0.2 μm膜に通してろ過する。

40

【0 6 0 0】

原薬の重量を用いて目標バッチ容積を計算する。清浄な10 Lガラスカーボイ内の緩衝液に、計算したバッチ容積の約80％となるように原薬を加え、混合する。この80％薬物製品溶液をpH（許容判定基準6.5±0.3）及びタンパク質濃度に関して280 nmの吸光度により1.44 L／（g×cm）の消衰係数を用いて検査する。

【0 6 0 1】

緩衝液成分は、6.5のpHが生じるように設計する。pHが緩衝液ステップ又は80％バルク薬物製品段階のいずれにおいても許容判定基準に適合しない場合、pHを許容判

50

定基準の範囲内に至らせるため、1 N 水酸化ナトリウム又は1 N 塩酸による滴定を実施し得る。

【0602】

DF h I L 1 2 - F c s i の1 mg / mL への希釈

前のステップから得られたタンパク質濃度を使用して、1 mg / mL の DF h I L 1 2 - F C S I 濃度に達するために必要な緩衝液の量を計算する。濃度は280 nm の吸光度によって確かめ（許容判定基準 1.0 ± 0.2 mg / mL）、及び試料を採取して pH（許容判定基準 6.5 ± 0.3 ）及び重量オスモル濃度を確認する。

【0603】

バイオバーデン低減のため、化合物化したバルク薬物製品溶液を滅菌0.2 µm フィルタに通過させて清浄な10 L ガラスカーボイに入れ、滅菌ろ過及び充填まで保っておく。予備的ろ過用の試料のバイオバーデンは、10 L ガラスカーボイから除去する。

【0604】

滅菌ろ過

各フィルタカプセルが0.45 µm ポリエーテルスルホン（PES）プレフィルタ膜及び0.2 µm PES 滅菌膜からなる連続した2つのフィルタカプセルにバルク薬物製品を通すことにより、ろ過を行う。薬物製品をろ過し、充填特別室の制御下にあるグレードB エリアにて滅菌ディスポーザブル充填バッグに入れる。両方の滅菌フィルタカプセルを完全性に関してろ過後の泡立ち点によって検査する（許容判定基準 ≥ 3200 mbar、WFI を使用）。

【0605】

バイアルへの充填

バルク薬物製品溶液は、アクセス制限バリアシステム（restricted access barrier system：RABS）のすぐ外側にあるディスポーザブルバッグから充填する。この製品を、充填特別室の制御されたグレードA RABS エリア内で既製の2 R ホウケイ酸I 型バイアルに充填する。

【0606】

バイアルを滅菌13 mm ゴムセラム栓で打栓し、13 mm アルミシールを巻き締める。充填作業中にバッチの100%の重量点検によってバイアルの充填容積を確かめる（許容判定基準 1.3 mL $\pm 5\%$ ）。充填後、バイアルを2～8℃の保存場所に移す。

【0607】

目視検査、包装及び保存

充填したバイアルを、容器、蓋、及び製品の欠陥に関する100%手動での目視検査と、続く合格品質限界検査（AQL）にかける。検査済みのバイアルは、バルク包装し、出荷時まで2～8℃で保存する。

【0608】

実施例24：製剤分析

緩衝液分析

表29に掲載する製剤を判定し、様々な緩衝液及びpH条件がDF h I L 1 2 - F c s i の安定性に及ぼす効果について評価した。DF h I L 1 2 - F c s i を表29に掲載される緩衝液中に1 mg / mL の目標タンパク質濃度となるように遠心限外ろ過装置（Amicon Ultra-4 30k MWCO）を使用して緩衝液交換した。最終回の緩衝液交換後、スポンサーが提供する消衰係数（ 1.43 mL / cm $\times$ mg）による紫外可視分光法を用いてタンパク質濃度を測定した。次に試料を3つの等しいサイズのアリコートに分割した。1つのアリコートは2～8℃で保存し、他の2つは50℃で保存した。2～8℃で保存したアリコート及び50℃のアリコートのうちの一方は、両方とも1週間の時点で取り出し、表30に掲載されるとおりの検査にかけた。50℃の他方のバイアルは2週間後に取り出し、-75℃で保存した。

【0609】

10

20

30

40

50

【表 5 3】

表 29: DF hIL12-Fc si プレ製剤をスクリーニングした緩衝液

緩衝液	pH
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5
	6.5
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5
	6.0
	7.0
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5
	7.0
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5
	7.0
	7.5
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5
	8.0

10

【0 6 1 0】

20

【表 5 4】

表 30: アッセイパネル

検査パネル	アッセイ容積 (μL)
外観	インバイアル
DSF	100
A ₂₈₀	100
DLS	100
SEC-HPLC ATM-2606	100
CE (還元) ATM-2747	100

30

【0 6 1 1】

結果

DF hIL12-Fc si の試料を 12 種の緩衝液 / pH 条件に緩衝液交換した。試料の pH 及び濃度を直ちに評価した。その後、試料をアリコートに分け、2 ~ 8 °C 及び 50 °C で保存した。1 週間インキュベートした後、次に表 30 のアッセイパネルに従い試料を評価した。結果は、以下、及び図 3 4 A ~ 図 4 2 B に示す。

【0 6 1 2】

40

50

【表 5 5】

表 31: DF hIL12-Fc si の濃度(緩衝液交換)

緩衝液	目標pH	濃度 (mg/mL)
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	1.08
	6.5	1.07
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	1.09
	6.0	1.09
	7.0	1.09
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	1.08
	7.0	1.11
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	1.05
	7.0	1.09
	7.5	1.07
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	1.12
	8.0	1.15

注記: 濃度 = $((A_{280} - A_{320}) / 1.43) * 1.0$ (cm 光路長)

* 希釈係数 (該当する場合)

【0 6 1 3】

【表 5 6】

表 32: pH 値 (緩衝液交換)

緩衝液	目標pH	緩衝液pH	試料pH
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	5.4	5.4
	6.5	6.4	6.5
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	5.5	5.5
	6.0	5.9	5.9
	7.0	6.9	7.0
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	6.4	6.4
	7.0	6.9	6.8
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	6.5	6.5
	7.0	6.9	7.0
	7.5	7.5	7.4
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	7.4	7.4
	8.0	7.9	7.9

【0 6 1 4】

外観 (1週間インキュベーション)

試料を 5℃又は 50℃でインキュベートしてから 1週間後に、全ての試料の外観を評価した。試料は全て、無色の澄明な液体で、目に見える粒子状物質を含まなかった (図 3 5 A ~ 図 3 5 B を参照)。

【0 6 1 5】

示差走査型蛍光定量法 (DSF) (1週間インキュベーション)

DSF実験は、Unchained Labs UNcleを使用して実施した。試料について、その熱安定性を判定した。DF hIL12-Fc si 熱アンフォールディング (T_m) 及び凝集の発生 (T_{agg}) を、それぞれ、固有のタンパク質蛍光及び静的光散乱 (266 nmでの SLS) の温度の関数としての変化を判定することによりモニタした。試料はトリプリケートで判定し、トリプリケートの結果の平均を求めた。試料は 0.5℃/分の定率線形ランプ速度で 25℃から 95℃までの温度ランプにわたって分析した。以

下の表 3 3～表 3 6、及び図 3 6 A～図 3 7 Dを参照のこと。

【0 6 1 6】

【表 5 7】

表 33: 決定された DSF T_m 温度 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	平均 T_{m1} (°C)	平均 T_{m2} (°C)	平均 T_{m3} (°C)
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	61.0	76.7	85.8
	6.5	64.4	75.9	N/A
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	62.0	78.6	N/A
	6.0	64.6	75.7	N/A
	7.0	65.8	74.7	N/A
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	61.3	76.5	N/A
	7.0	61.3	78.8	N/A
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	64.0 ¹	76.8 ¹	N/A ¹
	7.0	65.1	76.0	N/A
	7.5	64.8	75.4	N/A
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	62.9	75.0	80.6
	8.0	62.2	76.8	N/A

¹トリプレットウェルのうちの 1 つは分析から除外した。 T_{m1} 前後で低い読取り強度が発生したため、示差に悪影響が及び、 T_{m1} の適正な分析が妨げられた。

【0 6 1 7】

【表 5 8】

表 34: 決定された DSF T_m 温度 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	平均 T_{m1} (°C)	平均 T_{m2} (°C)	平均 T_{m3} (°C)
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	63.0	83.3	N/A
	6.5	65.1	76.7	N/A
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	63.0	79.1	N/A
	6.0	65.0 ¹	76.5 ¹	N/A ¹
	7.0	66.4	75.5	N/A
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	62.8	77.3	N/A
	7.0	62.4	80.5 ²	N/A ¹
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	64.8	77.5	N/A
	7.0	65.5	76.4	N/A
	7.5	64.9	75.1	N/A
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	63.9	76.0	83.4
	8.0	62.4	76.8	N/A

¹トリプレットウェルのうちの 1 つは分析から除外した。このウェルについて取得されたデータは、気泡又は誤った読取りのいずれかを指示するものであったため、適正な分析が妨げられた。

² T_{m1} と T_{m2} との間に更なる T_m (67.4°C) が同定された。この T_m は、その低い温度並びに T_{m1} との示差性及び分離の悪さを考慮して、 T_{m2} とは報告しなかった。

【0 6 1 8】

10

20

30

40

50

【表 5 9】

表 35: 決定された DSF T_{agg} 266 温度 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	T_{agg} 266(°C)平均
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	70.7
	6.5	75.3
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	72.9
	6.0	76.1
	7.0	63.9
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	65.4
	7.0	70.1
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	75.8
	7.0	63.7
	7.5	63.2
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	74.8
	8.0	63.4

10

【 0 6 1 9】

【表 6 0】

表 36: 決定された DSF T_{agg} 266 温度 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	T_{agg} 266(°C)平均
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	64.7
	6.5	74.9
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	70.1
	6.0	76.7
	7.0	63.3
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	62.2
	7.0	71.5
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	76.0
	7.0	63.4
	7.5	61.8
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	75.8
	8.0	63.1

20

30

【 0 6 2 0】

様々な緩衝液製剤中で、5°C及び50°Cで1週間インキュベートした後のDF hIL 12-Fc siの濃度及びpHを評価した。表37～表40及び図38A～図39Bを参照のこと。

【 0 6 2 1】

40

50

【表 6 1】

表 37: DF hIL12-Fc si の濃度 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	目標pH	濃度 (mg/mL)
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	0.80
	6.5	0.83
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	0.92
	6.0	0.92
	7.0	0.89
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	0.89
	7.0	0.97
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	0.91
	7.0	0.89
	7.5	0.96
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	0.96
	8.0	1.02

注記: 濃度 = $((A_{280} - A_{320}) / 1.43) * 1.0$ (cm 光路長) * 希釈係数 (該当する場合)

【 0 6 2 2】

【表 6 2】

表 38: DF hIL12-Fc si の濃度 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	目標pH	濃度 (mg/mL)
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	0.91
	6.5	0.93
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	0.97
	6.0	0.98
	7.0	0.96
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	0.90
	7.0	1.01
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	0.91
	7.0	0.98
	7.5	1.01
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	1.00
	8.0	1.06

注記: 濃度 = $((A_{280} - A_{320}) / 1.43) * 1.0$ (cm 光路長) * 希釈係数 (該当する場合)

【 0 6 2 3】

【表 6 3】

表 39: pH 値 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	目標pH	緩衝液pH	試料pH
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	5.4	5.4
	6.5	6.4	6.5
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	5.5	5.6
	6.0	5.9	6.0
	7.0	6.9	7.1
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	6.4	6.5
	7.0	6.9	6.9
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	6.5	6.5
	7.0	6.9	7.0
	7.5	7.5	7.5
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	7.4	7.4
	8.0	7.9	8.0

【0624】

【表64】

表 40: pH 値 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	目標pH	緩衝液pH	試料pH
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	5.4	5.5
	6.5	6.4	6.6
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	5.5	5.6
	6.0	5.9	6.0
	7.0	6.9	7.1
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	6.4	6.5
	7.0	6.9	7.0
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	6.5	6.5
	7.0	6.9	7.0
	7.5	7.5	7.5
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	7.4	7.5
	8.0	7.9	8.0

10

【0625】

動的光散乱法 (DLS) (1 週間インキュベーション)

DLS 実験は、Malvern Zeta サイザーを使用して実施した。各試料測定につき、5 回の連続スキャンを 25°C で取得した。Z 平均流体力学直径及び多分散性指数 (PDI) をキュムラント解析及びストークス・アインシュタインの式から決定した。多分散性は、試料中の不均一性の尺度である。粒子径が均一でない場合、より高い多分散性が測定されることになる。低い多分散性指数 (PDI) (≤ 0.200) は、その粒子の粒子径の均一性がより高いことを指し示している。表 41～表 42 及び図 40A～図 40L を参照のこと。

20

【0626】

【表65】

表 41: 決定された DLS 径 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	平均径 (d.nm)	PdI	モノマー径 (d.nm)	モノマー%Pd
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	13.71	0.16	15.33	37.70
	6.5	13.55	0.20	15.35	42.60
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	18.94	0.20	22.52	47.10
	6.0	11.22	0.07	12.17	28.80
	7.0	11.62	0.17	12.93	35.20
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	15.98	0.10	17.75	33.00
	7.0	14.88	0.06	15.92	26.90
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	13.38	0.17	14.81	36.50
	7.0	14.66	0.25	16.00	43.50
	7.5	21.24	0.36	18.42	29.40
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	85.19	0.15	20.42	27.10
	8.0	13.41	0.14	15.01	36.00

30

40

【0627】

50

【表 6 6】

表 42: 決定された DLS 径 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	平均径 (d.nm)	PdI	モノマー径 (d.nm)	モノマー%Pd
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	63.12	0.21	80.95	50.20
	6.5	14.46	0.12	15.76	30.10
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	44.20	0.28	76.39	49.30
	6.0	16.46	0.25	15.99	33.00
	7.0	14.31	0.25	14.13	28.90
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	98.61	0.44	185.60	46.10
	7.0	22.52	0.13	24.23	30.30
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	27.91	0.33	26.08	38.40
	7.0	14.69	0.20	15.46	32.00
	7.5	12.06	0.11	13.39	33.50
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	16.22	0.16	17.20	31.00
	8.0	17.42	0.25	17.25	32.50

10

【0 6 2 8】

サイズ排除クロマトグラフィー・高速液体クロマトグラフィー (SEC-HPLC)

SEC実験は、TOSOH G3000SWxL (7.8×300mm) を使用して実施した。各試料につき90μLを注入して、90μgのカラムロードを実現した(1mg/mLという低い濃度を考慮すると、100μgの目標カラムロードは実現不可能であった)。過去のデータが不足していることを考慮して、最も大きいピークを主ピークとして定義した。主ピークの前にあるピークを高分子量(HMW)種として定義し、後ろにあるピークを低分子量(LMW)種として定義した。表43～表44及び図41を参照のこと。5°Cで1週間のインキュベーションに関して試験した全ての条件について、主ピークの純度は93%を超えた。

20

【0 6 2 9】

【表 6 7】

表 43: SEC-HPLC 純度 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	% HMW	%Main	% LMW
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	1.0	96.6	2.4
	6.5	1.9	96.0	2.2
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	1.1	97.0	1.9
	6.0	0.4	96.7	2.8
	7.0	1.1	97.4	1.4
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	3.9	93.7	2.4
	7.0	2.0	96.5	1.5
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	1.4	97.4	1.2
	7.0	1.4	95.2	3.5
	7.5	1.3	95.2	3.5
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	2.2	96.8	1.0
	8.0	2.0	95.5	2.5

30

40

【0 6 3 0】

50

【表 6 8】

表 44: SEC-HPLC 純度 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	% HMW	% Main	% LMW
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	46.9	51.0	2.1
	6.5	11.4	86.9	1.7
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	26.7	71.9	1.4
	6.0	6.4	92.0	1.5
	7.0	4.2	94.3	1.5
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	44.7	53.7	1.7
	7.0	41.2	57.8	1.0
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	17.2	81.0	1.8
	7.0	8.8	89.7	1.5
	7.5	8.8	89.4	1.8
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	21.2	77.4	1.4
	8.0	22.0	76.6	1.4

10

【0 6 3 1】

キャピラリー電気泳動・ドデシル硫酸ナトリウム (CE-SDS) (還元)

CE-SDS 実験は、Beckman Coulter PA 800+キャピラリー電気泳動システムを使用して実施した。過去のデータが不足していることを考慮して、最も大きいピーク (ピーク 7) を主ピークとして定義した。主ピークの前にあるピークを LMW 種として定義し、後ろにあるピークを HMW 種として定義した。表 4 5 ~ 表 4 6 及び図 4 2 を参照のこと。5°C で 1 週間のインキュベーションに関して試験した全ての条件について、主ピークの純度は 4 9 % を超えた。

20

【0 6 3 2】

【表 6 9】

表 45: CE-SDS 純度 (5°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	%純度/不純物							
		ピーク1	ピーク2	ピーク3	ピーク4	ピーク5	ピーク6	ピーク7	ピーク8
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	0.2	6.9	8.0	1.3	5.6	24.8	52.8	0.4
	6.5	0.3	6.9	7.9	1.2	5.7	25.0	52.5	0.4
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	0.2	6.9	7.9	1.2	5.8	25.0	52.5	0.4
	6.0	0.2	6.8	7.9	1.2	5.8	24.9	52.8	0.4
	7.0	0.2	6.8	7.8	1.2	5.7	24.8	53.1	0.4
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	0.2	7.0	7.7	1.2	5.4	25.2	52.8	0.4
	7.0	0.3	7.1	7.8	1.1	5.4	25.1	52.8	0.4
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	2.2	8.5	10.1	1.0	5.2	22.9	49.1	0.4
	7.0	0.3	7.0	7.7	1.1	5.5	25.3	52.7	0.4
	7.5	0.3	7.0	7.8	1.2	5.7	24.9	52.8	0.4
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	0.3	7.0	7.9	1.2	5.5	25.1	52.6	0.5
	8.0	0.3	7.0	7.9	1.3	5.5	24.6	52.0	0.9

30

40

【0 6 3 3】

50

【表 7 0】

表 46: CE-SDS 純度 (50°C で 1 週間のインキュベーション)

緩衝液	pH	%純度/不純物							
		ピーク 1	ピーク 2	ピーク 3	ピーク 4	ピーク 5	ピーク 6	ピーク 7	ピーク 8
コハク酸塩 (20 mM) pKa = 5.64	5.5	1.4	5.7	10.1	1.7	6.8	24.5	46.7	1.6
	6.5	0.6	7.4	8.6	1.4	5.6	24.4	51.3	0.7
クエン酸塩 (20 mM) pKa = 6.4	5.5	1.0	5.9	9.5	1.5	6.5	25.8	49.1	0.4
	6.0	0.5	7.0	8.4	1.5	5.8	25.1	51.1	0.5
	7.0	0.6	7.8	8.9	1.3	5.7	24.6	50.5	0.2
ヒスチジン (20 mM) pKa = 6.04	6.5	0.6	6.2	7.9	1.4	5.7	24.9	50.4	1.7
	7.0	0.7	7.0	8.6	1.5	5.4	24.5	49.5	1.6
リン酸塩 (20 mM) pKa = 7.2	6.5	2.0	17.0	18.0	1.3	5.7	22.0	32.5	0.6
	7.0	0.8	8.1	9.2	1.5	5.3	24.5	49.5	0.9
	7.5	1.1	9.1	10.0	1.6	5.5	22.4	46.5	2.5
トリス (20 mM) pKa = 8.1	7.5	0.6	7.3	8.5	1.5	5.4	24	50.1	1.5
	8.0	0.6	7.5	8.8	1.5	5.0	23.7	49.2	2.4

【0 6 3 4】

まとめ及び結論

全ての試料について、外観、pH、A₂₈₀、DLS、DSF、SEC、及びCE-SDSにより分析した。外観及びpHによる判定では、様々な試料間に有意差は示されなかった。1週間のインキュベーション後に、全ての試料の濃度がやや低下した（0.1又は0.2 mg/mLの低下）。5°Cで1週間のインキュベーション後のコハク酸塩試料（pH 5.5及び6.5）の濃度は、（1.1 mg/mLから0.8 mg/mLへと）一層低下した。CE-SDSデータは、主ピーク純度の変動が最小限であることを示した（但しリン酸塩 pH 6.5 緩衝液は例外で、これは50°Cで1週間のインキュベーション後に大幅に低い平均ピーク純度を有した）。

【0 6 3 5】

熱安定性データによれば、低pH（5.5）及びヒスチジン緩衝液は分子に悪影響を及ぼしたことが示された。クエン酸塩緩衝液（但しpH 5.5を除く）及びリン酸緩衝液は、（5°C及び50°Cの両方の1週間インキュベーション試料について）最も高い熱安定性を示した。

【0 6 3 6】

5°Cで1週間のインキュベーション後の光散乱データによれば、クエン酸塩緩衝液試料（但しpH 5.5を除く）は、低い多分散性の最も小さい平均径を有したことが示された。リン酸塩及びコハク酸塩緩衝液も同様に、低い多分散性の小さい平均径を有した。50°Cで1週間のインキュベーション後、クエン酸塩緩衝液（但しpH 5.5を除く）、リン酸緩衝液（但しpH 6.5を除く）、及びコハク酸塩 pH 6.5 緩衝液は、全てが小さい平均径を有した。

【0 6 3 7】

5°Cで1週間のインキュベーション試料のSECデータは、主ピーク純度のばらつきが最小限であることを示した。50°Cで1週間のインキュベーション試料のSECデータは、51.0%～94.3%の範囲に及ぶ一層大きい変動程度を示した。最も望ましい緩衝液は、この場合もやはりクエン酸塩緩衝液（但しpH 5.5を除く）及びリン酸緩衝液であった。

【0 6 3 8】

クエン酸塩 pH 6.0 緩衝液又はクエン酸塩 pH 7.0 緩衝液の成績は、前掲に記載されたアッセイで試験されている代替的な緩衝液と比べて一層望ましいものであった。

【0 6 3 9】

賦形剤分析

表 47 に掲載される製剤を判定し、20 mM クエン酸塩、pH 6.5 中に緩衝したとき様々な賦形剤及び界面活性剤が DF-hIL-12-Fc si の安定性に及ぼす効果を評価した。遠心限外ろ過装置 (Amicon Ultra-15 30k MWCO) を使用して、DF-hIL-12-Fc si を 1 mg/mL 又は 10 mg/mL のいずれかの目標タンパク質濃度となるように表 47 に掲載される緩衝液中に緩衝液交換した。最終回の緩衝液交換後、スポンサーが提供する消費係数 (1.43 mL/cm²×mg) による紫外可視分光法 (UV-Vis) を用いてタンパク質濃度を測定した。次に、Durapore メンブレン (Fisher Scientific カタログ番号 UFC40GV0S) を備えた 0.22 µm EMD Millipore Ultrafree-CL 遠心フィルタ装置を使用して試料を滅菌ろ過した。滅菌ろ過後、各製剤は層流フードにて無菌的にハンドリングした。表 47 に指定されるとおりの、製剤化された試料は、最終濃度 0.01% のポリソルベート 80 (PS80) でスパイクするか、又は界面活性剤でスパイクしないかのいずれかとした。次に試料を 6 つの等しいサイズのアリコートに分割した。2 つのアリコートは 2~8 °C で保存し、3 つは 50 °C で保存し、及び最後のアリコートは 5 回の凍結融解サイクルを受けた。凍結融解アリコートについて、試料は -75 ± 10 °C で少なくとも 1 時間凍結して室温で解凍し、氷がないことを目視で確認した。2~8 °C で保存した両方のアリコートとも、2 週間で取り出した。一方のアリコートは試験に使用し、他方のアリコートは -75 ± 10 °C で凍結した。50 °C の単一のアリコートは 2 週間で試験のため取り出した。50 °C の他の 2 つのアリコートは 3 週間で取り出し、-75 ± 10 °C で凍結した (表 48 に示される)。検査パネルを表 49 に示す。高精度液体粒子カウント (HIA-C) による粒子状物質の判定もまた実行して、界面活性剤を判定した。

【0640】

【表 71】

表 47: DF-hIL-12-Fc si 賦形剤 DOE スクリーンをスクリーニングした緩衝液

コード	緩衝液 pH	糖	糖濃度	界面活性剤	DF-hIL-12-Fc si 濃度
A	20 mM クエン酸塩 pH 6.5	スクロース	高い (8% w/v, 233 mM)	なし	1 mg/mL
B				0.01% PS80	1 mg/mL
C				0.01% PS80	10 mg/mL
D		スクロース	低い (4% w/v, 117 mM)	なし	1 mg/mL
E		マンニトール	高い (6% w/v, 330 mM)	なし	1 mg/mL
F				0.01% PS80	1 mg/mL
G				0.01% PS80	10 mg/mL
H		マンニトール	低い (2% w/v, 110 mM)	なし	1 mg/mL
I		スクロース マンニトール	6% w/v (175 mM) 1% w/v (55 mM)	なし	1 mg/mL
J				0.01% PS80	1 mg/mL
K				0.01% PS80	10 mg/mL
L		スクロース マンニトール	4% w/v (117 mM) 2% w/v (110 mM)	なし	1 mg/mL
M				0.01% PS80	1 mg/mL
N				0.01% PS80	10 mg/mL

【0641】

【表 7 2】

表 48: バイアル割り付け

バイアル番号	条件	検査
バイアル1	2-8℃で2週間	2-8℃試料のみパッチ検査した
バイアル2	2週間 50℃	
バイアル3	5回の凍結融解サイクル -75±10℃で凍結 室温で解凍	
バイアル4	2-8℃で2週間 次に-75±10℃で凍結	必要に応じて検査した
バイアル5及び6	50℃で3週間 次に-75±10℃で凍結	

10

【0 6 4 2】

【表 7 3】

表 49: アッセイパネル

検査パネル	アッセイ容積 (μL)
外観	インバイアル
A ₂₈₀	100
DLS	100
SEC-HPLC, ATM-2606	100
DSF (2-8℃ バイアル1又は試料調製時の残り) ¹	100 ¹
HIAC ²	100

20

¹DSF は、試料調製からの残りの材料で 1 週間時点で実施した²HIAC は 0.1 mL 風袋容積及び 0.3 mL 試料容積 (1 回の抜き取り/読み取り)で実施した

【0 6 4 3】

結果

DF-hIL-12-Fc si の試料を 14 製剤中に緩衝液交換した。試料の pH 及び濃度を直ちに評価した。その後、試料をアリコートに分け、2-8℃、50℃で保存するか、又は 5 回の凍結融解サイクルにかけた。2 週間のインキュベーション後、次に表 49 のアッセイパネルに従い試料を評価した。未試験の試料を取り出し、概要を先述したとおり凍結した。

30

【0 6 4 4】

表 50 及び図 43A～図 43B は、UV-Vis 濃度決定 (ゼロ時点及び 2 週間試料)を示す。

【0 6 4 5】

40

50

【表 7 4】

表 50: DF-hIL-12-Fc si の濃度

コード	糖	界面活性剤	緩衝液 交換濃度 (mg/mL)	2 – 8°C 濃度 (mg/mL)	50°C 濃度 (mg/mL)	凍結融解濃度 (mg/mL)
A	8% w/v スクロース	なし	0.90	0.79	0.80	0.80
B		0.01% PS80		0.84	0.85	0.85
C		0.01% PS80	10.26	9.94	10.27	10.20
D	4% w/v スクロース	なし	1.11	0.97	1.00	0.99
E	6% w/v マンニトール	なし	0.89	0.81	0.82	0.82
F		0.01% PS80		0.87	0.87	0.86
G		0.01% PS80	10.61	10.69	10.91	10.74
H	2% w/v マンニトール	なし	1.04	0.93	0.94	0.95
I	6% w/v スクロース 1% w/vマンニトール	なし	1.03	0.93	0.92	0.95
J		0.01% PS80		0.98	0.98	0.98
K		0.01% PS80	9.96	9.59	10.09	9.95
L	4% w/v スクロース 2% w/vマンニトール	なし	1.05	0.92	0.93	0.94
M		0.01% PS80		0.99	0.98	0.98
N		0.01% PS80	10.14	9.41	10.19	9.48

注記: 濃度 = $((A_{280} - A_{320}) / 1.43) * 1.0$ (cm 光路長) * 希釈係数 (該当する場合)

【0 6 4 6】

表 5 1 は、ゼロ時点及び 2 週間試料の pH 決定を示す。

【0 6 4 7】

【表 7 5】

表 51: pH 値

コード	糖	界面活性剤	緩衝液交換 pH	2-8°C pH	50°C pH	凍結融解pH
A	8% w/v スクロース	なし	6.5	6.6	6.5	6.5
B		0.01% PS80		6.5	6.5	6.5
C		0.01% PS80	6.5	6.5	6.5	6.5
D	4% w/v スクロース	なし	6.5	6.6	6.5	6.5
E	6% w/v マンニトール	なし	6.5	6.5	6.5	6.5
F		0.01% PS80		6.5	6.5	6.5
G		0.01% PS80	6.5	6.5	6.5	6.5
H	2% w/v マンニトール	なし	6.5	6.5	6.5	6.4
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	6.5	6.5	6.5	6.5
J		0.01% PS80		6.5	6.5	6.5
K		0.01% PS80	6.5	6.5	6.5	6.5
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	6.5	6.5	6.5	6.5
M		0.01% PS80		6.4	6.5	6.5
N		0.01% PS80	6.5	6.5	6.5	6.4

【0 6 4 8】

外観（2週間試料）

試料は全て、無色の澄明な液体であった。表 5 2 に概略を示すとおり、一部の試料に粒子状物質が認められた。

【0 6 4 9】

【表 7 6】

表 52: 外観: 目に見える粒子状物質

コード	糖	界面活性剤	2-8℃ 外観	50℃ 外観	凍結融解 外観
A	8% w/v スクロース	なし	目に見える 粒子状物質はない	幾らかの小さく丸い 目に見える粒子状物質	目に見える 粒子状物質はない
B		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
C		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える粒子状物質 はない	目に見える 粒子状物質はない
D	4% w/v スクロース	なし	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	幾らかの小さく丸い 目に見える 粒子状物質
E	6% w/v マンニトール	なし	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
F		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
G		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
H	2% w/v マンニトール	なし	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	多数の小さく丸い 目に見える 粒子状物質
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	幾らかの小さく丸い 目に見える 粒子状物質
J		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
K		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	幾らかの小さく丸い 目に見える 粒子状物質
M		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない
N		0.01% PS80	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない	目に見える 粒子状物質はない

【0650】

示差走査型蛍光定量法 (DSF) (1週間試料)

DSF実験は、Unchained Labs UNcleを使用して実施した。試料について、その熱安定性を判定した。DF-hIL-12-Fc si 熱アンフォールディング (T_m) 及び凝集の発生 (T_{agg}) を、それぞれ、固有のタンパク質蛍光及び静的光散乱 (266 nmでのSLS) の温度の関数としての変化を判定することによりモニタした。試料はトリプリケートで判定し、トリプリケートの結果の平均を求めた。試料は0.5℃/分の定率線形ランプ速度で25℃から95℃までの温度ランプにわたって分析した。結果を表53及び図44A～図46Fに示す。

【0651】

10

20

30

40

50

【表 7 7】

表 53: 決定された DSF T_{m1} 、 T_{m2} 、及び T_{agg} 266 温度 (1 週間材料)

コード	糖	界面活性剤	平均 T_{m1} (°C)	平均 T_{m2} (°C)	平均 T_{agg} 266 (°C)
A	8% w/v スクロース	なし	66.1	76.1	66.2 ¹
B		0.01% PS80	66.3	76.4	66.1
C		0.01% PS80	66.4	77.9	75.6
D	4% w/v スクロース	なし	66.5	76.2	66.1
E	6% w/v マンニトール	なし	67.3	76.8	66.3
F		0.01% PS80	66.8	76.8	75.6 ¹
G		0.01% PS80	67.1	77.6	75.9
H	2% w/v マンニトール	なし	66.7	76.4	66.7
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	67.3	77.3	66.5
J		0.01% PS80	67.0	77.3	67.1
K		0.01% PS80	67.1	78.3	76.0
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	66.9	77.2	66.5 ¹
M		0.01% PS80	66.8	76.9	66.7
N		0.01% PS80	67.1	78.0	75.7

¹トリプリケートのうちの1つは、取得されたデータに不一致があったため分析から除外した

【0 6 5 2】

動的光散乱法 (DLS) (2 週間試料)

Malvern Zetaサイザーを使用してDLS実験を実施した。各試料測定につき、5回の連続スキャンを25°Cで取得した。Z平均流体力学直径及び多分散性指数をキュムラント解析及びストークス・アインシュタインの式から決定した。多分散性は、試料中の不均一性の尺度である。粒子径が均一でない場合、より高い多分散性が測定されることになる。低い多分散性 (≤ 0.200) は、その粒子の粒子径の均一性がより高いことを指し示している。結果を表 5 4 ~ 表 6 2 及び図 4 7 A ~ 図 4 8 H に示す。

【0 6 5 3】

10

20

30

40

50

【表 7 8】

表 54: DLS 平均径

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	13.85	28.51	21.60
B		0.01% PS80	18.61	23.61	21.67
C		0.01% PS80	14.75	30.59	14.66
D	4% w/v スクロース	なし	17.99	17.39	19.72
E	6% w/v マンニトール	なし	16.18	19.05	20.20
F		0.01% PS80	18.93	19.92	17.07
G		0.01% PS80	14.38	36.92	13.92
H	2% w/v マンニトール	なし	11.83	19.68	25.23
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	13.82	16.13	19.94
J		0.01% PS80	11.59	14.40	15.32
K		0.01% PS80	14.19	40.96	13.99
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	24.18	21.08	19.50
M		0.01% PS80	16.03	17.43	17.20
N		0.01% PS80	14.83	28.27	13.65
出発材料			12.25		

【0 6 5 4】

【表 7 9】

表 55: DLS 多分散性

コード	糖	界面活性剤	2 - 8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	0.42	0.45	0.48
B		0.01% PS80	0.33	0.37	0.34
C		0.01% PS80	0.15	0.26	0.14
D	4% w/v スクロース	なし	0.32	0.30	0.52
E	6% w/v マンニトール	なし	0.29	0.42	0.58
F		0.01% PS80	0.29	0.20	0.46
G		0.01% PS80	0.14	0.24	0.09
H	2% w/v マンニトール	なし	0.16	0.30	0.44
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	0.34	0.30	0.48
J		0.01% PS80	0.26	0.25	0.33
K		0.01% PS80	0.11	0.22	0.11
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	0.35	0.35	0.47
M		0.01% PS80	0.32	0.23	0.40
N		0.01% PS80	0.18	0.26	0.10
出発材料			0.09		

【0 6 5 5】

10

20

30

40

50

【表 8 0】

表 56: DLS モノマー径

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	15.79	31.20	17.77
B		0.01% PS80	22.74	53.08	24.89
C		0.01% PS80	16.76	44.53	16.87
D	4% w/v スクロース	なし	19.19	20.40	15.55
E	6% w/v マンニトール	なし	18.69	18.72	14.68
F		0.01% PS80	20.36	23.60	14.29
G		0.01% PS80	16.32	52.95	15.35
H	2% w/v マンニトール	なし	13.70	20.91	15.72
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	17.21	19.56	17.91
J		0.01% PS80	15.72	18.98	18.12
K		0.01% PS80	16.08	55.60	15.78
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	17.34	27.61	17.82
M		0.01% PS80	19.60	22.01	18.15
N		0.01% PS80	17.17	40.77	15.18
出発材料			13.47		

【 0 6 5 6】

【表 8 1】

表 57: DLS モノマー%Pd

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	35.50	55.10	28.60
B		0.01% PS80	36.50	213.40	36.20
C		0.01% PS80	36.60	68.00	36.80
D	4% w/v スクロース	なし	35.70	54.30	29.10
E	6% w/v マンニトール	なし	42.70	40.70	29.00
F		0.01% PS80	37.00	44.70	30.10
G		0.01% PS80	36.20	67.10	30.70
H	2% w/v マンニトール	なし	38.50	47.90	28.20
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	38.40	43.40	30.40
J		0.01% PS80	39.50	43.50	37.30
K		0.01% PS80	34.50	59.50	33.60
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	34.90	66.00	32.20
M		0.01% PS80	42.80	49.10	36.10
N		0.01% PS80	41.00	65.40	32.20
出発材料			31.20		

【 0 6 5 7】

10

20

30

40

50

【表 8 2】

表 58: DLS 第 2 種(Species 2)径 (200 d.nm~1500 d.nm)

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	631.10	838.60	493.10
B		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
C		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
D	4% w/v スクロース	なし	N/A	474.50	333.50
E	6% w/v マンニトール	なし	N/A	418.90	384.60
F		0.01% PS80	N/A	N/A	523.10
G		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
H	2% w/v マンニトール	なし	N/A	347.50	380.50
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	N/A	N/A	578.00
J		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
K		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	971.20	496.60	600.80
M		0.01% PS80	N/A	N/A	1047.00
N		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
出発材料					

【 0 6 5 8】

【表 8 3】

表 59: DLS 第 3 種(Species 3)径 (> 1500 d.nm)

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	4548.00	3861.00	5120.00
B		0.01% PS80	4152.00	3025.00	3261.00
C		0.01% PS80	4335.00	N/A	N/A
D	4% w/v スクロース	なし	1771.00	3873.00	5181.00
E	6% w/v マンニトール	なし	2538.00	4350.00	N/A
F		0.01% PS80	3079.00	4073.00	N/A
G		0.01% PS80	4557.00	N/A	N/A
H	2% w/v マンニトール	なし	4364.00	3896.00	5307.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	3155.00	2512.00	4862.00
J		0.01% PS80	N/A	4256.00	2769.00
K		0.01% PS80	N/A	N/A	N/A
L	4% w/v スクロース	なし	4428.00	3420.00	4906.00
M	2% w/v マンニトール	0.01% PS80	3883.00	3969.00	4581.00
N		0.01% PS80	4356.00	N/A	N/A
出発材料			N/A		

