

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-520249

(P2020-520249A)

(43) 公表日 令和2年7月9日(2020.7.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

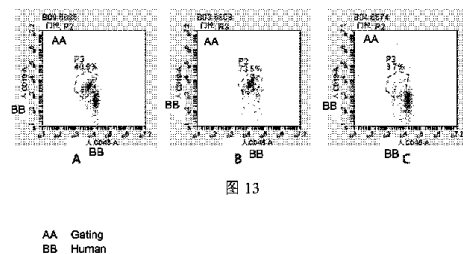
(21) 出願番号	特願2020-513390 (P2020-513390)	(71) 出願人	519399981 シャanghai ジェイエムティーバイオ テクノロジー カンパニー リミテッド 中華人民共和国 201210 シャanghai イ チャイナ (シャanghai) パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロー ド ナンバー300 ルーム 201
(86) (22) 出願日	平成30年5月8日 (2018.5.8)	(74) 代理人	110000578 名古屋国際特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	令和2年1月6日 (2020.1.6)	(72) 発明者	ソン リピン 中華人民共和国 201210 シャanghai イ チャイナ (シャanghai) パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロー ド ナンバー300 ルーム 201
(86) 国際出願番号	PCT/CN2018/086050		
(87) 国際公開番号	W02018/205936		
(87) 国際公開日	平成30年11月15日 (2018.11.15)		
(31) 優先権主張番号	201710317926.7		
(32) 優先日	平成29年5月8日 (2017.5.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	201711269620.5		
(32) 優先日	平成29年12月5日 (2017.12.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 二重特異性組換えタンパク質およびその応用

(57) 【要約】

本発明は、高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を含む二重特異性組換えタンパク質を開示し、高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体はCD47に結合せず、腫瘍細胞上の標的抗原に対する結合親和性は、腫瘍細胞上のCD47に対する低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍であり、ここで、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、SIRP細胞外ドメインを含む。本発明は、組換えタンパク質をコードする核酸分子および腫瘍を治療するための薬物の製造における前記組換えタンパク質と核酸分子の用途をさらに開示する。

【選択図】図13



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高親和性の腫瘍を標的とするアームと、低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質とを含み、

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは C D 4 7 に結合せず、かつ腫瘍細胞上の標的抗原に対する前記高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上の C D 4 7 に対する低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも 6 倍であり、

C D 4 7 に対する前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質の結合親和性は、C D 4 7 に対する S I R P 細胞外トランケーションを含むモノマー融合タンパク質のホモダイマーの結合親和性より高くなく、前記 S I R P 細胞外トランケーションは、ヒト S I R P 野生型細胞外トランケーションまたは C D 4 7 非高親和性突然変異のヒト S I R P 細胞外トランケーションを含む、二重特異性組換えタンパク質。

10

【請求項 2】

前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、S I R P 細胞外トランケーションを含み、前記 S I R P 細胞外トランケーションは下記 a 1) - a 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、a 1) 配列番号 3 0、a 2) 配列番号 3 1、a 3) 配列番号 3 2、a 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば 1 ~ 5 個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのモノマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対する a 1)、a 2) または a 3) モノマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

20

【請求項 3】

前記二重特異性組換えタンパク質は、相対的に設定される左、右のアーム構造を有し、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、左アームの位置に位置され、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、右アームの位置に位置され、好ましくは、前記左アームは、免疫グロブリンの F a b または F a b ' 形態であり、前記右アームは、S I R P 細胞外トランケーションである、請求項 1 又は 2 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

30

【請求項 4】

前記右アームの長さは、標的細胞膜の表面から左アームが結合する必要がある抗原空間エピトープの距離に適合し、好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームが標的細胞の近位膜エピトープに結合する必要がある場合、前記 S I R P 細胞外トランケーションは、a 1) ~ a 4) 中の比較的短いアミノ酸配列を選択して含む、請求項 3 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項 5】

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームの標的化の標的は、5 T 4、A G S - 1 6、A L K 1、A N G - 2、B 7 - H 3、B 7 - H 4、c - f m s、c - M e t、C A 6、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、E p C A M、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 2、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 b、C D 9 8、C E A、C E A C A M 5、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C S 1、C X C R 4、D L L - 4、E G F R、E G P - 1、E N P P 3、E p h A 3、E T B R、F G F R 2、F N、F R -、G C C、G D 2、G P C - 3、G P N M B、H E R 2、H E R 3、H L A - D R、I C A M - 1、I G F - 1 R、I L - 3 R、L I V - 1、M S L N、M U C 1 6、M U C 1、N a P i 2 b、ネクチン - 4、N o t c h 2、N o t c h 1、P D - L 1、P D - L 2、P D G F R -、P S、P S M A、S L T R K 6、S T E A P 1、T E M 1、V E G F R、C D 2 5、C D 2 7 L、D K K - 1、C S F - 1 R、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、

40

50

B C M A、C D 1 3 8 から選択され、

好ましくは、前記標的が C D 2 0、E G F R または P D - L 1 である場合、前記 S I R P 細胞外トランケーションは、a 1) を選択し、前記標的が H E R 2 である場合、前記 S I R P 細胞外トランケーションは、a 1) または a 2) を選択する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項 6】

高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、分子の間の作用力によって結合され、または鎖間ジスルフィド結合のような共有結合によって結合され、またはイオン結合によって結合され、または上記の結合方法における二つまたは三つの組み合わせによって結合される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の二重特異性組換えタンパク質。

10

【請求項 7】

F c 領域をさらに含み、好ましくは、前記 F c 領域は、F c 領域天然配列または F c 非天然配列を含み、より好ましくは、前記 F c 領域は、ヒト F c 領域であり、さらにより好ましくは、高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質の結合は、k n o b s - i n t o - h o l e s にによって結合される、請求項 6 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項 8】

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、標的化の標的が、5 T 4、A G S - 1 6、A L K 1、A N G - 2、B 7 - H 3、B 7 - H 4、c - f m s、c - M e t、C A 6、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、E p C A M、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 2、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 b、C D 9 8、C E A、C E A C A M 5、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C S 1、C X C R 4、D L L - 4、E G F R、E G P - 1、E N P P 3、E p h A 3、E T B R、F G F R 2、F N、F R - 、G C C、G D 2、G P C - 3、G P N M B、H E R 2、H E R 3、H L A - D R、I C A M - 1、I G F - 1 R、I L - 3 R、L I V - 1、M S L N、M U C 1 6、M U C 1、N a P i 2 b、ネクチン - 4、N o t c h 2、N o t c h 1、P D - L 1、P D - L 2、P D G F R - 、P S、P S M A、S L T R K 6、S T E A P 1、T E M 1、V E G F R、C D 2 5、C D 2 7 L、D K K - 1、C S F - 1 R、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、B C M A、C D 1 3 8 から選択される不完全抗体であり、好ましくは、I g G 1 抗体の不完全抗体であり、選択的に、ヒトマウスキメラ不完全抗体、ヒト化不完全抗体、完全ヒト不完全抗体であり、より好ましくは、ヒト化または完全ヒト I g G 1 抗体の不完全抗体である、請求項 7 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

20

30

【請求項 9】

低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、下記 b 1) - b 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、b 1) 配列番号 2 6、b 2) 配列番号 2 7、b 3) 配列番号 2 8、b 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば 1 ~ 5 個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのホモダイマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対する b 1)、b 2) または b 3) ホモダイマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、請求項 7 又は 8 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

40

【請求項 10】

高親和性の腫瘍を標的とするアームが C D 2 0 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 1 6 と配列番号 1 7 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 を含み、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが E G F R を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 1 9 と配列番号 8 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 を含み、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが H e r 2 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍

50

を標的とするアームは、配列番号 20 と配列番号 21、または配列番号 22 と配列番号 23 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 または配列番号 27 を含み、または、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが PD-L1 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 24 と配列番号 13 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 を含む、請求項 9 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項の二重特異性組換えタンパク質をコードする核酸分子であって、

好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、同じ DNA 鎖に位置され、または前記高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、異なる DNA 鎖に位置される、核酸分子。

【請求項 12】

請求項 11 の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 13】

請求項 12 の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の細胞を用いて前記組換えタンパク質を発現させる、前記二重特異性組換えタンパク質の製造方法。

【請求項 15】

腫瘍を治療するための薬物の製造における請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の二重特異性組換えタンパク質の用途であって、

好ましくは、前記腫瘍は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽頭癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮細胞癌、皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫または骨髄異形成症候群などの血液腫瘍および固形腫瘍から選択される、用途。

【請求項 16】

a) 標的とされ、ADCC 活性を有する組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を提供するステップと、

b) 前記組換えタンパク質 / 抗体の ADCC 活性を検出するステップと、

c) 前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含み、

好ましくは、ステップ a) とステップ b) の間に、

a1) ヒト NK92MI-CD16a エフェクター細胞などであるが、これに限定されないエフェクター細胞を製造するステップと、

a2) エフェクター細胞を組換えタンパク質 / 一価または多価抗体を含む抗体と接触させるステップとをさらに含み、

より好ましくは、前記 a1) において、獲得されたエフェクター細胞を 1×10^5 個の細胞 / ml 乃至 5×10^6 個の細胞 / ml の細胞密度に再懸濁させ、前記 a2) において、勾配希釈した組換えタンパク質 / 抗体を、a1) で製造されたエフェクター細胞と 0.5 ~ 5 h インキュベートし、前記 b) において、LDH 活性を測定し、細胞分解率を計算し、および / または、前記 c) において、細胞分解率に従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価し、ここで、細胞分解率を低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、CD47 を標的とし、且つ ADCC 活性を有する組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法。

【請求項 17】

- a) C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質 / 一価または多価抗体を含む抗体を提供するステップと、
- b) H u - N S G マウスを提供するステップと、
- c) 前記組換えタンパク質 / 抗体を H u - N S G マウスと接触させるステップと、
- d) 前記 H u - N S G マウスにおける前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含み、

好ましくは、前記 c) において、24 ~ 96 時間の投与後、マウス静脈血を採取し、赤血球を分解し、残りの細胞を蛍光標識した抗ヒト C D 4 5、抗ヒト C D 1 9 または抗ヒト C D 3 の抗体とともに 15 ~ 60 m i n インキュベートし、フローサイトメトリー検出を行い、前記 d) において、細胞クリアランスに従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価し、ここで、免疫細胞クリアランスを低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビボ評価方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、2017年5月8日に提出された、出願番号が C N 2 0 1 7 1 0 3 1 7 9 2 6 . 7 の中国特許出願および2017年12月5日に提出された、出願番号が C N 2 0 1 7 1 1 2 6 9 6 2 0 . 5 の中国特許出願に対して優先権を主張する。本出願は、当該中国特許出願の全文を引用する。

[技術分野]

本発明は、生物医学の分野に属し、具体的に、組換えタンパク質およびその用途に関する。

[背景技術]

腫瘍治療の分野における研究の深化に伴い、腫瘍分子標的治療薬物の開発および応用はますます注目されている。ターゲティングが強く、副作用が小さく、治療効果が顕著などの利点に基づいて、抗体薬物は腫瘍標的治療分野で急速に注目を集めた。現在、数十の腫瘍を標的とする抗体薬物が臨床使用のために承認されており、顕著な結果を達成した。前記抗体薬物は、例えば、C D 2 0 標的分子に対するリツキシアン (R i t u x a n) < 登録商標 > (リツキシマブは、癌の治療に承認された米国で最初のモノクローナル抗体であり、最初は非ホジキンリンパ腫の治療に使用された、ロシュ出品)、Z e v a l i n < 登録商標 > (i b r i t u m o m a b t i u x e t a n、最初はリツキシマブに耐性のある低分化型非ホジキンリンパ腫の治療薬として米国 F D A によって承認された、I D E C P h a r m a c e u t i c a l s 出品)、B e x x a r < 登録商標 > (t o s i t u m o m a b a n d i o d i n e I 1 3 1 t o s i t u m o m a b、G S K 出品)、A r z e r r a < 登録商標 > (o f a t u m u m a b、G S K 出品) など、H e r 2 標的分子に対するハーセプチン (H e r c e p t i n) < 登録商標 > (トラスツズマブ (T r a s t u z u m a b)、有名な乳癌治療薬物、G e n e n t e c h 出品)、P e r j e t a < 登録商標 > (ペルツズマブ (P e r t u z u m a b) モノクローナル抗体、R o c h e 出品)、K a d c y l a < 登録商標 > (a d o - t r a s t u z u m a b e m t a n s i n e、R o c h e 出品) など、V E G F またはその受容体標的分子に対するアバスタチン (A v a s t i n) < 登録商標 > (ベバシズマブ (B e v a c i z u m a b) モノクローナル抗体、G e n e n t e c h / R o c h e 出品)、C y r a m a z a < 登録商標 > (r a m u c i r u m a b、E l i L i l l y 出品) など、E G F R 標的に対するエルビタックス (E r b i t u x) < 登録商標 > (セツキシマブ (C e t u x i m a b) モノクローナル抗体、世界でトップ10の売れ筋の抗癌薬の1つ、最初は直腸癌の治療に承認され、E l i L i l l y 出品)、V e c t i b i x < 登録商標 > (パニツムマブ (P a n i t u m u m a b)、結腸直腸癌の治療薬、A m g e n 出品) など、P D - L 1 標的分子に対する T e c e n t r i q < 登録商標 > (a t e z o l i z u m a b、R o c h e 出品) など (曹睿ら、腫瘍標的治療抗体薬物の研究進捗、《中国生化学薬ジャーナル》、201