【 0 6 5 9】

10

20

30

40

50

【表 8 4】

表 60: 2 – 8°C 試料 種別

コード	糖	界面活性剤	モノマー	第2種(Species 2)	第3種(Species 3)
A	8% w/v スクロース	なし	15.79	631.10	4548.00
B		0.01% PS80	22.74	N/A	4152.00
C		0.01% PS80	16.76	N/A	4335.00
D	4% w/v スクロース	なし	19.19	N/A	1771.00
E	6% w/v マンニトール	なし	18.69	N/A	2538.00
F		0.01% PS80	20.36	N/A	3079.00
G		0.01% PS80	16.32	N/A	4557.00
H	2% w/v マンニトール	なし	13.70	N/A	4364.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	17.21	N/A	3155.00
J		0.01% PS80	15.72	N/A	N/A
K		0.01% PS80	16.08	N/A	N/A
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	17.34	971.20	4428.00
M		0.01% PS80	19.60	N/A	3883.00
N		0.01% PS80	17.17	N/A	4356.00

【 0 6 6 0】

【表 8 5】

表 61: 50°C 試料 種別

コード	糖	界面活性剤	モノマー	第2種(Species 2)	第3種(Species 3)
A	8% w/v スクロース	なし	31.20	838.60	3861.00
B		0.01% PS80	53.08	N/A	3025.00
C		0.01% PS80	44.53	N/A	N/A
D	4% w/v スクロース	なし	20.40	474.50	3873.00
E	6% w/v マンニトール	なし	18.72	418.90	4350.00
F		0.01% PS80	23.60	N/A	4073.00
G		0.01% PS80	52.95	N/A	N/A
H	2% w/v マンニトール	なし	20.91	347.50	3896.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	19.56	N/A	2512.00
J		0.01% PS80	18.98	N/A	4256.00
K		0.01% PS80	55.60	N/A	N/A
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	27.61	496.60	3420.00
M		0.01% PS80	22.01	N/A	3969.00
N		0.01% PS80	40.77	N/A	N/A

【 0 6 6 1】

10

20

30

40

50

【表 8 6】

表 62: 凍結融解試料 種別

コード	糖	界面活性剤	モノマー	第2種(Species 2)	第3種(Species 3)
A	8% w/v スクロース	なし	17.77	493.10	5120.00
B		0.01% PS80	24.89	N/A	3261.00
C		0.01% PS80	16.87	N/A	N/A
D	4% w/v スクロース	なし	15.55	333.50	5181.00
E	6% w/v マンニトール	なし	14.68	384.60	N/A
F		0.01% PS80	14.29	523.10	N/A
G		0.01% PS80	15.35	N/A	N/A
H	2% w/v マンニトール	なし	15.72	380.50	5307.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	17.91	578.00	4862.00
J		0.01% PS80	18.12	N/A	2769.00
K		0.01% PS80	15.78	N/A	N/A
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	17.82	600.80	4906.00
M		0.01% PS80	18.15	1047.00	4581.00
N		0.01% PS80	15.18	N/A	N/A

10

【0 6 6 2】

20

サイズ排除クロマトグラフィー—高速液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）（2週間試料）

SEC実験は、TOSOH G3000SWxL（7.8×300mm）を使用して実施した。1mg/mL試料にニートを90μLで注射して、90μgのカラムロードを実現した（1mg/mLという低い濃度を考慮すると、100μgの目標カラムロードは実現不可能であった）。10mg/mL試料にニートを10μLで注射して、100μgのカラムロードを実現した。主ピークは、ピーク面積が最も大きいピークとして定義し、これは全試料で保持時間と一致した。主ピークの前に溶出するピークを高分子量（HMW）種として定義し、後に溶出するピークを低分子量（LMW）種として定義した。ドラフト法のLOQを総ピーク面積の0.1%ピーク面積として定義した。

30

【0 6 6 3】

40

50

【表 8 7】

表 63: SEC-HPLC %Main

コード	糖	界面活性剤	2 - 8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	99.3	77.6	99.0
B		0.01% PS80	99.1	77.5	99.0
C		0.01% PS80	99.3	74.8	99.2
D	4% w/v スクロース	なし	98.9	83.8	98.9
E	6% w/v マンニトール	なし	99.1	88.9	98.0
F		0.01% PS80	99.1	68.8	98.6
G		0.01% PS80	99.2	66.3	99.0
H	2% w/v マンニトール	なし	99.2	76.7	98.7
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	99.1	85.0	98.7
J		0.01% PS80	99.0	85.2	98.9
K		0.01% PS80	99.2	57.4	99.1
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	99.1	76.6	98.5
M		0.01% PS80	99.1	78.6	99.0
N		0.01% PS80	99.2	76.5	99.1
出発材料			99.4		

【0 6 6 4】

【表 8 8】

表 64: SEC-HPLC %HMW

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	0.7	20.2	0.9
B		0.01% PS80	0.9	20.4	1.0
C		0.01% PS80	0.7	23.8	0.8
D	4% w/v スクロース	なし	0.7	14.6	1.1
E	6% w/v マンニトール	なし	0.9	9.3	2.0
F		0.01% PS80	0.9	29.5	1.4
G		0.01% PS80	0.8	32.4	1.0
H	2% w/v マンニトール	なし	0.7	21.9	1.3
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	0.9	13.5	1.3
J		0.01% PS80	1.0	13.3	1.1
K		0.01% PS80	0.8	41.3	0.9
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	0.9	22.0	1.5
M		0.01% PS80	0.9	20.0	1.0
N		0.01% PS80	0.8	22.4	0.9
出発材料			0.6		

【0 6 6 5】

10

20

30

40

50

【表 89】

表 65: SEC-HPLC %LMW

コード	糖	界面活性剤	2-8℃	50℃	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	<0.1%のLOQ	2.2	<0.1%のLOQ
B		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	2.2	<0.1%のLOQ
C		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.4	<0.1%のLOQ
D	4% w/v スクロース	なし	0.4	1.6	<0.1%のLOQ
E	6% w/v マンニトール	なし	<0.1%のLOQ	1.8	<0.1%のLOQ
F		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.6	<0.1%のLOQ
G		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.4	<0.1%のLOQ
H	2% w/v マンニトール	なし	<0.1%のLOQ	1.4	<0.1%のLOQ
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	<0.1%のLOQ	1.4	<0.1%のLOQ
J		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.5	<0.1%のLOQ
K		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.3	<0.1%のLOQ
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	<0.1%のLOQ	1.4	<0.1%のLOQ
M		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.5	<0.1%のLOQ
N		0.01% PS80	<0.1%のLOQ	1.1	<0.1%のLOQ
出発材料			<0.1%のLOQ		

【0666】

H I A C (2週間試料)

粒子状物質実験は、H I A C 9703+を使用して実施した。この分析のため、0.1 mL の試料で機器の風袋を測った後に、0.3 mL の試料容積を判定した。各ランの間に、機器を水で洗浄した。試料に加えて、緩衝液及び出発材料を分析し、有意な数の粒子がないことを示した。結果を表 66～表 69 に示す。

【0667】

【表 90】

表 66: HIAC $\geq 2 \mu\text{m}$ 粒子/mL

コード	糖	界面活性剤	2-8°C	50°C	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	113.33	740.00	210.00
B		0.01% PS80	53.33	50.00	63.33
C		0.01% PS80	176.67	193.33	120.00
D	4% w/v スクロース	なし	70.00	43.33	1466.67
E	6% w/v マンニトール	なし	93.33	83.33	193.33
F		0.01% PS80	73.33	150.00	73.33
G		0.01% PS80	83.33	210.00	116.67
H	2% w/v マンニトール	なし	40.00	100.00	5436.67
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	33.33	253.33	86.67
J		0.01% PS80	93.33	50.00	153.33
K		0.01% PS80	150.00	280.00	196.67
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	56.67	76.67	93.33
M		0.01% PS80	283.33	193.33	60.00
N		0.01% PS80	126.67	190.00	93.33

【0668】

【表 9 1】

表 67: HIAC $\geq 5 \mu\text{m}$ 粒子/mL

コード	糖	界面活性剤	2 – 8°C	50°C	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	33.33	220.00	56.67
B		0.01% PS80	20.00	16.67	23.33
C		0.01% PS80	53.33	113.33	50.00
D	4% w/v スクロース	なし	13.33	13.33	550.00
E	6% w/v マンニトール	なし	43.33	30.00	33.33
F		0.01% PS80	36.67	36.67	23.33
G		0.01% PS80	30.00	46.67	33.33
H	2% w/v マンニトール	なし	6.67	26.67	1560.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	26.67	56.67	20.00
J		0.01% PS80	33.33	3.33	36.67
K		0.01% PS80	36.67	76.67	70.00
L	4% w/v スクロース	なし	20.00	26.67	26.67
M	2% w/v マンニトール	0.01% PS80	103.33	40.00	16.67
N		0.01% PS80	40.00	23.33	33.33

10

20

【 0 6 6 9 】

【表 9 2】

表 68: HIAC $\geq 10 \mu\text{m}$ 粒子/mL

コード	糖	界面活性剤	2 – 8°C	50°C	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	13.33	60.00	20.00
B		0.01% PS80	6.67	3.33	6.67
C		0.01% PS80	13.33	83.33	20.00
D	4% w/v スクロース	なし	6.67	10.00	66.67
E	6% w/v マンニトール	なし	10.00	16.67	13.33
F		0.01% PS80	3.33	10.00	3.33
G		0.01% PS80	6.67	16.67	0.00
H	2% w/v マンニトール	なし	3.33	6.67	143.33
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	20.00	26.67	3.33
J		0.01% PS80	13.33	0.00	0.00
K		0.01% PS80	16.67	13.33	33.33
L	4% w/v スクロース	なし	3.33	16.67	10.00
M	2% w/v マンニトール	0.01% PS80	46.67	26.67	3.33
N		0.01% PS80	10.00	3.33	20.00

30

40

【 0 6 7 0 】

50

【表 9 3】

表 69: HIAC $\geq 25 \mu\text{m}$ 粒子/mL

コード	糖	界面活性剤	2-8°C	50°C	凍結融解
A	8% w/v スクロース	なし	3.33	0.00	0.00
B		0.01% PS80	0.00	0.00	0.00
C		0.01% PS80	3.33	6.67	0.00
D	4% w/v スクロース	なし	0.00	0.00	0.00
E	6% w/v マンニトール	なし	0.00	0.00	0.00
F		0.01% PS80	0.00	0.00	0.00
G		0.01% PS80	0.00	0.00	0.00
H	2% w/v マンニトール	なし	0.00	6.67	0.00
I	6% w/v スクロース 1% w/v マンニトール	なし	3.33	6.67	0.00
J		0.01% PS80	3.33	0.00	0.00
K		0.01% PS80	6.67	0.00	3.33
L	4% w/v スクロース 2% w/v マンニトール	なし	0.00	6.67	3.33
M		0.01% PS80	6.67	3.33	0.00
N		0.01% PS80	0.00	0.00	6.67

【0 6 7 1】

まとめ及び結論

全ての試料について、外観（2週間）、pH（緩衝液交換及び2週間）、A280（緩衝液交換及び2週間）、DLS（2週間）、DSF（1週間）、SEC（2週間）、及びHIAC（2週間）により分析した。

【0 6 7 2】

大多数の試料の濃度は、緩衝液交換の終わりに目標濃度から10%以内であった。両方の試料E（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、pH6.5）及びF（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、0.01%PS80 pH6.5）とも、緩衝液交換の終わりに0.89mg/mLの濃度を有した。それぞれの条件（2~8°C、50°C）でのインキュベーションの終わりに、判定した14製剤中10製剤が、その出発濃度と整合する濃度を有した。製剤A（20mMクエン酸塩、8%スクロース、pH6.5）、B（20mMクエン酸塩、8%スクロース、0.01%PS80、pH6.5）、E（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、pH6.5）、及びF（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、0.01%PS80）についての3つの試料は全て、0.87mg/mL~0.79mg/mLの範囲の濃度を有した。

【0 6 7 3】

pHによる判定は、様々な試料間で有意差を示さなかった。

【0 6 7 4】

外観による判定では、試料の色及び透明度に有意差は見られなかった。ほとんどの試料は、外観に基づけば、目に見える粒子状物質を含まなかった。製剤Aの50°C試料（20mMクエン酸塩、8%スクロース、pH6.5）、製剤Dの凍結融解試料（20mMクエン酸塩、4%スクロース、pH6.5）、製剤Iの凍結融解試料（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、pH6.5）、及び製剤Lの凍結融解試料（20mMクエン酸塩、4%スクロース、2%マンニトール、pH6.5）は全て、幾らかの小さく丸い目に見える粒子状物質を有した。製剤Hの凍結融解試料（20mMクエン酸塩、2%マンニトール、pH6.5）は、多数の小さく丸い目に見える粒子状物質を有した。注目すべきことに、これら4つ全ての製剤が界面活性剤（0.01%PS80）を欠いていた。

【0 6 7 5】

緩衝液交換した後（2～8℃で1週間保存した後）の残りの材料の示差走査型蛍光定量法による判定によれば、製剤E（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、pH6.5）及びI（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、pH6.5）が1mg/mL試料について最も高い T_{m1} を有した一方、製剤G（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、0.01%PS80、10mg/mL）、K（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80 pH6.5、10mg/mL）、及びN（20mMクエン酸塩、4%スクロース、2%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5、10mg/mL）が10mg/mL試料について最も高い T_{m1} を有したことが示された。製剤I（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、pH6.5）、J（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5）、及びL（20mMクエン酸塩、4%スクロース、2%マンニトール、pH6.5）は、1mg/mL試料について最も高い T_{m2} を有し、製剤K（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5、10mg/mL）は、10mg/mL試料について最も高い T_{m2} を有した。製剤F（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、0.01%PS80）は、他の1mg/mL試料と比べて大幅に高い T_{agg} を有した。10mg/mL試料は、 T_{agg} に関して一貫していた。全体的に見て、全ての試料が、66℃を超える T_{m1} 値を実証した。

【0676】

2週間材料のSEC-HPLCによる判定によれば、2～8℃試料並びに凍結融解試料間の変動は最小限であることが示された。1mg/mL50℃試料の%Mainは、68.8%～88.9%の範囲であった。製剤D（20mMクエン酸塩、4%スクロース、pH6.5）、E（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、pH6.5）、I（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、pH6.5）、及びJ（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5）は全て、80%を上回る%Mainを有した。10mg/mL50℃試料の%Mainは、57.4%～76.5%の範囲であった。製剤C（20mMクエン酸塩、8%スクロース、0.01%PS80、pH6.5、10mg/mL）、N（20mMクエン酸塩、4%スクロース、2%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5、10mg/mL）は、70%を上回る%Mainを有した一方、製剤K（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5、10mg/mL）は、57.4%の最も低い%Mainを有した。

【0677】

光散乱データによれば、製剤I（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、pH6.5）及びJ（20mMクエン酸塩、6%スクロース、1%マンニトール、0.01%PS80、pH6.5）が、概して、3つの試験した条件について最も小さい平均径並びに最も小さいモノマー径を有したことが示された。1mg/mL試料の一部（製剤A、B、I、J、L、及びM）では、スクロース及びマンニトールからのものである可能性が高い小さい種が検出された。これらの小さい種は、10mg/mL試料では検出されておらず、濃度が高くなることによってかき消された可能性が高い。自動分析に起因して、この種の存在により試料の多分散性に関する結論が複雑になった。平均径に関しては、製剤I及びJが、3つの条件の各々について、一貫して1mg/mL試料のほとんどよりも小さい平均径を有した。製剤I及びJはまた、2～8℃条件並びに50℃条件について、1mg/mL試料のほとんどよりも小さいモノマー径も有した。製剤D（20mMクエン酸塩、4%スクロース、pH6.5）、E（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、pH6.5）、F（20mMクエン酸塩、6%マンニトール、0.01%PS80）、及びH（20mMクエン酸塩、2%マンニトール、pH6.5）は、凍結融解条件について、残りの1mg/mL試料よりも小さいモノマー径を有した。10mg/mL試料について、全ての試料が、3つの試験した条件全てで概ね一貫していた。10mg/mL50℃試料は、両方の平均径並びにモノマー径の認め得る増加を示した。幾つもの試料において、第2の種が検出され（200d.nm～1200d.nm）、大多数の試料において

第3の種が検出された(1500 d. nm~5500 d. nm)。これらの大型の種は、3つの条件のいずれにおいても、主に1mg/mL試料に検出された。

【0678】

HIAによる判定は、概ね外観データを裏付けた。製剤Aの50℃試料(20mMクエン酸塩、8%スクロース、pH6.5)、製剤Dの凍結融解試料(20mMクエン酸塩、4%スクロース、pH6.5)、及び製剤Hの凍結融解試料(20mMクエン酸塩、2%マンニトール、pH6.5)は全て、一層多い $\geq 2\mu\text{m}$ 粒子カウント、 $\geq 5\mu\text{m}$ 粒子カウント、及び $\geq 10\mu\text{m}$ 粒子カウントを有した。これら3つの試料を除いては、残りの試料は比較的一貫していた。いずれの試料も、USP<787>規格を超えなかった。

【0679】

製剤J(20mMクエン酸塩、6%w/vスクロース、1%w/vマンニトール、0.01%PS80、pH6.5)の性能が、最も望ましいと決定された。この緩衝液/賦形剤/界面活性剤の組み合わせは、10mg/mL(製剤K)の一層高い濃度では、50℃で2週間のインキュベーション後に、SEC-HPLCによれば、十分な性能を発揮しなかった。加えて、1mg/mL試料は、概して、10mg/mL試料よりも良好な、又はそれと同程度に十分な性能を発揮した。

【0680】

実施例25: DF hIL12-Fc siの薬物動態(PK)分析

DF hIL12-Fc siは、有害作用を比例的に増加させることなくIL12の有効性を亢進させるように設計された一価ヒトIL12-Fc融合タンパク質である。DF hIL12-Fc siは、rhIL12と比較して実質的に長い半減期を有する。DF hIL12-Fc siの半減期が延長すると、頻回反復投与の必要がなくなり、結果として、毒性を引き起こすIL12曝露における反復的なスパイクがなくなることに伴い、薬力学的プロファイルが長く続くことが可能となる。マウスモデルでは、半減期が長くなると、大幅に高い抗腫瘍活性が低い投与頻度で可能となることから、3週間に1回(Q3W)など、患者における頻度の低い投与が効果的であり、許容できる安全性プロファイルをもたらす得ることが示唆される。

【0681】

DF hIL12-Fc siの投与に最適なものとして、薬物動態(PK)プロファイルがより良好であって、投与後観察される最高血清濃度(C_{max})での薬物濃度のスパイクが回避され、その結果、より良好な忍容性が得られ得るという理由で皮下(SC)経路を選択した。

【0682】

インビトロ薬理

インビトロ結合特性

DF hIL12-Fc siは、未変性IL12及びヒトIgG1-Fcの、そのそれぞれの受容体、IL12R及びFcRnに対する結合親和性を保持していた。対照的に、DF hIL12-Fc siのヒトIgG1-Fc部分は、FcγRへの結合が無効となるように突然変異していた。

【0683】

インビトロ細胞活性

DF hIL12-Fc siの効力をrhIL12の効力と比較するため、フィトヘマグルチニン(PHA)又は抗CD3抗体のいずれかで刺激したヒト初代免疫細胞からのIFNγ産生をインビトロで分析した。DF hIL12-Fc si及びrhIL12は両方とも、IFNγ産生アッセイ全体を通して一貫して同等の効力を呈し、ヒトPBMC、単離されたヒトT細胞、又は単離されたヒトNK細胞を活性化した。

【0684】

臨床グレードのDF hIL12-Fc siを伴う刺激されていないヒトPBMCにて、別個のインビトロ試験を行い、サイトカイン放出症候群(CRS)を誘導する潜在的能力を判定した。この試験では、DF hIL12-Fc siのみが、予想された薬理と一

10

20

30

40

50

致したIFN γ の用量依存的増加につながったが、判定した他の7つのサイトカインの分泌は誘導しなかった。

【0685】

インビトロ種交差反応性

毒性試験に適切な種を判定するため、DF hIL12-Fc siがマウス、ラット、及びカニクイザル免疫細胞からのIFN γ 放出を刺激するインビトロ活性を分析した。

【0686】

以下に基づき、非臨床安全性試験を行うのに唯一の薬理的に関連性のある種としてカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス（*Macaca fascicularis*））を選択した：種間でのIL12のアミノ酸配列の比較；ヒトPBMCサブセット上の結合パターンと比較した、PBMCにおけるカニクイザル免疫細胞サブセット上のIL12R β 1発現と比べたDF hIL12-Fc siの結合パターン；及びヒトと比べたカニクイザル初代免疫細胞におけるDF hIL12-Fc siによるIFN γ 放出の刺激。

10

【0687】

文献と一致して（Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, et al., J Immunol. 1992; 148 (11): 3433-40）、ヒトDF hIL12-Fc siもrhIL12も、マウス脾細胞又はラットPBMCからのIFN γ 産生を亢進させなかった。

【0688】

インビボ薬理

マウスにおけるインビボ薬理

ヒトIL12はマウス細胞において機能性でなかったため、ヒトDF hIL12-Fc si薬物候補を反映するサロゲートマウスIL12-Fcを作成し、これにより同系マウスインビボ腫瘍モデルにおけるPK/PDプロファイル及び有効性の調査が可能となった。マウスIL12は、未変性IL12を有するヒトで観察されるものと比較して、マウスに同様の発現パターン及び機能を有すると見なされる（Car 1999）。

20

【0689】

DF-mIL-12-Fc siと称されるサロゲート分子は、マウスIL12を利用するものであり、ここではp35及びp40サブユニットを2つの異なるFc変異体のN末端に融合した。マウスIgG2a Fc断片は、FcRnへの結合は保持しながらもFc γ R結合を無効にするように突然変異させており（Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, et al., J Immunol. 1992; 148 (11): 3433-40）、これは、DF hIL12-Fc siに利用されるヒトFc変異体（ヒトIgG1 Fcサイレント）に最も類似していることが分かっている。

30

【0690】

DF-mIL-12-Fc siのエキソビボでの生物学的効力

DF-mIL-12-Fc siの効力（平均50%有効濃度[EC₅₀]=2.07 $\pm$ 0.8 pM）は、rmIL12（平均EC₅₀=0.69 $\pm$ 0.14 pM）と同等であった。ヒトDF hIL12-Fc si又はrhIL12のいずれによっても、マウス脾細胞からのIFN γ 産生は亢進しなかったことから、種交差反応性がないことが確認された。

40

【0691】

DF-mIL-12-Fc siのインビボ特性評価及び薬物動態

この分子の単回用量投与後に、BALB/c又はC57BL/6マウスにおいてDF-mIL-12-Fc siのPK/PDプロファイル及びバイオアベイラビリティを判定した。

【0692】

DF-mIL-12-Fc siは、29.85時間という長く続く血清t_{1/2}を実証し、これはrmIL12の約5倍長くなる（t_{1/2}=6.05時間）。DF-mIL-1

50

2-Fc siの $t_{1/2}$ がこのように5倍延長したことにより、媒介されるIFN γ 産生が約40倍多くなり（投与時点から最後の観察時点までの濃度時間曲線下面積[AUC_{0-219h}]=916, 654 h $\cdot$ pg/mL）、これは、rmIL12（AUC_{0-219h}=20, 304 h $\cdot$ pg/mL）と比べたものと比較して、より耐久性のある、持続的なものであった。IFN γ レベルは、DF-mIL-12-Fc siの単回用量後200時間超にわたって上昇したままであり、IFN γ 曝露のこの亢進は、rmIL12群と等モル量でのDF-mIL-12-Fc siの投与によって起こったもので、これによりほぼ同じC_{max}が生じた。

【0693】

BALB/cマウスにおいて、DF-mIL-12-Fc siのバイオアベイラビリティは、IP及びSC投与したとき、それぞれ66%及び32%であった。73%及び44%（それぞれ、IP及びSC）の同等のバイオアベイラビリティがC57BL/6マウスで達成された。

【0694】

C57BL/6マウスでは、BALB/cマウスと比較して約4倍高いIFN γ 分泌が観察された（IFN γ のC_{max}は、C57BL/6及びBALB/cマウスにおいて、それぞれ約25, 000及び約6, 000 pg/mLであった）。

【0695】

重要なことに、PD応答は、血清IFN γ レベルにより測定したとき、バイオアベイラビリティの違い及びSC投与後に観察された低いC_{max}にもかかわらず、投与経路と無関係に同程度であった。これらの結果から、SC経路によるIL12-Fcフォーマットが、IV経路によるときの僅か10分の1のC_{max}への曝露でありながら、完全なPD有効性を実現可能であることが示唆される。幾らかのIL12毒性がIFN γ によって媒介されるため、従ってIV又はSC投与後に同程度であり得るが、他の副作用は、IFN γ 非依存的であることが報告されており（Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, et al., Blood. 1997; 90(7): 2541-8）、SC投与後は、IL12 C_{max}が低いため、あまり顕著でない可能性がある。

【0696】

要約すれば、DF-mIL-12-Fc siは、C57BL/6及びBALB/cマウス系統においてIP及びSC投与したとき、好都合なバイオアベイラビリティと共に、rmIL12と比較して長時間にわたる血清 $t_{1/2}$ 及びIFN γ 産生の延長を実証した。しかしながら、両方の投与経路とも、IV投与と同様に、同程度の血清IFN γ レベルが生じ、C57BL/6マウスではBALB/cと比較して4倍高いIFN γ 分泌が観察された。

【0697】

DF-mIL-12-Fc si 治療指数

B16F10黒色腫モデルにおいて、IL12変異体DF-mIL-12-Fc si及びrmIL12をそのIL12血清曝露レベル（DF-mIL-12-Fc si毎週及びrmIL12毎日）と適合するように投与し、PD応答、忍容性、及びインビボ有効性を分析することにより、rmIL12と比較したDF-mIL-12-Fc siのベネフィット・リスクプロファイルを決定した。

【0698】

ナীবC57BL/6においてrmIL12を反復SC投与すると、毎週注射したDF-mIL-12-Fc siと比較して、6日以内に血清IFN γ の著明な蓄積が生じた；rmIL12治療動物のAUC IFN γ は、DF-mIL-12-Fc si治療マウスと比べて2.8~4.5倍に増加した。加えて、rmIL12の後続用量によっては、IFN γ 産生がほとんど又は全くかったことから、応答を制限する強力な負のフィードバックが示唆される。対照的に、DF-mIL-12-Fc siの毎週投与では、持続的な中程度のIFN γ 分泌が生じ、2回目の用量が初回用量と同様のPDプロファイルを

10

20

30

40

50

実証した。更に、B16F10腫瘍担持C57BL/6マウスでは、0.5又は1 μ g rmIL12の毎日の投与は致死性となり、1週間の治療後に全てのマウスを安楽死させた。0.25 μ g rmIL12の毎日の投与(MTD)は、1 μ g rmIL12と等モルレベルで毎週投与するDF-mIL-12-Fc siと比較すると、腫瘍進行の制御において効果が低かった。

【0699】

これらの知見は、rhIL12で実施された臨床試験で観察された毒性が、少なくとも一部には、頻回投与スケジュールの帰結であったことを裏付けている。

【0700】

マウス腫瘍モデルにおけるDF-mIL-12-Fc si単独療法の有効性

10

インビボでのDF-mIL-12-Fc si有効性の分析に、2つの異なるマウスモデル、B16F10黒色腫(C57BL/6に由来する)及びCT26-20.7結腸癌(BALB/cに由来する)を選択した。B16F10は「寒性」腫瘍モデルであり、これは、単剤としてのチェックポイント遮断に対して抵抗性で、且つ抗体依存性細胞傷害(ADCC)機能を持つモノクローナル抗体に対して抵抗性であることが報告されている(Mosely SI, Prime JE, Sainson RC, Koopmann JO, Wang DY, Greenawalt DM, et al., Cancer Immunol Res. 2017; 5(1): 29-41)。CT26は、炎症性腫瘍微小環境を呈することが公知の、十分に特徴付けられている結腸癌モデルである。CT26-20.7は、親系統と同様の成長及び特性の、マウスTyrop1トランス遺伝子を持つ、形質導入によって得られたCT26のサブ系統である。

20

【0701】

薬理試験を行うことにより、(1)DF-mIL-12-Fc si及びrmIL12のインビボ活性を比較し；(2)樹立された大型800mm³腫瘍においてDF-mIL-12-Fc siの用量反応及び頻度を評価し；(3)DF-mIL-12-Fc siのIP及びSC投与が同様の抗腫瘍応答を媒介するかどうかを決定し；及び(4)異なる投与頻度が腫瘍量に及ぼす影響を判定した。

【0702】

CT26結腸癌モデルにおけるDF-mIL-12-Fc siの有効性

30

CT26-20.7腫瘍担持BALB/cマウスにおいて、平均腫瘍容積(MTV)が270mm³に達した後、1 μ g rmIL12と等モルの用量のDF-mIL-12-Fc si、mIgG2aアイソタイプ対照、又はrmIL12で毎週1回、5週間にわたってIP治療した。DF-mIL-12-Fc siで治療すると、抗腫瘍応答の増加が生じ($p < 0.0001$)、rmIL12治療群の10%のCRと比較して、100%の完全奏効(CR)が得られた。

【0703】

CT26-20.7腫瘍担持BALB/cマウスでDF-mIL-12-Fc si用量レベル及び頻度を調べたところ、単回用量のDF-mIL-12-Fc siが100%の奏効率を誘導したことが観察された。全てのマウスがDF-mIL-12-Fc si治療に応答したが、応答は耐久性が低く、腫瘍の20%が後の段階で進行した。マウスに毎週1回、2週間にわたって投与したときも同様の結果が得られた。

40

【0704】

可能性のある用量-効果を調べたところ、1又は0.1 μ gで治療された群間において抗腫瘍効果の有意な($p < 0.05$)用量依存的タイトレーションが明らかになった；しかしながら、10分の1のDF-mIL-12-Fc si用量濃度(0.1 μ g)で治療したマウスの80%が治療に応答し、生存は長時間にわたった。

【0705】

更に、平均腫瘍容積が230mm³の腫瘍担持BALB/cマウスにおいて、DF-mIL-12-Fc siを異なる経路(IP又はSC)によってQWで7週間、1 μ g rmIL12と等モルの用量で投与したところ、CT26-20.7腫瘍に対する同様の抗

50

腫瘍有効性が観察された（図19A～図19B）。これらの知見は既発表のデータと一致していることから、IFN γ が抗腫瘍有効性の主要なメディエーターであることが指摘され、DF-mIL-12-Fc siによるこれらの試験は、IV、IP又はSC投与後に、これらの様々な経路に伴いC_{max}が異なるにもかかわらず、同程度のレベルのIFN γ を実証した。

【0706】

DF-mIL-12-Fc si単独療法が大型の末期腫瘍に対して有効な免疫応答を誘導することができたかどうかを分析するため、CT26-20.7腫瘍担持マウスを接種後、腫瘍容積が平均815mm³に達した後に18日間治療した。DF-mIL-12-Fc siを毎週1回、1又は2 μ gのrmIL12と等モルの用量レベルで7週間SC投与するか、又は2 μ gと等モルを1回投与した。大型の腫瘍容積を持つこのモデルでは、強力な抗腫瘍応答を誘導するのに単回用量の2 μ g DF-mIL-12-Fc siが十分であり、CR率は80%であった。更に、1又は2 μ gのいずれかを毎週投与すると、腫瘍コントロールが維持され、CR率は100%（1 μ g毎週）又は90%（2 μ g毎週）になった。DF-mIL-12-Fc siは良好に忍容され、大型腫瘍の退縮を媒介した一方で、臨床所見又は体重に対する効果はなかった。

【0707】

B16F10黒色腫モデルにおけるPD1遮断とのDF-mIL-12-Fc si組み合わせ療法の有効性

PD1遮断は、樹立B16F10腫瘍に対して有効性がほとんど又は全くないことが公知である（Mosely 2017）。2つの試験においてB16F10腫瘍モデルでDF-mIL-12-Fc siとPD1遮断との組み合わせ療法を実施して、抗腫瘍免疫応答が増幅され得るかどうかを分析した。平均腫瘍容積が約215mm³又は約200mm³（それぞれ、試験1及び試験2）に達した時点で、DF-mIL-12-Fc si又は抗PD1によって単剤として、及び組み合わせでC57BL/6マウスを治療した。腫瘍担持マウスに、0.5 μ gのrmIL12と等モルの用量のDF-mIL-12-Fc si IP（試験1においてQWで8週間）又はSC（試験2においてQWで7週間）を投与し、抗PD1は、200 μ gで毎週2回、IP投与した（19又は13用量にわたって毎週2回、それぞれ試験1又は2において）。

【0708】

DF-mIL-12-Fc siを単独で投与すると、腫瘍退縮が遅れた一方、PD1遮断と組み合わせると、抗腫瘍応答の持続時間が更に延長した。生存は、DF-mIL-12-Fc siをPD1遮断と組み合わせると、いずれかの単独療法で観察されるものと比較して延長した。相乗的な有効性にもかかわらず、DF-mIL-12-Fc siと抗PD1との組み合わせ療法のレジメンは、B16F10腫瘍担持マウスによって良好に忍容されるように見えた。DF-mIL-12-Fc siと抗PD1とを組み合わせることによる相加的又は相乗的毒性の徴候はなく、臨床所見又は体重への効果のいずれもなかった。

【0709】

サルにおけるインビボ薬理

非臨床毒性試験においてカニクイザルでDF-hIL12-Fc siをIV投与（1.9～40 μ g/kg）又はSC投与（1～20 μ g/kg）した。投与後、PDマーカーIFN γ 及びインターフェロン γ 誘導性タンパク質10（IP-10）の実質的な二次ピークが続いて起こり、これは用量依存的であった。

【0710】

非GLP及びGLP試験では、DF-hIL12-Fc siで治療したサルは、概して用量依存的なIFN γ の増加を実証し、ピークレベルは投与後48～72時間に起こった。IP10もまた同様に増加した。等モル用量レベルのrhIL-12及びDF-hIL12-Fc siとの一対一非GLP比較では、DF-hIL12-Fc siは、概してIFN γ の大幅な増加を引き起こし、これはrhIL12によって生じたIFN γ 応答よ

10

20

30

40

50

りも長く続いた。DF hIL12-Fc siでは、投与後120～168時間経ってもなお検出可能なIFN γ 応答が生じた一方、モル当量rhIL12 IFN γ は同様の時点でベースラインに戻っていた。DF hIL12-Fc siのより耐久性の高いIFN γ 応答は、rhIL12と比較してDF hIL12-Fc siの長時間にわたる $t_{1/2}$ に起因する可能性が最も高い。IP10は、rhIL12との非GLP一対一比較では評価しなかった。

【0711】

GLP試験では、ピークIFN γ レベルは、 $\geq 8 \mu\text{g}/\text{kg}$ SC及び $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ IVで概して同程度であったが、一部の個別の動物について群内でばらつきがあった。反復投与後にIFN γ 及びIP10応答の幾らかの減弱が観察されたが、このGLP試験の一部のサルは、1回目及び2回目の用量に対して有意なIFN γ 応答を実証した。このGLP試験において3回目の用量後、減弱又は可能性のある抗薬物抗体(ADA)の影響のいずれかに起因して、IFN γ の増加は最小限しかなく、乃至全くなかった。DF hIL12-Fc siの3回目の用量後のIP10応答は、IFN γ 応答よりも一層顕著であったが、これはIP10の $t_{1/2}$ がより長いことを反映している可能性がある。

【0712】

副次的薬理

Fc γ Rへの結合

DF hIL12-Fc siがFc γ Rに結合する潜在的能力を表面プラズモン共鳴(SPR)により判定した。Biacore (商標) 8K SPRシステムを使用して、部位特異的ビオチン化によってチップ上に捕捉されたDF hIL12-Fc siによる組換えヒト(CD64、CD32a H131及びR131アレル、CD16a V158及びF158アレル、CD32b、CD16b)及びカニクイザル(CD64及びCD16)受容体への結合を判定した。十分に確立されたIgG1バイオ医薬品であるトラスツズマブをアイソタイプ特異的実験対照薬として使用した。データの定性的評価から、DF hIL12-Fc siは、試験したFc γ Rのいずれに対しても、有意な結合を実証しなかったと結論付けられた。対照的に、同じ受容体特異的な、生理学的に関連性のある濃度でのIgG1対照トラスツズマブのタイトレーションは、予想どおり、全Fc γ Rにわたって最大限の範囲の用量依存的結合を実証した。

【0713】

更に、ヒトIgG1 Fcドメインは、補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介する古典的補体カスケードの成分であるC1qに結合することが公知である(Indusogie 2000)。DF hIL12-Fc siがCDCを引き出さないことを確認するため、PHAで3日間刺激したヒトPBMCを0.0823～20nMの範囲のDF hIL12-Fc siの存在下で5%ヒト補体血清とインキュベートした。血清を加えてもCDCは惹起されなかった。対照的に、抗MHC1抗体(陽性対照として使用した)は、補体血清依存的なT細胞死滅を誘導した。

【0714】

IFN γ 分泌のサロゲートとしてのC反応性タンパク質

C反応性タンパク質(CRP)は、重症感染症を有する疑いがある患者をモニタするために使用される炎症初期段階のマーカーである。CRPレベルの増加は、カニクイザル試験において、その半減期の短さ故に臨床バイオマーカーとして使用するにははるかに難易度が高いIFN γ の分泌測定のスロゲートとして使用される。これらの試験に基づけば、CRPの測定値は、臨床セッティングにおけるDF hIL12-Fc siのPD活性の検出に一層信頼性の高いバイオマーカーに相当する。

【0715】

FcRnへの結合

DF hIL12-Fc siがカニクイザル及びヒトFcRnに結合する潜在的能力を判定すると、予想どおり、ヒト及びカニクイザル(cynomolgous monkey)FcRn結合はFc γ Rサイレンシング突然変異の影響を受けなかったことが示され