10

20

30

40

50

6, 36 (6) : 15 - 18)。

【0002】

臨床的に応用される腫瘍細胞を標的とする腫瘍抗体薬物（非結合裸抗体）において、抗腫瘍メカニズムは、主に抗体の二つの機能によって実現される。まず、抗体の第一の機能は親和性であり、即ち、抗体は腫瘍表面の標的抗原に特異的に結合した後、そのエフェクター機能を発揮して、腫瘍細胞を殺す。抗体分子は標的抗原に結合することにより、腫瘍成長因子シグナル伝達経路をブロックし、アポトーシスを誘発し、または腫瘍微小環境における新しい血管の形成を阻害することができる。第二に、抗体の第二の機能は免疫系によって実現され、即ち、腫瘍細胞に対する殺傷作用は、免疫系に依存して細胞死を媒介することができる。例えば、抗体定常領域により媒介される抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC: antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity）、補体依存性細胞阻害作用（CDC: complement dependent cytotoxicity）および抗体依存性細胞貪食（ADCP: Antibody dependent cellular phagocytosis）である。増え続けるデータは、抗体媒介免疫殺害活性は、抗体が抗腫瘍の効果を発揮する重要な作用メカニズムであることを示している（レビューについては、Barnhart BC, et al. Role of Fc - Fc R interaction in the antitumor activity of therapeutic antibodies. Immunology and Cell Biology, 2017, 95: 340 - 346を参照することができる）。

10

20

【0003】

近年、研究により、腫瘍細胞は自身の表面抗原の修飾および腫瘍組織の周囲の微小環境の変化などの方法によって、生体の免疫系の監視、認識、攻撃を逃げて、分裂および成長し続けることが確認され、これは腫瘍免疫回避とも言える。例えば、腫瘍細胞は、CD47を高度に発現し、マクロファージの表面の抑制性受容体シグナル調節タンパク質（signal regulatory protein, SIRP）に結合し、マクロファージの免疫機能を阻害することにより、免疫細胞の活性を著しく阻害する。同時に、腫瘍細胞のCD47の高発現は、Fc受容体を介した食作用を阻害し、最終的には抗体薬物の腫瘍標的治療効果に影響を及ぼす（Willingham SB, et al. The CD47 - signal regulatory protein Alpha (SIRP) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012, 109 (17): 6662 - 6667)。

30

【0004】

CD47は広く発現している膜糖タンパク質であり、受容体およびリガンドとしてSIRPと相互作用し、アポトーシス、増殖、免疫などの一連の反応を媒介するCD47 - SIRPシグナル複合体を形成することができる。2000年、Oldenborgらは、CD47がマクロファージの食作用の細胞表面調節の重要なシグナルであることを実証した（Oldenborg PA, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science, 2000, 288 (5473): 2051 - 2054）。CD47は「食べないでください」のシグナルを放出することにより、マクロファージ表面のSIRPに結合し、その免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（immunoreceptor tyrosine - based inhibitory motif, ITIM）をリン酸化し、続いて、SH2含有プロテインチロシンホスファターゼSHP1（SH2 - containing protein tyrosine phosphatase 1）タンパク質を動員し、マクロファージの食作用を阻害する一連のカスケード反応を生成した。若い赤血球はより高いCD47を発現し、「仲間ですから、食べないでください」と

40

50

いうシグナルをマクロファージに放出し、一方、老化した赤血球CD47の発現はダウンレギュレートされ、最終的にはマクロファージによって除去される。

【0005】

CD47は、様々な癌細胞の表面で広く発現しているので、当該標的は様々な癌の治療に使用されることができ、マウス同種異系腫瘍移植モデルはCD47遮断の有効性を実証したので、CD47は癌免疫チェックポイント療法の新規標的となった(Vonderheid R H, CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. *Nature Medicine*, 2015, 21(10):1122-1123)。抗CD47抗体、SIRP-Fc融合タンパク質などの研究薬は、CD47-SIRPシグナル伝達経路を遮断することにより免疫細胞に対するCD47の阻害効果を阻害し、一定の抗腫瘍活性を示す。しかし、赤血球も大量のCD47タンパク質を発現するので、CD47タンパク質と高親和性に結合される抗CD47抗体治療は、赤血球凝集、貧血などの毒性副作用を引き起こす可能性があり(Mccracken M N, et al. *Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 'Don't Eat Me' Signals*. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(16):3597-3601)、これにより、抗CD47抗体薬物の臨床開発は非常に困難になり、これまでのところ、第III相臨床試験進入した抗CD47抗体薬物はなく、一方、野生型SIRP-Fc融合タンパク質はCD47に対する親和性が低いので、効果は顕著ではなく、一部の研究者は、野生型SIRPの高親和性変異を行い、1000倍以上の親和性増強を伴うSIRP変異体を取得し、良好な抗腫瘍効果を示した(Weiskopf K, et al. *Engineered SIRP variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies*. *Science*, 2013, 341(6141):88-91)。しかし、マルチポイント変異が融合タンパク質の人における安全性、免疫原性、安定性、ないし標的特異性などに影響を与えるかどうかは、臨床的観察で確認されていない。

【0006】

一方、研究により、抗CD47抗体は、CD47+CD20、CD47+Her2などの他の腫瘍標的治療抗体と組み合わせて使用することにより、腫瘍効果を大幅に向上させることができる(Chao MP, et al. *Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma*. *Cell*, 2010, 142(5):699-713; Zhao XW, et al. *CD47-signal regulatory protein-1 (SIRP) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, 108(45):18342-18347)。しかし、抗CD47抗体は市場に公開されるか、いつ市場に効果されるかはまだ不確定であり、市場に公開された後、腫瘍を標的とする抗体薬物の組み合わせは、患者が非常に高価な併用療法の費用を負担することも難しくする。

【0007】

従って、腫瘍を特異的に標的化し、患者の免疫機能を活性化および強化し、安全性を確保しながら腫瘍治療の効果を大幅に改善し、同時に患者の薬物コストを低減できる新しい腫瘍標的薬を開発する必要がある。

【0008】

なお、CD47を標的とする一価または多価の抗体または組換えタンパク質の潜在的な

安全性リスク（貧血、赤血球凝集、CD47陽性の非腫瘍標的細胞死など）を考慮して、同時にヒトSIRP およびヒトCD47の組み合わせは種の特異性があり、人間の血液の使用は倫理、遺伝資源などによって制限されるので、CD47を標的とする抗体または組換えタンパク質の免疫安全性を評価する早期のインビボ/インビトロの免疫安全性の評価方法の開発が期待されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、マクロファージを調節する機能を有する組換えタンパク質の腫瘍を標的とする飽和結合度を有意に向上させ、非腫瘍を標的とする副作用を有意に低減させることができる二重特異性組換えタンパク質およびその応用を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様において、本発明は、高親和性の腫瘍を標的とするアームと、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質とを含む二重特異性組換えタンパク質を提供する。

【0011】

一実施形態において、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、CD47に結合せず、かつ腫瘍細胞上の標的抗原に対する前記高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上のCD47に対する低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍であり、選択的に、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、またはそれ以上の倍数、またはその間の任意の数値である。

20

CD47に対する前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合親和性は、CD47に対するSIRP細胞外トランケーションを含むモノマー融合タンパク質のホモダイマーの結合親和性より高くない。前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、SIRP細胞外トランケーションを含む。

【0012】

30

一実施形態において、SIRP細胞外トランケーションは、ヒトSIRP（野生型またはCD47非高親和性変異体）の細胞外アミノ酸配列の一部または全部を含む。

【0013】

さらに別の実施形態において、SIRP細胞外トランケーションは、ヒトSIRP細胞外トランケーションである。具体的な実施形態において、前記SIRP細胞外トランケーションは、下記a1) - a4)から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、a1)配列番号30、a2)配列番号31、a3)配列番号32、a4)前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が少なくとも一つのアミノ酸残基、例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのモノマーは、CD47タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、CD47タンパク質に対するa1)、a2)またはa3)モノマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する。

40

【0014】

一実施形態において、前記二重特異性組換えタンパク質は、相対的に設定される左、右のアーム構造を有し、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、左アームの位置に位置され、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、右アームの位置に位置され、好ましくは、前記左アームは、免疫グロブリンのFabまたはFab'形態であり、前記右アームは、SIRP細胞外トランケーションである。ここで、本発明による「相対的に設定される左、右のアーム構造」は、免疫グロブリンの通常の「Y」型構造の説明を参照し、その場合、本発明の二重特異性組換えタンパク質

50

の左側および右側は、異なる標的の特異的機能タンパク質を有する。当該構造の説明は、二つの特定の機能性タンパク質がC末端とN末端を介して上部構造と下部構造を形成できると主として区別されるためである。従って、本発明の左アームおよび右アームの空間位置は、二重特異性組換えタンパク質の構造に対する具体的な限定ではなく、二重特異性組換えタンパク質の二つのアームと前記C末端とN末端を介して形成された上部構造と下部構造を区分するだけであり、一方が片側にある場合、他の一方は反対側にあり、明らかに、二つの左右の空間位置は交換可能である。

【0015】

別の実施形態において、前記右アームの長さは、標的細胞膜の表面から左アームが結合する必要がある抗原空間エピトープの距離に適合する。好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームが標的細胞の膜近位端のエピトープに結合する必要がある場合、前記SIRP細胞外ドメインは、a1)～a4)中の比較的短いアミノ酸配列を選択して含む。

【0016】

一実施形態において、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームの標的化の標的は、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、Napi2b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138から選択される。

【0017】

好ましくは、前記標的がCD20、EGFRまたはPD-L1である場合、前記SIRP細胞外ドメインは、a1)を選択し、前記標的がHER2である場合、前記SIRP細胞外ドメインは、a1)またはa2)を選択する。

【0018】

一実施形態において、高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、分子の間の作用力によって結合され、または鎖間ジスルフィド結合のような共有結合によって結合され、またはイオン結合によって結合され、または上記の結合方法における二つまたは三つの組み合わせによって結合される。

【0019】

さらに別の実施形態において、高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、Fc領域をさらに含む。通常、本発明のFc領域は、Fc領域天然配列を含む。しかし、本発明のFc領域は、Fc領域天然配列にFc領域のC1qに結合活性が変更されたアミノ酸配列変更または修飾のような一つまたは複数の既存のアミノ酸配列の変更または修飾を有することができる。

【0020】

別の実施形態において、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、SIRP細胞外ドメインと前記アームを結合するための結合配列の融合タンパク質を含み、SIRP細胞外ドメインと前記アームを結合するための結合配列は、選択的に、リンカー配列によって連結され、前記アームを結合するための結合配列は、選択的に、Fc領域である。

【0021】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、本発明のFc領域は、概念的であり、即ち、実際存在しないかもしれないが、所望のFc領域変異体のアミノ酸配列に従って、抗体工程改造を実施することができ、当該配列を含むポリペプチドまたは融合タンパク質を産生し、または所望のFc領域変異体アミノ酸配列のDNAをコードする。

【0022】

他の実施形態において、前記Fc領域は、Fc領域変異体であることができる。本明細書で使用される「Fc領域変異体」は、Fc天然アミノ酸配列に一つまたは複数のアミノ酸残基の修飾により獲得されたFc領域を指す。修飾の方法は、当業者に周知であり、PCR突然変異誘発およびカセット突然変異誘発によってFc領域変異体を製造するなどのFc領域をコードするDNA配列に部位特異的突然変異を誘発することに限定されない。例えば、FcRへの結合を向上させるために、Fc領域の一つまたは複数のアミノ酸残基を欠損させることができる。例えば、一実施形態において、Fc領域のエフェクター機能を変更するために、アミノ酸挿入型Fc領域変異体を製造することができる。

10

【0023】

一実施形態において、FcR結合に影響を及ぼすと同定された一つまたは複数のFc領域部位の近くに少なくとも一つのアミノ酸残基（例えば、1～2個のアミノ酸残基、通常10個のアミノ酸残基を超えない）を導入することができる。「近く」とは、FcR結合に影響を及ぼすと同定されたFc領域部位から1～2個のアミノ酸残基以内を指す。このようなFc領域変異体は、FcR結合および/またはADCC活性の増強または低下を示すことができる。このような挿入型変異体を製造するために、FcR結合領域（例えば、標的FcRの細胞外ドメイン）を含むポリペプチドと挿入されるアミノ酸残基のFc領域の共結晶構造を評価することができ、例えば、増強されたFcR結合能力を有するFc領域変異体に関連する。このような挿入は、Fc領域のループに配置される。

20

【0024】

一実施形態において、天然Fc領域に適切なアミノ酸配列修飾を導入することにより、ヒトエフェクター細胞の存在下で、天然Fc領域を含む組換えタンパク質よりも効率的に抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）を媒介し、および/またはより強い親和性でFc受容体（FcR）に結合するFc領域変異体を製造することができる。通常、本発明のFc領域変異体は、Fc領域に少なくとも一つのアミノ酸修飾を含む。好ましくは、複数のアミノ酸修飾を組み合わせる。例えば、Fc領域変異体は、例えば、同定された特異的FcR結合部位に、2、3、4、5個またはそれ以上のアミノ酸残基の置換を含むことができる。

30

【0025】

前記天然Fc領域は、ヒトIgG1（Aまたは非Aアイソタイプ）、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域天然配列のような、ヒトFc領域が好ましい。

【0026】

別の実施形態において、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合は、knobs-into-holesによって結合される。例えば、前記knobs-into-holesは、T366W突然変異によって形成される突出された「knobs」型と、一つのアミノ酸突然変異（Y407V）によって形成される凹んだ「holes」型または三つのアミノ酸突然変異（T366S、L368AおよびY407V）によって形成される凹んだ「holes」型である。突然変異は、Kabab番号形態[Eu numbering scheme of Kabab et al. (1991)]に従って、左から右に元のアミノ酸残基、突然変異部位および置換アミノ酸残基としてそれぞれ表示され、例えば、T366Wにおいて、Tは、元のアミノ酸残基で、366は、突然変異部位で、Wは、Tを置換するアミノ酸残基である。

40

【0027】

一実施形態において、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、標的化の標的が、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c

50

- M e t、C A 6、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、E p C A M、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 2、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 b、C D 9 8、C E A、C E A C A M 5、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C S 1、C X C R 4、D L L - 4、E G F R、E G P - 1、E N P P 3、E p h A 3、E T B R、F G F R 2、F N、F R - 、G C C、G D 2、G P C - 3、G P N M B、H E R 2、H E R 3、H L A - D R、I C A M - 1、I G F - 1 R、I L - 3 R、L I V - 1、M S L N、M U C 1 6、M U C 1、N a P i 2 b、ネクチン - 4、N o t c h 2、N o t c h 1、P D - L 1、P D - L 2、P D G F R - 、P S、P S M A、S L T R K 6、S T E A P 1、T E M 1、V E G F R、C D 2 5、C D 2 7 L、D K K - 1、C S F - 1 R、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、B C M A、C D 1 3 8 から選択される不完全抗体であり、好ましくは、I g G 1 抗体の不完全抗体であり、選択的に、ヒトマウスキメラ不完全抗体、ヒト化不完全抗体、完全ヒト不完全抗体であり、より好ましくは、ヒト化または完全ヒト I g G 1 抗体の不完全抗体である。

10

【0028】

一実施形態において、低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、下記 b 1) - b 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、b 1) 配列番号 2 6、b 2) 配列番号 2 7、b 3) 配列番号 2 8、b 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば 1 ~ 5 個ののアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および / または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのホモダイマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対する b 1)、b 2) または b 3) ホモダイマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する。前記配列に含まれるシグナルペプチド領域配列、リンカー配列、ヒンジ領域、F c 領域および / または結合配列は、当業者に周知の方法または一般的に使用されるシグナルペプチド配列、リンカー配列、ヒンジ領域、F c 領域および / または結合配列によって任意に置き換えることができる。

20

【0029】

別の実施形態において、前記二重特異性組換えタンパク質は、以下の配列を含む。

【0030】

ここで、高親和性の腫瘍を標的とするアームが C D 2 0 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 1 6 と配列番号 1 7 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 または配列番号 2 7 または配列番号 2 8 を含み、

30

ここで、高親和性の腫瘍を標的とするアームが E G F R を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 1 9 と配列番号 8 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 または配列番号 2 7 または配列番号 2 8 を含み、

ここで、高親和性の腫瘍を標的とするアームが H e r 2 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 2 0 と配列番号 2 1、または配列番号 2 2 と配列番号 2 3 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 または配列番号 2 7 または配列番号 2 8 を含み、または

40

ここで、高親和性の腫瘍を標的とするアームが P D - L 1 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 2 4 と配列番号 1 3 を含み、前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 2 6 または配列番号 2 7 または配列番号 2 8 を含む。

【0031】

一態様において、本発明は、二重特異性組換えタンパク質をコードする核酸分子を提供する。好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と前記低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、同じ D N A 鎖に位置され、または前記高親和性の腫瘍を標的とするアームを

50

コードする核酸分子と前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、異なるDNA鎖に位置される。

【0032】

他の態様において、本発明は、核酸分子を含む発現ベクターを提供する。

【0033】

一態様において、本発明は、発現ベクターを含む細胞を提供する。

【0034】

他の態様において、本発明は、1)高親和性の腫瘍を標的とするアームを提供するステップと、2)低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を提供するステップと、3)高親和性の腫瘍を標的とするアームを低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に接触させて前記組換えタンパク質を形成するステップとを含む、二重特異性組換えタンパク質の製造方法をさらに提供する。

10

【0035】

一実施形態において、組換えタンパク質の製造方法は、発現ベクターを含む宿主細胞により当該組換えタンパク質を発現させるステップを含み、前記発現ベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸分子を含む。

【0036】

他の態様において、本発明は、腫瘍を標的とする治療の方法をさらに提供する。

【0037】

一実施形態において、腫瘍は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽頭癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮細胞癌、皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫または骨髄異形成症候群などの血液腫瘍および固形腫瘍から選択される。

20

【0038】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の組換えタンパク質または融合タンパク質および選択的のアジュバント、賦形剤または薬理学上許容されるベクターを含む薬物組成物をさらに提供する。組成物は、薬理学上許容されるベクターを含むことができる。組成物は、注射剤、散剤、凍結乾燥散剤などを含むがこれに限定されない任意の形態の薬物製剤として存在することができる。当該薬物製剤形態の薬物組成物は、医薬活性成分、本発明の組換えタンパク質または融合タンパク質を薬物ベクターと融合して、製剤の従来の技術に従って製造することができ、従来の製剤技術に従って所望の剤形に製造される。

30

【0039】

一実施形態において、本発明は、本発明組換えタンパク質または融合タンパク質をコードする核酸分子の発現ベクターと任意の薬理的に許容されるベクターを含む薬物組成物をさらに提供する。

【0040】

他の態様において、本発明は、患者または実験対象者に治療有効量の本発明に記載の薬物組成物を投与するステップを含む腫瘍の治療方法をさらに提供する。前記腫瘍は、追加の標的分子を発現し、前記標的は、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、P

40

50

S、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138を含むが、これに限定されない。

【0041】

さらに別の態様において、本発明は、患者または実験対象者に治療有効量の本発明の組換えタンパク質または融合タンパク質をコードする核酸分子またはその誘導体を導入するステップを含むインビボ遺伝子治療方法をさらに提供する。

【0042】

他の態様において、本発明は、a) 標的とされ、ADCC活性を有する組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を提供するステップと、b) 前記組換えタンパク質 / 抗体のADCC活性を検出するステップと、c) 前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含む、CD47を標的とし、且つADCC活性を有する組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法をさらに提供する。

10

【0043】

一実施形態において、本発明は、a) ヒトNK92MI-CD16aエフェクター細胞などであるが、これに限定されないエフェクター細胞を製造するステップと、b) エフェクター細胞を組換えタンパク質 / 抗体に接触させるステップと、c) 組換えタンパク質 / 抗体のADCC活性を検出するステップと、d) ADCC活性結果に従って、組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップを含む、CD47を標的とし、且つADCC活性を有する組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法を提供

20

【0044】

別の実施形態において、本発明は、a) 成長が良好なヒトNK92MI-CD16aエフェクター細胞を獲得し、獲得されたエフェクター細胞を 1×10^5 個の細胞/ml乃至 5×10^6 個の細胞/mlの細胞密度に再懸濁させるステップと、b) 勾配希釈した組換えタンパク質 / 抗体を、a) で製造されたエフェクター細胞と0.5~5hインキュベートするステップと、c) インキュベート完了後、LDH活性を測定し、細胞分解率を計算するステップと、d) 細胞分解率に従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップを含み、ここで、細胞分解率を低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、CD47を標的とし、且つADCC活性を有する組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法を提供する。

30

【0045】

さらに別の態様において、本発明は、a) CD47を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を提供するステップと、b) Hu-NSGマウスを提供するステップと、c) 前記組換えタンパク質 / 抗体をHu-NSGマウスに接触させるステップと、d) 前記Hu-NSGマウスにおける前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含む、CD47を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) の初期免疫安全性のインビボ評価方法をさらに提供する。

【0046】

一実施形態において、本発明は、a) Hu-NSGマウスを提供するステップと、b) 組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を投与するステップと、c) 24~96時間の投与後、マウス静脈血を採取し、赤血球を分解し、残りの細胞を蛍光標識した抗ヒトCD45、抗ヒトCD19または抗ヒトCD3の抗体とともに15~60minインキュベートし、フローサイトメトリー検出を行うステップと、d) 細胞クリアランスに従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップと含み、ここで、免疫細胞 (標的細胞を除く) クリアランスを低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、CD47を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) の初期免疫安全性のインビボ評価方法を提供する。

40

【発明の効果】

【0047】

50

本発明は、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質により、本発明の組換えタンパク質と非腫瘍細胞（例えば、赤血球、NK細胞、T細胞など）上のCD47標的との結合を低減し、それにより本発明に記載の組換えタンパク質の安全性（例えば、Hu5F9-G4などの抗CD47抗体/組換えタンパク質の回避、引き起こされる貧血、赤血球凝集、CD47陽性非腫瘍標的細胞殺傷、高親和性突然変異によるSIRP-Fc融合タンパク質によって引き起こされる潜在的な安全性、免疫原性、安定性などの不確実性に起因するリスクなどを低減する）を向上させる。

【0048】

本発明において、高親和性の腫瘍細胞を標的とするアームと、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックすることにより、本発明の組換えタンパク質と腫瘍細胞の結合親和性を有意に向上させ、それにより効率的に腫瘍細胞を殺傷する作用（抗体と腫瘍表面の標的抗原とが特異的に結合した後のエフェクター機能、マクロファージの標的食作用を含むが、これに限定されない）を媒介することが意外に見出された。

10

【0049】

本発明の組換えタンパク質は、高親和性の腫瘍を標的とするアーム（例えば、不完全抗体に限定されない）と、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質により二重標的作用を実現し、また本発明の結果から、本発明の組換えタンパク質は、高親和性の腫瘍を標的とするアームと、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質との間の複数の作用により、様々なメカニズムを介して、抗腫瘍作用を発揮し、薬物効果がより高いことを示す。

20

【0050】

二つの別個の標的抗体に比べて、本発明の組換えタンパク質は、低コスト、便利な使用などの利点を有するので、抗体の組み合わせの場合の低い患者コンプライアンスおよび高い治療コストなどの問題を解決できる。

【0051】

典型的な二重特異性抗体（二つの不完全抗体からなる）に比べて、本発明の組換えタンパク質は、CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の分子量が典型的な二重特異性抗体のシングルアーム（不完全抗体）より小さいので、組換えタンパク質の組織透過率は、典型的な二重特異性抗体より高く、薬物効果が高い。

30

【0052】

本発明の低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、異なる長さのSIRP細胞外トランシェーションを含み、高親和性の腫瘍を標的とするアーム（例えば、不完全抗体に限定されない）と迅速に最適化マッチングされることができ、二つの標的抗原を同時に結合する場合、従来の二機能性抗体が二つの標的抗原の空間構造の影響（特に、二つの標的抗原の抗体の認識部位と細胞膜との距離の差が大きい場合、腫瘍標的抗原及びCD47抗原と同時に結合しにくい問題）を受ける場合を回避して、獲得された組換えタンパク質が腫瘍細胞とより良く結合させるようにし、それにより、より良い腫瘍殺傷効力を発揮する。

【0053】

本発明は、CD47を標的とする免疫治療薬物の新規のインビトロ安全性の評価方法を提供する。従来の抗CD47抗体の初期安全性評価は、一般的に赤血球凝集に対する薬物の作用を検出することにより表かされた。しかし、ヒトSIRPとCD47の結合は、種の特異性があるので、CD47を標的とする組換えタンパク質/抗体が赤血球凝集の安全性の問題があるかどうかを評価する場合、ヒトの血液を使用する必要があり、ヒトの血液の使用は、倫理、遺伝資源などによって制限される。なお、赤血球凝集の実験では、薬物の免疫安全性を初期に評価することができない。本発明は、最適化されたADCC活性検出方法（初期インビトロ免疫安全性評価実験）を使用して、従来のヒト赤血球凝集実験を代替し、CD47を標的とし、ADCC活性を有する組換えタンパク質/抗体（一価または多価を含む）の初期免疫安全性を評価し、当該方法は、簡単で迅速であり、血液源によって制限されない。

40

50

【0054】

本発明は、CD47を標的とする免疫治療薬物の新規のインビボ安全性の評価方法を提供する。臨床前の薬物インビボ免疫安全性の評価は、一般的にヒト以外の霊長類を使用するので、必要なサンプル数が多くなり、初期サンプル製造の難しさとコストが増大する。他の種には、初期の生体内免疫安全性評価方法が成熟していないので、将来の臨床研究で大きな安全性リスクが生じ、研究開発投資が無駄になる。本発明は、Hu-NSGマウスを提供し、Hu-NSGマウスで実施された初期の安全性評価実験は、ヒト免疫系における薬物の安全性をシミュレートすることができ、臨床前または臨床研究と比較して、製造の難易度およびコストが削減され、低検出コストと高検出効率という利点があり、腫瘍免疫療法薬の研究開発のリスクを低減する。

10

【0055】

本発明は、組換えタンパク質を提供することにより、高親和性の腫瘍を標的とするアームを介して腫瘍に対する高親和性、特異的標的化を実現し、また低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を介してCD47-SIRPの相互作用に対するブロックを実現する。

【0056】

本発明の組換えタンパク質は、従来の二機能抗体目標産物の収率が低く、精製が難しい技術問題を克服することができる。本発明の一実施形態において、組換えタンパク質の右アーム(Fc knob突然変異)は、単鎖タンパク質であり、左アーム軽鎖、左アーム重鎖(Fc hole突然変異)および右アーム(Fc knob突然変異)が細胞で共発現すると、発現産物の80%以上がプロテインAによって精製され、発現率を効果的に向上させる。これらの産物の分子量、電荷分布などに明らかな違いがあることにより、少量の左アーム二量体、右アーム二量体、または左アームと右アームのアームモノマーが存在しても、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、分子アレイ、ブロッククロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、および塩析(硫酸アンモニウム沈殿など)などの通常の精製手段により除去され、工業規模の生産に適する。

20

【0057】

本発明の低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、高親和性の腫瘍を標的とするアーム(例えば、不完全抗体に限定されない)とCD47免疫抑制効果に拮抗する組換えタンパク質を形成することができる。

30

【0058】

本発明は、従来技術のSIRP-Fc融合タンパク質がCD47との親和性が低いために薬理的効率が低いという欠点を克服し、SIRP高親和性変異体がもたらす可能性のある免疫原性が高く、非腫瘍標的特異性が高いなどの多くの悪影響を回避した。同時に、本発明の組換えタンパク質は、正常細胞(例えば、赤血球)の表面に発現するCD47に対して弱い結合親和性を有するので、従来の抗CD47抗体処理によって生じる赤血球凝集、貧血などの副作用が低減または回避する。

【0059】

当業者は、本発明の保護範囲は、本発明の技術的解決策の一つが本発明に明示または暗示される一つの有益な効果を達成できるが、別の有益な効果を実現または完全に実現できなかったとして、不適切に制限されることではないことを理解すべきである。当業者は、本発明の保護範囲内で、任意の製品、方法、または使用が、いずれか一つの明示または暗示される本発明の有益な効果、または選択的に明示または暗示される本発明の有益な効果の組み合わせを獲得すると、本発明が解決しようとする技術的問題が解決され、対応する技術的効果の実現されたことを意味することを理解すべきである。

40

【0060】

具体的に、本発明は、以下の実施形態に関する。

【0061】

実施形態1. 腫瘍を標的とするアームとCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を含む、二重特異性組換えタンパク質。

50

【 0 0 6 2 】

実施形態 2 . C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、S I R P 細胞外トランケーション (ヒト S I R P 野生型細胞外トランケーションまたは C D 4 7 非高親和性突然変異のヒト S I R P 細胞外トランケーションを含む) を含む、実施形態 1 の二重特異性組換えタンパク質。