10

20

30

40

50

た。DF hIL12-Fc siとIgG1アイソタイプ対照トラスツズマブとは、pH 6.0におけるカニクイザル及びヒトFcRnについて、それらの結合親和性値の点で同等であった（1.5倍未満の差）。同じく、両方の分子とも、pH 7.4で試験した濃度で定量化可能な結合を欠いている点でも同様であった。

【0716】

安全性薬理

安全性薬理評価項目（例えば、サイトカイン評価、体温、呼吸数、血圧、心拍数、ECG評価、及びFOB評価）をカニクイザルにおけるGLP3週間反復用量毒性試験に取り込んだ。

【0717】

DF hIL12-Fc siをサルにQWで3週間、最高20 µg/kgでSC投与するか、又は12 µg/kgでIV投与した後、体温、血圧、又は中枢神経系（FOB評価により測定したとき）、呼吸器系（呼吸数により測定したとき）、又は心血管系（ECG及び心拍数により測定したとき）に関してDF hIL12-Fc si関連効果はなかった。

【0718】

このGLP3週間反復用量毒性試験では、DF hIL12-Fc siの投与後にIFNγ及びIP10がロバストに増加したが、これは、その予想される薬理と一致している。また、一部のDF hIL12-Fc si治療サルにおいては、IL-6の散発的な最小限の増加もあった。サルにおける非GLP試験では、予想されたIFNγ及びIP10の増加に加えて、IL6、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP）MIP-1α、MIP-1β、及び胸腺及び活性化制御ケモカイン（TARC）の最小限の主として一過性の増加もあった一方、測定された他のサイトカインに影響はなかった。サルにおけるこれらのインビボ結果は、IFNγの濃度依存的増加のみが観測された未刺激のヒトPBMCにおけるサイトカイン放出アッセイのインビトロ結果と一致しており、及び他のサイトカインに影響はなかった。従って、DF hIL12-Fc siは、CRSについての潜在的能力は低いが、選ばれたサイトカイン（例えば、IFNγ、IP-10）は、DF hIL12-Fc siの予想される薬理が理由で増加するものと予想される。

【0719】

動物における薬物動態及び薬物代謝

概要

4件の非GLP毒性試験及び1件のGLP毒性試験において、DF hIL12-Fc siの毒物動態の（TK）プロファイルについて、カニクイザルへの単回、反復、及び／又はクロスオーバーSC（21～20 µg/kg）及びIV（1.9～40 µg/kg）投与後に調査した。酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）（各IL 12サブユニットを検出することによりDF hIL12-Fc siのIL-12p70を測定する）及びMSD（DF hIL12-Fc siのIL12p40及びFcを測定する）の両方によって得られたDF hIL12-Fc si濃度を使用して血漿TKを判定した。適格とされるELISA方法から導き出されたデータが、DF hIL12-Fc siの曝露量評価に好ましい供給源であった。抗薬物抗体（ADA）方法もまた開発して、SC投与後のカニクイザル血清中の抗DF hIL12-Fc si抗体を検出した；この方法は、GLP3週間毒性試験における使用がバリデートされた。

【0720】

SC又はIV投与後のDF hIL12-Fc siの優勢なTKプロファイルを用量非依存的（線形）反応速度論によって特徴付けたが、非GLP試験における小動物数及びADAが、観察されるばらつきに寄与した可能性がある。DF hIL12-Fc siの血漿TKに、全体的に見て性別に関連する差があるようには見えなかった。

【0721】

非GLP試験では、ELISAデータに基づけば、SC投与後、バイオアベイラビリティは約60%であった。推定t_{1/2}は、4件の非GLP試験で単回又は反復SC投与後に

10

20

30

40

50

個別の動物間で12.4～56.4時間の範囲にわたった。 t_{max} は、SC投与後に個別の動物間で4～36時間の範囲にわたり、最も一般的には投与後8時間であった。推定 $t_{1/2}$ は、IV投与後に個別の動物間で16.2～82.4時間の範囲にわたり、 t_{max} は、投与後0.25～1時間の範囲にわたった。

【0722】

このGLP毒性試験では、DF hIL12-Fc siのTKプロファイルを確認した。一般に、DF hIL12-Fc si平均 C_{max} 、投与時点から投与後24時間までの濃度時間曲線下面積(AUC_{0-24})、及び AUC_{0-168} 値の性別に関連する差は、2倍未満であった。SC投与後、DF hIL12-Fc si平均 C_{max} 及び AUC_{0-168} によって評価したときの曝露量は、概して、 $4\mu g/kg$ DF hIL12-Fc siからの用量レベルの増加に伴い増加した。平均 C_{max} 及び AUC_{0-168} の増加は用量比例的であった。DF hIL12-Fc siの複数回用量後のDF hIL12-Fc siの蓄積は観察されなかった。DF hIL12-Fc siの皮下バイオアベイラビリティは約40%であった。SC投与についての平均 $t_{1/2}$ は、1及び15日目に17.5～35.8時間の範囲であった一方、IV投与についての平均 $t_{1/2}$ は、1日目に22.2時間及び15日目に45.3時間であった。

【0723】

サルにおける単回用量非GLP SC試験では、8日目までにDF hIL12-Fc siに対するADAが実証され、最長22日目までADAが生じた；しかしながら、全体的なADA力価は比較的低いままであり、低い陽性対照に近い値であったことが確認された。別の非GLP試験では、初回SC用量と、続くIV用量は、ADAによって説明し得る予想を下回るIV曝露量プロファイルを実証したが、力価は測定しなかった。全体的に見て、非GLP試験からのデータは、サルにおけるSC経路では、同様にGLP試験で確認されたIV経路と比べて、一層ADAを発生し易い傾向があり得ることを示唆している。例えば、 $20\mu g/kg$ SCの10匹中9匹のサル及び $12\mu g/kg$ IVの10匹中3匹のサルでは、このGLP試験において15日目までにADAが生じた。確認されたADA試料の大多数は、3回目の用量よりも前の15日目に見られ、一部の動物では最高濃度(C_{max})が影響を受けたことから、中和抗体の存在が示唆される。非GLP試験及びGLP試験の両方でADAは個別のサルの曝露量に影響を与えたが、DF hIL12-Fc siの毒性学プロファイルを確認をもって定義するのに十分に長い期間にわたって好適な曝露量の実現していた。しかしながら、サルにおけるADAには、ヒトにおける免疫原性の予測性はない。このような理由で、DF hIL12-Fc si-001ファースト・イン・ヒューマン(FIH)試験にて、この試験全体を通じた抗DF hIL12-Fc si抗体の血清力価が判定されることになる。

【0724】

加えて、IFN γ 応答により測定したときのDF hIL12-Fc siに対する薬理応答について、個別の動物間にばらつきがあり、明らかな性別に関連する差はなかったが、耐用量を比較すると、何らかの用量依存性が示された。ピークIFN γ 応答は、非GLP及びGLP試験における動物間で投与後3～5日の範囲にわたった。GLP試験では、IFN γ 応答は反復投与に伴い減弱したが、動物のごく一部は、1回目及び2回目の両方の用量後にIFN γ 応答を実証した。加えて、1回目及び3回目の用量後にIP-10の用量依存的増加が検出可能であったが、減弱を伴った。投与経路は、ピーク薬理応答のタイミングに影響を与えないように見えた。

【0725】

代謝及び排泄を判定する試験について、こうした試験は、小分子薬物に関してはルーチンで行われるが、モノクローナル抗体などの生物製剤には必要でない、又は有用でないと考えられるため、行わなかった。DF hIL12-Fc si、IL12-Fc融合タンパク質がシトクロムP450(CYP)酵素によって代謝され则认为る理由はないため、薬物間相互作用(DDI)の判定に特化した試験は行っていない。従って、CYP酵素を阻害し又は誘導する小分子がDF hIL12-Fc siのPKに影響を与え得る見込

みはあまりなく、ひいては、DF hIL12-Fc siについてのPK DDIの可能性は低いと見なされる。

【0726】

吸収及び薬物動態

単回用量薬物動態

単回用量又は反復用量毒性試験の一環としての単回用量のDF hIL12-Fc siの投与後の曝露量は、急性毒性評価に関する情報を与えるものである。全試験で見て、DF hIL12-Fc siは、単回SC用量として最大20 µg/kgまで忍容された。単回用量IV最大耐用量(MTD)は、雌で $\leq 19 \mu\text{g/kg}$ 及び雄で $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ であり；単回IV用量は、雌又は雄で、それぞれ ≥ 20 又は $\geq 40 \mu\text{g/kg}$ であったため、DF hIL12-Fc si投与の8日後に早期安楽死となった。

10

【0727】

1日目曝露量(C_{max} 及び投与時点から試料の定量化が可能な最終回の時点までの濃度時間曲線下面積[AUC_{0-t}]により測定したとき)、並びに単回用量及び反復用量毒性試験から入手されたELISAデータから導き出した t_{max} 及び $t_{1/2}$ を表70にまとめる。

【0728】

20

30

40

50

【表 9 4】

表 70: カニクイザルにおける 1 日目血漿毒物動態の比較

試験 (GLP ステータス)	用量 レベル ($\mu\text{g/kg}$)	投与経路	n	C _{max} (pg/mL)		AUC ₀₋₁₂ (h $\cdot$ pg/mL) ^a		t _{max} (h)		t _{1/2} (h)	
				M	F	M	F	M	F	M	F
RW11CN (非 GLP)	1	SC	2/性別	2010	1380	85,100 ^b	61,600 ^b	8 ^c	8 ^c	13.8 ^d	N/A
	2	SC	2/性別	3900	1670	161,000 ^b	149,000	6 ^c	8 ^c	17.3	42.4
	4	SC	2/性別	5410	8010	425,000 ^c	515,000 ^c	22 ^d	6 ^c	32.5 ^d	37.8
TD36MM (非 GLP)	4	SC	2/性別	8860	10,500	562,000 ^c	590,000 ^c	22 ^c	22 ^c	40.2	35.4
	8	SC	2/性別	14,000	20,200	783,000 ^c	1,550,000 ^c	8 ^c	24 ^c	33.9	29.6 ^d
NF37DV (GLP)	4	SC	3/性別	11,800	10,300	480,000	426,000	8 ^c	8 ^c	19.5	17.5
	8	SC	5/性別	16,900	12,800	1,080,000	720,000	8 ^c	8 ^c	18.5	28.0
	20	SC	5/性別	25,700	32,900	2,390,000	2,490,000	24 ^c	48 ^c	31.9	35.8
QW56LH (非 GLP)	12	IV	5/性別	147,000	189,000	3,240,000	4,440,000	1 ^c	1 ^c	25.6	18.8
	1.9	IV	1/性別	53,600	47,900	1,450,000	921,000	0.25	0.25	30.5	17.4
	19	IV	1/性別	570,000	502,000	20,700,000	15,100,000	0.25	0.25	26.4	19.0
DQ81GX (非 GLP)	20 ^f	IV	2/性別	498,000	572,000	14,800,000 ^g	16,900,000	0.25 ^c	0.25 ^c	70.0	22.9
	40 ^h	IV	2/性別	1,120,000	994,000	37,300,000	40,300,000	0.25 ^c	0.25 ^c	22.7	37.3

出典: RW11CN, TD36MM, QW56LH, DQ81GX, 及び NF37DV.

C_{max}: 最高血漿濃度; AUC₀₋₁₂: 投与時点から試料の定量化が可能な最終時点までの濃度時間曲線下面積.注記: ここに提示される全ての TK 曝露量は、適格とされる ELISA 方法 (IL12 の p70 を標的とする) を用いて測定した DF hIL12-Fe si 血漿濃度を用いて求めた。
a AUC 曝露量は、特に注記しない限り、168 時間にわたって定量化した濃度を基準とした。b AUC₀₋₇₂

c 中央値。

d n = 1。

e AUC₀₋₂₄₀f DF hIL12-Fe si は、20 $\mu\text{g/kg}$ で雌において忍容されなかったため、8 日目に安楽死となった。g AUC₀₋₃₃₆h DF hIL12-Fe si は、40 $\mu\text{g/kg}$ で雄及び雌において忍容されなかったため、8 日目に安楽死となった。

【0729】

単回用量投与後の全毒性試験間での急性毒性及び曝露量の比較

反復用量毒性試験における初回第 1 回目の用量の投与後の忍容性評価及び曝露量は、急性毒性評価に関する情報を与えるものである (試験 TD36MM、QW56LH、DQ81GX、及び NF37DV)。単回用量 IV MTD は、雌で $\leq 19 \mu\text{g/kg}$ 及び雄で $\leq 20 \mu\text{g/kg}$; 単回 IV 用量は、雌又は雄で、それぞれ ≥ 20 又は $\geq 40 \mu\text{g/kg}$ であったため、DF hIL12-Fe si 投与の 8 日後に早期安楽死となった (試験 DQ81GX)。1.9 及び $20 \mu\text{g/kg}$ IV での曝露量は、同様の IFN γ 薬理と重なり合ったことから、DF hIL12-Fe si 治療に応答した免疫系の動物間変動が示

10

20

30

40

50

唆され、これが忍容性の差につながった可能性がある。これは、標的器官としての免疫系の公知の変動と一致している (Brodin P, Davis MM., Nat Rev Immunol. 2017; 17 (1): 21-9)。

【0730】

反復用量薬物動態

クロスオーバー計画によるDF hIL12-Fc siの反復皮下／静脈内投与後の毒物動態 (試験TD36MM及びDX81GX)

非GLP試験 (試験TD36MM) では、カニクイザルにDF hIL12-Fc siを、最初にSC投与し、次にIV投与し、各用量後には14日のウォッシュアウト期間を置いて、TK用の試料を投与後336時間にわたって収集した。

10

【0731】

SC投与後、DF hIL12-Fc siへの雄サル及び雌サルの両方の全身曝露は、 $4 \sim 8 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量範囲で用量非依存的 (線形) 反応速度によって特徴付けられるように見えた。DF hIL12-Fc siへの全身曝露は、雄と比べて雌でやや高い傾向があった。

【0732】

過去にDF hIL12-Fc siをSC経路によって受けたことがあるサルへのIV投与後、DF hIL12-Fc siへの雄及び雌サルの全身曝露は、 $2 \sim 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量範囲の用量依存的 (非線形) 反応速度によって特徴付けられるように見え、DF hIL12-Fc siの用量を $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ を上回って増加させると、雄では線形関係から予測したよりも全身曝露量が低くなるが、雌では全身曝露量が高くなるというものであった。これらの結果は、IV用量が投与される前の2例の雄及び1例の雌におけるDF hIL12-Fc siに対するADAの産生と一致していると言える。結果的に、IV投与後の結果は、慎重に解釈しなければならない。

20

【0733】

DF hIL12-Fc siのSCバイオアベイラビリティは、60%～70%であるように見えた (4例の動物に基づく) ; しながら、異常に高いバイオアベイラビリティ推定値 (ここに提示する範囲からは除外した) が一部の動物で観察され、それがIV投与後の曝露量に影響を及ぼすADAの産生と一致したが、この試験ではADAは測定されなかったことに留意しなければならない。

30

【0734】

別の非GLP試験では (DQ81GX)、カニクイザルにDF hIL12-Fc siを初めにIVボラスで投与して、次にSC投与し、用量間には14日のウォッシュアウト期間を置いた。別の動物群は、rhIL12を同じ投与経路及び頻度で受けて、比較を可能にした。投与後240時間にわたってTK分析用の血液試料を入手した。血漿DF hIL12-Fc siの濃度及びrhIL12を、適格とされるELISA方法 (IL12のp70を標的とする [即ち、rhIL12及びDF hIL12-Fc siを測定する]) 及びMSD方法 (DF hIL12-Fc siのp40及びFcを標的とする [即ち、DF hIL12-Fc siを測定し、rhIL12を測定しない]) によって測定した。DF hIL12-Fc siのIV投与後に観察された毒性が理由で、SC投与のTKプロファイルは、DF hIL12-Fc si (男性のみ) 及びrhIL12についてのみ特徴付けた。

40

【0735】

MSD方法によって測定したとき (予想されるとおり、ELISA方法はIL12ヘテロ二量体を検出することを考慮する)、IV投与後の血漿DF hIL12-Fc siの濃度は、より低かった。このMSDデータから導き出された C_{max} 値は、ELISA方法から導き出されたものよりも約54%低く、 AUC_{0-t} 値は、雄ではELISA方法から導き出されたものと同程度であり、雌では18%高かった。雌サルにおけるDF hIL12-Fc siの AUC_{0-t} 値は、ELISA方法を用いて測定したときIV投与後の雄でのものと同程度であったが、MSD方法によって測定したとき、やや高かった。AU

50

C_{0-t} とIV投与後用量レベルとの間の関係（ELISAデータに基づく）は、曝露量が、 $20 \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量範囲では、用量比例的な増加よりもやや大きく増加したことを指示している。IV投与後の t_{max} は、予想されたとおり、投与後0.25時間（最初の試料採取時点）であった一方、SC投与後の t_{max} は、個別の動物間で4～24時間の範囲にわたった。

【0736】

$t_{1/2}$ は、 20 又は $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ でのIV投与後は極めて幅広く異なったが（個別の動物間で16.2～82.4時間の範囲にわたった）、SC投与後は1例の動物についてのみ適切な推定が可能であった（ELISAデータに基づけば14.9時間及びMSDデータに基づけば62.0時間）。 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ でのDF hIL12-Fc siの皮下バイオアベイラビリティは、ばらつきがあるように見え、平均値はELISAデータに基づけば53.5%（38.8%～68.2%の範囲）及びMSD結果に基づけば89.0%（62.8%～115.3%の範囲）であった。

【0737】

IV投与後、雌サルのrhIL12の C_{max} 値及び AUC_{0-t} 値は雄のものと同程度であった；しかしながら、SC投与後、 C_{max} 値及び AUC_{0-t} 値は雄のものよりも低かった。IV投与後の t_{max} もまた、投与後0.25時間であった一方、SC投与後、 t_{max} は投与後8時間であった。 $t_{1/2}$ は、IV投与後は個別の動物間で9.1～17.5時間の範囲にわたり、SC投与後は18.9～22.9時間の範囲にわたった。 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ におけるrhIL12の皮下バイオアベイラビリティは、雄で約31%及び雌で18%であった（全体では18.0%～35.2%の範囲）。

【0738】

DF hIL12-Fc siの反復静脈内投与後の毒物動態（試験QW56LH）

非GLP試験において、1及び8日目にカニクイザルにDF hIL12-Fc si、又はrhIL12をIVボラスで投与し、投与後168時間にわたってTK用の試料を収集した。適格とされるELISA方法（IL12のp70を標的とする〔即ち、rhIL12及びDF hIL12-Fc siを測定する〕）及びMSD方法（DF hIL12-Fc siのp40及びFcを標的とする〔即ち、DF hIL12-Fc siを測定し、rhIL12を測定しない〕）の両方によって血漿濃度を測定した。

【0739】

DF hIL12-Fc siの反復IVボラス投与後、DF hIL12-Fc siの蓄積はなかった。DF hIL12-Fc siの AUC_{0-168} は、雄では1及び8日目に $1.9 \sim 19 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量範囲にわたってほぼ用量比例的に増加したが、雌では用量比例的増加よりも大きく増加する傾向があった。 $19 \mu\text{g}/\text{kg}$ では、雌の AUC_{0-168} は、線形関係から予測されるものよりも約1.8倍高かった。雌のDF hIL12-Fc siの AUC_{0-168} は、概して雄のものと同程度であったが、MSDデータから導き出された雌 AUC_{0-168} は、1日目及び8日目の両方で、 $1.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ の雄のものよりも低いように見えた。

【0740】

終末 $t_{1/2}$ は、全ての動物について適切に推定することができなかったが、推定することが可能であった場合、それは17.4～30.5時間の範囲にわたり、概して用量及び性別に依存しないように見えた。DF hIL12-Fc siの血漿クリアランスは低く、分布容積は血液量（ $73.4 \text{mL}/\text{kg}$ ）よりもやや低く、且つ体内総水分量（ $693 \text{mL}/\text{kg}$ ）よりもかなり低かった（Davies B, Morris T., Pharm Res. 1993; 10 (7): 1093-5）。

【0741】

rhIL12の反復IVボラス投与後、rhIL12の蓄積はなかった。rhIL12の AUC_{0-168} は、概して、1及び8日目に $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量範囲にわたってほぼ用量比例的に増加したが、1日目に雄では用量比例的増加よりも大きく増加する傾向があった。 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ では、1日目の雄 AUC_{0-168} は、線形関係から予測され

るものよりも約1.8倍高かった。DF hIL12への全身曝露について雄及び雌で差はないように見えた。終末 $t_{1/2}$ (7.2~17.0時間)は、DF hIL12-Fc siよりも短かく、血漿クリアランスは低く、及び分布容積は血液量と同程度であり、且つ体内総水分量よりもかなり低かった。

【0742】

DF hIL12の半減期がDF hIL12-Fc siと比較して短いというのは、DF hIL12-Fc siで観察されるより高い(約4.5倍~7.4倍)AUC₀₋₁₆₈を説明している。

【0743】

【表95】

表 71: 3週間試験におけるカニクイザルへの皮下又は静脈内投与後の DF hIL12-Fc si の平均血漿毒物動態(試験 NF37DV)

用量 レベル ($\mu\text{g/kg}$)/ 経路	C _{max} (pg/mL)		AUC ₀₋₁₆₈ (h*pg/mL)		t _{max} ^a (h)		t _{1/2} (h)		F (%)	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
1日目 ^b										
4 (SC)	11,800	10,300	480,000	426,000	8.0	8.0	19.5	17.5 ^c	37.5	33.3
8 (SC)	16,900	12,800	1,080,000	720,000	8.0	8.0	18.5	28.0	42.2	28.1
20 (SC)	25,700	32,900	2,390,000	2,490,000	24.0	48.0	31.9	35.8 ^d	37.4	38.9
12 (IV)	147,000	189,000	3,240,000	4,440,000	1.0	1.0	25.6	18.8	NA	NA
15日目										
4 (SC)	9580 ^e	7240 ^e	NR	NR	8.0 ^e	8.0 ^e	NR	NR	NA	NA
8 (SC)	17,300 ^d	NA	151,000 ^e	NR	8.0 ^d	NR	NR	NR	NA	NA
20 (SC)	38,000 ^e	37,300 ^e	2,650,000 ^e	NR	8.0 ^e	24.0 ^e	23.9 ^e	NR	NA	NA
12 (IV)	155,000 ^f	173,000 ^d	3,400,000 ^f	2,280,000 ^d	1.0 ^f	1.0 ^d	24.2 ^e	59.8 ^e	NA	NA

出典: 試験 NF37DV。

AUC₀₋₁₆₈: 投与時点から投与後 168 時間までの濃度時間曲線下面積; ADA: 抗薬物抗体; C_{max}: 最高血漿濃度; ELISA: 酵素結合免疫吸着アッセイ; F: 雌; M: 雄; NA: 該当なし; NR: ADA 陰性動物数の不足により報告なし; TK: 毒物動態。

注記: TK パラメータは全て、バリデートされた ELISA によって定量化した濃度から導き出した。各群の性別毎の動物数は脚注に示す。15 日目に関して、曝露量は、それらの ADA 陽性動物に定量化可能な曝露があったとしても、ADA を有しなかった動物についてのみ提示する。DF hIL12-Fc si は、患者においては 3 週間に 1 回投与されることが意図されるため、意図されるヒト投与スケジュールとの最良の比較としてサル試験の 1 日目曝露量を使用した。

^a 中央値; ^b 1 日目 n = 5 匹/性別/群、但し 4 $\mu\text{g/kg}$ SC (n = 3 匹/性別)を除く; ^c n = 2 匹/性別; ^d n = 3 匹/性別; ^e n = 1 匹/性別; ^f n = 5 匹/性別。

【0744】

一般に、DF hIL12-Fc si 平均 C_{max}、AUC₀₋₂₄、及び AUC₀₋₁₆₈ 値の性別に関連する差は、2 倍未満であった。SC 投与後、DF hIL12-Fc si 平均 C_{max} 及び AUC₀₋₁₆₈ によって評価したときの曝露量は、概して、4 $\mu\text{g/kg}$ DF hIL12-Fc si からの用量レベルの増加に伴い増加した。平均 C_{max} 及び AUC₀₋₁₆₈ の増加は用量比例的であった。DF hIL12-Fc si の複数回用量後の DF hIL12-Fc si の蓄積は、サルでは観察されなかった。DF hIL12-Fc si の皮下バイオアベイラビリティは約 40% であった。SC 投与についての平均 $t_{1/2}$ は、1 及び 15 日目に 17.5~35.8 時間の範囲であった一方、IV 投与についての平均 $t_{1/2}$ は、1 日目に 22.2 時間及び 15 日目に 45.3 時間であった。

【0745】

DF hIL12-Fc si に対する ADA 誘導の発生率は、0 $\mu\text{g/kg}$ で 0% (10 例中 0)、4 $\mu\text{g/kg}$ SC で 33% (6 例中 2)、8 $\mu\text{g/kg}$ SC で 80% (1

10

20

30

40

50

0例中8)、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ SCで90%(10例中9)、及び $12\mu\text{g}/\text{kg}$ IVで30%(10例中3)であった。15日目のADA陽性動物における血漿DF hIL12-Fc siの濃度は、ADA陰性動物と比べると全体的に低かったが、概してなおも定量化可能であった。ADAの効果にはばらつきがあり、ADA陽性動物の血漿濃度は、ある場合にはADA陰性動物と同程度であるものから、他の場合にはそれより著しく低いものまでの範囲にわたった。しかしながら、これは、一般に、ADA陽性動物は15日目にもDF hIL12-Fc siになおも曝露されていることを示している。従って、投与期間のほとんどにわたって適切な曝露量があったとおり、ADAは毒性試験の解釈に悪影響を与えなかった。

【0746】

バイオアベイラビリティ

非GLP試験TD36MM及びDQ81GXにおけるカニクイザルでのSC投与後、DF hIL12-Fc siは、概して約60%のバイオアベイラビリティを実証したが、幾らかの変動が観察された。確認されていないが、試験TD36MMにおいてADAの発生は2回目のIV用量に影響を与えたかもしれず、それが続いてバイオアベイラビリティの計算に影響を与えた可能性があると考えられる；従って、全動物の総平均バイオアベイラビリティを考えると、これらの値は除外した。表72は、これらの試験の範囲内における全動物のバイオアベイラビリティを提示する。

【0747】

GLP試験NF37DVでは、DF hIL12-Fc siのSCバイオアベイラビリティは、 AUC_{0-168} に基づけば、個別の雄及び雌動物で18.2%~52.8%の範囲であり、4、8、及び $20\mu\text{g}/\text{kg}$ SCの初回用量後の平均値は、それぞれ35.4%、35.1%及び38.2%であった。

【0748】

10

20

30

40

50

【表 9 6】

表 72: DF hIL12-Fc si バイオアベイラビリティの評価

試験番号	投与経路	動物 ID	性別	用量 ($\mu\text{g/kg}$)	バイオアベイラビリティ (SC/IV AUC _{0-t} /用量)
TD36MM	SC 後に IV	1200	雄	4-SC, 2-IV	67%
TD36MM	SC 後に IV	1201	雄	4-SC, 2-IV	59%
TD36MM	SC 後に IV	1700	雌	4-SC, 2-IV	386% ^a
TD36MM	SC 後に IV	1701	雌	4-SC, 2-IV	64%
TD36MM	SC 後に IV	2200	雄	8-SC, 4-IV	536% ^a
TD36MM	SC 後に IV	2201	雄	8-SC, 4-IV	604% ^a
TD36MM	SC 後に IV	2700	雌	8-SC, 4-IV	62%
TD36MM	SC 後に IV	2701	雌	8-SC, 4-IV	479% ^a
DQ81GX	IV 後に SC	2170	雄	20-IV, 20-SC	39%
DQ81GX	IV 後に SC	2171	雄	20-IV, 20-SC	68%
NF37DV	SC	2360	雄	4	29%
NF37DV	SC	2361	雄	4	33%
NF37DV	SC	2362	雄	4	50%
NF37DV	SC	2860	雌	4	29%
NF37DV	SC	2861	雌	4	53%
NF37DV	SC	2862	雌	4	18%
NF37DV	SC	3360	雄	8	41%
NF37DV	SC	3361	雄	8	42%
NF37DV	SC	3362	雄	8	34%
NF37DV	SC	3363	雄	8	51%
NF37DV	SC	3364	雄	8	42%
NF37DV	SC	3860	雌	8	21%
NF37DV	SC	3861	雌	8	38%
NF37DV	SC	3862	雌	8	38%
NF37DV	SC	3863	雌	8	24%
NF37DV	SC	3864	雌	8	20%

【 0 7 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 9 7】

試験番号	投与経路	動物 ID	性別	用量 ($\mu\text{g/kg}$)	バイオアベイラビリティ (SC/IV AUC _{0-t} /用量)
NF37DV	SC	4360	雄	20	46%
NF37DV	SC	4361	雄	20	35%
NF37DV	SC	4362	雄	20	27%
NF37DV	SC	4363	雄	20	53%
NF37DV	SC	4364	雄	20	26%
NF37DV	SC	4860	雌	20	50%
NF37DV	SC	4861	雌	20	49%
NF37DV	SC	4862	雌	20	14%
NF37DV	SC	4863	雌	20	37%
NF37DV	SC	4864	雌	20	45%

出典: 試験 TD36MM, DQ8IGX 及び NF37DV。

ADA: 抗薬物抗体; AUC_{0-t}: 試料の定量化が可能な最終時点からの濃度時間曲線下面積; ID: 識別番号;
IV: 静脈内(に); SC: 皮下(に)。

- ・ 確認されていないが、試験 TD36MM では ADA の発生が 2 回目の IV 用量に影響を与え、それがバイオアベイラビリティの計算に影響を与えた可能性があると考えられる。従って、平均バイオアベイラビリティを計算するとき、これらの値は外している。

【0750】

分布

定常状態分布容積 (V_{ss}) は、非 GLP 試験、試験 QW56LH においてのみ計算することができた。平均 V_{ss} は、1 回目の IV 用量後に 37.6 mL/kg 及び 2 回目の IV 用量後に 47.55 mL/kg であった。サルにおける後続の非 GLP 試験では、静脈内注入後の終末相の特徴付けが不十分であったため、 V_{ss} は計算することができなかった。

【0751】

GLP 試験では、平均 V_{ss} は、1 回目の IV 用量後に雄及び雌でそれぞれ 91.9 及び 71.1 mL/kg であり、全 10 動物の総平均 V_{ss} は 81.5 mL/kg であった。15 日目、平均 V_{ss} は、判定した雄 ($n=2$) で 107 mL/kg 、及び単一の雌で 108 mL/kg であり、これらの 3 動物の総平均 V_{ss} は 108 mL/kg であった。

【0752】

代謝

DF hIL12-Fc si の代謝試験は行っていない。小分子薬物に関してルーチンで行われている標準的な代謝試験は、抗体などの生物製剤には必要でない、又は有用でないと考えられる。

【0753】

排泄

DF hIL12-Fc si の排泄試験は行っていない。小分子薬物に関してルーチンで行われている標準的な排出試験は、DF hIL12-Fc si などの生物製剤には必要でない、又は有用でないと考えられる。

【0754】

薬物間相互作用

現在までのところ、薬物間相互作用 (DDI) 試験は実施していない。サイトカイン調節薬として作用するサイトカイン又はモノクローナル抗体などの治療用タンパク質は、特異的サイトカイン p450 (CYP) 酵素及び薬物輸送体の発現及び安定性に影響を与えることによって小分子薬物と相互作用を呈するものと思われる (Huang SM, Zhao H, Lee JI, Reynolds K, Zhang L, Temple R, et al., Clin Pharmacol Ther. 2010; 87 (4): 497-50

3)。サイトカインの中でも、IL6は、CYP発現を下方制御することが公知である。モデル化によれば、IL-6は投与後約48時間の時点でCYP3A4の固有クリアランスを28%低減する可能性があることが示される(Xu Y, Hijazi Y, Wolf A, Wu B, Sun YN, Zhu M., CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2015; 4(9): 507-15)。DF hIL12-Fc siは、サルにおいて耐用量でIL6の最小限の散発的な増加を誘導した。CYP酵素はデノボ合成されること(24~36時間の $t_{1/2}$)及びDF hIL12-Fc siによるIL6サイトカインスパイクの持続期間が一過性であることを考慮すれば、DDIのリスクは重大でないと考えられる。

【0755】

DF hIL12-Fc si、IL12-Fc融合タンパク質がCYP酵素によって代謝されると考えられる理由はないため、CYP酵素を阻害又は誘導する小分子がDF hIL12-Fc siのPKに影響を与える可能性があるとは考えにくい。これらの考察に基づき、DF hIL12-Fc siについてPK DDIの可能性は低いと見なされる。

【0756】

免疫原性

サルにおける単回用量毒性試験では、12例中7例の治療済み動物が、抗薬物抗体(ADA)に関して陽性であることが分かった。加えて、ADAは判定しなかったが、カニクイザルでの4週間反復用量試験におけるTKのばらつき及び異常に高いバイオアベイラビリティ推定値は、DF hIL12-Fc siに対するADAの産生と一致しているものと考えられた。非GLP試験及びGLP試験の両方でADAは個別のサルの曝露量に影響を与えたが、DF hIL12-Fc siの毒性学プロファイルを確認をもって定義するのに十分に長い期間にわたって好適な曝露量が実現していた。サルにおけるADAには、ヒトにおける免疫原性の予測性はない。このような理由で、抗DF hIL12-Fc si抗体の血清力価は、臨床試験で判定することになる。

【0757】

実施例26: DF hIL12-Fc siを使用した癌の治療

目的

本臨床試験は、以下のフェーズで設計する: 第1相、第1b相、及び第2相。

【0758】

第1相の主要目的は、単独療法としてのDF hIL12-Fc siの安全性及び忍容性を評価すること、及び進行(切除不能、再発性又は転移性)固形腫瘍を有する患者におけるDF hIL12-Fc siの最大耐用量(MTD)を決定することである。

【0759】

第1b相の主要目的は、ペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの安全性及び忍容性を評価すること、及び進行(切除不能、再発性、又は転移性)固形腫瘍を有する患者におけるペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの最大耐用量(MTD)を決定することである。

【0760】

第2相の主要目的は、単独療法としての又は組み合わせでのDF hIL12-Fc siの臨床活性を試験する全ての有効性拡大コホートについて、独立評価項目レビュー委員会(Independent Endpoint Review Committee: IERC)による固形癌効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)第1.1版(RECIST 1.1)に基づき客観的奏効率(ORR)を評価することである。

【0761】

単独療法としての及びペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siによる第1相及び第1b相の副次的目的は、DF hIL12-Fc siのPKを特徴付けること; DF hIL12-Fc siの免疫原性を判定すること、及びその曝露量と臨床

10

20

30

40

50

活性とを相関付けること；治験責任医師によりRECIST 1.1を使用してDF hIL12-Fc siに関して決定されるとおりの、最良総合効果（BOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siの奏効期間（DOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siに関する無増悪生存（PFS）を評価すること；及び全生存（OS）期間を評価することである。

【0762】

単独療法としての及びペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siによる第2相の副次的目的は、DF hIL12-Fc siのPKを特徴付けること；IERCに従いRECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siの奏効期間（DOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用してDF hIL12-Fc siの臨床的有用率（CBR）を評価すること。CBRは、最良効果として完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、又は病勢安定（SD）である患者の割合として定義される；DF hIL12-Fc siの安全性を評価すること；DF hIL12-Fc siの免疫原性を判定すること、及び曝露量及び臨床活性と相関付けること；IERCに従いRECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siに関する無増悪生存（PFS）を評価すること；及び全生存（OS）期間を評価することである。

10

【0763】

探索的目的

単独療法としての及びペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの両方による探索的目的は、腫瘍及び末梢バイオマーカーのベースラインからの変化、及びPKとの関係を判定すること；ペンブロリズマブのPKを評価すること（第1b相及びコホート2Cのみ）；治験責任医師評価（RECISTによるORR、DOR、CBR、及びBOR）に従い有効性拡大コホートパート（第2相）におけるDF hIL12-Fc siの活性を判定すること；及び腫瘍及び末梢バイオマーカーと、腫瘍応答率との間の関連性を判定することである。

20

【0764】

試験デザイン概要

本試験は、単独療法としての及びペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの安全性、忍容性、PK、薬力学、及び予備的な抗腫瘍活性を決定するように設計される第1／2相非盲検用量漸増試験と、続く並行群間有効性拡大試験である。試験デザインの概略図を図51A（単独療法について）及び図51B（ペンブロリズマブとの組み合わせ療法について）に示す。

30

【0765】

本試験は3パートからなる：第1相：3＋3デザインを用いた単独療法としての用量漸増、第1相コホート拡大を伴う；第1b相：3＋3デザインを用いたペンブロリズマブとの組み合わせとしての用量漸増、第1b相コホート拡大を伴う；及び第2相：群逐次デザインを用いた有効性拡大。

【0766】

DF hIL12-Fc siは、以下の適応疾患において有効性拡大コホートで単独療法として判定する：コホート2A：進行（切除不能又は転移性）黒色腫；及びコホート2B：進行（切除不能又は転移性）腎細胞癌（RCC）

40

【0767】

DF hIL12-Fc siは、以下の適応疾患において有効性拡大コホートでペンブロリズマブと組み合わせて判定する：コホートC：進行（切除不能又は転移性）尿路上皮癌

【0768】

各試験フェーズにおいて、患者はDF hIL12-Fc siの投与を3週間毎（Q3W）に1日目に受ける。患者は、病勢進行（PD）の確認、許容できない毒性（即ち、用量制限毒性〔DLT〕）、又は本試験若しくは治験薬（IMP）から離脱する何らかの理由が発生するまでDF hIL12-Fc siの投与を受ける。

50

【0769】

第1相用量漸増DF hIL12-Fc si単独療法

本試験の第1相用量漸増フェーズは、標準的な3+3デザインを用いて単独療法としてのDF hIL12-Fc siの用量制限毒性(DLT)及び最大耐用量(MTD)を決定するようにデザインされる。

【0770】

次の用量レベル(DL)に漸増するか判断は、DLTが理由でない限り、サイクル2、1日目(C2D1)までのコホートの全ての患者に対する安全性評価の実施が終わった後の安全性評価に基づく。DF hIL12-Fc siの安全性を評価するため、用量漸増判断について責任を負う安全性監視委員会(SMC)が設立される。

10

【0771】

用量レベル「n」の安全性が確立された後、SMCは、第1相拡大コホートにおいて当該のDLに最大10例の患者の登録を許可する選択権を有する；この手順によって30例以下の患者を登録することができる。

【0772】

MTDは、6例の評価可能な患者のうち1例以上の患者にDLTが認められるときの最も高いDLとして定義される。

【0773】

第1b相：ペンブロリズマブとの組み合わせとしての用量漸増

本試験の第1b相用量漸増フェーズは、第1相について記載されるとおり、標準的な3+3デザインを用いて、ペンブロリズマブとの組み合わせを所与としたときのDF hIL12-Fc siのDLT及びMTDを決定するようにデザインされる。

20

【0774】

ペンブロリズマブは、その米国添付文書に従い3週間毎に1回(各サイクルの1日目に)投与される。ペンブロリズマブの投与は、DF hIL12-Fc siの投与よりも前に行われる。

【0775】

ペンブロリズマブと組み合わせて試験されるDF hIL12-Fc si用量レベルは、単独療法として試験されるレベルと同じである。

【0776】

第1b相は、DF hIL12-Fc si単独療法によって以下の判定基準のいずれかが満たされた後に開始する：DLT観察期間中に発生するいずれかの用量レベルでグレード2薬物関連毒性が発生する；MTDとして確定されない用量レベルでDLTが発生する；及び用量漸増が完了し、MTDが確定されていない。

30

【0777】

これらの判定基準のうちの1つが満たされた後、上記の判定基準のいずれかを満たした用量レベルよりも2つ低い用量レベルの用量のDF hIL12-Fc siを使用して第1b相(ペンブロリズマブと組み合わせたDF hIL12-Fc si)を開始するか、又は判定基準のいずれかがDL1又はDL2で満たされる場合、DL1の安全性が確立された後に(DL2で治療した3例の患者又はDL1で治療した6例の患者によって確定され、DL1で観察されるDLTが1例を超えない)、組み合わせの開始用量はDL1とする。

40

【0778】

用量レベル「n」の安全性が確立された後、SMCは、第1b相拡大コホートにおいて当該の用量レベルに最大10例の患者の登録を許可する選択権を有する；この手順によって30例以下の患者を登録することができる。

【0779】

第2相有効性拡大

推奨第2相用量(RP2D)で以下の腫瘍型を登録する：

単独療法として：コホート2A：進行(切除不能又は転移性)黒色腫；及びコホート2

50

B：進行（切除不能又は転移性）腎細胞癌。

【0780】

ペンブロリズマブとの組み合わせで：コホート2 C：進行（切除不能又は転移性）尿路上皮癌。

【0781】

組み入れ基準及び除外基準

試験登録時の米国東海岸癌臨床試験グループ（Eastern Cooperative Oncology Group：ECOG）パフォーマンスステータスが0又は1であり、且つ推定平均余命が少なくとも3ヵ月の年齢18歳以上の男性又は女性患者を登録する。

【0782】

各試験フェーズ／コホートにおける主要組み入れ基準は、以下のとおりである：

第1／1 b相における用量漸増コホート：疾患の臨床的又は放射線学的エビデンス

第1／1 b相における用量拡大コホートは、以下の腫瘍型：黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、又はトリプルネガティブ乳癌のうちの1つを有し；固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（RECIST）、第1.1版を使用して治験責任医師によって決定されるとき、測定可能な疾患を有する。

【0783】

コホート2 A

進行性黒色腫を有する患者であって、抗プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）抗体による治療を少なくとも6週間受けた；抗PD-1の投与が行われる一方で、PDの初回診断の少なくとも4週間後にPDの確認を有する患者。PDの確認は、放射線学的又は臨床的所見に基づき得る；腫瘍がBRAF活性化変異を持ち、及び最終ラインの治療後に進行した場合、BRAF阻害薬を受けていなければならない。

【0784】

コホート2 B

進行RCCを有する患者であって、任意の明細胞成分を有する；抗PD-1／PD-L1抗体及び抗血管内皮成長因子療法による治療を単独療法として又は組み合わせで受けた；過去に3ライン以下の療法を受けた患者

【0785】

コホート2 C

進行尿路上皮癌を有する患者であって、組織学的又は細胞学的に確認された局所進行又は転移性尿路移行上皮癌（腎盂、尿管、尿路上皮、尿道を含む）を有する；手術不能、局所進行又は転移性尿路上皮癌に対する1つの（及び1つを超えない）白金含有レジメン（例えば、白金＋別の薬剤、例えば、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキソルビシン等）を受けたことがあり、X線所見進行を伴うか、又は補助療法としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内の再発を伴う（これらが伴えば、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なされることになり得る）；転移性疾患の治療に対する2ラインを超えない療法（白金含有レジメンを含む）を受けたことがある；チェックポイント阻害薬（CPI）による治療（即ち、単独療法としての、又は白金系化学療法との組み合わせでの抗PD-1又は抗PD-L1を受けたことがない患者。

【0786】

用量／投与様式／投薬スケジュール

DF hIL12-Fc siは、皮下（SC）注射としてQ3Wで（即ち、各サイクルの1日目に）投与される。患者は薬物SCの投与を最大2ヵ所の注射部位に1mLを超えない容積で受ける。2回目の投与は、該当する場合、1回目の投与の完了後10分以内に完了される。

【0787】

10

20

30

40

50

第1／1b相では、患者はDF hIL12-Fc siの1回目の投与後に一晚入院する。

【0788】

DF hIL12-Fc si DL ($\mu\text{g}/\text{kg}$) は、以下の表73にあるとおりである。

【0789】

【表98】

表73: DF hIL12-Fc si DL ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	DL1	DL2	DL3	DL4	DL5	DL6	DL7	DL8	DL9	DL10
DF hIL12-Fc siの用量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.75
当量のIL12 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.021	0.053	0.105	0.211	0.316	0.421	0.526	0.632	0.737	0.921

10

【0790】

DF hIL12-Fc siの用量は、ベースライン時の患者の体重を基準に計算する。患者の計算された用量は、その最後の用量計算時点から患者の体重が10%以上変化した場合に限り再計算される。

20

【0791】

探索的バイオマーカー

末梢バイオマーカー

末梢バイオマーカーは、全ての患者において、細胞パラメータ：フローサイトメトリーによる免疫表現型タイピング (IPT) 用の末梢血単核球 (PBMC)；可溶性因子：血清試料中のサイトカイン及びケモカイン；エキソビボIL12応答アッセイ：エキソビボ刺激と、続くIFN γ 産生分析用のPBMC；循環腫瘍 (ct) デオキシリボ核酸 (DNA) を含めた末梢で評価する。

【0792】

IPT評価は、以下の試験来院：C1D3、C1D8、C2D8、及びC3D3の各々において、DF hIL12-Fc si C1～C3の投与の2時間前に採取される全血試料に由来するPBMCで実施する。

30

【0793】

可溶性因子は、各治療サイクルのD1、並びにC1D2、C1D3、C1D5、C1D8、C1D15、C2D3、C3D3、及びC4D3、並びにEOT及びSFU来院時に、DF hIL12-Fc si投与前2時間以内に採取した血清試料中で決定する。

【0794】

腫瘍材料に関する全ての評価を完了するため、血液（例えば、全血、血漿、及び血清試料）を患者から採取する。

【0795】

腫瘍組織に由来するバイオマーカー

用量漸増フェーズ（任意生検）、第1／1b相拡大コホートパート（必須生検）、及び第2相有効性拡大コホートフェーズ（必須生検）に参加している患者の治療前生検及び治療生検に関して組織由来バイオマーカーを判定する。

40

【0796】

保管されている腫瘍組織（又は利用可能な場合、新鮮腫瘍生検）、全血、及び血清試料から、ベースライン時に分子、可溶性及び細胞マーカーを含む推定マーカーのパネルを分析して、臨床的有效性と分析したマーカーとの間の可能性のある相関を調べる。

【0797】

用量漸増フェーズに登録している患者については、市販のキット (Dako PD-L1

50

IHC 22C3 pharmDx) を使用してPD-L1 発現レベルを決定し、CD3 陽性 (T細胞浸潤) の分析を免疫組織化学 (IHC) によって実施する。

【0798】

第1 / 1b 相拡大コホート及び有効性拡大コホートに登録している患者については、スクリーニング時 (即ち、1 回目の試験薬物用量前30日以内) 及び治療期間中の予め指定された時点で新鮮必須腫瘍生検を実施する。

【0799】

評価される他のバイオマーカーとしては、以下が挙げられる: 腫瘍浸潤白血球の頻度及び局在 (例えば、IHC又はIFによるCD8、CD4 T細胞、Treg、NK細胞、マクロファージ [M1 / 2プロファイル])、遺伝子発現プロファイル、及びファーマコゲノミクス (PGx)。

【0800】

参照療法: 用量 / 投与様式 / 投薬スケジュール

第1b 相及びコホート2Cでは、ペンブロリズマブは、米国添付文書に従い200mgの用量で静脈内 (IV) 注入により3週間に1回投与される。ペンブロリズマブの投与は、DF hIL12-Fc siの投与よりも前に行われる。DF hIL12-Fc siは、ペンブロリズマブの投与の完了後1時間以内に投与される。

【0801】

患者毎に計画される治療期間

病勢進行 (PD) 若しくは許容できない毒性の発生、又は本試験若しくはDF hIL12-Fc siからの任意の離脱基準が起こるまで、患者は試験治療を受ける。

【0802】

確認された完全奏効 (CR) が得られた患者はいずれも、治験責任医師の裁量により、打ち切り基準を満たさない限り、確認後少なくとも12ヵ月間治療する。治験責任医師が、かかる患者は12ヵ月を超えて治療から利益を受け得ると考える場合、治験依頼者メディカルモニターとの協議を経て、治療を継続することが許容されてもよい。最大治療期間は24ヵ月である。

【0803】

統計的方法 (標本サイズ計算を含む)

本試験の評価可能な患者数を用量漸増「3+3」デザイン及び拡大コホートサイズから導き出した。最終的な標本サイズは、判定するDLの総数、該当する場合に、DLT判定用の患者の入れ替え、及びDLTが認められた場合の3例から6例の患者への拡大に応じて異なり得る。

【0804】

拡大時の急速な募集によってIMPの供給に影響が出た場合、24時間前までに治験責任医師に通知があれば、任意のコホートの新規患者のスクリーニングを一時的に中断し得る。

【0805】

最終的な標本サイズは、判定するDLの総数、該当する場合に、DLT判定用の患者の補充、及びDLTが認められた場合の3例から6例への患者の拡大に応じて異なり得る。

【0806】

単独療法としての有効性拡大 (コホート2A及び2B)

このフェーズの主要評価項目は、ORRである。これらのコホートの各々について、帰無仮説は、客観的奏効率 (ORR) が5%を超えない ($H_0: ORR < 5\%$) というものであり、対立仮説は、ORRが10%より高い ($H_1: ORR \geq 5\%$) というものである。

【0807】

単独療法としてのDF hIL12-Fc siの目標ORRは20%である。これらのコホートの各々について40例の患者 (即ち、合計約80例の患者) を登録することが予想される。

【0808】

10

20

30

40

50

指示コホートの各々に40例の患者を含む群逐次デザインを用いると、この有効性コホートは、DF hIL12-Fc siについて20%の目標ORRと仮定すれば、片側の全体の第1種の過誤率0.025で15%の差を検出するために約90%の試験検出力を提供する。

【0809】

コホート2A及び2Bの各々について、ラン・ドメッツ (Lan-DeMets) のオブライエン・フレミング境界を用いる無益性中間解析を50%情報分数で(即ち、約20例の患者で)計画する。

【0810】

20例の患者が3ヵ月フォローアップを完了した時点、又は本試験から離脱した時点で、登録した患者のうち、RECIST 1.1に基づく未確認のPR又はCRのBORを実現した者がいなかった場合には、無益性についての登録は中止してもよい。試験終了時、少なくとも5例の患者が、RECIST 1.1に基づく確認されたPR又はCRのBORを実現した場合には、コホートは成功が宣言される。

【0811】

ペンブロリズマブとの組み合わせでの有効性拡大(コホート2C)

ペンブロリズマブとの組み合わせでの有効性拡大についての第2相部分では、1ラインの白金系化学療法後に進行したUBC患者における組み合わせでのDF hIL12-Fc siの臨床活性が決定される。

【0812】

主要評価項目はORRである。本試験には40例の患者が登録し、そのため40例の患者中15の奏効例(CR又はPR)が観測されれば、95%CI(0.2317; 0.5419)につながることであり、これは、KEYNOTE-045に登録した同様の集団でペンブロリズマブについて報告されている奏効例の割合の値を除外する。その試験では、ORRは21.7%であった(Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al., N Engl J Med. 2017; 376(11):1015-1026.)。

【0813】

最低でも4週間の計量を用いてSDを定量化し、CR、PR又はPDを確認する。DORは、CR又はPRの最初の観察と病勢進行との間の時間から定義される。PFSは、RECIST 1.1に基づき定義され、試験治療の最初の投与から、病勢進行の最初の観察又は死亡のうちいずれか早くが起こるまでと定義される。OSは、試験治療の最初の投与から死亡までとして定義される。

【0814】

安全性分析は、記述統計学的表現により、コホート別に、及び／又は全コホートにわたってまとめられる。

【0815】

実施例27: 単回用量のDF hIL12-Fc siを使用した癌の治療

本試験の主要目的は、単回用量で投与したときの単独療法としてのDF hIL12-Fc siの安全性及び忍容性を評価すること、及び進行(切除不能、再発性又は転移性)固形腫瘍を有する患者におけるDF hIL12-Fc siの最大耐用量(MTD)を決定することである。DF hIL12-Fc siは、皮下(SC)注射として単回用量で投与される。患者は薬物SCの投与を最大2ヵ所の注射部位に1mLを超えない容積で受ける。2回目の投与は、該当する場合、1回目の投与の完了後10分以内に完了される。患者は単回用量のDF hIL12-Fc siのみを受ける。

【0816】

実施例28: DF hIL12-Fc siを使用した癌の治療

これは、安全性、忍容性(tolerability)、PK、薬力学、及び単独療法としての及びペンブロリズマブと組み合わせたDF-hIL-12-Fc siの予備的抗腫瘍活性を決定するように設計された、連続的な並行群間有効性拡大試験を伴う第1

10

20

30

40

50

／ 2 相非盲検用量漸増試験である。

【 0 8 1 7 】

【表 9 9】

表 74: 第 1/2 相非盲検用量漸増試験

病態又は疾患	介入/治療	フェーズ
固形腫瘍; 黒色腫; 腎細胞癌; 尿路上皮癌	生物製剤/ワクチン: DF-hIL-12-Fc si; 生物製剤/ワクチン: ペンブロリズマブ	第 1 相/第 2 相

【 0 8 1 8 】

本試験は 3 パートからなる：第 1 相：3 + 3 デザインを用いた単独療法としての用量漸増、第 1 相コホート拡大を伴う；第 1 b 相：3 + 3 デザインを用いたペンブロリズマブとの組み合わせとしての用量漸増、第 1 b 相コホート拡大を伴う；第 2 相：群逐次デザインを用いた有効性拡大。

【 0 8 1 9 】

第 2 相では、DF-hIL-12-Fc si を以下の適応疾患において単独療法として判定する：コホート 2 A：進行（切除不能又は転移性）黒色腫；コホート 2 B：進行（切除不能又は転移性）腎細胞癌（RCC）。

【 0 8 2 0 】

第 2 相では、DF-hIL-12-Fc si を以下の適応疾患においてペンブロリズマブと組み合わせて判定する：コホート C：進行（切除不能な又は転移性（metastatic））尿路上皮癌。

【 0 8 2 1 】

各試験フェーズにおいて、患者（patients）は DF-hIL-12-Fc si を 3 週間毎（Q3W）に 1 日目に受ける。患者は、病勢進行（PD）の確認、許容できない毒性（即ち、用量制限毒性 [DSL]）、又は本試験若しくは治験薬（IMP）から離脱する何らかの理由が発生するまで、DF-hIL-12-Fc si の投与を受ける。

【 0 8 2 2 】

アーム及び介入（intervention）を以下の表 7 5 に提示する。

【 0 8 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 100】

表 75: アーム及び介入

アーム	介入/治療
実験薬 DF-hIL-12-Fc si 単独療法用量漸増; 固形腫瘍を有する患者における皮下 DF-hIL-12-Fc si の単独療法としての 3+3 用量漸増。	生物製剤/ワクチン DF-hIL-12-Fc si; DF-hIL-12-Fc si は、IL-12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL-12)定常断片(Fc)融合タンパク質である。
実験薬: DF-hIL-12-Fc si 単独療法拡大(黒色腫); 皮下 DF-hIL-12-Fc si を単独療法として受けている黒色腫を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤/ワクチン: DF-hIL-12-Fc si; DF-hIL-12-Fc si は、IL-12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン 12(IL-12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である
実験薬: DF-hIL-12-Fc si 単独療法拡大(腎細胞); 皮下 DF-hIL-12-Fc si を単独療法として受けている腎細胞癌を有する最大 40 例の患者の用量拡大	生物製剤/ワクチン: DF-hIL-12-Fc si; DF-hIL-12-Fc si は、IL-12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン 12(IL-12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である
実験薬: DF-hIL-12-Fc si のキイトルーダ(Keytruda)との組み合わせ漸増; 皮下 DF-hIL-12-Fc si の静脈内キイトルーダ(Keytruda)との組み合わせの 3+3 用量漸増。	生物製剤/ワクチン: DF-hIL-12-Fc si; DF-hIL-12-Fc si は、IL-12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL-12)定常断片(Fc)融合タンパク質である; 生物製剤/ワクチン: ペンブロリズマブ; ペンブロリズマブは、PD-1 とそのリガンド、PD-L1 及び PD-L2 との間の相互作用を直接遮断するように設計された免疫グロブリン(IgG4)/κ アイソタイプの強力で高度に選択的なヒト化 mAb である; 別名: キイトルーダ(Keytruda)
実験薬: DF-hIL-12-Fc si のキイトルーダ(Keytruda)との組み合わせ拡大(尿路上皮); 皮下 DF-hIL-12-Fc si の静脈内キイトルーダ(Keytruda)との組み合わせを受けている尿路上皮癌を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤/ワクチン: DF-hIL-12-Fc si; DF-hIL-12-Fc si は、IL-12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL-12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である; 生物製剤/ワクチン: ペンブロリズマブ; ペンブロリズマブは、PD-1 とそのリガンド、PD-L1 及び PD-L2 との間の相互作用を直接遮断するように設計された免疫グロブリン(IgG4)/κ アイソタイプの強力で高度に選択的なヒト化 mAb である; 別名: キイトルーダ(Keytruda)

【0824】

主要アウトカム尺度には、以下が含まれる：1．試験プロトコルにある判定基準に従い定義されるとおりの、単独療法 DF-hIL-12-Fc si による試験中に認められた用量制限毒性の数の評価〔時間フレーム：各対象について治療下にある最初の 3 週間〕；試験プロトコルに従う用量制限毒性判定基準を満たす、単独療法 DF-hIL-12-Fc si による治療中に認められた有害事象の数を評価すること；2．試験プロトコルにある判定基準に従い定義されるとおりの、DF-hIL-12-Fc si とペンブロリズマブとの組み合わせ療法による試験中に認められた用量制限毒性の数の評価〔時間フレーム：組み合わせ療法コホートの各対象について治療下にある最初の 3 週間〕；用量制限毒性；試験プロトコルに従う判定基準を満たす、DF-hIL-12-Fc si とペンブロリズマブとの組み合わせ療法による治療中に認められた有害事象の数を評価すること；3．全奏効率を評価する〔時間フレーム：試験完了後 90 日まで、平均 1 年〕；第 2 相拡大コホートの患者の RECIST 第 1.1 版の判定基準に従う全奏効率 (ORR) を評価すること。

【0825】

副次アウトカム尺度には、以下が含まれる：1．試験全体を通じた治療中に発生した有害事象の数を評価する〔時間フレーム：試験の第2相部分に登録した最後の対象の最終回治療後30日まで〕；D F - h I L - 1 2 - F c s i による治療下にある間に発生した有害事象の数を評価することにより、D F - h I L - 1 2 - F c s i の安全性プロファイルの特徴付ける；2．様々な時点でD F - h I L - 1 2 - F c s i の血清濃度を決定する〔時間フレーム：治療開始から最終回治療後28日にわたるまで〕；D F - h I L - 1 2 - F c s i の濃度対時間が、試験中の様々な時点で採取された血液試料を使用して測定されることになる；3．奏効期間を評価する〔時間フレーム：療法開始時点から、最初に腫瘍進行が記録された日まで、最長24ヵ月まで評価される〕；R E C I S T 1. 1判定基準を使用して奏効期間を評価すること；4．最良総合効果を評価する〔時間フレーム：試験完了後90日まで、平均1年〕；R E C I S T 1. 1判定基準を使用して最良総合効果を評価すること；5．全生存を評価する〔時間フレーム：本試験への登録から死亡までの時間、試験中の最終回治療後最長2年まで測定される〕；治療後の全生存を評価すること；6．全奏効率を評価する〔時間フレーム：試験への登録から、試験中の最終回治療後最長2年までの時間（l i m e）〕；試験責任医師の判断により全奏効率を評価すること。

10

【0826】

適格性判定基準

組入れ基準（第1相全般）は、以下である：1．署名した書面によるインフォームドコンセント；2．年齢18歳以上の男性又は女性患者；3．標準療法が存在しないか、又は標準療法が失敗した、組織学的又は細胞学的に証明されている局所進行又は転移性固形腫瘍；4．試験登録時のE C O Gパフォーマンスステータスが0又は1及び推定平均余命が少なくとも3ヵ月；5．疾患の臨床的又は放射線学的エビデンス；6．6ヵ月以内に保管された腫瘍生検が利用可能、少なくとも8スライドが利用可能；又は任意選択の、スクリーニングウィンドウ中に入手された新鮮生検；7．白血球（W B C）数 $\geq 3 \times 10^9 / L$ 、好中球絶対数（A N C） $\geq 1.5 \times 10^9 / L$ 、リンパ球数 $\geq 0.5 \times 10^9 / L$ 、血小板数 $\geq 75 \times 10^9 / L$ 、及びヘモグロビン $\geq 9 g / d L$ （輸血されたものであってもよい）によって定義される適切な血液学的機能；8．総ビリルビンレベル $\leq 1.5 \times$ 正常上限（U L N）、A S Tレベル $\leq 2.5 \times$ U L N、及びA L Tレベル $\leq 2.5 \times$ U L Nによって定義される適切な肝機能、又は肝転移疾患の記録がある患者について、A S T及びA L Tレベル $\leq 5 \times$ U L N；9．コッククロフト・ゴールト式に従う推算クレアチニンクリアランス $50 ml / 分$ によって定義される適切な腎機能；10．過去直近の抗癌療法の毒性作用が、N C I C T C A E v 5. 0に従う $\leq$ グレード1（脱毛を除く）に解消した、患者が大手術又は放射線療法を受けたのであれば > 30 グレイに解消したことが認められる、患者は、介入による毒性及び／又は合併症から回復していなければならない（ $\leq$ グレード2ニューロパチー又は $\leq$ グレード2脱毛を有する患者は、この判定基準の例外とし、本試験に適格となり得る）；11．妊娠可能な女性（W O C B P）患者について、世界保健機関（W o r l d H e a l t h O r g a n i z a t i o n : W H O）ガイドラインによって1「極めて有効」な方法又は2「有効」な方法に定義されるとおりの有効な避妊法；12．その承認されている表示に従いペンブロリズマブの投与を受けるのに適格である（組み合わせセコホートのみ）。

20

30

40

【0827】

追加的な第1相単独療法（m o n o t h e r p a h y）拡大組入れ基準は、以下である：1．以下の腫瘍型のうちの1つを有する：黒色腫、非小細胞肺癌（N S C L C）、小細胞肺癌（S C L C）、頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、尿路上皮癌、マイクロサテライト不安定性高値の癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、子宮内膜癌、皮膚T細胞リンパ腫、又はトリプルネガティブ乳癌；2．試験責任医師によってR E C I S T、第1. 1版を使用して決定されるとおりの、測定可能な疾患；3．治療前生検及び治療下にある

50

間の別の生検を受けることに同意する；4．治療前生検及び治療下にある間の別の生検を行ったことと一致するその疾患の臨床的／放射線学的発現を示す。

【0828】

追加的な第1b相組み合わせ療法拡大コホート判定基準は、以下である：1．治験責任医師によってRECIST、第1．1版を使用して決定されたとおりの、測定可能な疾患；2．治療前生検及び治療下にある間の別の生検を受けることに同意する；3．治療前生検及び治療下にある間の別の生検を行ったことと一致するその疾患の臨床的／放射線学的発現を示す。

【0829】

組入れ基準（第2相全般）は、以下である：1．署名した書面によるインフォームドコンセント；2．年齢18歳以上の男性又は女性患者；3．試験登録時のECOGパフォーマンスステータスが0又は1及び推定平均余命が少なくとも3ヵ月；4．治験責任医師によってRECIST、第1．1版を使用して決定されたとおりの、測定可能な疾患；5．治療前生検及び治療下にある間の別の生検を受けることに同意する；6．WBC数 $\geq 3 \times 10^9 / L$ であってANC $\geq 1.5 \times 10^9 / L$ 、リンパ球数 $\geq 0.5 \times 10^9 / L$ 、血小板数 $\geq 75 \times 10^9 / L$ 、及びヘモグロビン $\geq 9 g / dL$ （輸血されたものであってもよい）によって定義される適切な血液学的機能；7．総ビリルビンレベル $\leq 1.5 \times ULN$ 、ASTレベル $\leq 2.5 \times ULN$ 、及びALTレベル $\leq 2.5 \times ULN$ 、又は肝転移疾患の記録がある患者について、AST及びALTレベル $\leq 5 \times ULN$ によって定義される適切な肝機能；8．コッククロフト・ゴールト式に従う推算クレアチニークリアランス $> 50 ml / 分$ によって定義される適切な腎機能；9．過去直近の抗癌療法の毒性作用がNCICTCAE v5.0に従うグレード ≤ 1 （脱毛を除く）に解消した、患者が大手術又は放射線療法を受けたのであれば > 30 グレイに解消したことが認められる、患者は、介入による毒性及び／又は合併症から回復していなければならない（ $\leq$ グレード2ニューロパチー又は $\leq$ グレード2脱毛を有する患者は、この判定基準の例外とし、本試験に適格となり得る）；10．治療前生検及び治療下にある間の別の生検を行ったことと一致するその疾患の臨床的／放射線学的発現を示す；11．WOCBP患者について、WHOガイドラインによって1「極めて有効」な方法又は2「有効」な方法に定義されたとおりの有効な避妊法。

【0830】

追加的な第2相組入れ基準（黒色腫のみ）は、以下である：1．抗PD-1抗体による治療を少なくとも6週間受けた；2．抗PD-1の投与が行われている間、PDの初回診断の少なくとも4週間後にPDの確認を有する。PDの確認は、放射線学的又は臨床的所見に基づき得る；3．腫瘍がBRAF活性化変異を持ち、及び最終ラインの治療後に進行した場合、BRAF阻害薬を受けていなければならない。

【0831】

追加的な第2相組入れ基準（腎細胞のみ）は、以下である：1．任意の明細胞成分；2．抗PD-1／PD-L1抗体又は抗血管内皮成長因子療法による治療を単独療法として又は組み合わせで受けた；3．過去に3ライン以下の療法を受けた。

【0832】

追加的な第2相組入れ基準（尿路上皮癌のみ）は、以下である：1．組織学的又は細胞学的に確認された局所進行又は転移性尿路上皮癌（腎盂、尿管、尿路上皮、尿道を含む）；2．手術不能局所進行又は転移性尿路上皮癌に対する1つの（及び1つを超えない）白金含有レジメン（例えば、白金＋別の薬剤、例えば、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキシソルビシンなど）を受けたことがなければならず、X線所見進行を伴う又は補助療法としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内の再発を伴う（これらが伴えば、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なされることになり得る）；3．転移性疾患の治療に対する2ラインを超えない療法（白金含有レジメンを含む）を受けたことがある；4．CPI（即ち、単独療法としての、又は白金系化学療法との組み合わせでの抗PD-1又は抗PD-L1による治療を受けたことがあってはならない。

【0833】

除外基準は、以下である：1．許可されていない薬物による同時治療；2．r h I L 2 又は I L 2 部分を含有する任意の組換え長時間作用型薬物前による過去の治療歴；3．同時に行われる抗癌治療（例えば、細胞減少療法、放射線療法〔但し、骨転移に対する緩和放射線療法を除く〕、免疫療法、又はエリスロポエチンを除くサイトカイン療法）、大手術（過去の診断的生検を除く）、同時に行われるステロイド又は他の免疫抑制剤による全身療法、又は試験治療の開始前28日以内の任意の治験薬の使用。全身性ステロイド薬の（即ち、アレルギー反応又は i r A E の管理のための）短期投与は許容される；注記：ビスホスホネート系薬の投与を受けたことがある患者は、D F - h I L - 1 2 - F c s i の初回用量の少なくとも14日前に治療が開始されたならば適格とする；4．過去3年以内の本試験で研究されることになる標的悪性腫瘍以外の悪性疾患歴、但し、皮膚基底細胞癌又は扁平上皮癌は例外とする、限局性前立腺癌又は子宮頸部上皮内癌；5．急速進行性疾患；6．抗 P D - 1 又は P D - L 1 薬剤が単独療法として投与される治療中に起こる任意のグレード2以上の神経毒性又は肺毒性；7．活動中の又は過去の中樞神経系（C N S）転移。脳転移を伴う黒色腫患者は、治療後4週間にわたって安定していれば適格である；8．自家又は同種異系幹細胞移植を含めた任意の臓器移植の受容；9．重大な急性又は慢性感染症（ヒト免疫不全ウイルス〔H I V〕の検査陽性歴、又はスクリーニングウィンドウ内で検査した活動性若しくは潜在性B型肝炎又は活動性C型肝炎）を含む；10．過去3年以内に28日超にわたって全身性免疫抑制剤による治療を必要とした既存の自己免疫疾患（白斑を有する患者を除く）又は臨床的に関連性のある免疫不全症（例えば、異常ガンマグロブリン血症又は先天性免疫不全症）、又は1日目から7日以内の発熱；11．モノクローナル抗体（m A b）に対する既知の重症過敏性反応（≧グレード3 N C I C T C A E v 5 . 0）、任意のアナフィラキシー歴、又は喘息のコントロール不良（即ち、部分的にコントロールされている喘息の3つ以上の特徴）；12．≧グレード2 N C I C T C A E v 5 . 0 の過去の療法に関連する持続性の毒性、しかしながら≦グレード2の脱毛及び感覚性ニューロパチーは許容される；13．試験中に妊娠中又は授乳中の女性；14．既知のアルコール又は薬物乱用；15．重篤な心臓の病気又は病状であって、限定はされないが、a．ニューヨーク心臓協会（New York Heart Association）クラスIII又はIV心不全又は収縮機能不全（左室駆出率〔L V E F〕<55%）の病歴；b．高リスクのコントロールされていない不整脈、即ち、安静時心拍数100/分超を伴う頻脈；c．重大な心室性不整脈（心室頻拍）又は高グレード房室（A V）ブロック（第2度房室ブロック2型〔モビッツ2型〕又は第3度房室ブロック）；d．抗狭心症薬投与を必要とする狭心症；e．臨床的に重大な心臓弁膜症；f．E C G 上の貫壁性梗塞のエビデンス；g．コントロール不良の高血圧症（収縮期>180mmHg又は拡張期>100mmHgによって定義される）；h．臨床的に関連性のあるコントロール不良の心リスク要因、治験責任医師の意見によれば本試験への参加を制限し得る臨床的に関連性ある肺疾患又は任意の臨床的に関連性のある病態を含むもの；16．治験責任医師の意見によれば、患者が参加する能力を損なう可能性のある他のあらゆる重大な疾患（例えば、炎症性腸疾患）；17．インフォームドコンセントの理解又は提出を妨げることになるであろう任意の精神医学的病態；18．法的無能力又は限られた法的行為能力；19．インフォームドコンセント用紙（I C F）及び本プロトコルに挙げられる要求事項及び制限事項の順守を含む、署名したインフォームドコンセントを差し出すことができない。

【0834】

実施例29：D F h I L 1 2 - F c s i を使用した癌の治療

目的

本臨床試験は、以下のフェーズで設計する：第1相、第1b相、及び第2相。

【0835】

第1相の主要目的は、D F h I L 1 2 - F c s i の安全性及び忍容性を評価することである（別名D F 6 0 0 2）単独療法としての、及び進行（切除不能、再発性又は転移性

10

20

30

40

50

）固形腫瘍を有する患者におけるDF hIL12-Fc siの最大耐用量（MTD）を決定すること。

【0836】

第1b相の主要目的は、ニボルマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの安全性及び忍容性を評価すること、及び進行（切除不能、再発性、又は転移性）固形腫瘍を有する患者におけるニボルマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siの最大耐用量（MTD）を決定することである。

【0837】

第2相の主要目的は、単独療法としての又は組み合わせでのDF hIL12-Fc siの臨床活性を試験する全ての有効性拡大コホートについて、独立評価項目レビュー委員会（Independent Endpoint Review Committee: IERC）による固形癌効果判定基準（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors）第1.1版（RECIST 1.1）に基づき客観的奏効率（ORR）を評価することである。

【0838】

単独療法としての及びニボルマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siによる第1相及び第1b相の副次的目的は、DF hIL12-Fc siのPKを特徴付けること；DF hIL12-Fc siの免疫原性を判定すること、及びその曝露量と臨床活性とを相関付けること；治験責任医師によりRECIST 1.1を使用してDF hIL12-Fc siに関して決定されたとおりの、最良総合効果（BOR）を評価すること；治験責任医師によりRECIST 1.1を使用してDF hIL12-Fc siに関して決定されたとおりの、最良総合効果（BOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siの奏効期間（DOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siに関する無増悪生存（PFS）を評価すること；全生存（OS）期間を評価することである。

【0839】

単独療法としての及びニボルマブと組み合わせたDF hIL12-Fc siによる第2相の副次的目的は、DF hIL12-Fc siのPKを特徴付けること；IERCに従いRECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siの奏効期間（DOR）を評価すること；RECIST 1.1を使用してDF hIL12-Fc siの臨床的有用率（CBR）を評価すること。CBRは、最良効果として完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、又は病勢安定（SD）である患者の割合として定義される；DF hIL12-Fc siの安全性を評価すること；DF hIL12-Fc siの免疫原性を判定すること、及び曝露量及び臨床活性と相関付けること；IERCに従いRECIST 1.1を使用して、DF hIL12-Fc siに関する無増悪生存（PFS）を評価すること；及び全生存（OS）期間を評価することである。

【0840】

アーム及び介入は、以下の表76に提示する。

【0841】

10

20

30

40

50

【表 101】

表 76: アーム及び介入

アーム	介入/治療
実験薬: DF6002 単独療法用量漸増; 固形腫瘍を有する患者における単独療法としての皮下 DF6002 の 3+3 用量漸増。	生物製剤: DF6002; DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。
実験薬: DF6002 単独療法拡大(黒色腫); 皮下 DF6002 を単独療法として受けている黒色腫を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤: DF6002; DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。
実験薬: DF6002 単独療法拡大(NSCLC); 皮下 DF6002 を単独療法として受けている非小細胞肺癌を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤: DF6002; DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。
実験薬: DF6002 のオブジーボ(Opdivo)との組み合わせ漸増; 皮下 DF6002 の静脈内オブジーボ(Opdivo)との組み合わせの 3+3 用量漸増。	生物製剤: DF6002 DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。 生物製剤: ニボルマブ ニボルマブはヒト免疫グロブリン G4(IgG4)モノクローナル抗体であり、プログラム死-1 受容体(PD-1)に結合する。 別名: オブジーボ(Opdivo)
実験薬: DF6002 のオブジーボ(Opdivo)との組み合わせ拡大(黒色腫) 皮下 DF6002 の静脈内オブジーボ(Opdivo)との組み合わせを受けている黒色腫を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤: DF6002 DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。 生物製剤: ニボルマブ ニボルマブはヒト免疫グロブリン G4(IgG4)モノクローナル抗体であり、プログラム死-1 受容体(PD-1)に結合する。 別名: オブジーボ(Opdivo)
実験薬: DF6002 のオブジーボ(Opdivo)との組み合わせ拡大(NSCLC) 皮下 DF6002 の静脈内オブジーボ(Opdivo)との組み合わせを受けている非小細胞肺癌を有する最大 40 例の患者の用量拡大。	生物製剤: DF6002 DF6002 は、IL12 受容体に結合する一価ヒトインターロイキン-12(IL12)-定常断片(Fc)融合タンパク質である。 生物製剤: ニボルマブ ニボルマブはヒト免疫グロブリン G4(IgG4)モノクローナル抗体であり、プログラム死-1 受容体(PD-1)に結合する。 別名: オブジーボ(Opdivo)

【0842】

主要アウトカム尺度としては、以下が挙げられる：

1. 試験プロトコルにある判定基準に従い定義されるとおりの、単独療法 DF6002 による試験中に認められた用量制限毒性の数の評価 [時間フレーム：各対象について治療下にある最初の 3 週間]。試験プロトコルに従う用量制限毒性判定基準を満たす、単独療法 DF6002 による治療中に認められた有害事象の数を評価すること；