【 0 0 6 3 】

実施形態 3 . S I R P 細胞外トランケーションは、S I R P の細胞外アミノ酸配列の一部または全部を含む、実施形態 2 の二重特異性組換えタンパク質。

【 0 0 6 4 】

実施形態 4 . 高親和性の腫瘍を標的とするアームは、C D 4 7 に結合せず、かつ腫瘍細胞上の標的抗原に対する高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上の C D 4 7 に対する低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも 6 倍である、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 項の二重特異性組換えタンパク質。

10

【 0 0 6 5 】

実施形態 5 . S I R P 細胞外トランケーションは、下記 a 1) - a 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、a 1) 配列番号 3 0、a 2) 配列番号 3 1、a 3) 配列番号 3 2、a 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば 1 ~ 5 個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および / または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのモノマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対する a 1)、a 2) または a 3) モノマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 項の二重特異性組換えタンパク質。

20

【 0 0 6 6 】

実施形態 6 . 二重特異性組換えタンパク質は、相対的に設定される左、右のアーム構造を有し、高親和性の腫瘍を標的とするアームは、左アームの位置に位置され、低親和性の C D 4 7 と S I R P の相互作用をブロックする融合タンパク質は、右アームの位置に位置される、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 項の二重特異性組換えタンパク質。

【 0 0 6 7 】

実施形態 7 . 左アームは、免疫グロブリンの F a b または F a b ' 形態であり、右アームは、S I R P 細胞外トランケーションである、実施形態 6 の二重特異性組換えタンパク質。

30

【 0 0 6 8 】

実施形態 8 . 右アームの長さは、標的細胞膜の表面から左アームが結合する必要がある抗原空間エピトープの距離に適合する、実施形態 7 の二重特異性組換えタンパク質。

【 0 0 6 9 】

実施形態 9 . 高親和性の腫瘍を標的とするアームが標的細胞の膜の近位端エピトープに結合する必要がある場合、S I R P 細胞外トランケーションは、a 1) ~ a 4) 中の比較的短いアミノ酸配列を選択して含む実施形態 8 の二重特異性組換えタンパク質。

40

【 0 0 7 0 】

実施形態 1 0 . 高親和性の腫瘍を標的とするアームの標的化の標的は、5 T 4、A G S - 1 6、A L K 1、A N G - 2、B 7 - H 3、B 7 - H 4、c - f m s、c - M e t、C A 6、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、E p C A M、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 2、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 b、C D 9 8、C E A、C E A C A M 5、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C S 1、C X C R 4、D L L - 4、E G F R、E G P - 1、E N P P 3、E p h A 3、E T B R、F G F R 2、F N、F R - 、G C C、G D 2、G P C - 3、G P N M B、H E R 2、H E R 3、H L A - D R、I C A M - 1、I G F - 1 R、I L - 3 R、L I V - 1、M S L N、M U C 1 6、M U C 1、N a P i 2 b、ネクチン - 4、N o t c h 2、N o t c h 1、P D - L

50

1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138から選択される、実施形態1～9のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

【0071】

実施形態11．前記標的がCD20、EGFRまたはPD-L1である場合、SIRP細胞外トランセクションは、a1)を選択し、前記標的がHER2である場合、SIRP細胞外トランセクションは、a1)またはa2)を選択する、実施形態10の二重特異性組換えタンパク質。

【0072】

実施形態12．腫瘍を標的とするアームとCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、分子の間の作用力によって結合され、または鎖間ジスルフィド結合のような共有結合によって結合され、またはイオン結合によって結合され、または上記の結合方法における二つまたは三つの組み合わせによって結合される、実施形態1～11のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

【0073】

実施形態13．腫瘍を標的とするアームおよび/またはCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、Fc領域をさらに含む、実施形態1～12のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

【0074】

実施形態14．Fc領域は、Fc領域天然配列またはFc非天然配列を含む、実施形態13の二重特異性組換えタンパク質。

【0075】

実施形態15．Fc領域は、ヒトFc領域である、実施形態14の二重特異性組換えタンパク質。

【0076】

実施形態16．高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合は、knobs-into-holesによって結合される、実施形態15の二重特異性組換えタンパク質。

【0077】

実施形態17．腫瘍を標的とするアームは、標的化の標的が5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、Nap12b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138から選択される不完全抗体であり、好ましくは、IgG1抗体の不完全抗体であり、選択的に、ヒトマウスキメラ不完全抗体、ヒト化不完全抗体、完全ヒト不完全抗体であり、より好ましくは、ヒト化または完全ヒトIgG1抗体の不完全抗体である、実施形態1～16のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

【0078】

実施形態18．CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、SIRP細胞外トランセクションと前記アームを結合するための結合配列を含む融合タンパク質であって、SIRP細胞外トランセクションと前記アームを結合するための結合配列は、選択的に、リンカー配列によって連結され、前記アームを結合するための結

10

20

30

40

50

合配列は、選択的に、Fc領域である実施形態1～17のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

【0079】

実施形態19．CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、b1) - b4)から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、b1)配列番号26、b2)配列番号27、b3)配列番号28、b4)前記アミノ酸配列のいずれか一つのアミノ酸配列が例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのホモダイマーは、CD47タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、CD47タンパク質に対するb1)、b2)またはb3)ホモダイマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列である、実施形態1～18のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質。

10

【0080】

実施形態20．高親和性の腫瘍を標的とするアームがCD20を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号16と配列番号17を含み、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号26を含み、高親和性の腫瘍を標的とするアームがEGFRを標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号19と配列番号8を含み、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号26を含み、高親和性の腫瘍を標的とするアームがHer2を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号20と配列番号21、または配列番号22と配列番号23を含み、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号26または配列番号27を含み、または、高親和性の腫瘍を標的とするアームがPD-L1を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号24と配列番号13を含み、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号26を含む、実施形態19の二重特異性組換えタンパク質。

20

【0081】

実施形態21．実施形態1～20のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質をコードする核酸分子。

【0082】

実施形態22．高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、同じDNA鎖に位置され、又は異なるDNA鎖に位置される実施形態21の核酸分子。

30

【0083】

実施形態23．実施形態21または22の核酸分子を含む発現ベクター。

【0084】

実施形態24．実施形態23の発現ベクターを含む細胞。

【0085】

実施形態25．1)腫瘍を標的とするアームを提供するステップと、2)CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を提供するステップと、3)腫瘍を標的とするアームをCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に接触させて前記組換えタンパク質を形成するステップとを含む、実施形態1～20のいずれか1項の二重特異性組換えタンパク質の製造方法。

40

【0086】

実施形態26．実施形態24の細胞を使用して前記組換えタンパク質を発現させる、実施形態25の製造方法。

【0087】

実施形態27．実施形態25の製造方法であって、前記接触は、分子の間の作用力による結合、または鎖間ジスルフィド結合のような共有結合による結合、またはイオン結合による結合、または上記の結合方法における二つまたは三つの組み合わせによる結合を含む

50

。

【0088】

実施形態28．前記接触は、k n o b s - i n t o - h o l e s による技術結合を含む実施形態25～27のいずれか1項の製造方法。

【0089】

実施形態29．前記融合タンパク質は、S I R P 細胞外トランケーションと他のポリペプチドを結合するための結合配列を含むことを特徴とする融合タンパク質。

【0090】

実施形態30．他のポリペプチドを結合するための結合配列は、F c 領域であり、選択的に、F c 領域は、h o l e s 突然変異および/またはk n o b s 突然変異を含む、実施形態29の融合タンパク質。

10

【0091】

実施形態31．S I R P 細胞外トランケーションは、ヒトS I R P 野生型およびその非高親和性変異体の細胞外アミノ酸配列の一部または全部を含む実施形態29又は30の融合タンパク質。

【0092】

実施形態32．S I R P 細胞外トランケーションは、下記a 1) - a 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、a 1) 配列番号30、a 2) 配列番号31、a 3) 配列番号32、a 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのモノマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対するa 1)、a 2) またはa 3) モノマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する実施形態31の融合タンパク質。

20

【0093】

実施形態33．b 1) 配列番号26、b 2) 配列番号27、b 3) 配列番号28、b 4) 前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのホモダイマーは、C D 4 7 タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対するb 1)、b 2) またはb 3) ホモダイマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、b 1) - b 4) から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含む、実施形態29～32のいずれか1項の融合タンパク質。

30

【0094】

実施形態34．実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【0095】

実施形態35．実施形態34の核酸分子を含む発現ベクター。

【0096】

実施形態36．実施形態35の発現ベクターを含む細胞。

【0097】

実施形態37．1) S I R P 細胞外トランケーションを提供するステップと、2) 他のポリペプチドに結合するための結合配列を提供するステップと、3) S I R P 細胞外トランケーションを他のポリペプチドに結合するための結合配列に接触させて前記融合タンパク質を形成するステップとを含む、実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質の製造方法。

40

【0098】

実施形態38．実施形態32の細胞を使用して前記融合タンパク質を発現させる、実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質の製造方法。

【0099】

実施形態39．実施形態1～20のいずれか1項の組換えタンパク質または実施形態2

50

9～33のいずれか1項の融合タンパク質、および選択的なアジュバント、賦形剤または薬理学上許容されるベクターを含む、薬物組成物。

【0100】

実施形態40．注射剤または凍結乾燥粉末形態である、実施形態39の薬物組成物。

【0101】

実施形態41．実施形態1～20のいずれか1項の組換えタンパク質または実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質をコートする核酸分子、および選択的な薬理的に許容されるベクターを含む、薬物組成物。

【0102】

実施形態42．実施形態1～20のいずれか1項の組換えタンパク質の製造における実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質の用途。

【0103】

実施形態43．腫瘍を治療するための薬物の製造における実施形態1～20のいずれか1項の組換えタンパク質または実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質の用途。

【0104】

実施形態44．腫瘍は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽頭癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮細胞癌、皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫または骨髄異形成症候群などの血液腫瘍および固形腫瘍から選択される、実施形態43の用途。

【0105】

実施形態45．インビボ遺伝子治療方法のための薬物の製造における実施形態1～20のいずれか1項の組換えタンパク質または実施形態29～33のいずれか1項の融合タンパク質をコードする核酸分子またはその誘導体の用途。

【0106】

実施形態46．a) 標的とされ、ADCC活性を有する組換えタンパク質/抗体(一価または多価を含む)を提供するステップと、b) 前記組換えタンパク質/抗体のADCC活性を検出するステップと、c) 前記組換えタンパク質/抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含む、インビトロ評価CD47を標的とし、且つADCC活性を有する組換えタンパク質/抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法。

【0107】

実施形態47．a) ヒトNK92MI-CD16aエフェクター細胞などであるが、これに限定されないエフェクター細胞を製造するステップと、b) エフェクター細胞を組換えタンパク質/(一価または多価抗体を含む)抗体と接触させるステップと、c) 前記組換えタンパク質/抗体のADCC活性を検出するステップと、d) ADCC活性の結果に従って、前記組換えタンパク質/抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含む、インビトロ評価CD47を標的とし、且つADCC活性を有する組換えタンパク質/抗体の初期免疫安全性の評価方法。

【0108】

実施形態48．a) 成長が良好なヒトNK92MI-CD16aエフェクター細胞を獲得し、獲得されたエフェクター細胞を 1×10^5 個の細胞/ml乃至 5×10^6 個の細胞/mlの細胞密度に再懸濁させるステップと、b) 勾配希釈した組換えタンパク質/抗体を、a)で製造されたエフェクター細胞と0.5～5hインキュベートするステップと0.5～5hインキュベートするステップと、c) hインキュベート完了後、LDH活性を測定し、細胞分解率を計算するステップと、d) 細胞分解率に従って組換えタンパク質/抗体の初期免疫安全性を評価するステップを含み、ここで、細胞分解率を低下させる組換えタンパク質/抗体の免疫安全性が高い、実施形態47の評価方法。

【0109】

10

20

30

40

50

実施形態 49 . a) C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を提供するステップと、 b) H u - N S G マウスを提供するステップと、 c) 前記組換えタンパク質 / 抗体を H u - N S G マウスに接触させるステップと、 d) 前記 H u - N S G マウスにおける前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含む C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) の初期免疫安全性のインビボ評価方法。

【 0 1 1 0 】

実施形態 50 . a) H u - N S G マウスを提供するステップと、 b) 組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を投与するステップと、 c) 2 4 ~ 9 6 時間の投与後、マウス静脈血を採取し、赤血球を分解し、残りの細胞を蛍光標識した抗ヒト C D 4 5 、抗ヒト C D 1 9 または抗ヒト C D 3 の抗体とともに 1 5 ~ 6 0 m i n インキュベートし、フローサイトメトリー検出を行うステップと、 d) 細胞クリアランスに従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップと含み、ここで、免疫細胞 (標的細胞を除く) クリアランスを低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) の初期免疫安全性インビボ評価方法。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 1 】

【 図 1 】 本発明の挿入される発現ベクターの挿入物の構造模式図である。

【 図 2 】 本発明で使用される例示的な発現ベクター p C H O - T E 2 のプラスミドマップである。

【 図 3 】 本発明の組換えタンパク質の例示的な実施形態としての構造模式図である。

【 図 4 A 】 プロテイン A による精製後の組換えタンパク質の S D S - P A G E 電気泳動図である。図 4 A の第 1 ~ 6 レーンは、還元サンプルであり、それぞれ 1 : M a r k e r 、 2 : A n t i - C D 2 0 m A b (O f a t u m u m a b) 、 3 : A n t i - C D 4 7 m A b (H u 5 F 9 - G 4) 、 4 : S I R P D 1 - F c 、 5 : O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 、 6 : O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 であり、図 4 A の第 7 ~ 1 2 レーンは、非還元サンプルであり、それぞれ 7 : M a r k e r 、 8 : A n t i - C D 2 0 m A b (O f a t u m u m a b) 、 9 : A n t i - C D 4 7 m A b (H u 5 F 9 - G 4) 、 1 0 : S I R P D 1 - F c 、 1 1 : O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 、 1 2 : O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 である。