2. 試験プロトコルにある判定基準に従い定義されるとおりの、DF6002 とニボルマブとの組み合わせ療法による試験中に認められた用量制限毒性の数の評価 [時間フレーム：組み合わせ療法コホートの各対象について治療下にある最初の 3 週間]。試験プロトコルに従う用量制限毒性判定基準を満たす、DF6002 とニボルマブとの組み合わせ療法による治療中に認められた有害事象の数を評価すること；及び

3. 全奏効率を評価する [時間フレーム：試験完了後 90 日まで、平均 1 年。] 第 2 相

拡大コホートの患者のRECIST第1.1版の判定基準に従う全奏効率（ORR）を評価すること。副次アウトカム尺度としては、以下が挙げられる：1. 試験全体を通じた治療中に発生した有害事象の数を評価する〔時間フレーム：試験の第2相部分に登録した最後の対象の最終回治療後30日まで〕。DF6002による治療下にある間に発生した有害事象の数を評価することにより、DF6002の安全性プロファイルを特徴付ける；2. 様々な時点でDF6002の血清濃度を決定する〔時間フレーム：治療開始から最終回治療後28日にわたるまで〕。DF6002の濃度対時間が、試験中の様々な時点で採取された血液試料を使用して測定されることになる；

4. 奏効期間を評価する〔時間フレーム：療法開始時点から、最初に腫瘍進行が記録された日まで、最長24ヵ月まで評価される〕。RECIST 1.1判定基準を使用して奏効期間を評価すること；

5. 最良総合効果を評価する〔時間フレーム：試験完了後90日まで、平均1年〕RECIST 1.1判定基準を使用して最良総合効果を評価すること；

6. 全生存を評価する〔時間フレーム：本試験への登録から死亡までの時間、試験中の最終回治療後最長2年まで測定される〕治療後の全生存を評価すること；及び

7. 全奏効率を評価する〔時間フレーム：試験への登録から、試験中の最終回治療後最長2年までの時間〕治験責任医師の判断により全奏効率を評価すること。

【0843】

組入れ基準（第1相及び第1b相全般）には、以下が含まれる：1. 年齢18歳以上の男性又は女性患者；2. 以下の腫瘍型の間の、標準療法が存在しない又は標準療法が失敗した、組織学的又は細胞学的に証明されている局所進行又は転移性固形腫瘍：黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、尿路上皮癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、皮膚扁平上皮癌、腎細胞癌、子宮内膜癌、トリプル陰性乳癌、卵巣癌、及び前立腺癌；3. ECOGパフォーマンスステータスが0又は1；4. 疾患の臨床的又は放射線学的エビデンス；5. 適切な血液学的機能、肝及び腎機能；6. 抗癌療法前の毒性作用の≤グレード1への解消（≤グレード2ニューロパシー、≤グレード2内分泌病又は≤グレード2脱毛を有する患者は除外される）；及び7. 妊娠可能な女性について世界保健機関（World Health Organization）ガイドライン1「極めて有効」な方法又は2「有効」な方法によって定義されるとおりの有効な避妊法。

【0844】

追加的な第1相単独療法及び第1b相ニボルマブとの組み合わせ拡大組入れ基準には、以下が含まれる：1. 以下の腫瘍型：黒色腫、非小細胞肺癌、又はトリプルネガティブ乳癌のうちの1つを有する；及び2. 治療前生検及び治療下にある間の別の生検を受けることに同意する。

【0845】

黒色腫に特異的な拡大組入れ基準には、以下が含まれる：1. 対がん米国合同委員会（American Joint Committee on Cancer）ステージ分類システムに指定されるとおりの、組織学的に確認された切除不能なステージIII又はステージIV黒色腫；2. 眼メラノーマ又はぶどう膜黒色腫を有する参加者は不適格である；3. 利用可能な場合、PD-L1ステータスの記録がなければならない；4. BRAF（V600）突然変異ステータスが既知でなければならない。BRAF突然変異型及び野生型の両方の参加者がこのコホートに許容される；5. BRAF突然変異型参加者は、承認済みのターゲット療法で治療したことがなければならない；6. RECIST 1.1判定基準によるとおりの抗PD-（L）1療法（単独療法として又は組み合わせの一部として投与される）の中止時又は中止後における進行性又は再発性疾患の記録がなければならない；及び7. 補助療法セッティングで抗PD-（L）1の投与を受けた参加者は、RECIST 1.1判定基準によるとおりの抗PD-（L）1療法（単独療法として又は組み合わせの一部として投与される）の中止時又は中止から6ヵ月以内の進行性又は再発性疾患の記録がなければならない。

【0846】

NSCLCに特異的な拡大組入れ基準には、以下が含まれる：1．ステージIIIB、ステージIV、又は再発性疾患に関するステージ判定基準を満たしている組織学的に確認されたNSCLC；2．参加者は、進行又は転移性疾患に対するプラチナダブレットベースの化学療法又は少なくとも2ラインの過去の全身療法の最中又はその後に再発性又は進行性疾患を有していなければならないか、又は局所性疾患に対する白金系化学療法の完了後6ヵ月以内の再発性又は進行性疾患を有していなければならない；3．参加者は、利用可能な場合、抗PD-(L)1療法の投与を受けたことがあり、その投与時又は投与後に進行していなければならない；及び4．アクションナブルな突然変異のステータス（例えば、EGFR、ALK、ROS1、RET等）（国／地域の標準治療実践によるとおり検査が利用可能なとき）が既知でなければならない；アクションナブルな突然変異を有する参加者は、標準チロシンキナーゼ阻害薬（国／地域の標準治療実践により利用可能なとりの）の投与を受けたことがあり、その投与時に進行したか、それに不耐容であったか、又はそれが候補でない者でなければならない。

【0847】

TNBCに特異的な拡大組入れ基準には、以下が含まれる：1．組織学的に確認された切除不能局所進行性又は転移性トリプルネガティブ乳癌。登録前に、米国臨床腫瘍学会（American Society of Clinical Oncology）及び米国病理医協会（College of American Pathologists）のガイドラインによるPD-L1ステータス、HER2陰性、エストロゲン受容体陰性、及びプロゲステロン受容体陰性ステータスが地方施設によって判定されていなければならない；2．患者は、転移性疾患の治療のための抗PD-1／PD-L1の投与を受けたことがあってはならず、但し補助療法セッティングでの抗PD-1／PD-L1の投与は許容される；3．患者は、その転移性疾患の治療のための1ラインの化学療法を受けたことがなければならず、その化学療法ラインの最中又はその後に進行が認められなければならない；及び4．患者は、その切除不能再発性又は転移性疾患の治療のための2ライン以上の化学療法を受けたことがあってはならない。

【0848】

第2相（全般）の組入れ基準には、以下が含まれる：1．年齢18歳以上の男性又は女性患者；2．ECOGパフォーマンスステータスが0又は1；3．測定可能な疾患の臨床的又は放射線学的エビデンス；4．適切な血液学的機能、肝及び腎機能；5．過去の抗癌療法の毒性作用の≦グレード1への解消。（≦グレード2ニューロパシー、≦グレード2内分泌病又は≦グレード2脱毛を有する患者は除く。）；6．参加者は、抗PD-(L)1療法の投与を受けたことがあり、その投与時又は投与後に進行していなければならない；及び7．妊娠可能な女性について、世界保健機関（World Health Organization）ガイドライン1「極めて有効」な方法又は2「有効」な方法によって定義されるとおりの有効な避妊法。

【0849】

第2相（進行性黒色腫患者）の追加的な組入れ基準には、以下が含まれる：1．進行／転移性セッティングで抗PD-(L)1の投与を受けた参加者は、抗PD-(L)1療法中止時又はその中止から3ヵ月以内の進行性又は再発性疾患の記録がなければならない；2．補助療法セッティングで抗PD-(L)1の投与を受けた参加者は、抗PD-(L)1療法中止時又は中止から6ヵ月以内の進行性又は再発性疾患の記録がなければならない；3．抗PD-1抗体の投与を受けている間に病勢進行の初期診断から少なくとも4週間後に病勢進行が確認された；4．BRAF突然変異ステータスが既知であり、承認済みのターゲット療法で治療されなければならない；5．腫瘍がBRAF活性化変異を担持している場合にBRAF阻害薬の投与を受け、最終ラインの治療後に進行した；6．眼メラノーマ又はぶどう膜黒色腫を有する参加者は不適格である；及び7．初期進行から少なくとも4週間後に、抗PD-(L)1療法前のX線所見進行が、進行を確認するスキャンで確認される必要がある。

【0850】

第2相（非小細胞肺癌）の追加的な組入れ基準には、以下が含まれる：1．参加者は、進行又は転移性疾患に対するプラチナダブレットベースの化学療法又は少なくとも2ラインの過去の全身療法の最中又はその後に再発性又は進行性疾患を有していなければならないか、又は局所性疾患に対する白金系化学療法の完了後6ヵ月以内の再発性又は進行性疾患を有しなければならない；及び2．アクシオナブルな突然変異のステータスが既知でなければならない；アクシオナブルな突然変異を有する参加者は、標準チロシンキナーゼ阻害薬の投与を受けたことがあり、その投与時に進行したか、それに不耐容であったか、又はそれが候補でない者でなければならない。

【0851】

全ての患者（全てのフェーズ）の除外基準：1．r h I L 2又はI L 2部分を含有する任意の組換え長時間作用型薬物前による過去の治療歴；2．同時に行われる抗癌治療（但し、骨転移に対する緩和放射線療法を例外とする）、免疫療法、又はサイトカイン療法（エリスロポエチンを除く）、大手術（過去の診断的生検を除く）、同時に行われるステロイド又は他の免疫抑制剤による全身療法、又は試験治療の開始前28日以内の任意の治験薬の使用；3．過去3年以内の、目下の標的悪性腫瘍以外の悪性疾患歴、但し、皮膚基底細胞癌又は扁平上皮癌、限局性前立腺癌又は子宮頸部上皮内癌は例外とする；4．急速進行性疾患；5．抗P D - 1又はP D - L 1薬剤が単独療法として投与される治療中に起こる任意のグレード2以上の神経毒性又は肺毒性；6．活動中の又は過去の中樞神経系（C N S）転移、但し、以下の判定基準の全てを満たしたときは、この限りでない：a．C N S病変が無症候性であり、過去に治療されている；b．患者は、副腎不全の補充療法のための連日のステロイド治療を継続する必要がない；c．イメージングにより、C N S転移に対する最終回の治療から28日超にわたって疾患の安定性が実証される；7．任意の臓器移植の受容、自家又は同種異系幹細胞移植；8．重大な急性又は慢性感染症、又は活動性又は潜在性B型肝炎又は活動性C型肝炎；9．過去3年以内に28日超にわたって全身性免疫抑制剤による治療を必要とした既存の自己免疫疾患、臨床的に関連性のある免疫不全症、又は1日目から7日以内の発熱；10．モノクローナル抗体に対する既知の重症過敏性反応及び任意のアナフィラキシー歴、又は喘息のコントロール不良；11．重篤な心臓の病気又は病状；及び12．標準的な対応策で再発する見込みの低いものを除いた、過去の免疫療法に関連する生命を脅かす毒性の病歴。

【0852】

探索的目的

単独療法としての及びニボルマブと組み合わせたD F h I L 1 2 - F c s iの両方による探索的目的は、腫瘍及び末梢バイオマーカーのベースラインからの変化、及びP Kとの関係を判定すること；ニボルマブのP Kを評価すること（第1 b相及びコホート2 Cのみ）；治験責任医師評価（R E C I S TによるO R R、D O R、C B R、及びB O R）に従い有効性拡大コホートパート（第2相）におけるD F h I L 1 2 - F c s iの活性を判定すること；腫瘍及び末梢バイオマーカーと、腫瘍応答率との間の関連性を判定することである。

【0853】

試験デザイン概要

本試験は、単独療法としての及びニボルマブと組み合わせたD F h I L 1 2 - F c s iの安全性、忍容性、P K、薬力学、及び予備的な抗腫瘍活性を決定するように設計された、連続する並行群間有効性拡大試験による第1 / 2相非盲検用量漸増試験である。試験デザインの概略図を図5 2 A（単独療法について）及び5 2 B（ニボルマブとの組み合わせ療法について）に示す。

【0854】

本試験は3パートからなる：第1相：3 + 3デザインを用いた単独療法としての用量漸増、第1相コホート拡大を伴う；第1 b相：3 + 3デザインを用いたニボルマブとの組み合わせとしての用量漸増、第1 b相コホート拡大を伴う；第2相：群逐次デザインを用いた有効性拡大。

【0855】

DF hIL12-Fc si は、以下の適応疾患において有効性拡大コホートで単独療法として判定する：コホート2A：進行（切除不能又は転移性）黒色腫；コホート2B：進行（切除不能又は転移性）腎細胞癌（RCC）。

【0856】

DF hIL12-Fc si は、以下の適応疾患において有効性拡大コホートでニボルマブとの組み合わせで判定する：コホート2C：進行（切除不能又は転移性）尿路上皮癌。

【0857】

各試験フェーズにおいて、患者はDF hIL12-Fc si の投与を4週間毎に（Q4W）1日目に受ける。患者は、病勢進行（PD）の確認、許容できない毒性（即ち、用量制限毒性〔DLT〕）、又は本試験若しくは治験薬（IMP）から離脱する何らかの理由が発生するまでDF hIL12-Fc si の投与を受ける。

【0858】

第1相用量漸増DF hIL12-Fc si 単独療法

本試験の第1相用量漸増フェーズは、標準的な3+3デザインを用いて単独療法としてのDF hIL12-Fc si の用量制限毒性（DLT）及び最大耐用量（MTD）を決定するようにデザインされる。

【0859】

次の用量レベル（DL）に漸増するかの判断は、DLTが理由でない限り、サイクル1、21日目（C1D21）までのコホートの全ての患者に対する安全性評価の実施が終わった後の安全性評価に基づく。DF hIL12-Fc si の安全性を評価するため、用量漸増判断について責任を負う安全性監視委員会（SMC）が設立される。

【0860】

用量レベル「n」の安全性が確立された後、SMCは、第I相拡大コホートにおいて当該の用量レベルまで登録を許可する選択権を有する；この手順によって50例以下の患者を登録することができる。

【0861】

MTDは、6例の評価可能な患者のうち1例以上の患者にDLTが認められるときの最も高いDLとして定義される。

【0862】

第1b相：ニボルマブとの組み合わせとしての用量漸増

本試験の第1b相用量漸増フェーズは、第1相について記載されるとおり、標準的な3+3デザインを用いて、ニボルマブとの組み合わせを所与としたときのDF hIL12-Fc si のDLT及びMTDを決定するようにデザインされる。

【0863】

ニボルマブは、4週間毎に1回投与される（各サイクルの1日目に）その米国添付文書に従い。ニボルマブの投与は、DF hIL12-Fc si の投与よりも前に行われる。

【0864】

ニボルマブと組み合わせて試験されるDF hIL12-Fc si 用量レベルは、単独療法として試験されるレベルと同じである。

【0865】

第1b相は、SMCがDL2単独療法の安全性を確立した後に開始する（DL3への登録を開始することの合意として定義される）。第1b相は、第1b相が開始される時点で単独療法によって確立された安全用量の少なくとも1レベル低いDF hIL12-Fc si 用量から開始する。

【0866】

用量レベル「n」の安全性が確立された後、SMCは、第1b相拡大コホートにおいて登録を許可する選択権を有する；この手順によって全用量レベルで50例以下の患者を登録することができる。

【0867】

10

20

30

40

50

第2相有効性拡大

以下の腫瘍型を推奨第2相用量（RP2D）で登録する：単独療法として：コホート2A：進行（切除不能又は転移性）黒色腫；コホート2B：進行（切除不能又は転移性）腎細胞癌。ニボルマブと組み合わせて、コホート2C：進行（切除不能又は転移性）尿路上皮癌。

【0868】

安全性の監視

試験登録時の米国東海岸癌臨床試験グループ（Eastern Cooperative Oncology Group：ECOG）パフォーマンスステータスが0又は1であり、且つ推定平均余命が少なくとも3ヵ月の年齢18歳以上の男性又は女性患者を登録する。各試験フェーズ／コホートにおける主要組入れ基準は、以下のとおりである：

第1／1b相における用量漸増コホート：以下の適応疾患における標準療法が存在しない又はそれに対する標準療法が失敗した、組織学的又は細胞学的に証明されている局所進行又は転移性固形腫瘍：黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、尿路上皮癌、胃癌、食道癌、子宮頸部癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、皮膚扁平上皮癌、腎細胞癌、子宮内膜癌、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、卵巣癌、及び前立腺癌；疾患の臨床的又は放射線学的エビデンス。

【0869】

第1／1b相における用量拡大コホート：標準療法が存在しない又はそれに対する標準療法が失敗した組織学的又は細胞学的に証明されている局所進行又は転移性固形腫瘍；固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（RECIST）、第1.1版を使用して治験責任医師によって決定されるとき、測定可能な疾患を有する。

【0870】

コホート2A

進行性黒色腫を有する患者であって、抗プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）抗体による治療を少なくとも6週間受けた；抗PD-1の投与が行われている間、PDの初回診断の少なくとも4週間後にPDの確認を有する。PDの確認は、放射線学的又は臨床的所見に基づき得る；腫瘍がBRAF活性化変異を持ち、及び最終ラインの治療後に進行的な場合、BRAF阻害薬を受けていなければならない患者。

【0871】

コホート2B

進行RCCを有する患者であって、任意の明細胞成分を有する；抗PD-1／PD-L1抗体及び抗血管内皮成長因子療法による治療を単独療法として又は組み合わせて受けた；過去に3ライン以下の療法を受けた患者。

【0872】

コホート2C

進行尿路上皮癌を有する患者であって、組織学的又は細胞学的に確認された局所進行又は転移性尿路移行上皮癌（腎盂、尿管、尿路上皮、尿道を含む）を有する；手術不能、局所進行又は転移性尿路上皮癌に対する1つの（及び1つを超えない）白金含有レジメン（例えば、白金＋別の薬剤、例えば、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキソルビシン等）を受けたことがあり、X線所見進行を伴うか、又は補助療法としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内の再発を伴う（これらが伴えば、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なされることになり得る）；転移性疾患の治療に対する2ラインを超えない療法（白金含有レジメンを含む）を受けたことがある；チェックポイント阻害薬（CPI）による治療（即ち、単独療法としての、又は白金系化学療法との組み合わせでの抗PD-1又は抗PD-L1を受けたことがない患者。

【0873】

用量／投与様式／投薬スケジュール

DF hIL12-Fc siは、単独療法コホート及び組み合わせコホートの両方においてQ4W（即ち、各サイクルの1日目に）で皮下（SC）注射として投与される。患者

10

20

30

40

50

は薬物 S C の投与を最大 2 ヲ所の注射部位に 1 mL を超えない容積で受ける。2 回目の投与は、該当する場合、1 回目の投与の完了後 10 分以内に完了される。

【0874】

第 1 / 1 b 相では、患者は D F h I L 1 2 - F c s i の 1 回目の投与後に一晩入院する。

【0875】

D F h I L 1 2 - F c s i D L (μ g / k g) は、以下の表 7 7 にあるとおりである。

【0876】

【表 102】

表 77: D F h I L 1 2 - F c s i D L (μ g / k g)

	DL1	DL2	DL3	DL4	DL5	DL6	DL7	DL8	DL9	DL10
D F h I L 1 2 - F c s i の用量 (μ g / k g)	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.75
当量の IL12 (μ g / k g)	0.021	0.053	0.105	0.211	0.316	0.421	0.526	0.632	0.737	0.921

【0877】

D F h I L 1 2 - F c s i の用量は、ベースライン時の患者の体重を基準に計算する。患者の計算された用量は、その最後の用量計算時点から患者の体重が 10 % 以上変化した場合に限り再計算される。

【0878】

第 1 b 相及びコホート 2 C では、ニボルマブは、添付文書に従い、静脈内 (I V) 注入によって 4 週間毎に 1 回 (Q 4 W) 、 480 mg の用量で投与される。ニボルマブの投与は、D F h I L 1 2 - F c s i の投与よりも前に行われる。D F h I L 1 2 - F c s i は、ニボルマブの投与の完了後 1 時間以内に投与される。

【0879】

単独療法としての有効性拡大 (コホート 2 A 及び 2 B)

このフェーズの主要評価項目は、O R R である。これらのコホートの各々について、帰無仮説は、客観的奏効率 (O R R) が 5 % を超えない ($H_0: O R R < 5\%$) というものであり、対立仮説は、O R R が 5 % より高いというものである ($H_1: O R R \geq 5\%$) 。

【0880】

単独療法としての D F h I L 1 2 - F c s i の目標 O R R は、20 % である。これらのコホートの各々につき 40 例の患者を登録することが予想される (即ち、合計で約 80 例の患者) 。

【0881】

指示コホートの各々に 40 例の患者を含む群逐次デザインを用いると、この有効性コホートは、D F h I L 1 2 - F c s i について 20 % の目標 O R R と仮定すれば、片側の全体の第 1 種の過誤率 0.025 で 15 % の差を検出するために約 90 % の試験検出力を提供する。

【0882】

コホート 2 A 及び 2 B の各々について、ラン・ドメッツ (L a n - D e M e t s) のオブライエン・フレミング境界を用いる無益性中間解析を 50 % 情報分数で (即ち、約 20 例の患者で) 計画する。

【0883】

ニボルマブと組み合わせた有効性拡大 (コホート 2 C)

ニボルマブと組み合わせた有効性拡大についての第 2 相部分は、1 ラインの白金系化学療法後に進行した U B C 患者において組み合わせでの D F h I L 1 2 - F c s i の臨床

10

20

30

40

50

活性を決定する。

【0884】

本試験には40例の患者が登録し、そのため40例の登録患者中14例の奏効（CR又はPR）が観察されれば、95%CI（0.206；0.517）につながることであり、これは、Checkmate 275に登録された同様の集団でニボルマブについて報告されている奏効割合の値を除外する。その試験では、ORRは19.6%であった（Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm phase 2 trial. Lancet Oncol. 2017 Jan 25; S1470-2045 (17): 30065-7)。

10

【0885】

探索的バイオマーカー

末梢バイオマーカー

末梢バイオマーカーは、全ての患者において、細胞パラメータ：フローサイトメトリーによる免疫表現型タイピング（IPT）用の末梢血単核球（PBMC）；可溶性因子：血清試料中のサイトカイン及びケモカイン；エキソソームIL12応答アッセイ：エキソソーム刺激と、続くIFN γ 産生分析用のPBMC；循環腫瘍（ct）デオキシリボ核酸（DNA）を含めた末梢で評価する。一遺伝子発現プロファイルはNanostringを使用して実施する：スクリーニング時及びC1D15に採取した末梢血から全RNAを単離する；IPT評価は、以下の試験来院：C1D3、C1D8、C2D8、及びC3D3の各々において、DF hIL12-Fc si C1~C3の投与の2時間前に採取した全血試料に由来するPBMCで実施する；可溶性因子は、各治療サイクルのD1、並びにC1D2、C1D3、C1D5、C1D8、C1D15、C2D3、C3D3、及びC4D3、並びにEOT及びSFU来院時に、DF hIL12-Fc si 投与前2時間以内に採取した血清試料中で決定する。

20

【0886】

腫瘍材料に関する全ての評価を完了するため、血液（例えば、全血、血漿、及び血清試料）を患者から採取する。

30

【0887】

腫瘍組織に由来するバイオマーカー

用量漸増フェーズ（任意生検）、第1／1b相拡大コホートパート（必須生検）、及び第2相有効性拡大コホートフェーズ（必須生検）に参加している患者の治療前生検及び治療生検に関して組織由来バイオマーカーを判定する。

【0888】

保管されている腫瘍組織（又は利用可能な場合、新鮮腫瘍生検）、全血、及び血清試料から、ベースライン時に分子、可溶性及び細胞マーカーを含む推定マーカーのパネルを分析して、臨床的有效性と分析したマーカーとの間の可能性のある相関を調べる。

【0889】

用量漸増フェーズに登録している患者については、市販のキット（Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx）を使用してPD-L1発現レベルを決定し、CD3陽性（T細胞浸潤）の分析を免疫組織化学（IHC）によって実施する。

40

【0890】

第1／1b相拡大コホート及び有効性拡大コホートに登録している患者についてはスクリーニング時（即ち、1回目の試験薬物用量前30日以内）及び治療期間中の予め指定された時点で、新鮮必須腫瘍生検を実施する。

【0891】

評価される他のバイオマーカーとしては、腫瘍浸潤白血球の頻度及び局在（例えば、IHC又はIFによるCD8、CD4 T細胞、Treg、NK細胞、マクロファージ [M

50

1 / 2 プロファイル])、遺伝子発現プロファイル、及びファーマコゲノミクス (P G x) が挙げられる。

【 0 8 9 2 】

全血及び／又は保管腫瘍から抽出した D N A に関して、生殖細胞系列 D N A が調べられてもよい。この抽出 D N A を全エクソームシーケンシング及び／又は遺伝子タイピングに使用する。この目的で、全ての適応疾患について、ベースライン時に (即ち、試験治療の 1 回目の投与よりも前に) 追加的な 6 m L の全血を採取する ; 必要であれば、腫瘍遺伝学の試験のための D N A の抽出には、保管されている腫瘍試料の一部が使用されるため、追加の腫瘍試料は必要ない。

【 0 8 9 3 】

参照による援用

本明細書に引用される特許文献及び科学論文の各々の開示は、全体があらゆる目的から参照によって援用される。

【 0 8 9 4 】

均等物

本発明は、その趣旨又は本質的な特徴から逸脱することなく他の特定の形態で具体化されてもよい。従って前述の実施形態は、あらゆる点で、本明細書に記載される発明を限定するのではなく、むしろ例示するものと考えられるべきである。このように、本発明の範囲は、前述の説明によるのではなく、むしろ添付の特許請求の範囲によって指示され、特許請求の範囲の均等の意味及び範囲に含まれるあらゆる変更が、特許請求の範囲に包含されることが意図される。

本開示は以下の態様を提供し得る。

[項 1]

(a) ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質であって、

(i) 第 1 の抗体 F c ドメインポリペプチドと、多サブユニットサイトカインの第 1 のサブユニットとを含む第 1 のポリペプチド ; 及び

(i i) 第 2 の抗体 F c ドメインポリペプチドと、前記多サブユニットサイトカインの第 2 の異なるサブユニットとを含む第 2 のポリペプチドを含むヘテロ二量体 F c 融合タンパク質、

(b) クエン酸塩 ;

(c) 糖 ;

(d) 糖アルコール ; 及び

(e) 非イオン性界面活性剤

を含む、p H 6 . 0 ~ 7 . 0 の医薬製剤であって、

前記第 1 及び第 2 の抗体 F c ドメインポリペプチドが、各々、ヘテロ二量体化を促進する異なる突然変異を含み、及び

前記多サブユニットサイトカインの前記第 1 のサブユニット及び第 2 の異なるサブユニットが互いに結合している、医薬製剤。

[項 2]

前記第 1 及び／又は第 2 の抗体 F c ドメインポリペプチドが、F c のエフェクター機能を低減する 1 つ以上の突然変異を含む、項 1 に記載の医薬製剤。

[項 3]

前記医薬製剤中のクエン酸塩の濃度が約 1 0 m M ~ 約 3 0 m M である、項 1 又は 2 に記載の医薬製剤。

[項 4]

前記医薬製剤中のクエン酸塩の濃度が約 2 0 m M である、項 3 に記載の医薬製剤。

[項 5]

前記医薬製剤中の前記糖の濃度が約 3 % ~ 約 1 2 % (w / v) である、項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 6]

前記医薬製剤中の前記糖の濃度が約 6 % (w / v) である、項 5 に記載の医薬製剤。

[項 7]

前記糖が二糖である、項 5 又は 6 に記載の医薬製剤。

[項 8]

前記二糖がスクロースである、項 7 に記載の医薬製剤。

[項 9]

前記医薬製剤中の前記糖アルコールの濃度が約 0 . 5 % ~ 約 6 % (w / v) である、項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 10]

前記医薬製剤中の前記糖アルコールの濃度が約 1 % (w / v) である、項 9 に記載の医薬製剤。

10

[項 11]

前記糖アルコールが単糖に由来する、項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 12]

前記糖アルコールがマンニトールである、項 11 に記載の医薬製剤。

[項 13]

前記医薬製剤中の前記非イオン性界面活性剤の濃度が約 0 . 005 % ~ 約 0 . 02 % (w / v) である、項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 14]

前記医薬製剤中のポリソルベート 80 の濃度が約 0 . 01 % (w / v) である、項 13 に記載の医薬製剤。

20

[項 15]

前記非イオン性界面活性剤がポリソルベートである、項 13 又は 14 に記載の医薬製剤。

[項 16]

前記ポリソルベートがポリソルベート 80 である、項 15 に記載の医薬製剤。

[項 17]

pH が約 6 . 1 ~ 約 6 . 9 である、項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 18]

pH が約 6 . 2 ~ 約 6 . 8 である、項 17 に記載の医薬製剤。

[項 19]

pH が約 6 . 3 ~ 約 6 . 7 である、項 18 に記載の医薬製剤。

30

[項 20]

pH が約 6 . 4 ~ 約 6 . 6 である、項 19 に記載の医薬製剤。

[項 21]

pH が約 6 . 5 である、項 20 に記載の医薬製剤。

[項 22]

水を更に含む、項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 23]

前記水が、USP 注射用水である、項 22 に記載の医薬製剤。

[項 24]

約 1 g / L ~ 約 10 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

40

[項 25]

約 2 g / L ~ 約 8 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、項 24 に記載の医薬製剤。

[項 26]

約 4 g / L ~ 約 6 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、項 25 に記載の医薬製剤。

[項 27]

約 5 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を含む、項 26 に記載の医

50

薬製剤。

[項 28]

約 0.5 g/L ~ 約 1.5 g/L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 29]

約 0.75 g/L ~ 約 1.25 g/L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 28 に記載の医薬製剤。

[項 30]

約 1 g/L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 29 に記載の医薬製剤。

[項 31]

約 2℃ ~ 約 8℃ の温度で保存するように設計される、1 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 32]

澄明な無色の溶液であり、目に見える粒子状物質を含まない、項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 33]

示差走査型蛍光定量法により測定したとき、

(a) 約 60℃ より高い、約 61℃ より高い、約 62℃ より高い、約 63℃ より高い、約 64℃ より高い、約 65℃ より高い、又は約 66℃ より高い T_{m1} ; 及び / 又は

(b) 約 70℃ より高い、約 71℃ より高い、約 72℃ より高い、約 73℃ より高い、約 74℃ より高い、約 75℃ より高い、約 76℃ より高い、又は約 77℃ より高い T_{m2} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 34]

約 67.0℃ の T_{m1} 及び約 77.3℃ の T_{m2} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、項 33 に記載の医薬製剤。

[項 35]

T_{m1} 及び / 又は T_{m2} によって定義されたとおりの、前記医薬製剤の熱安定性プロファイルが、前記医薬製剤を 50℃ で 1 週間インキュベートしたとき、5℃ で 1 週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2℃ 未満又は約 1℃ 未満しか変化しない、項 34 に記載の医薬製剤。

[項 36]

示差走査型蛍光定量法により測定したとき、約 60℃ より高い、約 61℃ より高い、約 62℃ より高い、約 63℃ より高い、約 64℃ より高い、約 65℃ より高い、約 66℃ より高い、又は約 67℃ より高い T_{agg} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、1 ~ 35 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 37]

T_{agg} によって定義されたとおりの、前記医薬製剤の熱安定性プロファイルが、前記医薬製剤を 50℃ で 1 週間インキュベートしたとき、5℃ で 1 週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2℃ 未満又は約 1℃ 未満しか変化しない、項 36 に記載の医薬製剤。

[項 38]

前記医薬製剤を 5℃ で 1 週間インキュベートした後、前記医薬製剤の pH が、約 0.2 又は約 0.1 の pH 値より大きく変化しない、項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 39]

前記医薬製剤を 50℃ で 1 週間インキュベートした後、前記医薬製剤の pH が、約 0.2 又は約 0.1 の pH 値より大きく変化しない、項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 40]

10

20

30

40

50

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約15 nm未満、約14 nm未満、約13 nm未満、又は約12 nm未満の Z 平均流体力学直径を有する、項1～39のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項41]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約11.6 nmの Z 平均流体力学直径を有する、項40に記載の医薬製剤。

[項42]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、前記医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約20 nm未満、約19 nm未満、約18 nm未満、約17 nm未満、約16 nm未満、又は約15 nm未満の Z 平均流体力学直径を有する、項1～41のいずれか一項に記載の医薬製剤。

10

[項43]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約14.4 nmの Z 平均流体力学直径を有する、項42に記載の医薬製剤。

[項44]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、前記医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約20 nm未満、約19 nm未満、約18 nm未満、約17 nm未満、又は約16 nm未満の Z 平均流体力学直径を有する、項1～43のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項45]

20

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約15.3 nmの Z 平均流体力学直径を有する、項44に記載の医薬製剤。

[項46]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、又は約0.27未満である、項1～45のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項47]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約0.26である、項1～46のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項48]

30

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、前記医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.30未満、約0.29未満、約0.28未満、約0.27未満、又は約0.26未満である、項1～47のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項49]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約0.25である、項1～48のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項50]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、前記医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、25℃で動的光散乱法により測定したとき、約0.40未満、約0.35未満、又は約0.34未満である、項1～49のいずれか一項に記載の医薬製剤。

40

[項51]

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約0.33である、項1～50のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項52]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、又は約99%超である、項1～51のいずれか一項に記載の医薬製剤。

50

[項 5 3]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約99.0%である、項52に記載の医薬製剤。

[項 5 4]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、前記医薬製剤を50℃で2週間インキュベートした後、約75%超、約80%超、約81%超、約82%超、約83%超、約84%超、又は約85%超である、項1～53のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 5 5]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約85.2%である、項54に記載の医薬製剤。

[項 5 6]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、前記医薬製剤を5回の凍結融解サイクルに供した後、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、又は約98%超である、項1～55のいずれか一項に記載の医薬製剤。

[項 5 7]

前記医薬製剤の純度プロファイルが、SEC-HPLC分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約98.9%である、項56に記載の医薬製剤。

[項 5 8]

それを必要としている対象に、項1～57のいずれか一項に記載の医薬製剤を単回用量療法として投与することを含む、方法。

[項 5 9]

それを必要としている対象に、項1～57のいずれか一項に記載の医薬製剤を複数回用量療法で、用量間に少なくとも3週間又は用量間に少なくとも4週間の間隔を置いて投与することを含む、方法。

[項 6 0]

前記医薬製剤が、前記対象に3週間に1回投与される、項59に記載の方法。

[項 6 1]

前記医薬製剤が、前記対象に4週間に1回投与される、項59に記載の方法。

[項 6 2]

前記医薬製剤が、前記対象に6週間に1回投与される、項59に記載の方法。

[項 6 3]

前記対象に病勢進行、許容できない毒性が現れた場合、又は前記対象が離脱基準を満たした場合、前記複数回用量療法を中止することを更に含む、項59～62のいずれか一項に記載の方法。

[項 6 4]

前記複数回用量療法の間に前記対象に完全奏効(CR)が見られた場合、前記完全奏効の確認後少なくとも12ヵ月間にわたって前記複数回用量療法が更に投与される、項59～63のいずれか一項に記載の方法。

[項 6 5]

前記複数回用量療法の総継続期間が24ヵ月以下である、項64に記載の方法。

[項 6 6]

前記総治療継続期間が24ヵ月より長い、項64に記載の方法。

[項 6 7]

前記医薬製剤が皮下注射によって投与される、項58～66のいずれか一項に記載の方

10

20

30

40

50

法。

〔項 6 8〕

前記医薬製剤が、前記対象の体重を基準として、約 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $1.75 \mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬量で前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を提供するのに十分な量で前記対象に投与される、項 5 8 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 9〕

前記医薬製剤が、前記対象の体重を基準として、約 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.60 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.80 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、又は約 $1.75 \mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬量で前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を提供するのに十分な量で前記対象に投与される、項 5 8 ～ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

〔項 7 0〕

前記医薬製剤が、前記対象の体重を基準として、 $0.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ より多く約 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ より少ない投薬量で前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を提供するのに十分な量で前記対象に投与される、項 5 8 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 1〕

前記医薬製剤が、前記対象の体重を基準として、約 $1.75 \mu\text{g}/\text{kg}$ より多い投薬量で前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質を提供するのに十分な量で前記対象に投与される、項 5 8 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 2〕

前記対象が癌を有する、項 5 8 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

20

〔項 7 3〕

前記対象が局所進行又は転移性固形腫瘍を有する、項 7 2 に記載の方法。

〔項 7 4〕

前記対象における前記癌の存在が、前記固形がんの治療効果判定のためのガイドライン (RECIST)、第 1. 1 版を使用して確認される、項 7 2 又は 7 3 に記載の方法。

〔項 7 5〕

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌 (NSCLC)、小細胞肺癌 (SCLC)、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型 B 細胞リンパ腫、膀胱癌、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌 (RCC)、子宮内膜癌、皮膚 T 細胞リンパ腫、及びトリプルネガティブ乳癌からなる群から選択される、項 7 2 ～ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

〔項 7 6〕

前記対象が抗 PD-1 不応性である、項 7 2 ～ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 7〕

前記対象が黒色腫を有する、項 7 5 に記載の方法。

〔項 7 8〕

前記対象が、過去に抗 PD-1 抗体で少なくとも 6 週間治療されたことがある、項 7 7 に記載の方法。

40

〔項 7 9〕

前記対象が、抗 PD-1 抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも 4 週間後に病勢進行を確認されている、項 7 8 に記載の方法。

〔項 8 0〕

病勢進行が、放射線学的又は臨床的所見によって確認される、項 7 9 に記載の方法。

〔項 8 1〕

前記対象が、BRAF 活性化突然変異を含む腫瘍を有する場合、前記対象が、過去に BRAF 阻害薬で治療されたことがある、項 7 7 に記載の方法。

〔項 8 2〕

前記対象が RCC を有する、項 7 5 に記載の方法。

50

〔項 8 3〕

前記 R C C が明細胞を有する、項 8 2 に記載の方法。

〔項 8 4〕

前記患者が、過去に抗 P D - 1 / P D - L 1 抗体及び／又は抗血管内皮成長因子療法で治療されたことがある、項 8 2 に記載の方法。

〔項 8 5〕

前記対象が、過去に 3 ライン以下の療法を受けたことがある、項 8 2 に記載の方法。

〔項 8 6〕

前記対象が尿路上皮癌を有する、項 7 5 に記載の方法。

〔項 8 7〕

前記対象が局所進行又は転移性尿路移行上皮癌を有する、項 8 6 に記載の方法。

〔項 8 8〕

前記対象が、過去に白金含有レジメンを含む単回治療で治療されたことがあり、且つ前記白金含有レジメンの最終回投与後 6 ヶ月以内の X 線所見進行再発を示している、項 8 6 に記載の方法。

〔項 8 9〕

前記対象が、過去に 2 ライン以下の療法を受けたことがある、項 8 6 に記載の方法。

〔項 9 0〕

前記対象が、過去に単独療法としての又は白金ベースの化学療法と組み合わせたチェックポイント阻害薬（例えば、抗 P D - 1 又は抗 P D - L 1 抗体）療法を受けたことがない、項 8 6 に記載の方法。

〔項 9 1〕

前記医薬製剤が、前記対象に単独療法として投与される、項 5 8 ～ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 9 2〕

前記医薬製剤が、前記対象に組み合わせ療法として投与される、項 5 8 ～ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 9 3〕

前記対象に抗 P D - 1 抗体を投与することを更に含む、項 9 2 に記載の方法。

〔項 9 4〕

前記抗 P D - 1 抗体がペンブロリズマブである、項 9 3 に記載の方法。

〔項 9 5〕

ペンブロリズマブが静脈内投与される、項 9 4 に記載の方法。

〔項 9 6〕

ペンブロリズマブが 2 0 0 m g の用量で投与される、項 9 4 又は 9 5 に記載の方法。

〔項 9 7〕

ペンブロリズマブの投与が、前記医薬製剤の各投与よりも前に行われる、項 9 4 ～ 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 9 8〕

前記医薬製剤が、ペンブロリズマブの投与完了後 1 時間以内に投与される、項 9 7 に記載の方法。

〔項 9 9〕

前記抗 P D - 1 抗体がニボルマブである、項 9 2 に記載の方法。

〔項 1 0 0〕

ニボルマブが静脈内投与される、項 9 9 に記載の方法。

〔項 1 0 1〕

ニボルマブが 4 8 0 m g の用量で投与される、項 9 9 又は 1 0 0 に記載の方法。

〔項 1 0 2〕

ニボルマブの投与が、前記医薬製剤の各投与よりも前に行われる、項 9 9 ～ 1 0 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔項 1 0 3〕

前記医薬製剤が、ニボルマブの投与完了後 1 時間以内に投与される、項 1 0 2 に記載の方法。

〔項 1 0 4〕

前記癌が、黒色腫、NSCLC、SCLC、RCC、古典的ホジキンリンパ腫、HNSCC、尿路上皮癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される、項 9 9 ～ 1 0 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 5〕

前記癌が黒色腫である、項 1 0 4 に記載の方法。

〔項 1 0 6〕

前記黒色腫が切除不能である、項 1 0 5 に記載の方法。

〔項 1 0 7〕

前記癌が結腸直腸癌である、項 1 0 4 に記載の方法。

〔項 1 0 8〕

前記結腸直腸癌が高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) 又はミスマッチ修復機構欠損転移性 (dMMR) 結腸直腸癌である、項 1 0 7 に記載の方法。

〔項 1 0 9〕

外科的介入を実施することにより、前記対象の癌細胞を溶解させ、腫瘍を除去し、又は腫瘍を減量させることを更に含む、項 9 2 ～ 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 0〕

前記外科的介入が凍結療法を含む、項 1 0 9 に記載の方法。

〔項 1 1 1〕

前記外科的介入が温熱療法を含む、項 1 0 9 に記載の方法。

〔項 1 1 2〕

前記外科的介入が、前記対象に放射線療法を投与することを含む、項 1 0 9 に記載の方法。

〔項 1 1 3〕

前記放射線療法が、体幹部定位放射線療法 (SBRT) である、項 1 1 2 に記載の方法。

〔項 1 1 4〕

前記対象に NK 細胞標的療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 5〕

前記対象に多特異性結合タンパク質が投与される、項 1 1 4 に記載の方法。

〔項 1 1 6〕

前記対象にキメラ抗原受容体療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 7〕

前記対象にサイトカイン療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 8〕

前記対象に自然免疫系アゴニスト療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 9〕

前記対象に化学療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 2 0〕

前記対象に標的抗原療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 2 1〕

前記対象に腫瘍溶解性ウイルス療法を投与することを更に含む、項 9 2 ～ 1 2 0 のい

10

20

30

40

50

れか一項に記載の方法。

〔項 1 2 2〕

医薬製剤の投与を受けている対象において毒性を検出する方法であって、前記対象の血中の C 反応性タンパク質 (CRP) 濃度を測定することを含む方法において、前記医薬製剤が、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含み、及び前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質が、免疫グロブリン Fc (断片結晶化可能) 対の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、IL-12 の前記 p40 及び p35 サブユニットが、別々に、それぞれ前記第 1 の Fc 領域及び前記第 2 の Fc 領域に連結されるか、又は前記第 2 の Fc 領域及び前記第 1 の Fc 領域に連結され、前記 p40 及び p35 サブユニットが、各々、前記 Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結され、前記第 1 の Fc 領域及び前記第 2 の Fc 領域の CH3 ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含む、方法。

10

〔項 1 2 3〕

(1) 前記対象の血中の CRP 濃度が閾値 CRP 濃度よりも高い場合、前記対象が、薬物有害反応を発症するリスクがあると同定され；及び

(2) 前記対象の血中の CRP 濃度が前記閾値 C 反応性タンパク質濃度とほぼ同じであるか、又はそれより低い場合、前記対象が、薬物有害反応を発症するリスクはないと同定される、

項 1 2 2 に記載の方法。

〔項 1 2 4〕

前記対象の血中の CRP 濃度が前記閾値 CRP 濃度よりも高い場合、(1) 前記医薬製剤の前記投与が中断されるか；(2) 前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質が用量を下げて投与されるか；又は(3) 前記対象における前記製剤の毒性効果を低減し又は緩和するための治療上の措置が講じられる、項 1 2 2 に記載の方法。

20

〔項 1 2 5〕

前記第 1 及び第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドが、ヒト IgG1 Fc ドメインポリペプチドである、項 1 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の医薬製剤又は項 5 8 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 2 6〕

前記多サブユニットサイトカインがヒト IL12 である、項 1 2 5 に記載の医薬製剤又は方法。

30

〔項 1 2 7〕

前記ヒト IgG1 Fc ドメインポリペプチドが、Fc のエフェクター機能を低減する 1 つ以上の突然変異を含む、項 1 2 6 に記載の医薬製剤又は方法。

〔項 1 2 8〕

前記第 1 及び第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドが、EU 番号付け方式に従い番号付けして、L234A、L235A 又は L235E、G237A、P329A、A330S、及び P331S から選択される突然変異を含む、項 1 2 7 に記載の医薬製剤又は方法。

〔項 1 2 9〕

前記第 1 及び第 2 の抗体 Fc ドメインポリペプチドが、各々、突然変異 L234A、L235A、及び P329A を含む、項 1 2 8 に記載の医薬製剤又は方法。

40

〔項 1 3 0〕

多サブユニットサイトカインの前記第 1 のサブユニットが、IL12 の p40 サブユニットであり、多サブユニットサイトカインの前記第 2 のサブユニットが、IL12 の p35 サブユニットである、項 1 2 9 に記載の医薬製剤又は方法。

〔項 1 3 1〕

多サブユニットサイトカインの前記第 1 のサブユニットが配列番号 127 のアミノ酸配列を含み、多サブユニットサイトカインの前記第 2 のサブユニットが配列番号 128 のアミノ酸配列を含む、項 1 3 0 に記載の医薬製剤又は方法。

〔項 1 3 2〕

50

多サブユニットサイトカインの前記第2のサブユニットが、配列番号108のアミノ酸配列を含むリンカーによって前記第2の抗体Fcドメインに融合している、項131に記載の医薬製剤又は方法。

[項133]

(a) 前記第1の抗体Fcドメインが、突然変異L234A、L235A、P329A、Y349C、K360E、及びK409Wを含み、

(b) 前記第2の抗体Fcドメインが、突然変異L234A、L235A、P329A、Q347R、S354C、D399V、及びF405Tを含む、

項132に記載の医薬製剤又は方法。

[項134]

(a) 前記第1の抗体Fcドメインが配列番号215のアミノ酸配列を含み、

(b) 前記第2の抗体Fcドメインが配列番号216のアミノ酸配列を含む、

項133に記載の医薬製剤又は方法。

[項135]

前記第1の抗体Fcドメインペプチドが配列番号290のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗体Fcドメインペプチドが配列番号291のアミノ酸配列を含む、項134に記載の医薬製剤又は方法。

[項136]

医薬製剤を含む1つ以上の容器を含むキットであって、前記医薬製剤が、

(a) 免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域を含むヘテロ二量体Fc融合タンパク質並びにIL-12のp40及びp35サブユニット（IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p40及びp35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む）；及び

(b) 薬学的に許容可能な担体

を含み、

及び前記1つ以上の容器が、合計で約0.1mg～約2mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む、キット。

[項137]

前記1つ以上の容器が、合計で約0.5mg～約2mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む、項136に記載のキット。

[項138]

前記1つ以上の容器が、合計で約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む、項137に記載のキット。

[項139]

約1mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む1つの容器を含む、項138に記載のキット。

[項140]

前記医薬製剤が凍結乾燥製剤又は液体製剤である、項136～139のいずれか一項に記載のキット。

[項141]

前記医薬製剤が、1mLの容積で供給される液体製剤である、項140に記載のキット。

[項142]

癌の治療用医薬の製造におけるヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用であって、前記医薬が、1つ以上の容器に入った約0.5g/L～約1.5g/Lの前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む液体医薬製剤として製造され、

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含

10

20

30

40

50

み、I L-12の前記p 40及びp 35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p 40及びp 35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項143]

前記液体医薬製剤が、約1.0 g/Lの前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む、項142に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項144]

癌の治療用医薬の製造におけるヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用であって、前記医薬が、1つ以上の容器に入った約0.1 mg～約2 mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む液体医薬製剤として製造され、

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とI L-12のp 40及びp 35サブユニットとを含み、I L-12の前記p 40及びp 35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p 40及びp 35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々がヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項145]

前記液体医薬製剤が、約1 mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む、項144に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項146]

前記医薬が1つの容器に入っている、項142～145のいずれか一項に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項147]

各容器に1 mgのヘテロ二量体Fc融合タンパク質が入っている、項142～146のいずれか一項に記載のヘテロ二量体Fc融合タンパク質の使用。

[項148]

前記医薬が、3週間毎に1日目に前記対象に投与される、項146～147のいずれか一項に記載の使用。

[項149]

前記医薬が、4週間毎に1日目に前記対象に投与される、項146～147のいずれか一項に記載の使用。

[項150]

前記医薬が皮下投与される、項146～148のいずれか一項に記載の使用。

[項151]

前記医薬が、約0.1 mL～約1 mLの容積で投与される、項146～150のいずれか一項に記載の使用。

[項152]

前記医薬が、約1 mLの容積で投与される、項151に記載の使用。

[項153]

前記医薬が、最大2ヵ所までの注射部位に投与される、項146～152のいずれか一項に記載の使用。

[項154]

2回目の注射が、1回目の注射後10分以内に完了される、項153に記載の使用。

[項155]

前記医薬が、約0.05 mg/kg～約1.75 mg/kgの用量で投与される、項1

10

20

30

40

50

46～154のいずれか一項に記載の使用。

[項156]

前記医薬が、約1mg/kgの用量で投与される、項155に記載の使用。

[項157]

前記医薬が投与前に0.9%生理食塩水（注射用塩化ナトリウム）及び0.01%ポリソルベート80の溶液中に希釈される、項146～156のいずれか一項に記載の使用。

[項158]

その医薬製剤の調製用のヘテロ二量体Fc融合タンパク質を製造する方法であって、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞培養液から入手した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む溶液に酢酸を30分～90分間加えることを含む方法において、前記酢酸塩が前記溶液のpHをpH3.55～3.75に調整及び維持し、及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p40及びp35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、方法。

[項159]

前記酢酸が、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液に約60分間加えられる、項158に記載の方法。

[項160]

前記酢酸が、前記溶液のpHを約3.65に調整及び維持する、項158又は159に記載の方法。

[項161]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現する前記CHO細胞培養液が、浮遊下に維持される、項158に記載の方法。

[項162]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現する前記CHO細胞培養液が、バイオリアクターにて7～21日間培養される、項161に記載の方法。

[項163]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現する前記CHO細胞培養液が、バイオリアクターにて14日間培養される、項161又は162に記載の方法。

[項164]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を発現する前記CHO細胞培養液を深層ろ過によって回収すると、CHO回収培地が生じる、項158～163のいずれか一項に記載の方法。

[項165]

前記深層ろ過が、DOHC及びXOHCフィルタからなる二段階使い捨て深層ろ過である、項164に記載の方法。

[項166]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を前記CHO回収培地からプロテインAキャプチャークロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製すると、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液が生じる、項164又は165に記載の方法。

[項167]

プロテインAキャプチャークロマトグラフィーが、
プロテインA樹脂をpH7.5の20mMトリス、150mM NaClで平衡化させること；

10

20

30

40

50

CHO回収培地を前記プロテインA樹脂にロードすること；

前記ロードされたプロテインA樹脂をpH7.5の20mMトリス、150mM NaClで洗浄すること；

前記ロードされたプロテインA樹脂をpH5.4の50mM酢酸塩で洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH3.7の50mM酢酸塩、100mMアルギニンで前記プロテインA樹脂から溶出させること、及び280nm UVによって1.25AU/cm上昇から開始して1.25AU/cm下降で終了するまで収集することを含む、項166に記載の方法。

[項168]

前記プロテインA樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液に前記酢酸が0.5Mの濃度で加えられ、前記酢酸が前記溶液のpHを60分間にわたってpH3.65に酸性化し、続いて2Mトリスを加えることにより前記溶液をpH5.2に中和する、項167に記載の方法。

[項169]

前記溶液の酸性化及び中和に続いて、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記溶液が0.2µmフィルタに通される、項168に記載の方法。

[項170]

前記プロテインA樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ろ過した溶液が、XOSP深層ろ過に通される、項169に記載の方法。

[項171]

混合モードクロマトグラフィーが、

混合モードクロマトグラフィーカラムをpH5.2の50mM酢酸塩で平衡化させること；

XOSPろ過に通した前記溶液を前記混合モードクロマトグラフィーカラムにロードすること；

前記ロードした混合モードクロマトグラフィーカラムをpH5.2の50mM酢酸塩で洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH5.2の50mM酢酸塩、250mM NaClで前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出させること、及び280nm UVによって0.625AU/cm上昇から開始して1.50AU/cm下降で終了するまで収集すること

を含む、項170に記載の方法。

[項172]

前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含むこの前記溶液を0.2µmフィルタに通す、項171に記載の方法。

[項173]

陽イオン交換クロマトグラフィーが、

陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50mMトリスで平衡化させること；

前記混合モードクロマトグラフィーカラムから溶出した前記ろ過した溶液を前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂にロードすること；

前記ロードした陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂をpH7.4の50mMトリスで洗浄すること；及び

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質をpH7.4の50mMトリス及びpH7.4の50mMトリス、0.5M NaClのグラジエントで前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出させること、及び280nm UVによって2.5AU/cm上昇から開始して4.5AU/cm下降で終了するまで収集することを含む、項172に記載の方法。

[項174]

前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タン

10

20

30

40

50

パク質を含む前記溶液が、 $0.2\ \mu\text{m}$ フィルタに通される、項173に記載の方法。

[項175]

前記陽イオン交換クロマトグラフィー樹脂から溶出した前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ろ過した溶液が、前置フィルタ、公称 $20\ \text{nm}$ フィルタ、及び $0.2\ \mu\text{m}$ 膜でナノろ過される、項174に記載の方法。

[項176]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ナノろ過した溶液が限外ろ過され、及びダイアフィルトレーションされる、項175に記載の方法であって、限外ろ過及びダイアフィルトレーションが、

限外ろ過システムを $\text{pH}7.4$ の $50\ \text{mM}$ トリス、 $265\ \text{mM}$ NaClで平衡化させること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ナノろ過した溶液を約 $5.0\ \text{g/L}$ の濃度に濃縮すること；

7ダイアボリュームの $\text{pH}6.5$ の $20\ \text{mM}$ クエン酸塩を使用して緩衝液を交換すること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記ダイアフィルトレーションした溶液を約 $11.0\ \text{g/L}$ の濃度に濃縮すること；

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記濃縮溶液を $\text{pH}6.5$ の $20\ \text{mM}$ クエン酸塩で約 $5\ \text{g/L}$ ～約 $10\ \text{g/L}$ の濃度に希釈すること；及び

$\text{pH}6.5$ の $20\ \text{mM}$ クエン酸塩、 18% (w/v) スクロース、 3% (w/v) マンニトール、 0.03% (w/v) ポリソルベート80を加えることにより、 $20\ \text{mM}$ クエン酸塩、 6% (w/v) スクロース、 1% (w/v) マンニトール、 0.01% (w/v) ポリソルベート80の前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記限外ろ過／ダイアフィルトレーション保持溶液の最終濃度を実現すること

を含む、方法。

[項177]

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質を含む前記限外ろ過した／ダイアフィルトレーションした溶液を $0.2\ \mu\text{m}$ 膜に通してバルク原薬を生じさせる、項176に記載の方法。

[項178]

前記バルク原薬が、 $\text{pH}6.5$ の $20\ \text{mM}$ クエン酸塩、 6% (w/v) スクロース、 1% (w/v) マンニトール、及び 0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む $0.2\ \mu\text{m}$ フィルタでろ過した緩衝液中に、 80% 薬物製品溶液となるように希釈される、項177に記載の方法。

[項179]

前記原薬又は 80% 薬物製品が、 $\text{pH}6.5$ の $20\ \text{mM}$ クエン酸塩、 6% (w/v) スクロース、 1% (w/v) マンニトール、及び 0.01% (w/v) ポリソルベート80を含む $0.2\ \mu\text{m}$ フィルタでろ過した緩衝液中に、 $1\ \text{mg/mL}$ の前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の投与用濃度となるように希釈される、項177又は178に記載の方法。

[項180]

チェックポイント阻害薬抗体による治療を少なくとも6週間受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を前記対象に投与することを含む方法において、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p40及びp35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、方法。

[項181]

10

20

30

40

50

前記チェックポイント阻害薬抗体が、抗プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1) 抗体である、項 180 に記載の方法。

[項 182]

前記癌が黒色腫である、項 180 又は 181 に記載の方法。

[項 183]

前記黒色腫が切除不能又は転移性である、項 182 に記載の方法。

[項 184]

前記対象が、前記抗 PD-1 抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも 4 週間後に病勢進行を有すると確認される、項 182 又は 183 に記載の方法。

[項 185]

前記対象が、前記抗 PD-1 抗体の投与を受けている間に、病勢進行の初期診断から少なくとも 4 週間後に病勢進行を有すると確認される、項 182～184 のいずれか一項に記載の方法。

[項 186]

病勢進行が、放射線学的又は臨床的所見によって確認される、項 184 又は 185 に記載の方法。

[項 187]

チェックポイント阻害薬抗体又は抗血管内皮成長因子療法による治療を単独療法として、又は組み合わせで受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を前記対象に投与することを含む方法において、前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質が、免疫グロブリン Fc (断片結晶化可能) 対の第 1 の Fc 領域及び第 2 の Fc 領域と IL-12 の p40 及び p35 サブユニットとを含み、IL-12 の前記 p40 及び p35 サブユニットが、別々に、それぞれ前記第 1 の Fc 領域及び前記第 2 の Fc 領域に連結されるか、又は前記第 2 の Fc 領域及び前記第 1 の Fc 領域に連結され、前記 p40 及び p35 サブユニットが、各々、前記 Fc 領域の N 末端又は C 末端に連結され、前記第 1 の Fc 領域及び前記第 2 の Fc 領域の CH3 ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含む、方法。

[項 188]

前記チェックポイント阻害薬抗体が、抗 PD-1 抗体又は抗 PD-L1 抗体である、項 187 に記載の方法。

[項 189]

前記癌が進行性腎細胞癌 (RCC) である、項 187 又は 188 に記載の方法。

[項 190]

前記 RCC が切除不能又は転移性である、項 189 に記載の方法。

[項 191]

前記 RCC が明細胞成分を有する、項 189 又は 190 に記載の方法。

[項 192]

前記対象が、過去に療法を 3 ライン以下だけ受けた、項 189～191 のいずれか一項に記載の方法。

[項 193]

前記対象が、チェックポイント阻害薬による治療を受けたことがない、項 189～192 のいずれか一項に記載の方法。

[項 194]

前記チェックポイント阻害薬が、単独療法としての、又は白金ベースの化学療法と組み合わせた抗 PD-1 抗体又は抗 PD-L1 抗体を含む、項 193 に記載の方法。

[項 195]

ただ 1 つの白金含有レジメンによる治療を受けたことがある対象の癌を治療する方法であって、ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を前記対象に投与することを含む方法において、前記ヘテロ二量体 Fc 融合タンパク質が、

10

20

30

40

50

免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p40及びp35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、方法。

[項196]

前記白金含有レジメンが、ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンブラスチン、及びドキソルビシンから選択される薬剤との組み合わせでの白金である、項195に記載の方法。

[項197]

前記癌が、局所進行又は転移性尿路移行上皮癌である、項195又は196に記載の方法。

[項198]

前記尿路上皮癌に、腎盂、尿管、泌尿器尿路上皮、及び尿道からなる群の1つ以上が含まれる、項197に記載の方法。

[項199]

前記尿路上皮癌が手術不能である、項197又は198に記載の方法。

[項200]

前記尿路上皮癌が、補助剤としての白金含有レジメンの最終回投与後6ヵ月以内のX線所見進行又は再発を伴い特徴付けられる、項197～199のいずれか一項に記載の方法。

[項201]

前記尿路上皮癌が、第一選択の白金含有レジメンの失敗と見なされる、項197～200のいずれか一項に記載の方法。

[項202]

前記対象が、前記医薬製剤の投与前に、前記尿路上皮癌の前記治療のための療法（前記白金含有レジメンを含む）を2ライン以下だけ受けたことがある、項197～201のいずれか一項に記載の方法。

[項203]

前記対象が、チェックポイント阻害薬（CPI）による治療を第一選択療法として受けたことがない、項197～202のいずれか一項に記載の方法。

[項204]

前記チェックポイント阻害薬が、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体である、項203に記載の方法。

[項205]

前記チェックポイント阻害薬が単独療法であるか、又は白金ベースの化学療法との組み合わせである、項203又は204に記載の方法。

[項206]

前記医薬製剤が、ペンブロリズマブと組み合わせて投与される、項195～205のいずれか一項に記載の方法。

[項207]

ペンブロリズマブが3週間毎に1回投与される、項206に記載の方法。

[項208]

ペンブロリズマブが、前記医薬製剤の投与前に投与される、項206又は207に記載の方法。

[項209]

前記医薬製剤が、ペンブロリズマブの投与完了後1時間以内に投与される、項208に記載の方法。

[項210]

ペンブロリズマブが、200mgの用量で投与される、項206～209のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

〔項 2 1 1〕

ペンブロリズマブが静脈内投与される、項 2 0 6 ～ 2 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 2〕

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、古典的ホジキンリンパ腫、縦隔原発大細胞型 B 細胞リンパ腫、尿路上皮癌、高頻度マイクロサテライト不安定性癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、肝細胞癌、メルケル細胞癌、腎細胞癌、及び子宮内膜癌からなる群から選択される、項 2 0 6 ～ 2 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 3〕

前記医薬製剤が、ニボルマブと組み合わせて投与される、項 1 9 5 ～ 2 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 4〕

ニボルマブが、前記医薬製剤の投与前に投与される、項 2 1 3 に記載の方法。

〔項 2 1 5〕

前記医薬製剤が、ニボルマブの投与完了後 1 時間以内に投与される、項 2 1 4 に記載の方法。

〔項 2 1 6〕

ニボルマブが、約 4 8 0 m g の用量で投与される、項 2 1 3 ～ 2 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 7〕

ニボルマブが静脈内投与される、項 2 1 3 ～ 2 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 8〕

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、結腸直腸癌、肝細胞癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される、項 2 1 3 ～ 2 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 1 9〕

前記癌が黒色腫である、項 2 1 8 に記載の方法。

〔項 2 2 0〕

前記黒色腫が切除不能又は転移性である、項 2 1 9 に記載の方法。

〔項 2 2 1〕

前記癌が結腸直腸癌である、項 2 1 8 に記載の方法。

〔項 2 2 2〕

前記結腸直腸癌が、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）又はミスマッチ修復機構欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌である、項 2 2 1 に記載の方法。

〔項 2 2 3〕

前記医薬製剤が、3 週間毎に 1 日目に前記対象に投与される、項 1 8 0 ～ 2 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2 4〕

前記医薬製剤が、4 週間毎に 1 日目に前記対象に投与される、項 1 8 0 ～ 2 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2 5〕

前記医薬製剤が皮下投与される、項 1 8 0 ～ 2 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2 6〕

前記医薬製剤が、約 0 . 1 m L ～ 約 1 m L の容積で投与される、項 1 8 0 ～ 2 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2 7〕

前記医薬製剤が、約 1 m L の容積で投与される、項 2 2 6 に記載の方法。

〔項 2 2 8〕

10

20

30

40

50

前記医薬製剤が、最大2ヵ所までの注射部位に投与される、項180～227のいずれか一項に記載の方法。

〔項229〕

2回目の注射が、1回目の注射後10分以内に完了される、項228に記載の方法。

〔項230〕

前記医薬製剤が、約0.05mg/kg～約1.75mg/kgの用量で投与される、項180～229のいずれか一項に記載の方法。

〔項231〕

前記医薬製剤が、約1mg/kgの用量で投与される、項230に記載の方法。

〔項232〕

前記医薬製剤が投与前に0.9%生理食塩水（注射用塩化ナトリウム）及び0.01%ポリソルベート80の溶液中に希釈される、項180～231のいずれか一項に記載の方法。

〔項233〕

前記癌の存在が、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン（RECIST）、第1.1版を使用して決定される、項180～232のいずれか一項に記載の方法。

〔項234〕

完全奏効の確認が得られている対象が、打ち切り基準を満たさない限り、確認後少なくとも12ヵ月間にわたって前記医薬製剤で治療される、項180～233のいずれか一項に記載の方法。

〔項235〕

C反応性タンパク質（CRP）の血中濃度がモニタされる対象を治療する方法であって、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤を前記対象に投与することを含む方法において、前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1のFc領域に連結され、前記p40及びp35サブユニットが、各々、前記Fc領域のN末端又はC末端に連結され、前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域のCH3ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する1つ以上の突然変異を含む、方法。

〔項236〕

（1）前記対象の血中のCRP濃度が閾値CRP濃度よりも高い場合、前記対象が、薬物有害反応を発症するリスクがあると同定され；及び

（2）前記対象の血中のCRP濃度が前記閾値C反応性タンパク質濃度とほぼ同じであるか、又はそれより低い場合、前記対象が、薬物有害反応を発症するリスクはないと同定される、項235に記載の方法。

〔項237〕

前記対象の血中のCRP濃度が前記閾値CRP濃度よりも高い場合、（1）前記医薬製剤の前記投与が中断されるか；（2）前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が用量を下げて投与されるか；又は（3）前記対象における前記製剤の毒性効果を低減し又は緩和するための治療上の措置が講じられる、項235に記載の方法。

〔項238〕

それを必要としている対象の癌を治療する方法であって、前記対象へのヘテロ二量体Fc融合タンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤の皮下投与を含む方法において、

前記ヘテロ二量体Fc融合タンパク質が、免疫グロブリンFc（断片結晶化可能）対の第1のFc領域及び第2のFc領域とIL-12のp40及びp35サブユニットとを含み、IL-12の前記p40及びp35サブユニットが、別々に、それぞれ前記第1のFc領域及び前記第2のFc領域に連結されるか、又は前記第2のFc領域及び前記第1の

10

20

30

40

50

F c 領域に連結され、前記 p 4 0 及び p 3 5 サブユニットが、各々、前記 F c 領域の N 末端又は C 末端に連結され、前記第 1 の F c 領域及び前記第 2 の F c 領域の C H 3 ドメインが、各々、ヘテロ二量体化を促進する 1 つ以上の突然変異を含み；及び前記医薬製剤が、クエン酸塩；糖；糖アルコール；及び非イオン性界面活性剤を含み、及び前記製剤の p H が 5 . 5 ～ 7 . 0 である、方法。

[項 2 3 9]

前記第 1 の F c 領域及び第 2 の F c 領域が、ヒト I g G 1 F c 領域である、項 1 3 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載のキット、項 1 4 2 ～ 1 5 7 のいずれか一項に記載の使用、又は項 1 5 8 ～ 2 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項 2 4 0]

ヒト I g G 1 F c 領域が、F c のエフェクター機能を低減する 1 つ以上の突然変異を含む、項 2 3 9 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 1]

前記第 1 の F c 領域及び第 2 の F c 領域が、E U 番号付け方式に従い番号付けして、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 又は L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、P 3 2 9 A、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S から選択される 1 つ以上の突然変異を含む、項 2 4 0 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 2]

前記第 1 の F c 領域及び第 2 の F c 領域が、各々、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 A を含む、項 2 4 1 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 3]

I L 1 2 の前記 p 4 0 サブユニットが配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含み、I L - 1 2 の前記 p 3 5 サブユニットが配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を含む、項 2 4 2 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 4]

I L - 1 2 の前記 p 3 5 サブユニットが、配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含むリンカーによって前記第 2 の F c 領域に融合される、項 2 4 3 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 5]

(a) 前記第 1 の F c 領域が、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 A、Y 3 4 9 C、K 3 6 0 E、及び K 4 0 9 W を含み、

(b) 前記第 2 の F c 領域が、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 A、Q 3 4 7 R、S 3 5 4 C、D 3 9 9 V、及び F 4 0 5 T を含む、
項 2 4 4 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 6]

(a) 前記第 1 の F c 領域が配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を含み、

(b) 前記第 2 の F c 領域が配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列を含む、
項 2 4 5 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 7]

I L 1 2 の前記 p 4 0 サブユニットに連結された前記第 1 の F c 領域が配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を含み、I L - 1 2 の前記 p 3 5 サブユニットに連結された前記第 2 の F c 領域が配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を含む、項 2 4 6 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 8]

前記医薬製剤が、(a) クエン酸塩；(b) 糖；(c) 糖アルコール；及び(d) 非イオン性界面活性剤を含み、更に前記製剤の p H が約 6 . 0 ～約 7 . 0 である、項 2 3 9 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 4 9]

前記医薬製剤中のクエン酸塩の濃度が約 1 0 m M ～約 3 0 m M である、項 2 4 8 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 5 0]

前記医薬製剤中のクエン酸塩の濃度が約 20 mM である、項 249 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 251]

前記医薬製剤中の前記糖の濃度が約 3%～約 12% (w/v) である、項 248～250 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 252]

前記医薬製剤中の前記糖の濃度が約 6% (w/v) である、項 251 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 253]

前記糖が二糖である、項 251 又は 252 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 254]

前記二糖がスクロースである、項 253 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 255]

前記医薬製剤中の前記糖アルコールの濃度が約 0.5%～約 6% (w/v) である、項 248～254 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 256]

前記医薬製剤中の前記糖アルコールの濃度が約 1% (w/v) である、項 255 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 257]

前記糖アルコールが単糖に由来する、項 248～256 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 258]

前記糖アルコールがマンニトールである、項 257 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 259]

前記医薬製剤中の前記非イオン性界面活性剤の濃度が約 0.005%～約 0.02% (w/v) である、項 248～258 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 260]

前記医薬製剤中のポリソルベート 80 の濃度が約 0.01% (w/v) である、項 259 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 261]

前記非イオン性界面活性剤がポリソルベートである、項 259 又は 260 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 262]

前記ポリソルベートがポリソルベート 80 である、項 261 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 263]

前記 pH が約 6.1～約 6.9 である、項 248～262 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 264]

前記 pH が約 6.2～約 6.8 である、項 263 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 265]

前記 pH が約 6.3～約 6.7 である、項 264 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 266]

前記 pH が約 6.4～約 6.6 である、項 265 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 267]

前記 pH が約 6.5 である、項 266 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 268]

水を更に含む前記医薬製剤、項 248～267 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 269]

10

20

30

40

50

前記水が、U S P 注射用水である、項 2 6 8 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 0]

前記医薬製剤が、約 1 g / L ~ 約 1 0 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む、項 2 4 8 ~ 2 6 9 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 1]

前記医薬製剤が、約 2 g / L ~ 約 8 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む、項 2 7 0 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 2]

前記医薬製剤が、約 4 g / L ~ 約 6 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む、項 2 7 1 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 3]

前記医薬製剤が、約 5 g / L のバルク濃度のヘテロ二量体 F c 融合タンパク質を含む、項 2 7 2 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 4]

前記医薬製剤が、約 0 . 5 g / L ~ 約 1 . 5 g / L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 2 4 8 ~ 2 7 3 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 5]

前記医薬製剤が、約 0 . 7 5 g / L ~ 約 1 . 2 5 g / L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 2 7 4 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 6]

前記医薬製剤が、約 1 g / L の投与用濃度の前記タンパク質を含む、項 2 7 5 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 7]

前記製剤が、2 °C ~ 8 °C の温度で保存するように設計される、2 4 8 ~ 2 7 6 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 8]

前記医薬製剤が、澄明な無色の溶液であり、目に見える粒子状物質を含まない、項 2 4 8 ~ 2 7 7 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 7 9]

前記医薬製剤が、

示差走査型蛍光定量法により測定したとき、

(a) 約 6 0 °C より高い、約 6 1 °C より高い、約 6 2 °C より高い、約 6 3 °C より高い、約 6 4 °C より高い、約 6 5 °C より高い、又は約 6 6 °C より高い T_{m1} ; 及び / 又は

(b) 約 7 0 °C より高い、約 7 1 °C より高い、約 7 2 °C より高い、約 7 3 °C より高い、約 7 4 °C より高い、約 7 5 °C より高い、約 7 6 °C より高い、又は約 7 7 °C より高い T_{m2}

によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、項 2 4 8 ~ 2 7 8 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 8 0]

前記製剤が、約 6 7 . 0 °C の T_{m1} 及び約 7 7 . 3 °C の T_{m2} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、項 2 7 9 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 8 1]

T_{m1} 及び / 又は T_{m2} によって定義されたとおりの、前記医薬製剤の前記熱安定性プロファイルが、前記医薬製剤を 5 0 °C で 1 週間インキュベートしたとき、5 °C で 1 週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2 °C 未満又は約 1 °C 未満しか変化しない、項 2 8 0 に記載のキット、使用、又は方法。

[項 2 8 2]

前記製剤が、示差走査型蛍光定量法により測定したとき、6 0 °C より高い、約 6 1 °C より高い、約 6 2 °C より高い、約 6 3 °C より高い、約 6 4 °C より高い、約 6 5 °C より高い、約 6 6 °C より高い、又は約 6 7 °C より高い T_{agg} によって定義されたとおりの熱安定性プロファイルを有する、2 4 8 ~ 2 8 1 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

10

20

30

40

50

〔項 2 8 3〕

T a g g によって定義されるとおりの、前記医薬製剤の前記熱安定性プロファイルが、前記医薬製剤を 5 0 °C で 1 週間インキュベートしたとき、5 °C で 1 週間インキュベートする同じ医薬製剤と比較すると、示差走査型蛍光定量法により測定したとき約 2 °C 未満又は約 1 °C 未満しか変化しない、請求項 2 8 2 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 4〕

前記医薬製剤を 5 °C で 1 週間インキュベートした後、前記医薬製剤の p H が、約 0 . 2 又は約 0 . 1 の p H 値より大きく変化しない、項 2 4 8 ~ 2 8 3 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 5〕

前記医薬製剤を 5 0 °C で 1 週間インキュベートした後、前記医薬製剤の p H が、約 0 . 2 又は約 0 . 1 の p H 値より大きく変化しない、項 2 4 8 ~ 2 8 4 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 6〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 1 5 n m 未満、約 1 4 n m 未満、約 1 3 n m 未満、又は約 1 2 n m 未満の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 4 8 ~ 2 8 5 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 7〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約 1 1 . 6 n m の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 8 6 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 8〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、前記医薬製剤を 5 0 °C で 2 週間インキュベートした後、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 2 0 n m 未満、約 1 9 n m 未満、約 1 8 n m 未満、約 1 7 n m 未満、約 1 6 n m 未満、又は約 1 5 n m 未満の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 4 8 ~ 2 8 7 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 8 9〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約 1 4 . 4 n m の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 8 8 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 0〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、前記医薬製剤を 5 回の凍結融解サイクルに供した後、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 2 0 n m 未満、約 1 9 n m 未満、約 1 8 n m 未満、約 1 7 n m 未満、又は約 1 6 n m 未満の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 4 8 ~ 2 8 9 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 1〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質が、約 1 5 . 3 n m の Z 平均流体力学直径を有する、項 2 9 0 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 2〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 0 . 3 0 未満、約 0 . 2 9 未満、約 0 . 2 8 未満、又は約 0 . 2 7 未満である、項 2 4 8 ~ 2 9 1 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 3〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約 0 . 2 6 である、項 2 4 8 ~ 2 9 2 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 4〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、前記医薬製剤を 5 0 °C で 2 週間インキュベートした後、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 0 . 3 0 未満、約 0 . 2 9 未満、約 0 . 2 8 未満、約 0 . 2 7 未満、又は約 0 . 2 6 未