【 図 4 B 】 プロテイン A による精製後の組換えタンパク質の S D S - P A G E 電気泳動図である。図 4 B のレーン 1 は、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 非還元サンプルであり、レーン 2 は、M a r k e r であり、レーン 3 は、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 還元サンプルである。

【 図 5 】 本発明の組換えタンパク質とヒト C D 4 7 の結合親和性を E L I S A により測定した結果 (タンパク質レベル) である。

【 図 6 】 フローサイトメトリーによって本発明の組換えタンパク質とヒトヒト C D 4 7 の結合親和性を測定した結果 (細胞レベル) である。

【 図 7 】 フローサイトメトリーによって本発明の組換えタンパク質と対応する左アーム標的の結合力を測定した結果である。H u 5 F 9 - G 4 、 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 、 S I R P D 1 - F c は、サンプル H u 5 F 9 - G 4 、 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 、 S I R P D 1 - F c と抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2 によってブロックされなかった R a j i 細胞結合後の平均蛍光強度に対応し、H u 5 F 9 - G 4 (b) 、 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (b) 、 S I R P D 1 - F c (b) は、サンプル H u 5 F 9 - G 4 、 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 、 S I R P D 1 - F c と抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2 によってブロックされた R a j i 細胞結合後の平均蛍光強度に対応する。

【 図 8 】 フローサイトメトリーによって本発明の組換えタンパク質と C D 4 7 および左アーム標的の二重陽性細胞の結合親和性を測定した結果である。図 8 A では、R a j i 細胞 (

C D 2 0 + C D 4 7) を使用し、図 8 B では S K B R - 3 細胞 (H e r 2 + C D 4 7) を使用し、図 8 C では、A 4 3 1 細胞 (E G F R + C D 4 7) を使用し、図 8 D では、N C I - H 4 4 1 細胞 (P D - L 1 + C D 4 7) を使用した。

【図 9】E L I S A によって本発明の組換えタンパク質と C D 4 7 に対する S I R P D 1 - F c および抗 C D 4 7 抗体の競合的結合を測定した結果である。

【図 10】フローサイトメトリーによって本発明の組換えタンパク質およびその C D 4 7 高親和性変異体、抗 C D 4 7 抗体と、抗 C D 2 0 抗体とヒト C D 4 7 の結合親和性を測定した結果である。

【図 11】本発明の組換えタンパク質のインビトロ免疫安全性評価実験の結果である。

【図 12】R a j i リンパ腫皮下移植 N S G マウスモデルにおける本発明の組換えタンパク質の薬物効果を実験した結果である。

【図 13】同じ用量の異なるサンプルで H u - N S G マウスを処理した後、96 時間の B 細胞の含有量を検出した結果である。ここで、図 13 A では、0.9% の生理食塩水を使用し、図 13 B では、H u 5 F 9 - G 4 (6.7 μ g / 匹) を使用し、図 13 C では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (5 μ g / 匹) を使用した。

【図 14】H u - N S G 体内における O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 および O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2 初期安全性評価実験結果 (F A C S 免疫細胞タイピングアッセイ) である。図 14 A ~ D はそれぞれ O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (1 μ g / 匹) を使用し、ここで、図 14 A と図 14 B は、投与前の検出結果図であり、図 14 C と図 14 D は、投与 72 時間後の検出結果図である。図 14 E ~ H はそれぞれ O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2 (1 μ g / 匹) を使用し、ここで、図 14 E と図 14 F は、投与前の検出結果図であり、図 14 G と図 14 H は、投与 72 時間後の検出結果図である。

【図 15】高用量の異なるサンプルで H u - N S G マウスを処理した後、96 時間の F A C S 免疫細胞タイピングアッセイである。図 15 A ~ B は、投与した後 96 時間の結果であり、ここで、図 A では H u 5 F 9 - G 4 (200 μ g / 匹) を使用し、図 15 B では O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 高用量 (150 μ g / 匹) を使用した。図 15 C ~ D は、投与した後 14 日の結果であり、ここで、図 15 C では H u 5 F 9 - G 4 (200 μ g / 匹) を使用し、図 15 D では O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 高用量 (150 μ g / 匹) を使用した。

【図 16】本発明の組換えタンパク質の S K B R - 3 で二重標的 (H e r 2、C D 4 7) との結合状況である。図 16 A は、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2 と A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 サンプルの検出結果であり、図 16 B は、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2 と A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 サンプルの検出結果である。

【図 17 A】本発明の例示的な蛋白質の対応するアミノ酸配列と DNA 配列である。

【図 17 B】本発明の例示的な蛋白質の対応するアミノ酸配列と DNA 配列である。

【図 17 C】本発明の例示的な蛋白質の対応するアミノ酸配列と DNA 配列である。

【図 17 D】本発明の例示的な蛋白質の対応するアミノ酸配列と DNA 配列である。

【図 17 E】本発明の例示的な蛋白質の対応するアミノ酸配列と DNA 配列である。

【図 18】図 18 A は、カニクイザル赤血球の数に対する二つの用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の影響であり、図 18 B は、カニクイザルヘモグロビンに対する二つの用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の影響である。

【図 19】カニクイザル B 細胞含有量に対する二つの用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の検出結果である。

【図 20】ヒト B 細胞リンパ腫 D a u d i 皮下移植腫瘍の成長に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、リツキシマブ < 登録商標 > の影響である。

【図 21】担癌マウスの体重に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、リツキシマブ < 登録商標 > の影響である。

【図 22】ヒト B 細胞リンパ腫 D a u d i 皮下移植腫瘍に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、リツキシマブ < 登録商標 > の効果の腫瘍写真である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0112】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの実施形態を参照し、特定の言語を使用して本発明を説明する。しかし、これらの具体的な実施形態は、本発明の範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。記載された実施形態における任意の変更およびさらなる修正、ならびに本発明の任意のさらなる応用は、当業者には明らかである。

【0113】

組換えタンパク質

本明細書で使用される場合、用語「組換えタンパク質」とは、天然に存在するタンパク質ではなく、設計/構築されたタンパク質を指す。本発明の「組換えタンパク質」における「組換え」は、その生産方法を意味するものではなく、単に「組換えタンパク質」が自然に存在しないことを示すために使用される。本発明の組換えタンパク質は、発現タンパク質であってもよく、組み立てタンパク質であってもよい。

10

【0114】

選択的に、本発明の組換えタンパク質は、高親和性の腫瘍を標的とするアームおよび低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を含む。

【0115】

本明細書で使用する「高親和性標的腫瘍」は、本発明の組換えタンパク質の腫瘍に対する結合親和性が、先行技術における腫瘍に結合する抗体ベースの薬物の結合親和性よりも高いかまたは略同等であることを意味し、通常、先行技術において、腫瘍への結合親和性に対する腫瘍に結合する抗体ベースの薬物の結合親和性EC50は、一般的にnMまたはpMレベルである。好ましくは、本発明の組換えタンパク質において、腫瘍細胞上の標的抗原に対する高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上のCD47に対する低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍であり、選択的に、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍であり、またはより高い倍数であり、またはその間の任意の数値である。選択的に、本発明の組換えタンパク質において、腫瘍細胞上の標的抗原に対する高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上のCD47に対する低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するSIRP-Fcホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍であり、選択的に、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍であり、またはより高い倍数であり、またはその間の任意の数値である。

20

30

【0116】

本明細書で使用する「低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする」は、本発明の組換えタンパク質が低い親和性でCD47とSIRPの相互作用をブロックすることを指す。好ましくは、CD47に対する本発明の組換えタンパク質における低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合親和性は、CD47に対するSIRP細胞外ドメインを含むモノマー融合タンパク質のホモダイマーの結合親和性より高くない。より好ましくは、CD47に対するヒトSIRP-Fc融合タンパク質の結合親和性より高くない。

40

【0117】

本明細書に記載の二重特異性組換えタンパク質は、腫瘍細胞上の標的抗原に対する高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性が、腫瘍細胞上のCD47に対するCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質のアームに対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍である場合、マクロファージ機能を調節する組換えタンパク質の腫瘍標的飽和結合度を有意に向上させ、非腫瘍標的の副作用の欠陥を低減することを実現することができる。

【0118】

50

本明細書で使用する結合親和性の測定方法は、当業者に周知であり、例えば、E L I S A および / またはフローサイトメトリーを含むがこれに限定されない。

【 0 1 1 9 】

選択的に、本発明に記載のシグナル調節タンパク質 細胞外トランケーション（野生型細胞外トランケーションおよび非高親和性変異体細胞外トランケーションを含む）- F c 融合タンパク質と不完全抗体は、抗体重鎖を修飾してヘテロ二量体を形成することができ、具体的に、例えば、K n o b s - i n t o - h o l e s 連結および / または鎖間ジスルフィド結合および / またはイオン結合媒介により、組換えタンパク質を獲得することができる。

【 0 1 2 0 】

選択的に、「腫瘍を標的とするアーム」または「不完全抗体」または「左アーム」または「不完全抗体構造」または「I g 分子モノマー」と「C D 4 7 を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション - F c 融合タンパク質」または「S I R P - F c」が k n o b s - i n t o - h o l e s 連結を介して組換えタンパク質を獲得する場合、獲得された組換えタンパク質の構造は、図 3 に示した通りである。ここで、左アームは、腫瘍を標的とする不完全抗体であり、抗 5 T 4 不完全抗体、抗 A G S - 1 6 不完全抗体、抗 A L K 1 不完全抗体、抗 A N G - 2 不完全抗体、抗 B 7 - H 3 不完全抗体、抗 B 7 - H 4 不完全抗体、抗 c - f m s 不完全抗体、抗 c - M e t 不完全抗体、抗 C A 6 不完全抗体、抗 C D 1 2 3 不完全抗体、抗 C D 1 9 不完全抗体、抗 C D 2 0 不完全抗体、抗 C D 2 2 不完全抗体、抗 E p C A M 不完全抗体、抗 C D 3 0 不完全抗体、抗 C D 3 2 b 不完全抗体、抗 C D 3 7 不完全抗体、抗 C D 3 8 不完全抗体、抗 C D 4 0 不完全抗体、抗 C D 5 2 不完全抗体、抗 C D 7 0 不完全抗体、抗 C D 7 4 不完全抗体、抗 C D 7 9 b 不完全抗体、抗 C D 9 8 不完全抗体、抗 C E A 不完全抗体、抗 C E A C A M 5 不完全抗体、抗 C L D N 1 8 . 2 不完全抗体、抗 C L D N 6 不完全抗体、抗 C S 1 不完全抗体、抗 C X C R 4 不完全抗体、抗 D L L - 4 不完全抗体、抗 E G F R 不完全抗体、抗 E G P - 1 不完全抗体、抗 E N P P 3 不完全抗体、抗 E p h A 3 不完全抗体、抗 E T B R 不完全抗体、抗 F G F R 2 不完全抗体、抗 F N 不完全抗体、抗 F R - 不完全抗体、抗 G C C 不完全抗体、抗 G D 2 不完全抗体、抗 G P C - 3 不完全抗体、抗 G P N M B 不完全抗体、抗 H E R 2 不完全抗体、抗 H E R 3 不完全抗体、抗 H L A - D R 不完全抗体、抗 I C A M - 1 不完全抗体、抗 I G F - 1 R 不完全抗体、抗 I L - 3 R 不完全抗体、抗 L I V - 1 不完全抗体、抗 M S L N 不完全抗体、抗 M U C 1 6 不完全抗体、抗 M U C 1 不完全抗体、抗 N a P i 2 b 不完全抗体、抗ネクチン - 4 不完全抗体、抗 N o t c h 2 不完全抗体、抗 N o t c h 1 不完全抗体、抗 P D - L 1 不完全抗体、抗 P D - L 2 不完全抗体、抗 P D G F R - 不完全抗体、抗 P S 不完全抗体、抗 P S M A 不完全抗体、抗 S L T R K 6 不完全抗体、抗 S T E A P 1 不完全抗体、抗 T E M 1 不完全抗体、抗 V E G F R 不完全抗体、抗 C D 2 5 不完全抗体、抗 C D 2 7 L 不完全抗体、抗 D K K - 1 不完全抗体、抗 C S F - 1 R 不完全抗体、抗 M S B 0 0 1 0 7 1 8 C 不完全抗体、抗 B C M A 不完全抗体、抗 C D 1 3 8 不完全抗体を含むがこれに限定されない。右アームは、S I R P （ヒト S I R P 野生型および非高親和性変異体を含む）細胞外トランケーションが I g G 抗体のヒンジ領域と F c 領域に連結することによって形成される融合タンパク質である。ここで、右アーム F c 領域が h o l e 変異体である場合、対応する左アーム F c 領域は、k n o b 変異体であり、右アームが k n o b 変異体である場合、対応する左アーム F c 領域は、h o l e 変異体である。当業者に知られているように、F c 領域は複数の h o l e s および / または k n o b s の突然変異を同時に製造することもできる。

【 0 1 2 1 】

以下の表 1 は、組換えタンパク質の例示的な分子構造である。

【 0 1 2 2 】

【表 1】

表 1 組換えタンパク質の分子構造の例示

番号	左アーム	右アーム
1	A n t i - C D 2 0 - F c 1	D 1 - F c 2
2	A n t i - C D 2 0 - F c 1	D 1 - D 2 - F c 2
3	A n t i - C D 2 0 - F c 1	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2
4	A n t i - C D 2 0 - F c 1	D 1 ^m - F c 2
5	A n t i - C D 2 0 - F c 1	D 1 ^m - D 2 - F c 2
6	A n t i - P D - L 1 - F c 1	D 1 - F c 2
7	A n t i - P D - L 1 - F c 1	D 1 - D 2 - F c 2
8	A n t i - P D - L 1 - F c 1	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2
9	A n t i - P D - L 1 - F c 1	D 1 ^m - F c 2
1 0	A n t i - P D - L 1 - F c 1	D 1 ^m - D 2 - F c 2
1 1	A n t i - E G F R - F	D 1 - F c 2