10

20

30

40

50

満である、項 2 4 8 ～ 2 9 3 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 5〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約 0 . 2 5 である、項 2 4 8 ～ 2 9 4 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 6〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、前記医薬製剤を 5 回の凍結融解サイクルに供した後、2 5 °C で動的光散乱法により測定したとき、約 0 . 4 0 未満、約 0 . 3 5 未満、又は約 0 . 3 4 未満である、項 2 4 8 ～ 2 9 5 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 7〕

前記医薬製剤中の前記ヘテロ二量体 F c 融合タンパク質の多分散性指数が、約 0 . 3 3 である、項 2 4 8 ～ 2 9 6 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 8〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約 9 0 % 超、約 9 1 % 超、約 9 2 % 超、約 9 3 % 超、約 9 4 % 超、約 9 5 % 超、約 9 6 % 超、約 9 7 % 超、約 9 8 % 超、又は約 9 9 % 超である、項 2 4 8 ～ 2 9 7 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 2 9 9〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約 9 9 . 0 % である、項 2 9 8 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 3 0 0〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、前記医薬製剤を 5 0 °C で 2 週間インキュベートした後、約 7 5 % 超、約 8 0 % 超、約 8 1 % 超、約 8 2 % 超、約 8 3 % 超、約 8 4 % 超、又は約 8 5 % 超である、項 2 4 8 ～ 2 9 9 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 3 0 1〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約 8 5 . 2 % である、項 3 0 0 に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 3 0 2〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、前記医薬製剤を 5 回の凍結融解サイクルに供した後、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約 9 0 % 超、約 9 1 % 超、約 9 2 % 超、約 9 3 % 超、約 9 4 % 超、約 9 5 % 超、約 9 6 % 超、約 9 7 % 超、又は約 9 8 % 超である、項 2 4 8 ～ 3 0 1 のいずれか一項に記載のキット、使用、又は方法。

〔項 3 0 3〕

前記医薬製剤の純度プロファイルが、S E C - H P L C 分析における検出総面積に対する割合としての主ピークの面積によって測定したとき、約 9 8 . 9 % である、項 3 0 2 に記載のキット、使用、又は方法。

10

20

30

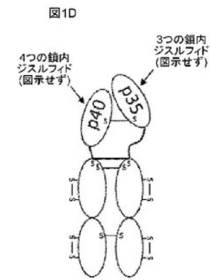
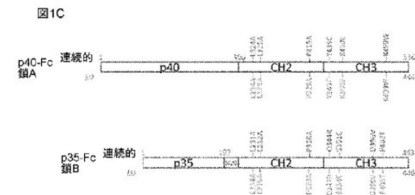
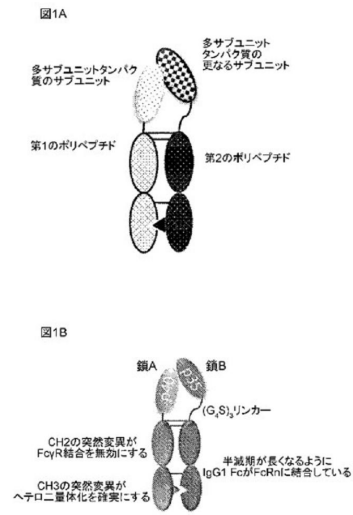
40

50

【図面】

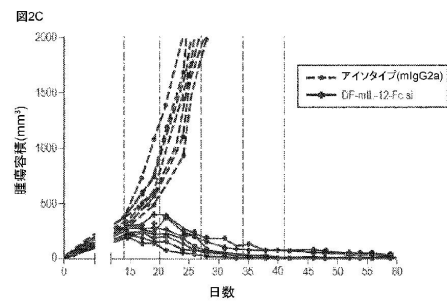
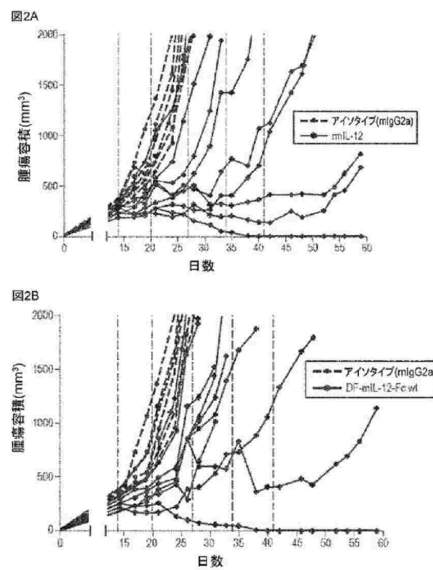
【図 1 - 1】

【図 1 - 2】



【図 2 - 1】

【図 2 - 2】



10

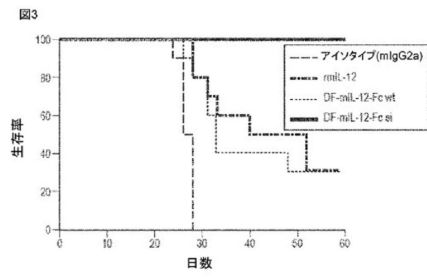
20

30

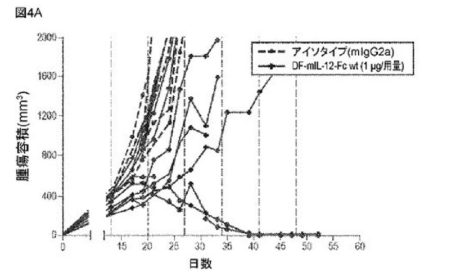
40

50

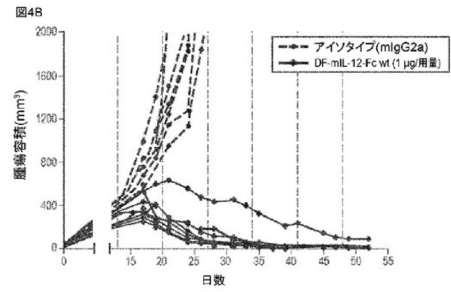
【図 3】



【図 4 - 1】

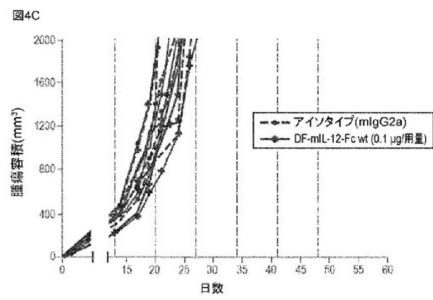


10

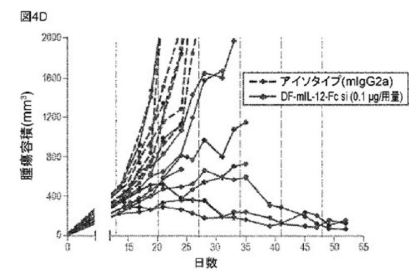


20

【図 4 - 2】



【図 4 - 3】

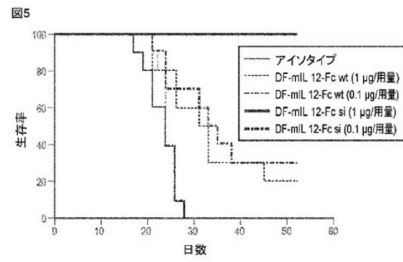


30

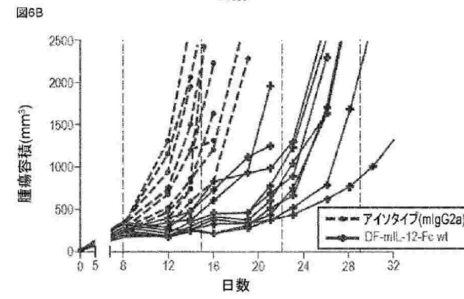
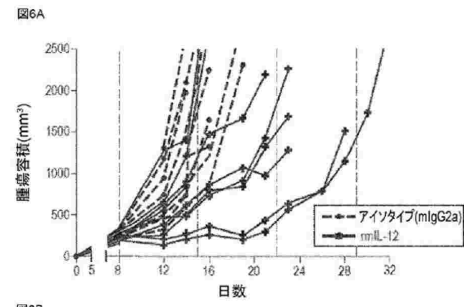
40

50

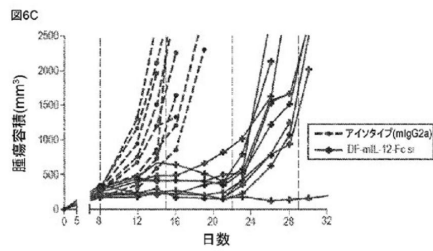
【図 5】



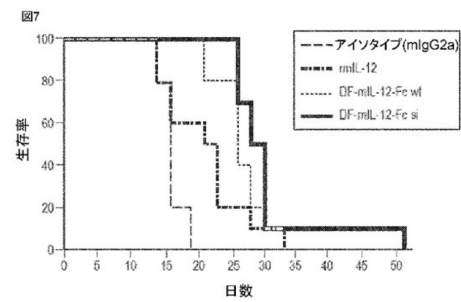
【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



【図 7】



10

20

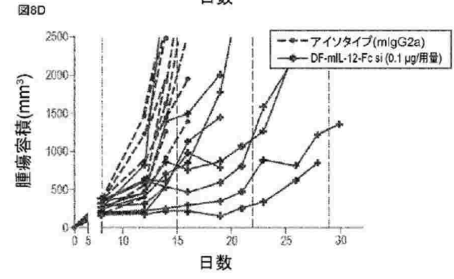
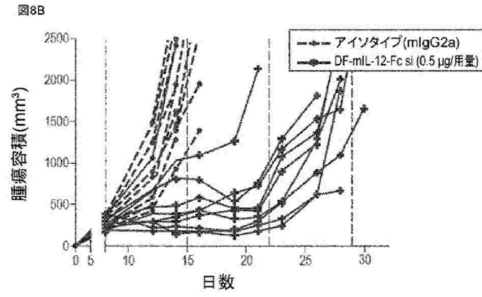
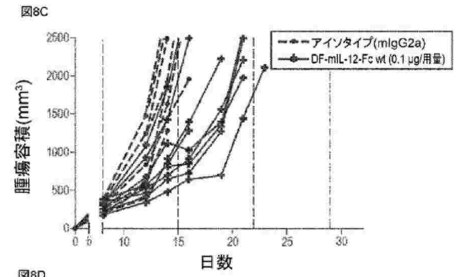
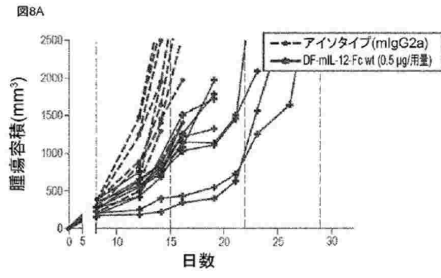
30

40

50

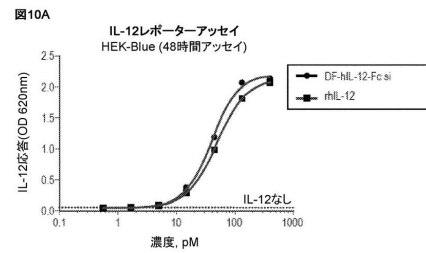
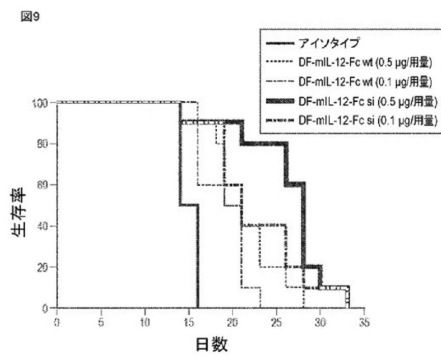
【図 8 - 1】

【図 8 - 2】



【図 9】

【図 10 - 1】



10

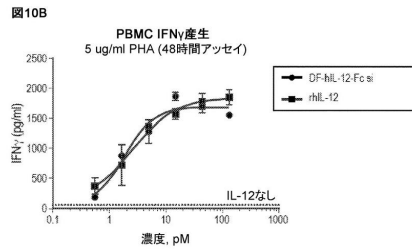
20

30

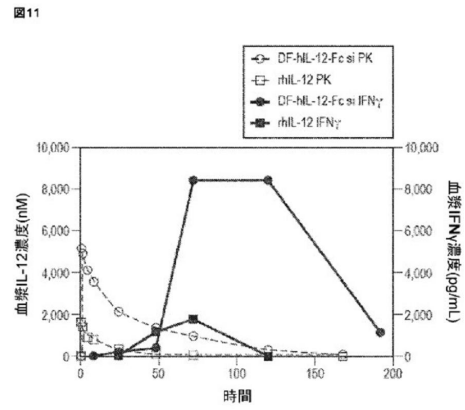
40

50

【図 10-2】



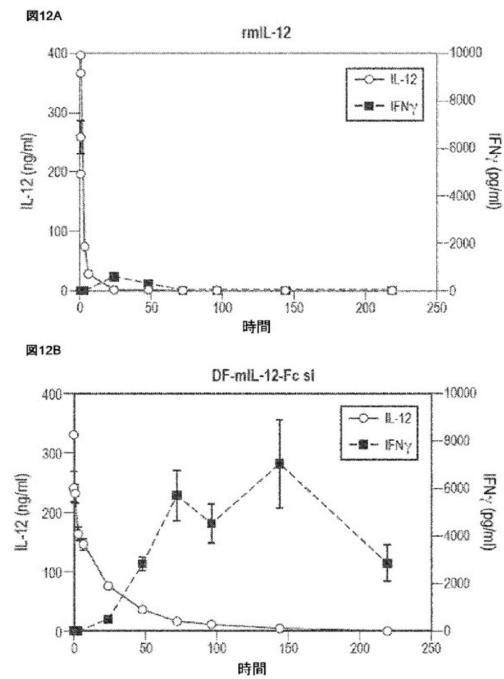
【図 11】



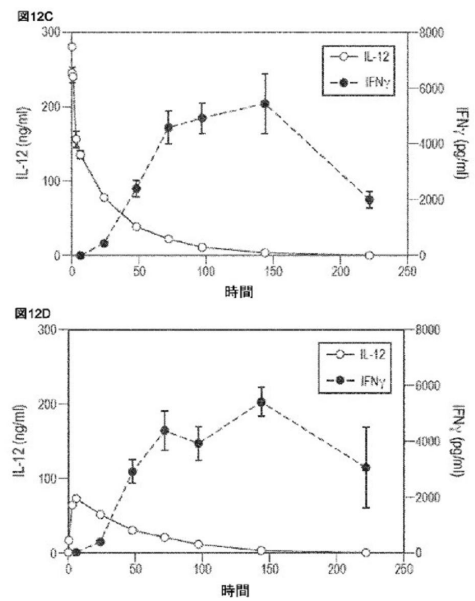
10

20

【図 12-1】



【図 12-2】

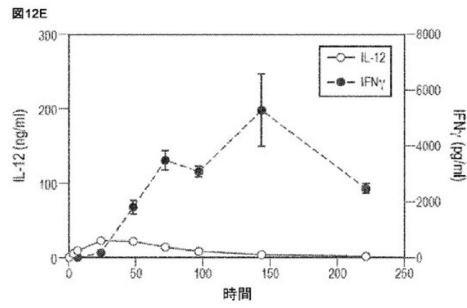


30

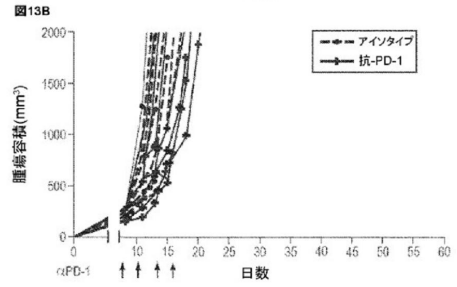
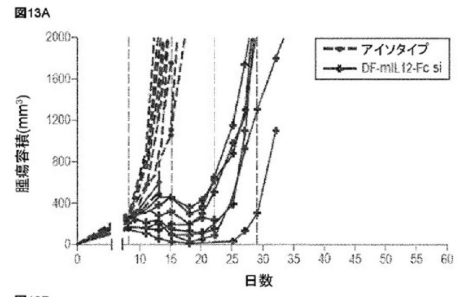
40

50

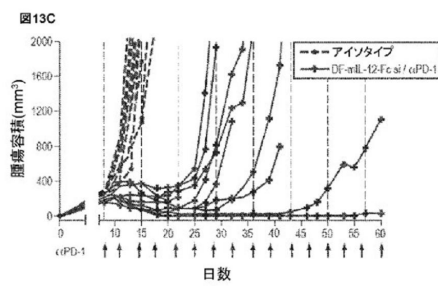
【図 12-3】



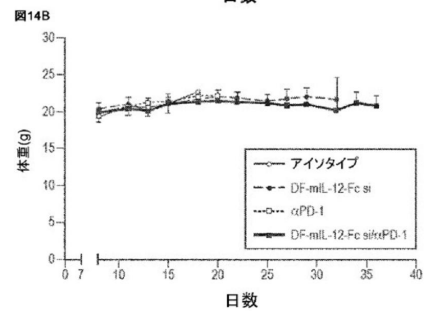
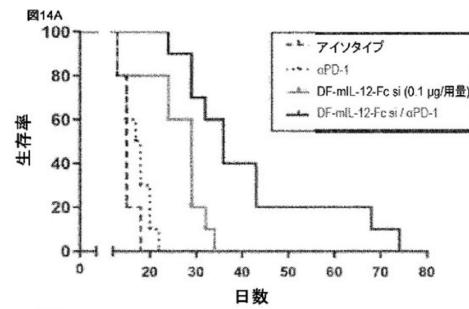
【図 13-1】



【図 13-2】



【図 14】



10

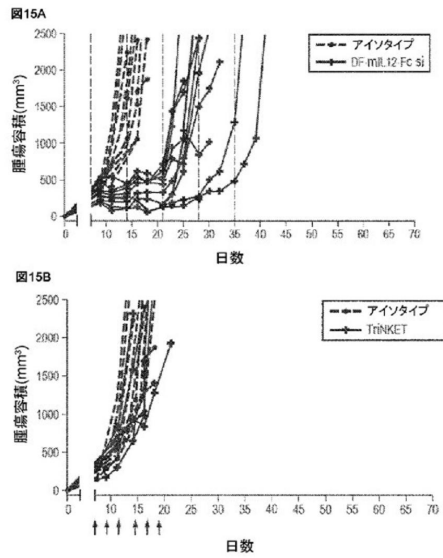
20

30

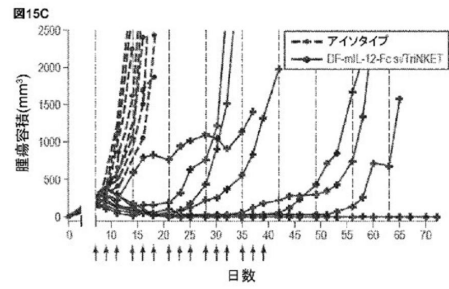
40

50

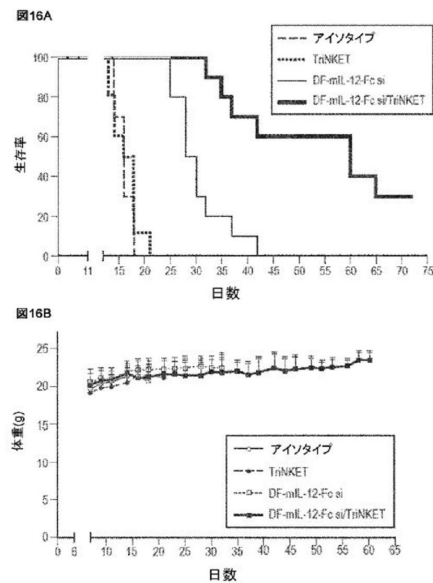
【図 15 - 1】



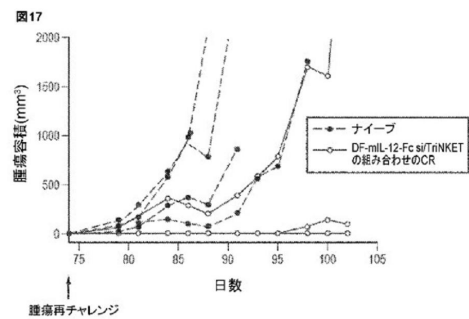
【図 15 - 2】



【図 16】



【図 17】



10

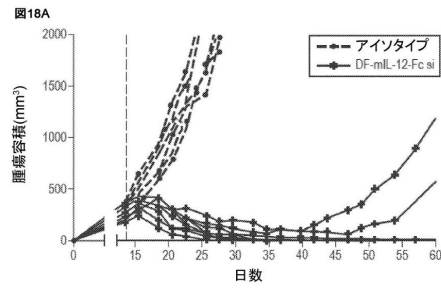
20

30

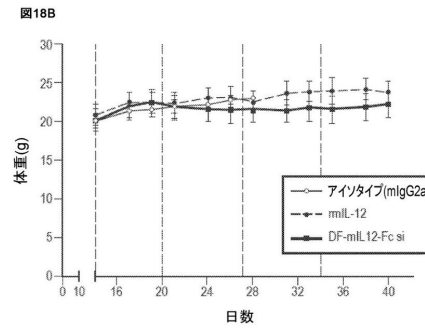
40

50

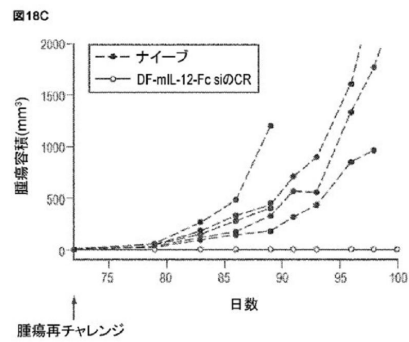
【図 18-1】



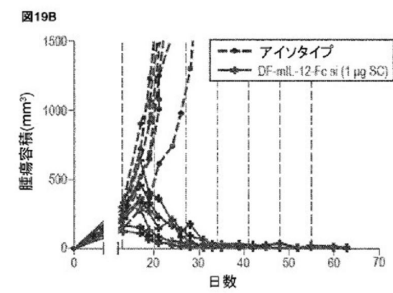
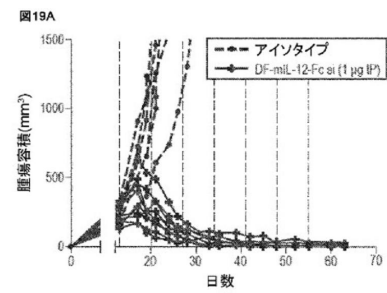
【図 18-2】



【図 18-3】



【図 19】



10

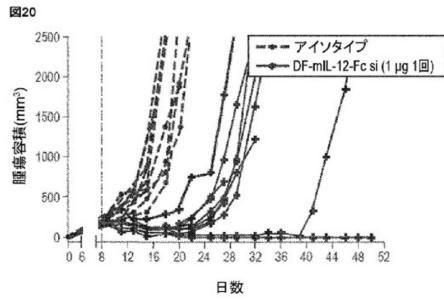
20

30

40

50

【図 20】



【図 21】

図21A

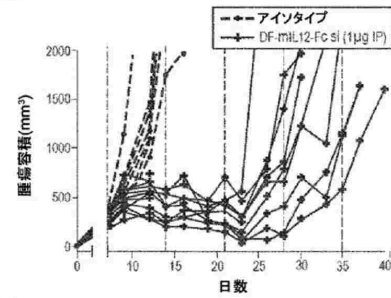
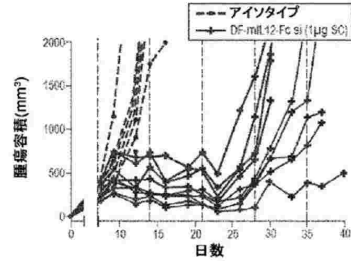


図21B



【図 22】

図22A

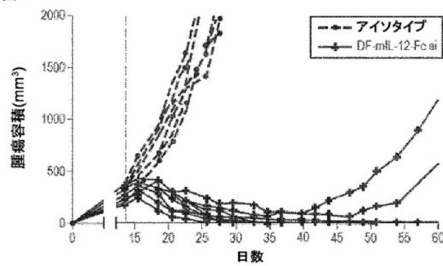
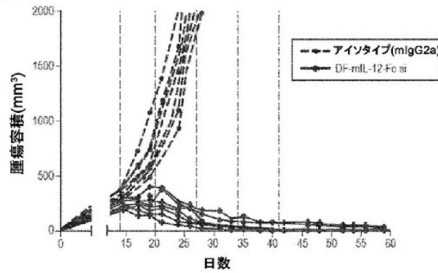


図22B



【図 23】

図23A

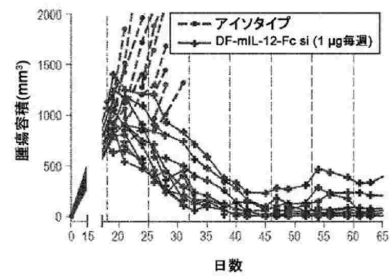
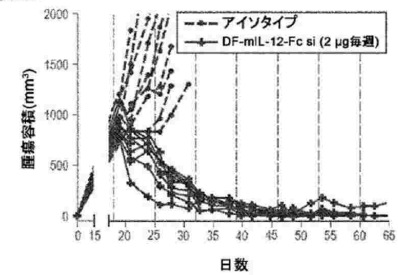


図23B



10

20

30

40

50

【図 2 4 - 1】

【図 2 4 - 2】

図24A

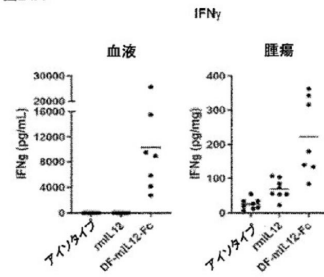


図24B

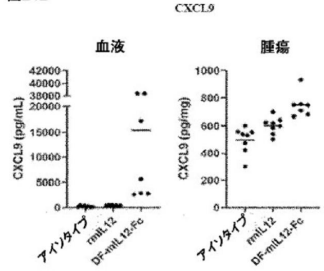
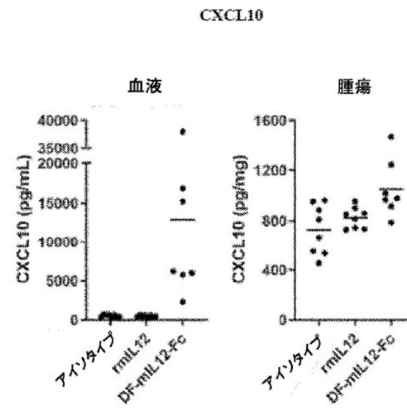


図24C



10

20

【図 2 5 - 1】

【図 2 5 - 2】

図25A

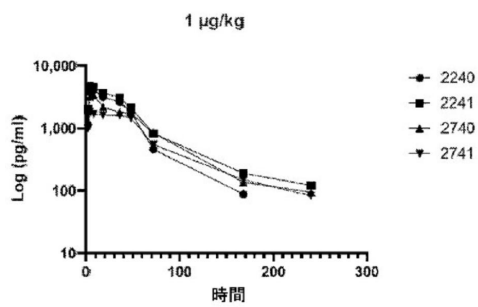


図25B

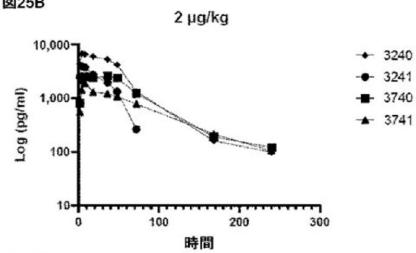
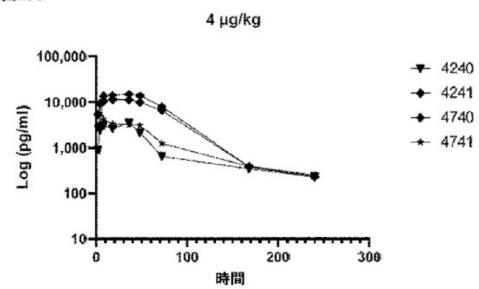


図25C



30

40

50

【図 26-1】

図26A

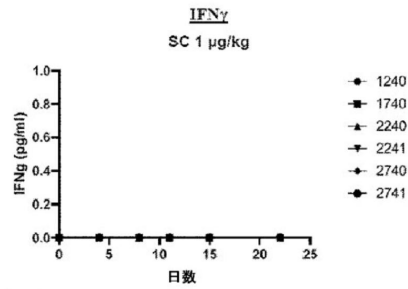
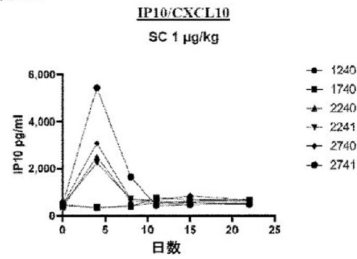


図26B



【図 26-2】

図26C

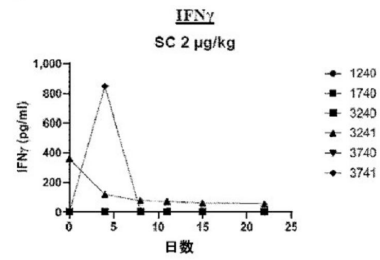
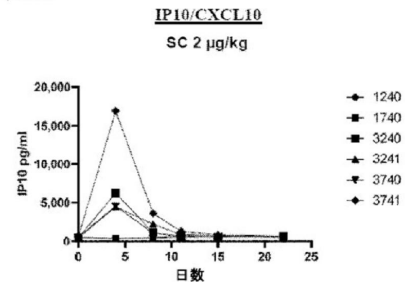


図26D



【図 26-3】

図26E

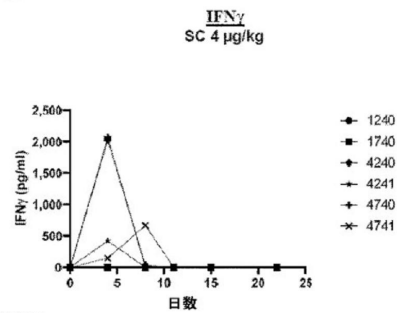
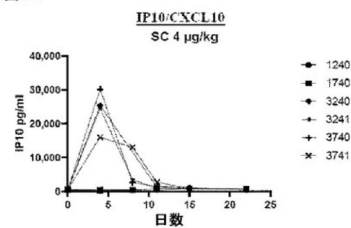
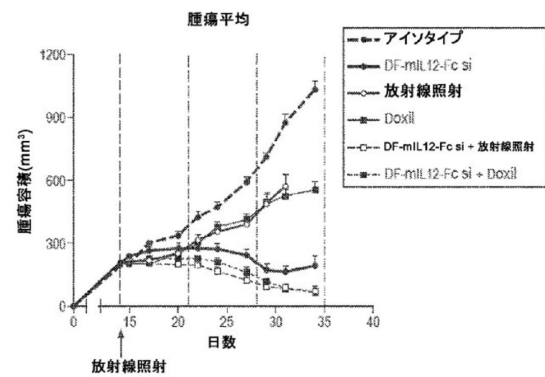


図26F



【図 27】

図27



10

20

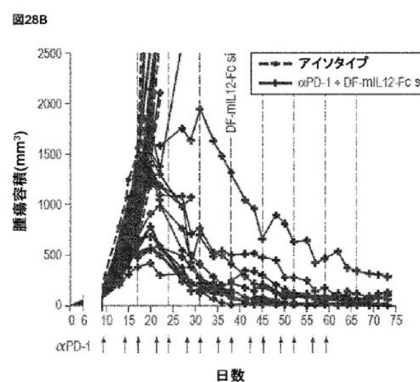
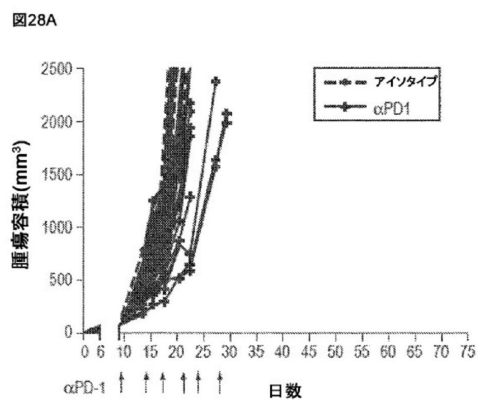
30

40

50

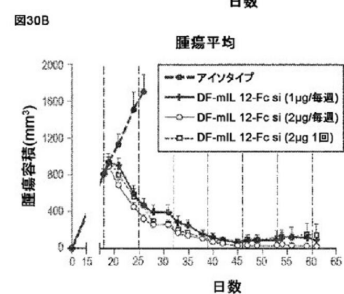
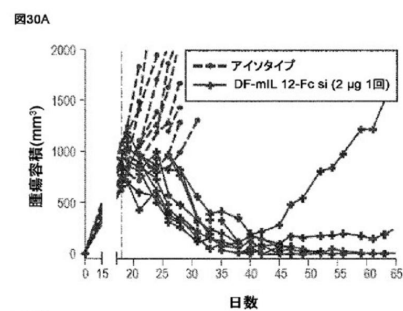
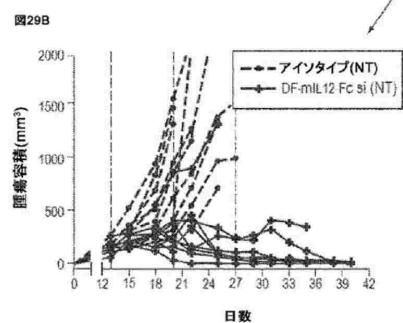
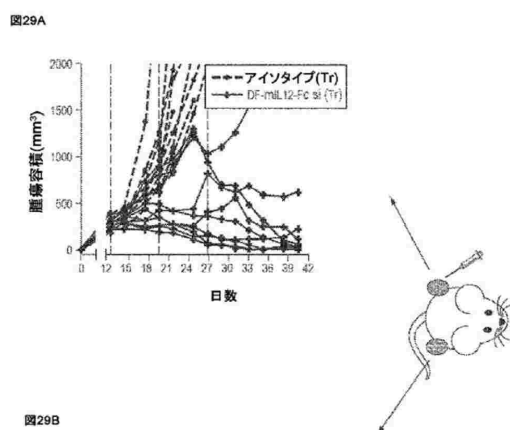
【圖 28-1】

【圖 28-2】

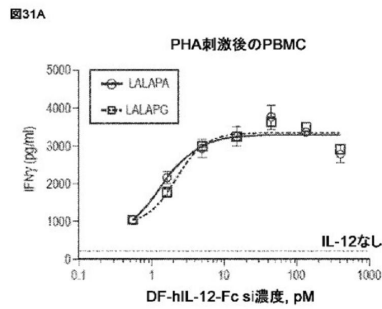


【図 29】

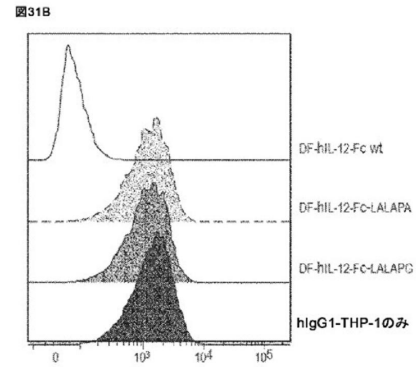
【図 30】



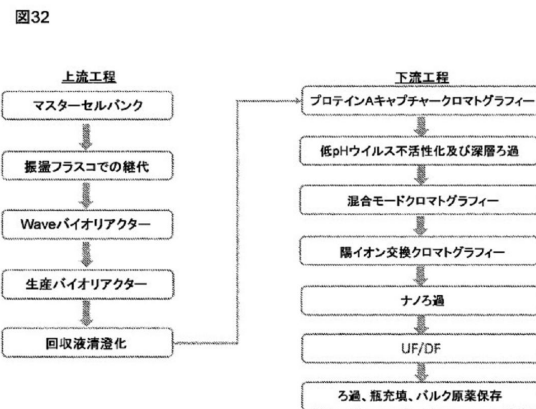
【図 3 1 - 1】



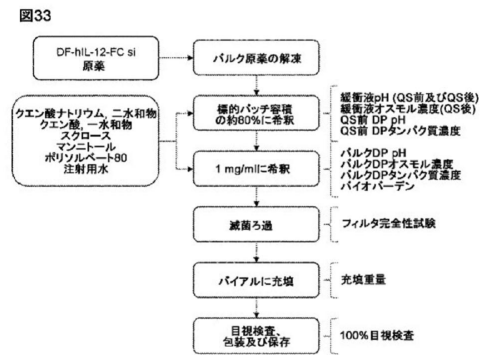
【図 3 1 - 2】



【図 3 2】



【図 3 3】



10

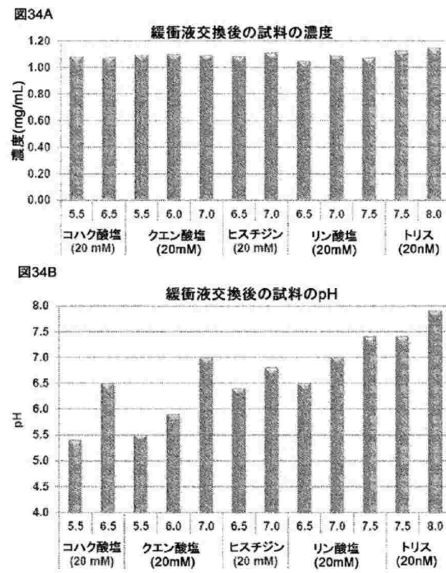
20

30

40

50

【図 3 4】



【図 3 5】

FIG. 35A

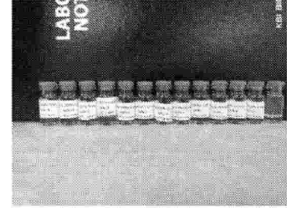
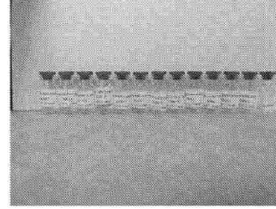
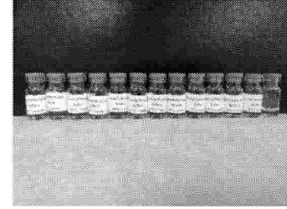
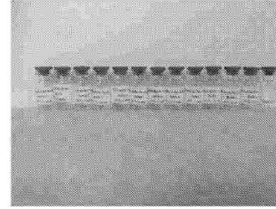


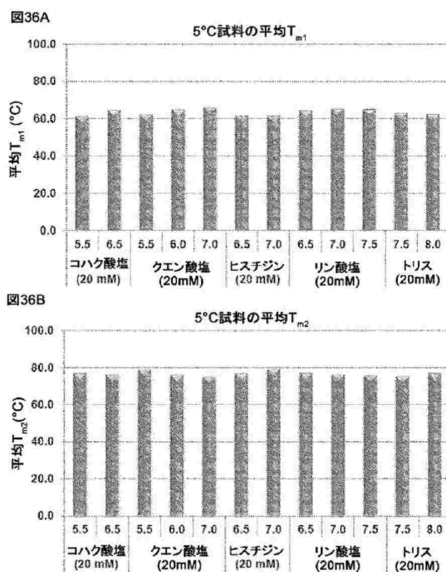
FIG. 35B



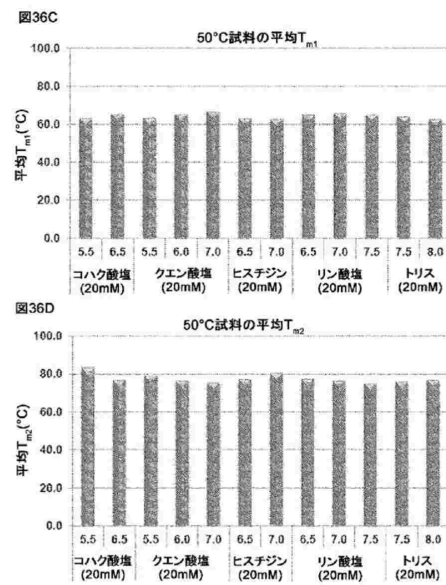
10

20

【図 3 6 - 1】



【図 3 6 - 2】



30

40

50

【図 3 6 - 3】

図36E

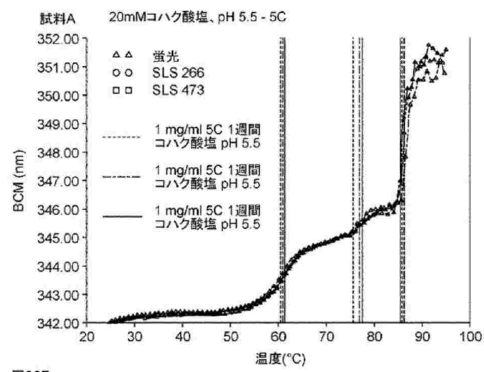
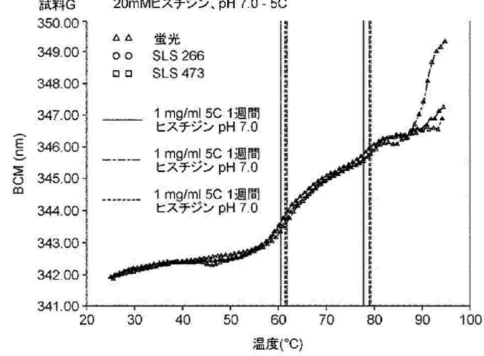


図36F



【図 3 6 - 4】

図36G

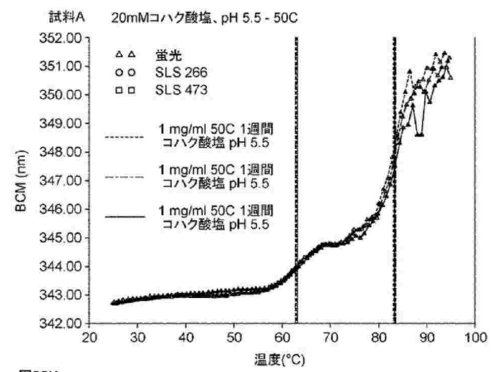
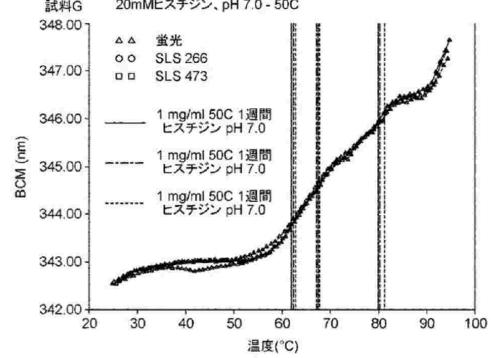


図36H



【図 3 7 - 1】

図37A

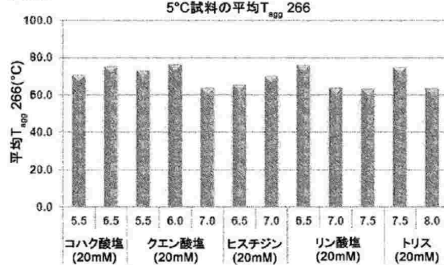
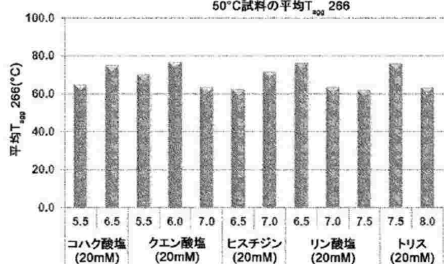


図37B



【図 3 7 - 2】

図37C

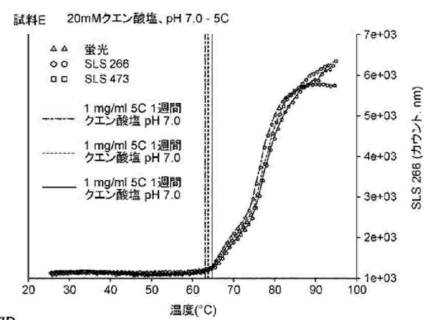
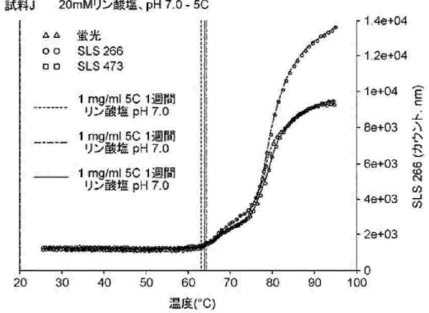


図37D



10

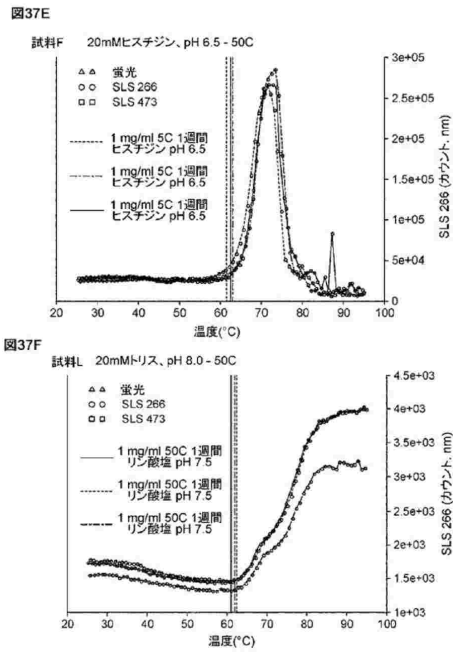
20

30

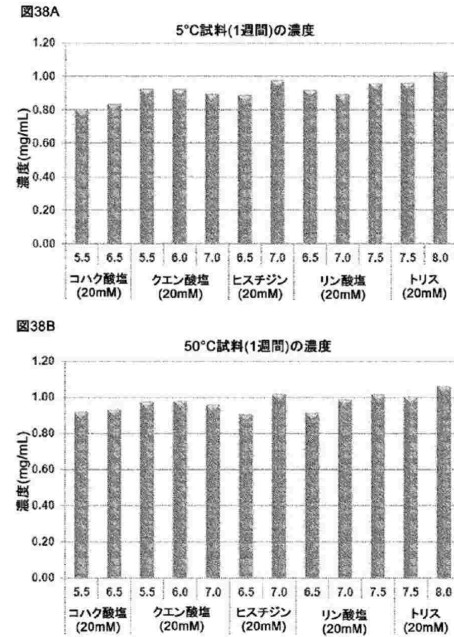
40

50

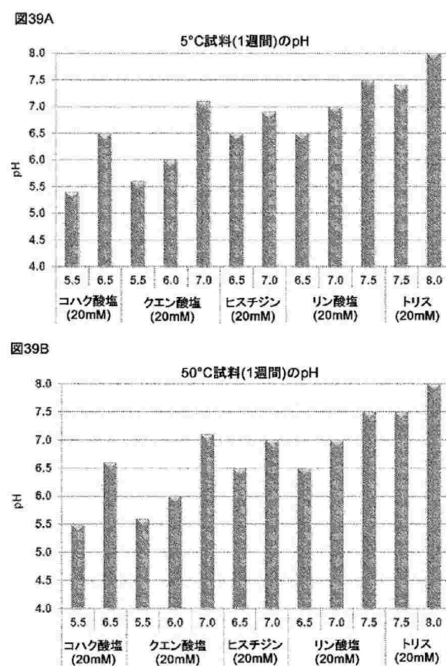
【図 37-3】



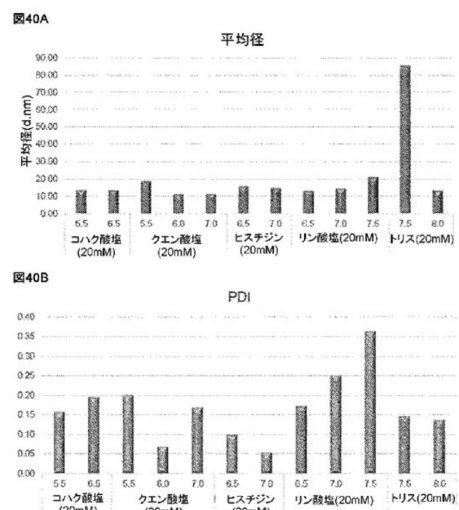
【図 38】



【図 39】



【図 40-1】



10

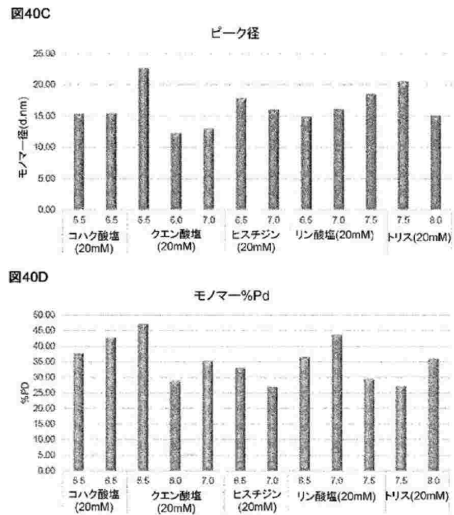
20

30

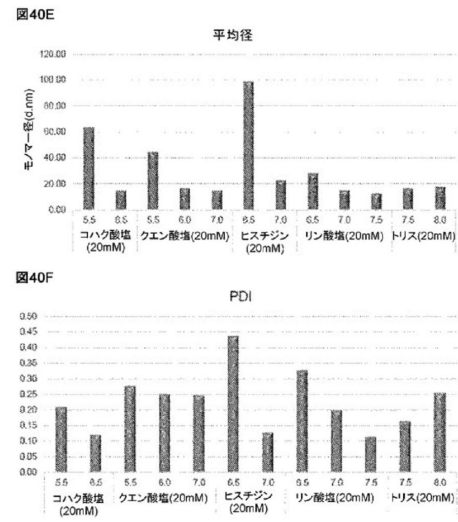
40

50

【図 40-2】



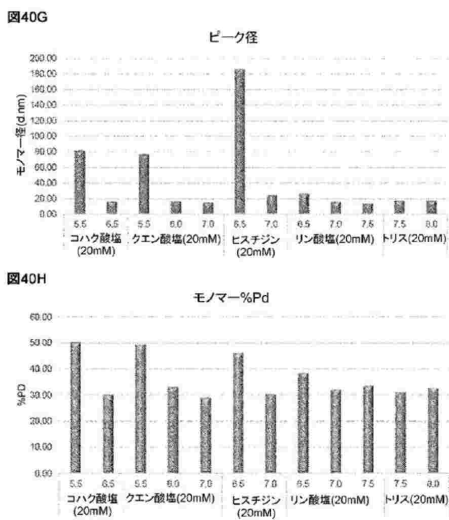
【図 40-3】



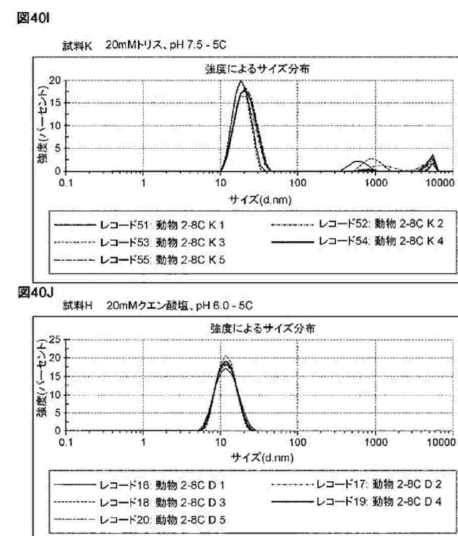
10

20

【図 40-4】



【図 40-5】



30

40

50

【図 40 - 6】

【図 4 1】

図40K

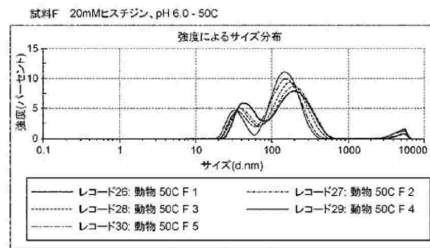


図40L

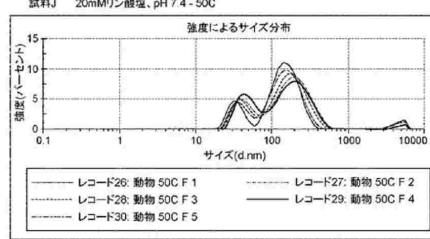
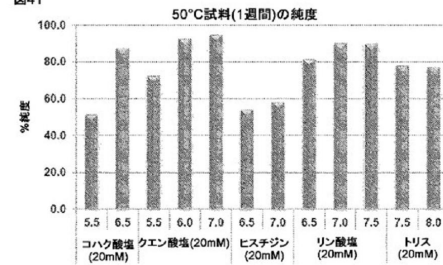


図41



10

20

【図 4 2】

【図 4 3】

図42

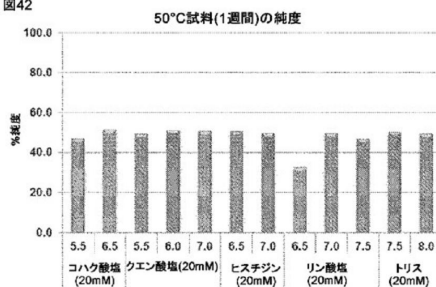
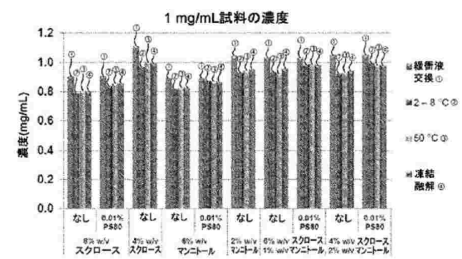
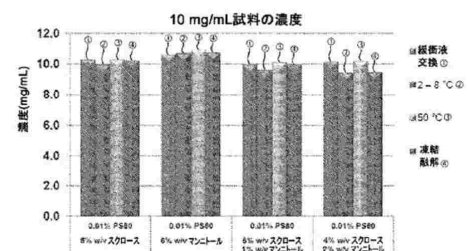


図43A



30

図43B

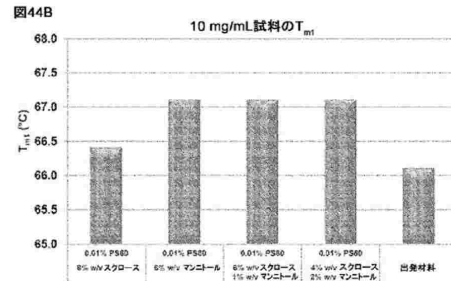
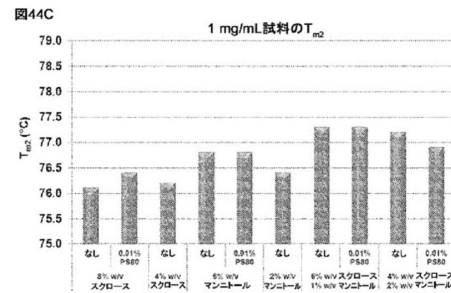
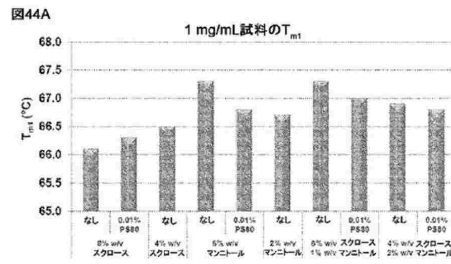


40

50

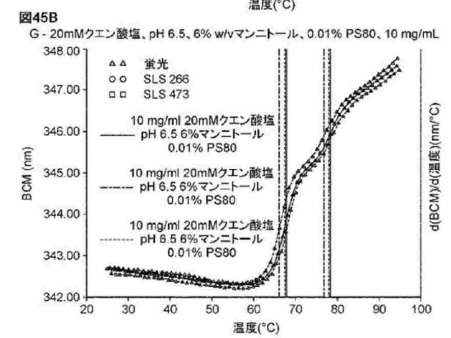
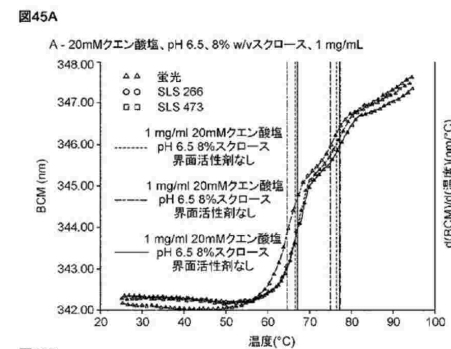
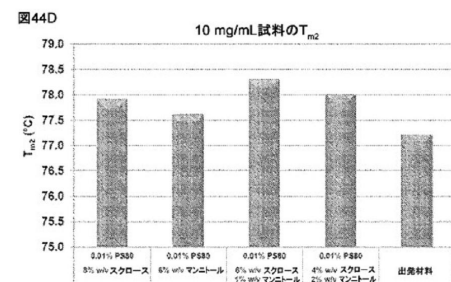
【図 4 4 - 1】

【図 4 4 - 2】



【図 4 4 - 3】

【図 4 5 - 1】



10

20

30

40

50

【図 4 5 - 2】

【図 4 6 - 1】

圖45C

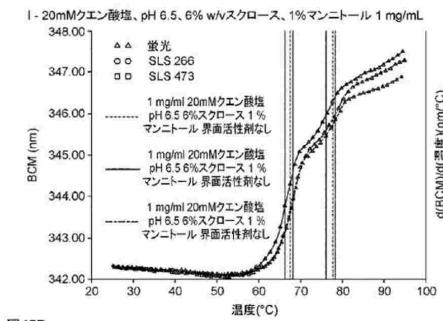


图45D

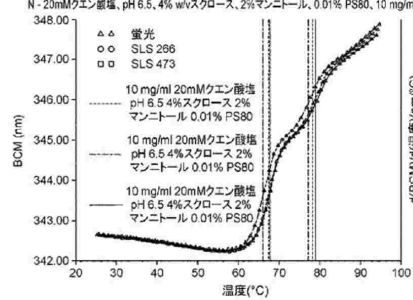


图46A

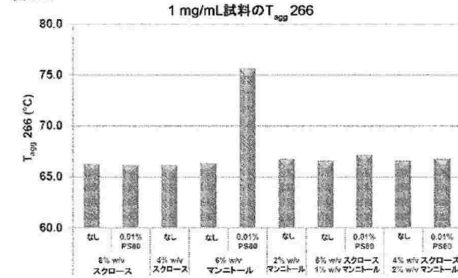
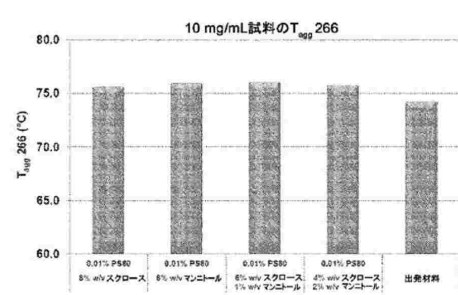


图46B



【図 46-2】

【図 4 6 - 3】

46C

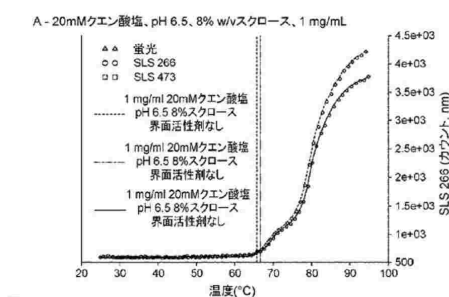


图46D

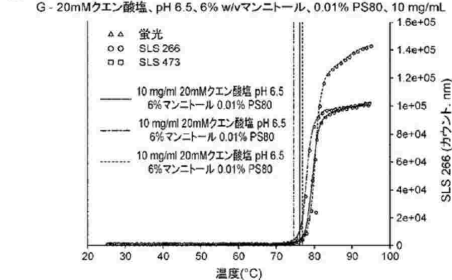


图46E

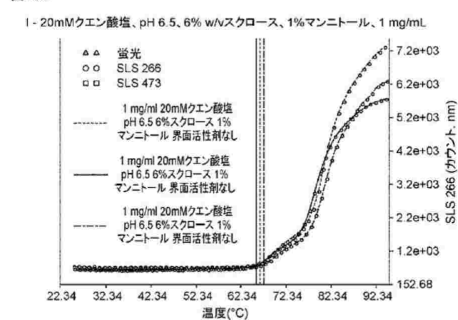
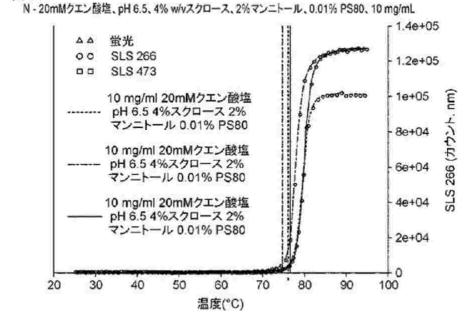
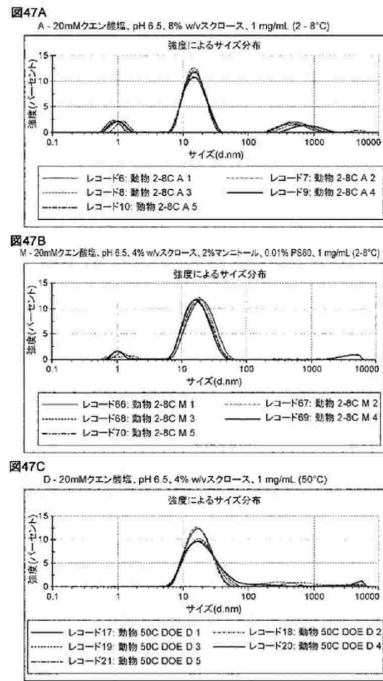


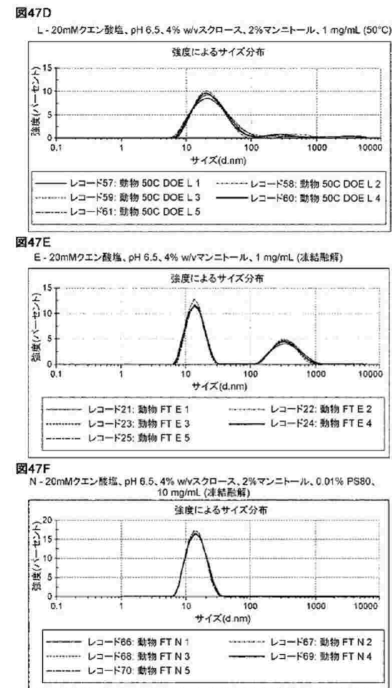
图46F



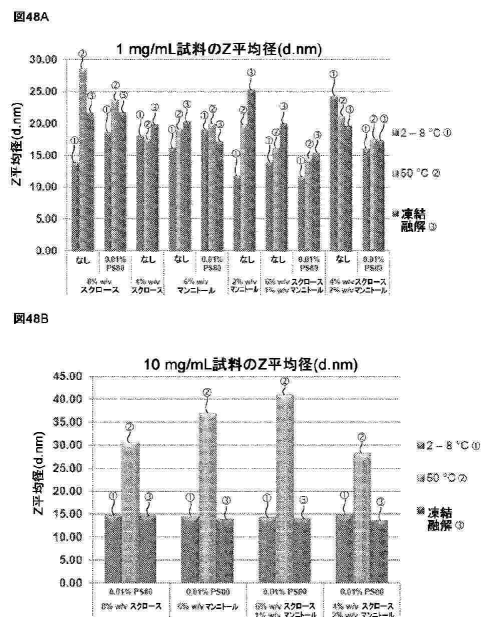
【図 47-1】



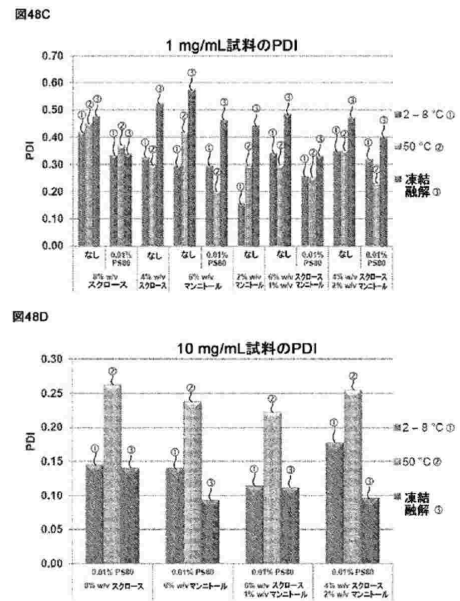
【図 47-2】



【図 48-1】



【図 48-2】



10

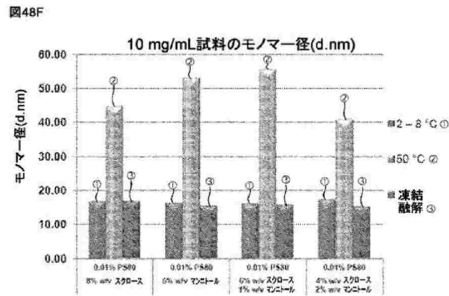
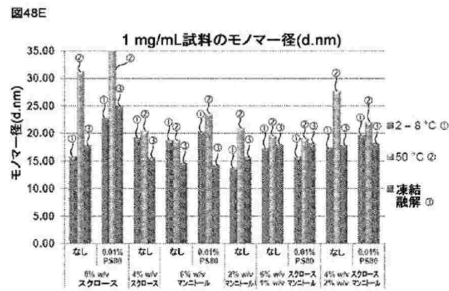
20

30

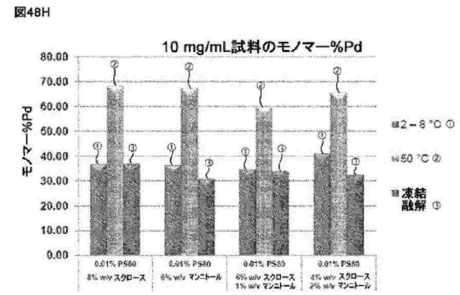
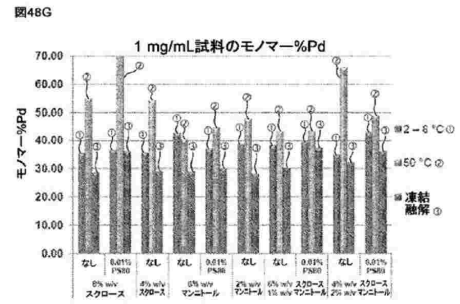
40

50

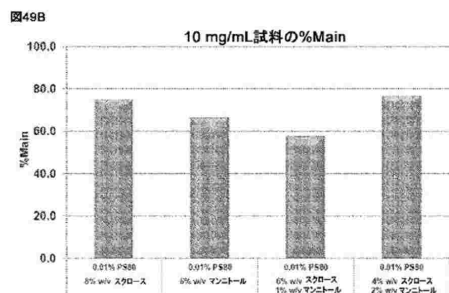
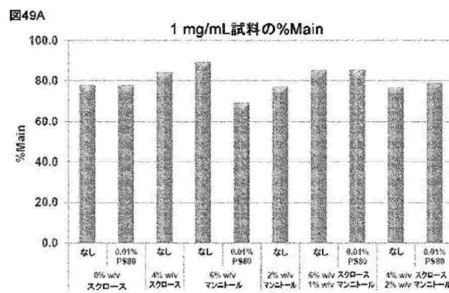
【図 48-3】



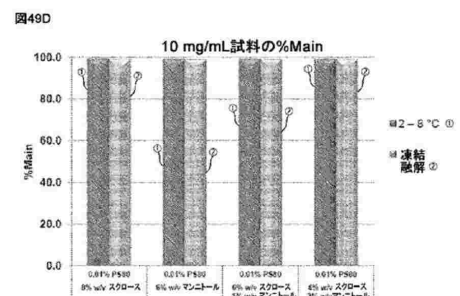
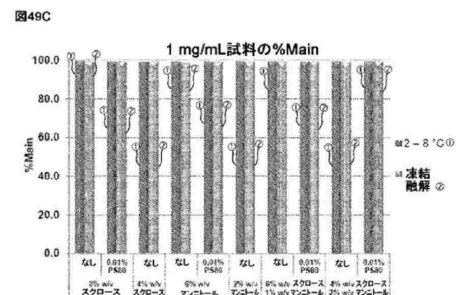
【図 48-4】



【図 49-1】



【図 49-2】



10

20

30

40

50

【図 5 0 - 1】

図50A

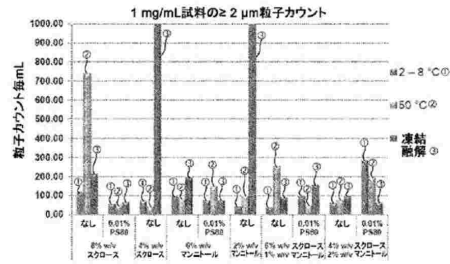
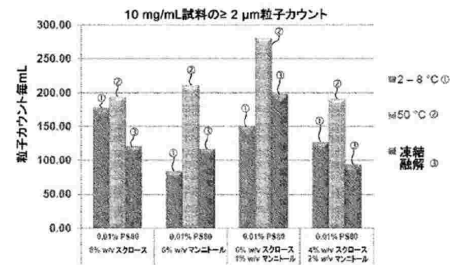


図50B



【図 5 0 - 2】

図50C

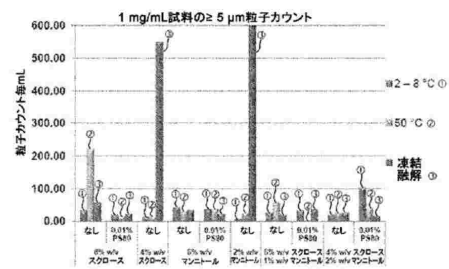
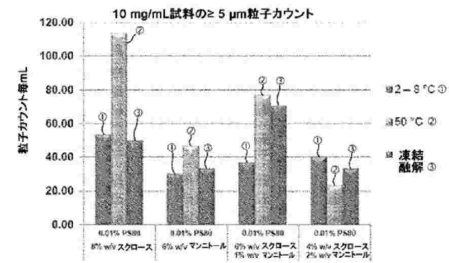


図50D



【図 5 0 - 3】

図50E

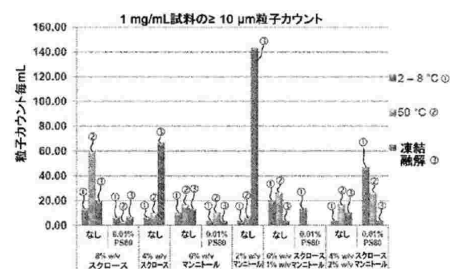
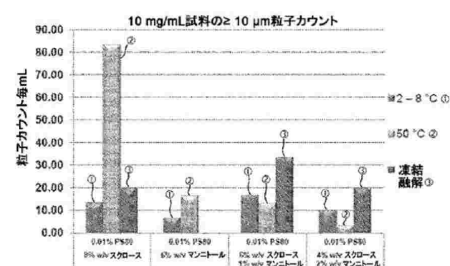


図50F



【図 5 0 - 4】

図50G

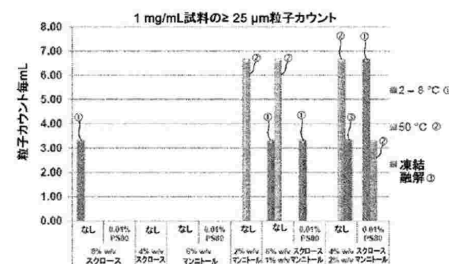
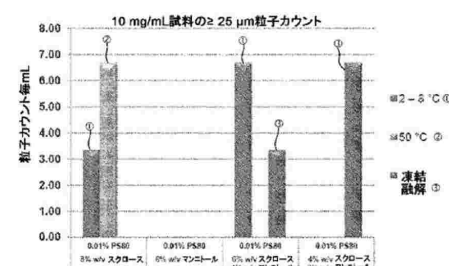


図50H



10

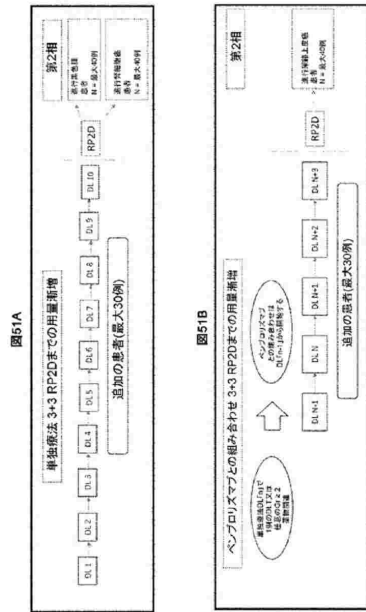
20

30

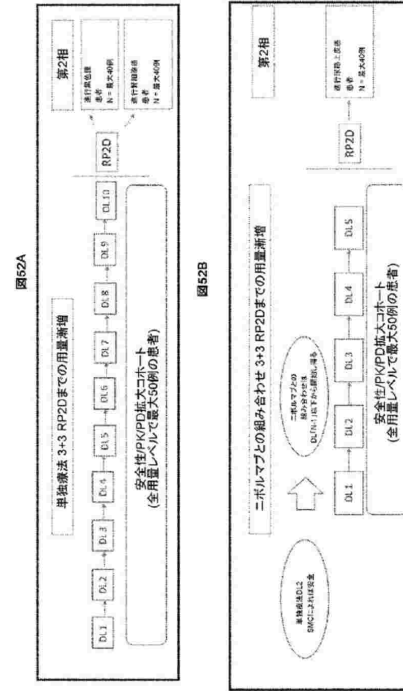
40

50

【図 5 1】



【図 5 2】



【配列表】

0007644777000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	1/18	(2006.01)	C 0 7 K	1/18
C 0 7 K	1/20	(2006.01)	C 0 7 K	1/20
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22
C 0 7 K	1/34	(2006.01)	C 0 7 K	1/34
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

早期審査対象出願

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州ケンブリッジ、エモンズ・プレイス 6

(72)発明者 ブラウン, アレクサンドラ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州ケンブリッジ、フォーセット・ストリート 8 0、ナンバー 2 5 6

(72)発明者 チョン, アン エフ

アメリカ合衆国 0 1 7 7 3 マサチューセッツ州リンカーン、モーニングサイド・レイン 2 5

(72)発明者 キュイユロ, ジャンーマリ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州サマービル、タワー・コート 5、アパートメント・ナンバー 4

(72)発明者 デローズ, マーク

アメリカ合衆国 0 1 8 8 7 マサチューセッツ州ウィルミントン、キャサリン・アベニュー 9

(72)発明者 グリンバーク, アシャ

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州レキシントン、フォレン・ロード 3 7

(72)発明者 グティエレス, エバ

アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州ウォルサム、ヒルクレスト・ストリート 6 7

(72)発明者 カービー, バトリック

アメリカ合衆国 0 1 7 1 9 マサチューセッツ州ボックスボロー、リード・ファーム・ロード 3 6 0

(72)発明者 モーガン, クリストファー ライアン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 2 マサチューセッツ州サウスボロー、マールボロ・ロード 2 5

(72)発明者 ネイル, マイケル シー

アメリカ合衆国 0 1 7 7 5 マサチューセッツ州ストウ、アップル・ブロッサム・ウェイ 5 7

(72)発明者 オニール, スティーブン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 8 マサチューセッツ州ウェイランド、プレザント・ラン 7

(72)発明者 シフリン, マイケル

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州メドフォード、アンドリュース・ストリート 9 8

(72)発明者 ヴァクトマン, ニコライ

アメリカ合衆国 0 1 7 4 2 マサチューセッツ州コンコード、モニュメント・ストリート 1 7 7 6

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献

国際公開第 2 0 2 0 / 0 7 2 8 2 1 (WO, A 1)

特表 2 0 1 9 - 5 3 6 7 3 4 (JP, A)

特表 2 0 1 3 - 5 3 9 7 8 7 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 7 1 5 9 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 8 4 4 8 (WO, A 1)

特表 2 0 2 2 - 5 0 5 8 7 1 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 8 / 2 0

A 6 1 K 9 / 0 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0 - 3 5 / 0 4

C07K 1/00-1/36

C07K 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)