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

	c 1	
1 2	A n t i - E G F R - F c 1	D 1 - D 2 - F c 2
1 3	A n t i - E G F R - F c 1	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2
1 4	A n t i - E G F R - F c 1	D 1 ^m - F c 2
1 5	A n t i - E G F R - F c 1	D 1 ^m - D 2 - F c 2
1 6	A n t i - H e r 2 - F c 1	D 1 - F c 2
1 7	A n t i - H e r 2 - F c 1	D 1 - D 2 - F c 2
1 8	A n t i - H e r 2 - F c 1	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2
1 9	A n t i - H e r 2 - F c 1	D 1 ^m - F c 2
2 0	A n t i - H e r 2 - F c 1	D 1 ^m - D 2 - F c 2

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

D 1^m は、S I R P 細胞外トランケーション D 1 の高親和性変異体を示し、D 1 は、ヒト S I R P 野生型および非高親和性変異体の細胞外 D 1 ドメインを示し、F c は、野生型 F c 領域を示し、F c 1 は、h o l e または h o l e s 突然変異を有する F c 領域を示し、F c 2 は、k n o b または k n o b s 突然変異を有する F c 領域を示す。

【 0 1 2 5 】

本発明組換えタンパク質の対応するアミノ酸配列と D N A 配列は、図 1 7 A ~ E に示され、本発明の配列表ファイルに見出される。

【 0 1 2 6 】

抗体

本明細書で使用される場合、用語「抗体」または「免疫グロブリン」は、2つの同じ軽鎖 (L) および2つの同じ重鎖 (H) からなる、同じ構造的特徴を有する約 1 5 0 0 0 0

ダルトンのアイソテトラマー糖タンパク質である。各軽鎖は、一つの共有結合のジスルフィド結合によって重鎖に連結され、異なる免疫グロブリンのアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は異なる。各重鎖と軽鎖には、一定の間隔で鎖内ジスルフィド結合がある。各重鎖の一端には可変領域（VH）があり、その後には複数の定常領域がある。各軽鎖の一端には可変領域（VL）があり、他端には定常領域があり、軽鎖の定常領域と重鎖の最初の定常領域は対向し、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域は対向し。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変領域間に界面を形成する。

【0127】

腫瘍を標的とするアーム

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍を標的とするアーム」または「不完全抗体」または「左アーム」または「不完全抗体構造」または「Ig分子モノマー」は、抗体の一つの軽鎖（L）および一つの重鎖（H）からなるヘテロ二糖類タンパク質であり、免疫グロブリン分子を形成する基本構造であり、本発明において互換的に使用することができ、その分子量は、抗体分子量の半分に対応し、約75000ダルトンであり、ここで、軽鎖は、一つの共有結合のジスルフィド結合によって重鎖に結合される。重鎖と軽鎖にも一定の間隔で鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖の一端には、可変領域（VH）があり、その後には複数の定常領域がある。各軽鎖の一端には可変領域（VL）があり、他端には定常領域があり、軽鎖の定常領域と重鎖の最初の定常領域は対向し、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域は対向し。特定のアミノ酸残基は、軽鎖と重鎖の可変領域間に界面を形成する。

10

20

【0128】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍を標的とするアーム」、「不完全抗体」または「左アーム」または「不完全抗体構造」または「Ig分子モノマー」は、様々な腫瘍を標的とするIgGタンパク質であることができる。腫瘍標的分子は、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、Napi2b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138を含むが、これらに限定されない。

30

【0129】

「腫瘍を標的とするアーム」、「不完全抗体」または「左アーム」または「不完全抗体構造」または「Ig分子モノマー」のFc配列は、holeまたはholes変異体および/またはknobまたはknobs変異体を使用することができる。

40

【0130】

CD47を標的とするアーム

本明細書で使用される場合、用語「CD47を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション-Fc融合タンパク質」または「SIRP-Fc」または「CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質」は、本発明において交換可能に使用することができる。当業者に知られているように、前記「CD47を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション-Fc融合タンパク質」または「SIRP-Fc」または「CD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質」分子の長さは変えられる。選択的に、SIRP（ヒトSIRP野生型および非高親和性変異体を含む）の細胞外トランケーションをIgG1抗体のヒンジ領域およびFc領域に連結すること

50

により、複数の分子長さの異なる「CD47を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション - Fc融合タンパク質」または「SIRP - Fc」または「CD47とSIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質」を形成することができる。IgG1は、ヒトIgG1であることができる。

【0131】

「CD47を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション - Fc融合タンパク質」または「SIRP - Fc」または「CD47とSIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質」のFcは、knobまたはknobs変異体および/またはholeまたはholes変異体を使用することができる。

10

【0132】

「腫瘍を標的とするアーム」または「不完全抗体」または「左アーム」または「不完全抗体構造」または「Ig分子モノマー」および「CD47を標的とするアーム」または「右アーム」または「シグナル調節タンパク質 トランケーション - Fc融合タンパク質」または「SIRP - Fc」または「CD47とSIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質」は、当業者に知られているように、Fcフラグメント（領域）を改造することによりヘテロ二量体組換えタンパク質を形成することができる。具体的に、本発明の組換えタンパク質は、分子の間の作用力によって得られることができ、鎖間ジスルフィド結合のような共有結合によって得られることもでき、イオン結合媒介によって得られることもでき、また前記三つの技術における二つまたは三つの任意に組み合わせによって得られることもできる。選択的に、本発明の組換えタンパク質は、knobs - into - holes技術によって結合される。

20

【0133】

knobs - into - holes技術

本明細書で使用される場合、用語「knobs - into - holes技術」または「杵臼」技術または「突起 - 入り - 空洞」技術または「ボタン」技術は、遺伝子工学技術を使用して、重鎖の二つのCH3ドメインに異なる突然変異を導入して、重鎖のヘテロ二量体化を引き起こし、一つの重鎖に一つのノブ（knob）を作り、他方の重鎖にホール（hole）を作り、その後二つが優先的に咬合して、非対称抗体を形成する（Ridgway JB, et al. 'Knobs - into - holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Engineering, 1996, 9(7): 617 - 621)。当業者に知られているように、一つの重鎖に複数のノブ（knob）および/またはホール（hole）を作りことができ、対応的に、他方の重鎖に複数のホール（hole）および/またはノブ（knob）を作ることができる。

30

【0134】

SIRP

本明細書で使用される場合、用語「SIRP」は、シグナル調節タンパク質（Signal Regulatory Protein）であり、CD172aとも称される。シグナル調節タンパク質（SIRP）は、三つのファミリーメンバ、SIRP（CD172a）、SIRP（CD172b）、およびSIRP（CD172g）を含む膜貫通糖タンパク質である。これらの三つのメンバーは、外膜の端が似ているが、内膜の領域が異なる。膜の外端には三つの免疫グロブリン（Ig）様領域が含まれ、その第1領域はIgV領域に属し、第2と第3領域はIgC領域に属する。SIRP（CD172a）の膜内領域には、阻害シグナルを伝達し、細胞の対応する機能を阻害する二つの阻害シグナルドメインが含まれる。SIRP（CD172b）およびSIRP（CD172g）の細胞内領域は短く、シグナル伝達領域はないが、SIRP（CD172b）はアダプタータンパク質（Adaptor protein、DAP12など）を介して活性化シグナルを伝達することができる。SIRPタンパク質は、主にマクロファージ（

40

50

M)、樹状細胞(DC)、および神経細胞で発現する。本明細書は、特に、ヒトSIRP野生型とそのCD47非高親和性変異体を指す。

【0135】

SIRP 細胞外トランケーション

「細胞外トランケーション」は、膜貫通機能を有するタンパク質を指す。本明細書で用いられる「SIRP 細胞外トランケーション」は、細胞膜の外側空間に全体的または部分的に位置するアミノ酸配列を選択的にトランケーションするヒトSIRP野生型およびそのCD47非高親和性変異体を指す。

【0136】

本明細書で使用される場合、用語「D1、D2、D3」は、タンパク質のアミノ基端から順次に、D1ドメイン(Ig可変領域様ドメイン, IgV領域)、D2ドメイン(Ig定常領域様ドメイン, IgC領域)及びD3ドメイン(Ig定常領域様ドメイン, IgC領域)であるSIRP細胞外の三つのIg様ドメインを指す(Lee WY, et al. The Role of cis Dimerization of Signal Regulatory Protein (SIRP) in Binding to CD47. J Biol Chem, 2010, 285 (49): 37953 - 37963)。

10

【0137】

SIRP - Fc融合タンパク質

本明細書で使用される場合、用語「SIRP - Fc融合タンパク質」は、SIRP細胞外トランケーション、リンカー配列およびFc領域を含む融合タンパク質を指す。前記配列に含まれるリンカー配列および/またはFc領域は、当業者に周知の方法または従来のリンカー配列および/またはFc領域に従って任意に置換することができる。

20

【0138】

グリコシル化の影響を回避するために、本発明は、D1をアスパラギンからアラニンへのD1の突然変異を実施した(参考文献: Lee WY, et al. Novel Structural Determinants on SIRP that Mediate Binding to CD47. Journal of Immunology, 2007, 179 (11): 7741 - 7750)。

30

【0139】

本発明のD1、D2、D3は、対応するリンカー配列をさらに含む。

【0140】

リンカー配列

本明細書で使用されるように、用語「リンカー配列」は、SIRP細胞外トランケーションと結合配列を連結するアミノ酸配列を指し、選択的に、IgG抗体のヒンジ領域であり、選択的に、ヒンジ領域とIgG重鎖CH1ドメインを含む。前記配列に含まれるリンカー配列またはヒンジ領域配列は、当業者に周知の方法または従来のリンカー配列またはヒンジ領域配列に従って任意に置換することができる。

【0141】

結合配列

本明細書で使用されるように、用語「結合配列」は、高親和性の腫瘍を標的とするアームと、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質を結合させる配列を指し、選択的に、前記結合配列は、ヒンジ領域とFc領域を含み、より選択的に、前記Fc領域は、knobまたはknobsおよび/またはholeまたはholes突然変異を含む。前記配列に含まれる結合配列またはヒンジ領域またはFc領域配列は、当業者に周知の方法または従来の結合配列またはヒンジ領域またはFc領域配列に従って任意に置換することができる。

40

【0142】

CD47

CD47は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通糖タンパク質であり、

50

赤血球を含むほぼすべての細胞表面に発現する。CD47のリガンドには、接着因子（インテグリン）、 тромбоспонジン1（thrombospondin-1）、およびシグナル調節タンパク質（SIRP）を含む。CD47は、細胞移動、T細胞、樹状細胞の活性化、軸索の発達などを含むさまざまな生物学的機能を有する。さらに、CD47はSIRPと相互作用することによりマクロファージの食作用を阻害する。CD47は、このような方法でいわゆる「食べないでください」（「Don't eat me」）信号を送信し、赤血球、B細胞、T細胞などの正常細胞をマクロファージによる食作用から保護する。

【0143】

Ofa

10

本明細書で使用される場合、用語「Ofa」、「Ofatumumab」、「Anti-CD20（Ofatumumab）」は、本発明で交換的に使用することができ、抗CD20抗体Ofatumumabを示す。

【0144】

Obi

本明細書で使用されるように、用語「Obi」、「Obinutuzumab」、「Anti-CD20（Obinutuzumab）」は、本発明で交換的に使用することができ、抗CD20抗体Obinutuzumabを示す。

【0145】

Hu5F9-G4

20

本明細書で使用されるように、用語「Anti-CD47 mAb」、「抗CD47抗体」、「Hu5F9-G4」は、本発明で交換的に使用することができ、抗CD47抗体Hu5F9-G4を示す。

【0146】

Anti-EGFR mAb

本明細書で使用される場合、用語「Anti-EGFR mAb」、「JMT101」は、本発明で交換的に使用することができ、抗EGFR抗体JMT101を示す。JMT101は、ヒト化抗EGFRモノクローナル抗体であり、ZL201210406288.3特許BA03を参照することができる。

【0147】

トラスツズマブモノクローナル抗体

30

本明細書で使用されるように、用語「トラスツズマブモノクローナル抗体」、「Trastuzumab」、「Anti-Her2（T） mAb」、「Herceptin」は、本発明で交換的に使用することができ、抗Her2抗体Trastuzumabを示す。

【0148】

ペルツズマブモノクローナル抗体

本明細書で使用されるように、用語「ペルツズマブモノクローナル抗体」、「Pertuzumab」、「Anti-Her2（P） mAb」、「Perjeta」は、本発明で交換的に使用することができ、抗Her2抗体Pertuzumabを示す。

40

【0149】

Atezolizumab

本明細書で使用されるように、用語「Tecentriq」、「Atezolizumab」は、本発明で交換的に使用することができ、抗PD-L1抗体Atezolizumabを示す。

【0150】

SIRP D1-Fc

本明細書で使用されるように、用語「SIRP D1-Fc」、「D1-Fc」は、本発明で交換的に使用することができ、一本鎖融合タンパク質SIRP D1-Fcの二量体を示す。

50

【0151】

O f a - F c 1

h o l e 突然変異を有する F c 領域の O f a t u m u m a b 不完全抗体を示す。

【0152】

A n t i - H e r 2 (T) - F c 1

h o l e 突然変異を有する F c 領域の T r a n s t u z u m a b 不完全抗体を示す。

【0153】

A n t i - H e r 2 (P) - F c 1

h o l e 突然変異を有する F c 領域の P e r t u z u m a b 不完全抗体を示す。

【0154】

A n t i - E G F R - F c 1

h o l e 突然変異を有する F c 領域の抗 E G F R 不完全抗体を示す。

【0155】

D 1 - F c 2

S I R P D 1 ドメイン細胞外トランケーションと k n o b 突然変異を有する F c 領域を含む融合タンパク質を示す。

【0156】

D 1 - D 2 - F c 2

S I R P D 1 および D 2 ドメイン細胞外トランケーションと k n o b 突然変異を有する F c 領域を含む融合タンパク質を示す。

【0157】

D 1 - D 2 - D 3 - F c 2

S I R P D 1、D 2 および D 3 ドメイン細胞外トランケーションと k n o b 突然変異を有する F c 領域を含む融合タンパク質を示す。

【0158】

治療

本明細書で使用される場合、用語「治療」、「治療方法」および「治癒」は、交換的に使用することができる。用語「治療」は、疾患、病症、病状、および関連する症状の進行を制御すること、好ましくは、疾患、病症、病状を低減し、または疾患、病症、病状の一つまたは複数の症状の影響を緩和することを含む。この用語は、疾患の治癒または症状の完全な除去を含む。この用語は、症状の緩和を含む。この用語は、非治癒の緩和治療も含むが、これに限定されない。用語「治療する」は、疾患、病症、病状の進行、またはまたは疾患、病症、病状の一つまたは複数の症状の影響を予防または遅延、低減または緩和するために、本発明の組換えタンパク質または融合タンパク質を含む医薬組成物の治療有効量を実験対象者に投与することを含む。

【0159】

投与

本明細書で使用されるように、用語「投与」は、本発明の組換えタンパク質または融合タンパク質を含む医薬組成物の治療有効量を実験対象者へ送達することを指す。投与は、全身的投与または局所的投与であり得る。投与は、注射器などの投与装置によることができる。投与方法は、埋め込み、経鼻吸入、噴霧、注射などを含むが、これらに限定されない。投与経路は、吸入、鼻腔内、経口、静脈内、皮下または筋肉内投与などを含む。

【0160】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

配列名と配列番号の対応関係

配列番号	配列名
配列番号 1	O f a 重鎖アミノ酸配列
配列番号 2	O f a 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 3	O b i 重鎖アミノ酸配列
配列番号 4	O b i / O b i - F c 1 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 5	H u 5 F 9 - G 4 重鎖アミノ酸配列
配列番号 6	H u 5 F 9 - G 4 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 7	J M T 1 0 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 8	J M T 1 0 1 / A n t i - E G F R - F c 1 軽鎖 アミノ酸配列
配列番号 9	T r a s t u z u m a b 重鎖アミノ酸配列
配列番号 10	T r a s t u z u m a b 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 11	S I R P α D 1 - F c アミノ酸配列
配列番号 12	A t e z o l i z u m a b 重鎖アミノ酸配列
配列番号 13	A t e z o l i z u m a b / A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 14	D 1 - F c 2 DNA配列
配列番号 15	D 1 - D 2 - F c 2 DNA配列
配列番号 16	O f a - F c 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 17	O f a - F c 1 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 18	O b i - F c 1 重鎖アミノ酸配列

10

20

30

40

【 0 1 6 1 】

配列番号 19	A n t i - E G F R - F c 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 20	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 21	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 22	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 23	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 軽鎖アミノ酸配列
配列番号 24	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 重鎖アミノ酸配列
配列番号 25	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 DNA配列
配列番号 26	D 1 - F c 2 アミノ酸配列
配列番号 27	D 1 - D 2 - F c 2 アミノ酸配列
配列番号 28	D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 アミノ酸配列
配列番号 29	D 1 ^m - F c 2 アミノ酸配列
配列番号 30	D 1 アミノ酸配列
配列番号 31	D 1 - D 2 アミノ酸配列
配列番号 32	D 1 - D 2 - D 3 アミノ酸配列
配列番号 33	D 1 ^m アミノ酸配列
配列番号 34	O f a - F c 1 重鎖DNA配列
配列番号 35	O f a - F c 1 軽鎖DNA配列
配列番号 36	O b i - F c 1 重鎖DNA配列

10

20

30

40

配列番号 37	A n t i - E G F R - F c 1 重鎖DNA配列
配列番号 38	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 重鎖DNA配列
配列番号 39	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 軽鎖DNA配列
配列番号 40	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 重鎖DNA配列
配列番号 41	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 軽鎖DNA配列
配列番号 42	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 重鎖DNA配列
配列番号 43	D 1 ^m - F c 2 DNA配列
配列番号 44	D 1 ^m - D 2 - F c 2 アミノ酸配列

10

20

【 0 1 6 3 】

【表 2 - 2】

組換えタンパク質と配列の対応関係

タンパク質の名称	配列表に対応する配列番号
S I R P α D 1 - F c	配列番号 1 1
O f a - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 1 6 (O f a - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 7 (O f a - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)
O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	配列番号 1 6 (O f a - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 7 (O f a - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m - F c 2)
O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	配列番号 1 6 (O f a - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 7 (O f a - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 7 (D 1 - D 2 - F c 2)
O f a - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号 1 6 (O f a - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 7 (O f a - F c 1 軽鎖) + 配列番号 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)
O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	配列番号 1 6 (O f a - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 7 (O f a - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1 - D 2 - D 3 - F c 2)
O b i - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 1 8 (O b i - F c 1 重鎖) + 配列番号 4 (O b i - F c 1 軽鎖) + 配列 番号 2 6 (D 1 - F c 2)
A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 2 4 (A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 0 (A n t

10

20

30

40

【 0 1 6 4 】

	i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	
A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 0 (A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 0 (A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	10
A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 重 鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列 番号 1 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	20
A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 1 9 (A n t i - E G F R - F c 1 重鎖) + 配列番号 8 (A n t i - E G F R - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	30
A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 2 0 (A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 重鎖) + 配列番号 2 1 (A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	40
A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2	配列番号 2 2 (A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 重鎖) + 配列番号 2 3 (A n t i -	

	He r 2 (P) - F c 1 輕鎖) + 配列番号 2 6 (D 1 - F c 2)	
O b i - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	配列番号 1 8 (O b i - F c 1 重鎖) + 配列番号 4 (O b i - F c 1 輕鎖) + 配列 番号 2 9 (D 1 ^m - F c 2)	10
A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	配列番号 2 4 (A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 重鎖) + 配列番号 1 0 (A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 輕鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m - F c 2)	
A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 0 (A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 0 (A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 輕鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m - F c 2)	20
A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 輕鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m - F c 2)	30
A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	配列番号 1 9 (A n t i - E G F R - F c 1 重鎖) + 配列番号 8 (A n t i - E G F R - F c 1 輕鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m	40

	— F c 2)	
A n t i — H e r 2 (T) — F c 1 — D 1 ^m — F c 2	配列番号 2 0 (A n t i — H e r 2 (T) — F c 1 重鎖) + 配列番号 2 1 (A n t i — H e r 2 (T) — F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m — F c 2)	10
A n t i — H e r 2 (P) — F c 1 — D 1 ^m — F c 2	配列番号 2 2 (A n t i — H e r 2 (P) — F c 1 重鎖) + 配列番号 2 3 (A n t i — H e r 2 (P) — F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 9 (D 1 ^m — F c 2)	
O b i — F c 1 — D 1 — D 2 — F c 2	配列番号 1 8 (O b i — F c 1 重鎖) + 配列番号 4 (O b i — F c 1 軽鎖) + 配列 番号 2 7 (D 1 — D 2 — F c 2)	20
A n t i — P D — L 1 (A t e) — F c 1 — D 1 — D 2 — F c 2	配列番号 2 4 (A n t i — P D — L 1 (A t e) — F c 1 重鎖) + 配列番号 1 0 (A n t i — P D — L 1 (A t e) — F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 7 (D 1 — D 2 — F c 2)	30
A n t i — P D — L 1 (1 3 G 4) — F c 1 — D 1 — D 2 — F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 0 (A n t i — P D — L 1 (1 3 G 4) — F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 0 (A n t i — P D — L 1 (1 3 G 4) — F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 7 (D 1 — D 2 — F c 2)	40
A n t i — P D — L 1 (1 2 A 4) — F c 1 — D 1 — D 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 (A n t i — P D — L 1 (1 2 A 4) — F c	

- F c 2	1 重鎖) + CN104356236A 配列番号12 (Anti-PD-L1 (12 A4) - F c 1 軽鎖) + 配列番号27 (D 1-D2-F c 2)	
Anti-EGFR-F c 1 -D1-D2-F c 2	配列番号19 (Anti-EGFR-F c 1 重鎖) + 配列番号8 (Anti-EGF R-F c 1 軽鎖) + 配列番号27 (D1- D2-F c 2)	10
Anti-Her2 (T) - F c 1-D1-D2-F c 2	配列番号20 (Anti-Her2 (T) - F c 1 重鎖) + 配列番号21 (Anti- Her2 (T) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 27 (D1-D2-F c 2)	20
Anti-Her2 (P) - F c 1-D1-D2-F c 2	配列番号22 (Anti-Her2 (P) - F c 1 重鎖) + 配列番号23 (Anti- Her2 (P) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 27 (D1-D2-F c 2)	30
O b i - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号18 (O b i - F c 1 重鎖) + 配列番号4 (O b i - F c 1 軽鎖) + 配列 番号44 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	
Anti-PD-L1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号24 (Anti-PD-L1 (A t e) - F c 1 重鎖) + 配列番号10 (A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 軽鎖) + 配列番号44 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	40
Anti-PD-L1 (13	CN104356236A 配列番号10	

G 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	(A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 0 (A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	10
A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 2 (A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	20
A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号 1 9 (A n t i - E G F R - F c 1 重鎖) + 配列番号 8 (A n t i - E G F R - F c 1 軽鎖) + 配列番号 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	30
A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号 2 0 (A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 重鎖) + 配列番号 2 1 (A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	40
A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	配列番号 2 2 (A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 重鎖) + 配列番号 2 3 (A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 軽鎖) + S E Q I D 4 4 (D 1 ^m - D 2 - F c 2)	
O b i - F c 1 - D 1 - D 2	配列番号 1 8 (O b i - F c 1 重鎖) +	

-D 3-F c 2	配列番号 4 (O b i-F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1-D 2-D 3-F c 2)	
A n t i-P D-L 1 (A t e)-F c 1-D 1-D 2-D 3-F c 2	配列番号 2 4 (A n t i-P D-L 1 (A t e)-F c 1 重鎖) + 配列番号 1 0 (A n t i-P D-L 1 (A t e)-F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1-D 2-D 3-F c 2)	10
A n t i-P D-L 1 (1 3 G 4)-F c 1-D 1-D 2-D 3-F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 0 (A n t i-P D-L 1 (1 3 G 4)-F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 0 (A n t i-P D-L 1 (1 3 G 4)-F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1-D 2-D 3-F c 2)	20
A n t i-P D-L 1 (1 2 A 4)-F c 1-D 1-D 2-D 3-F c 2	C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 2 (A n t i-P D-L 1 (1 2 A 4)-F c 1 重鎖) + C N 1 0 4 3 5 6 2 3 6 A 配列番号 1 2 (A n t i-P D-L 1 (1 2 A 4)-F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1-D 2-D 3-F c 2)	30
A n t i-E G F R-F c 1-D 1-D 2-D 3-F c 2	配列番号 1 9 (A n t i-E G F R-F c 1 重鎖) + 配列番号 8 (A n t i-E G F R-F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1-D 2-D 3-F c 2)	40
A n t i-H e r 2 (T)-F	配列番号 2 0 (A n t i-H e r 2 (T)-	

c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	F c 1 重鎖) + 配列番号 2 1 (A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1 - D 2 - D 3 - F c 2)
A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	配列番号 2 2 (A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 重鎖) + 配列番号 2 3 (A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 軽鎖) + 配列番号 2 8 (D 1 - D 2 - D 3 - F c 2)

10

【 0 1 7 1 】

実施例 1 発現ベクターの構築

設計された分子構造に従って、各構成部分のアミノ酸配列を前後で一緒にスプライスし、コドンに対するチャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) の好みに従って、最適な DNA コード配列が設計され、遺伝子クローニング操作などに必要な酵素トランケーション部位を除外し、その後、当該配列 5' 端に順序にクローニングサイト、Kozak 配列とシグナルペプチドコード配列を追加し、当該配列 3' 端に順序に停止コドン及びクローニングサイトを追加し、図 1 に示された通りである。

20

【 0 1 7 2 】

全遺伝子合成を実施し、5' 端および 3' 端クローニングサイトを使用して、発現ベクター pCHO-TE2 (Thermo Fisher から購入) の対応するクローニングサイトの間に、全遺伝子を一方向にクローニングし、配列が正しいことを確認した後、発現プラスミドを獲得することができる。5' 端および 3' 端で使用されるクローニングサイトはすべて、EcoRV および PacI サイトである。図 2 は、発現ベクター pCHO-TE2 のプラスミドマップである。

30

【 0 1 7 3 】

実施例 2 発現プラスミドの製造、細胞トランスフェクションおよび標的タンパク質の発現、精製

発現プラスミドの製造

発現プラスミドを含むグリセロール細菌 (発現プラスミドを含む 1 mL の大腸菌液に 0.5 mL の 60% 滅菌グリセロール溶液を加え、十分に混ぜる) を、液体 LB 培地に 1:1000 の比率で接種した。37℃、220 rpm で 16 時間振盪した後、遠心分離によりバクテリアを収集した。発現プラスミドは、エンドトキシンを含まないプラスミドキット (DP117、Tiagen Biochemical Technology (Beijing) Co., Ltd. から購入) を使用して、キットの説明書に提供された標準手順に従って、抽出することにより得た。

40

【 0 1 7 4 】

細胞トランスフェクション、タンパク質の発現

得られた発現プラスミドを 0.22 μm フィルターで濾過した後、3 mg のプラスミド (ここで、生成物は典型的な抗体分子であり、その軽鎖と重鎖の発現プラスミドの比は 1:1 (モル比) であり、生成物は組換えタンパク質であり、その軽鎖、重鎖、右アーム発現プラスミドの発現プラスミドの比率は 1:1:1 (モル比) であり、具体的に表 3 を参照) を吸引し、50 mL の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO から購入) に加え、均一に混合した。6 mg のトランスフェクション

50

試薬ポリエーテルイミド (Polyetherimide、PEI、Polysciences から購入し、1 mg/mL の濃度で滅菌超純水に溶解) を吸引し、50 mL の Opti MEM I Reduced Serum Medium に加え、均一に混合した。得られた PEI 溶液を、プラスミドを含む Opti MEM I Reduced Serum Medium 溶液に加え、均一に混合した。室温で 15 分間放置した後、プラスミドと PEI の混合物を、1 L の体積と 3×10^6 細胞/mL の細胞密度を有する宿主細胞 CHO-S (Thermo Fisher から購入) の懸濁液にゆっくりと均一に加え、37 に置き、5 % の CO_2 インキュベーターで培養した。4 時間後、初期容量の 7 % に相当するフィード培地を添加 (当該フィード培地は、水 1 リットルあたりに 80 g の CD Efficient Feed C AGT (Gibco から購入)、75 g の 5×00483 (Kerry から購入) を溶解した) した。培養温度を 33 に下げ、6 日間の培養後に収穫した。細胞懸濁液を 10 で 10000 g で 30 分間遠心分離し、遠心分離によって得られた上清、すなわち細胞培養回収溶液を標的タンパク質の精製に使用した。

10

【0175】

タンパク質の精製

以下の方法では、Ofa-Fc1-D1-Fc2 を例として、プロテイン A をアフィニティキャプチャした。

【0176】

前記細胞培養回収液を 10000 rpm で 30 分間遠心分離して、細胞とその断片を除去した後、プロテイン A アフィニティークラム (カタログ番号 17-5438-02、GE Healthcare) でロードし、溶出によって目標のタンパク質を回収した。SDS-PAGE でタンパク質の純度を検出した。

20

【0177】

プロテイン A 精製方法は、当業者に周知の従来のタンパク質精製方法であり、具体的に試験方法は、GE Healthcare プロテイン A 製品取扱説明書および GE 抗体精製マニュアルを参照することができる。

【0178】

SIRP D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2 四種類のたんぱく質の理論分子量は、それぞれ 37.8 kD、110.7 kD、121.7 kD および 131.4 kD である。SDS-PAGE タンパク質電気泳動検出の結果は、図 4 A と図 4 B に示された通りである。

30

【0179】

タンパク質電気泳動 (SDS-PAGE) : 結果 (図 4 A と図 4 B) は、各レーンの標的タンパク質はすべて効率的に発現および精製されたことを示し、ここで、Ofa-Fc1-D1-Fc2 (図 4 A のレーン 11)、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2 (図 4 B のレーン 1)、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2 (図 4 A のレーン 12) は、異なる程度の左アーム二量体 (Ofa-Fc1-Ofa-Fc1)、右アーム二量体 (SIRP-Fc2) および / または多量体を示す。

40

【0180】

【表 3】

発現プラスミドの比率

生成物		発現プラスミドの比率
典型的な 抗体分子 ／融合タ ンパク質 二量体	A n t i - C D 2 0 m A b (O f a t u m u m a b)	軽鎖、重鎖発現プラス ミドの比率は1 : 1で ある
	A n t i - C D 2 0 m A b (O b i n u t u z u m a b)	
	A n t i - E G F R m A b (J M T 1 0 1)	
	A n t i - C D 4 7 m A b (H u 5 F 9 - G 4)	
	A n t i - H e r 2 (T) m A b (T r a n s t u z u m a b)	
	A n t i - H e r 2 (P) m A b (P e r t u z u m a b)	

10

20

30

【 0 1 8 1 】

	Anti-PD-L1 mAb (Atezolizumab)	
	Anti-PD-L1 mAb (12A4)	
	Anti-PD-L1 mAb (13G4)	
	SIRP α D1-Fc	二量体
生成物は、組換えタンパク質である	Ofa-Fc1-D1-Fc2	軽鎖、重鎖、右アームの発現プラスミドの比率は、前記軽鎖、重鎖、右アームの比率に従う
	Ofa-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Ofa-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Obi-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1 (Ate)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1 (13G4)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1 (12A4)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-Her2 (T)-Fc1-	

10

20

30

40

	D 1 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2	
	O b i - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	10
	A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	20
	A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2	30
	O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	40
	A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	
	A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 -	

	D 2 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2	10
	O b i - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	20
	A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	
	A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	30
	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2	
	O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	40
	A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) -	

	F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	
	A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	
	A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	
	A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2	

10

【 0 1 8 5 】

20

備考：D 1^mは、S I R P 細胞外トランシェンD 1の高親和性変異体を表し、D 1は、ヒトS I R P 野生型およびその非高親和性変異体の細胞外D 1ドメインを表し、F cは、野生型F c領域であり、F c 1は、holeまたはholes突然変異を有するF c領域であり、F c 2は、knobまたはknobs突然変異を有するF c領域である。

【 0 1 8 6 】

実施例 3 標的親和性、標的競合結合活性の検出

1、CD 4 7、CD 2 0、E G F R、H e r 2 標的親和性の検出方法

標的CD 4 7およびCD 2 0に対する組換えタンパク質O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2の結合親和性は、E L I S Aおよび/またはフローサイトメトリーにより測定した。以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2を例とし、左アームがCD 2 0標的である組換えタンパク質の検出に適用される。

30

【 0 1 8 7 】

組換えタンパク質A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 -

40

50

D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 が、標的 C D 4 7 および H e r 2 に対する結合親和性は、E L I S A および / またはフローサイトメトリーにより測定した。以下の方法では、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2 を例とし、左アームが H e r 2 標的である組換えタンパク質の検出に適用される。

【 0 1 8 8 】

標的 C D 4 7 および E G F R に対する組換えタンパク質 A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 の結合親和性は、E L I S A および / またはフローサイトメトリーにより測定した。以下の方法では、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c を例とし、左アームが E G F R 標的である組換えタンパク質の検出に適用される。

10

【 0 1 8 9 】

標的 C D 4 7 および P D - L 1 に対する組換えタンパク質 A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 の結合親和性は、E L I S A および / またはにより測定した。以下の方法では、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2 を例とし、左アームが P D - L 1 標的である組換えタンパク質の検出に適用される。

20

【 0 1 9 0 】

E L I S A により標的 C D 4 7 に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 の親和性を検出：

30

酵素プレートに 100 μl の 1 μg / ml の C D 4 7 - H i s (1 2 2 8 3 - H 0 8 H - 2 0 0、S i n o B i o l o g i c a l) でコーティングし、4 で一晩放置し、P B S T 溶液 (0 . 1 % T w e e n 2 0 を含む P B S) で洗浄した後、P B S + 1 % B S A で室温で 2 時間ブロックし、洗浄した後、コーティングされた酵素プレートに希釈された O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 (1 0 0 0 n g / ml から、2 . 5 倍希釈、合計 1 1 ポイント) をウェルあたり 100 μl にそれぞれ加え、25 で 1 時間インキュベートし、サンプルを捨てて、P B S T 溶液で 3 回洗浄し、100 μl の希釈マウス抗ヒト I g G F c - H R P (1 : 1 0 0 0 0) (A b 7 4 9 9、a b c a m) を加え、25 で 1 時間インキュベートし、溶液を捨てて P B S T 溶液で 3 回洗浄し、T M B (P 0 2 0 9、b e y o t i m e) を加えて約 2 0 分間遮光して発色させた後、H₂ S O₄ で反応を停止し、マイクロプレートリーダーで O D (4 5 0 - 6 5 0 n m) 値を読み取った。

40

【 0 1 9 1 】

試験結果は、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 -

50

D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2がそれぞれC D 4 7に結合することができ、C D 4 7に対するO f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2の結合親和性が略弱于C D 4 7に対する抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4および/またはS I R P D 1 - F cの結合親和性よりわずかに弱いことを示した。

10

【0192】

以上の試験データは、本発明の組換えタンパク質がタンパク質レベルで腫瘍細胞のC D 4 7抗原を特異的に標的とすることができ、C D 4 7への結合親和性は、C D 4 7タンパク質に対するS I R P D 1 - F c融合タンパク質の結合親和性より高くなく、本発明の組換えタンパク質は、抗C D 4 7抗体の治療による赤血球凝集、貧血および/またはS I R P 高親和性変異体治療による非腫瘍を標的とする細胞殺傷などの副作用を低減または回避することができることを証明した(P e t r o v a P S , e t a l . T T I - 6 2 1 (S I R P F c) : A C D 4 7 - B l o c k i n g I n n a t e I m m u n e C h e c k p o i n t I n h i b i t o r w i t h B r o a d A n t i t u m o r A c t i v i t y a n d M i n i m a l E r y t h r o c y t e B i n d i n g . C l i n C a n c e r R e s , 2 0 1 7 , 2 3 (4) : 1 0 6 8 - 1 0 7 9)。

20

【0193】

例えば、図5に示したように、C D 2 0抗体O f a t u m u m a bおよび抗E G F R抗体J M T 1 0 1がC D 4 7に結合できないこと以外に、抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2はすべてC D 4 7に結合することができるが、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2とA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2は、右アームのみがC D 4 7抗原に結合することができるなどの原因により、その親和性($EC_{50} = 52.57 \text{ ng/mL}$ / $EC_{50} = 93.86 \text{ ng/mL}$)は、抗C D 4 7抗体($EC_{50} = 5.439 \text{ ng/mL}$)と/ S I R P D 1 - F c ($EC_{50} = 6.118 \text{ ng/mL}$)より弱い。

30

【0194】

フローサイトメトリーによる標的C D 4 7に対するO f a - F c 1 - D 1 - F c 2の親和性を検出：

A 4 3 1細胞(ヒト表皮癌細胞)、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、P B S + 2 % F B S (G i b c oから購入)で 3×10^6 個の細胞/mLの濃度に再懸濁した。細胞を $100 \mu\text{l}$ /ウェルで96ウェルプレートUプレート(商品番号: 3799、C o r n i n g)に加え、少なくとも15分間放置し、遠心して上清を吸引し、9希釈度のO f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (15000 ng/mL から開始、5倍勾配希釈、合計9濃度)をそれぞれ加え、96ウェルプレートを4の冷蔵庫で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B Sで洗浄した後、ヤギ抗ヒトI g G F c - F I T C (F 9 5 1 2 - 2 M L、S i g m a)を加え、4で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B Sで洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター(A c c u r i C 6、B D)により蛍光値を測定した。

40

【0195】

A 4 3 1細胞は、C D 2 0抗原を発現せず、O f a t u m u m a b、O b i n u t u z u m a bに結合できないため、細胞レベルでA 4 3 1細胞を用いてO f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O

50

b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 が C D 4 7 に対する結合親和性を評価することができる。

【0196】

試験結果は、抗 C D 2 0 抗体 O f a t u m u m a b、O b i n u t u z u m a b が A 4 3 1 に結合できないこと以外に、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 はすべて A 4 3 1 細胞に結合することができる、C D 4 7 に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 の結合親和性は、C D 4 7 に対する抗 C D 4 7 抗体および / または S I R P D 1 - F c の結合親和性よりわずかに弱く、E L I S A のデータの傾向と一致することを示す。

10

【0197】

以上の試験データは、本発明の組換えタンパク質がタンパク質レベルで腫瘍細胞 C D 4 7 抗原を特異的に標的とすることができ、C D 4 7 への結合親和性は、C D 4 7 タンパク質に対する S I R P D 1 - F c 融合タンパク質の結合親和性より高くなく、本発明の組換えタンパク質は、抗 C D 4 7 抗体の治療による赤血球凝集、貧血および / または S I R P 高親和性変異体治療に起因する非腫瘍を標的とする細胞殺傷などの副作用を低減または回避することができることを証明した。

20

【0198】

例えば、図 6 に示したように、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c および O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 はすべて A 4 3 1 細胞に結合することができる。具体的に、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の親和性は、抗 C D 4 7 抗体および / または S I R P D 1 - F c よりわずかに弱く、E L I S A のデータの傾向と一致する。

【0199】

フローサイトメトリーにより標的 C D 2 0 に対する O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の親和性を測定：

30

R a j i 細胞 (ヒト B 細胞リンパ腫) (上海科学院細胞バンクから購入)、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、P B S + 2 % F B S で 3×10^6 個の細胞 / m l の濃度に再懸濁した。細胞を $100 \mu l$ / ウェルで 96 ウェルプレート U プレート (商品番号 : 3799、C o r n i n g) に加え、少なくとも 15 分間放置し、遠心して上清を吸引し、 $100 \mu l$ の P B S + 2 % F B S (対照群) または $1.5 \mu g / m l$ の抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2 (実験群) (ペプシンにより F c を切除、キット : T h e r m o F i s h e r、44988) を加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄した後、7 希釈度の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c ($6250 ng / m l$ から開始、4 倍 勾配希釈、合計 7 濃度、図 7 では形質転換後のモル濃度) をそれぞれ加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄した後、ヤギ抗ヒト I g G F c - F I T C (F 9512 - 2 M L、S i g m a) を加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター (A c c u r i C 6、B D) により蛍光値を測定した。

40

【0200】

試験結果は、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2 が、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 および / または S I R P D 1 - F c と R a j i 細胞上の C D 4 7 の結合を効果的にブロックすることができるが、C D 4 7 抗原に対する H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2 のブロック作用は、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 -

50

F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2とR a j i細胞の結合を有意に阻害しなかったことを示す。

【0201】

以上の試験データは、腫瘍細胞表面のC D 4 7抗原がブロックされ、S I R P - C D 4 7相互結合がブロックされた場合にも、本発明の組換えタンパク質は、左アームによって腫瘍細胞上の対応する抗原に特異的に結合することができ、左アーム親和性は、右アームの結合がブロックされたことによって影響を受けないことを証明した。

【0202】

例えば、図7に示したように、抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2は、抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4および/またはS I R P - D 1 - F cとR a j i細胞上のC D 4 7の結合を効果的にブロックすることができるが、C D 4 7抗原に対するH u 5 F 9 - G 4 (F a b) 2のブロック作用は、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2とR a j i細胞の結合を有意に阻害せず、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2は、S I R P - C D 4 7の相互結合がブロックされた後にも、左アーム(抗C D 2 0不完全抗体)により、R a j i細胞上のC D 2 0抗原と特異的に結合することができ、且つ親和性が右アーム結合によってブロックされたことにより、影響を受けなかったことを示す。

【0203】

フローサイトメトリーにより標的C D 2 0とC D 4 7の二重特異性結合状況を検出：

R a j i細胞(ヒトB細胞リンパ腫)(上海科学院細胞バンクから購入)、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、P B S + 2 % F B Sで 3×10^6 個の細胞/mlの濃度に再懸濁した。細胞を $100 \mu\text{l}$ /ウェルで96ウェルプレートUプレート(商品番号：3799、C o r n i n g)に加え、少なくとも15分間放置し、遠心して上清を吸引し、12希釈度のO f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a t u m u m a b、H u 5 F 9 - G 4、S I R P - D 1 - F c (50000 ng/ml 、 25000 ng/ml 、 6250 ng/ml 、4倍勾配希釈、合計12濃度、図8Aは形質転換後のモル濃度)をそれぞれ加え、4で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B Sで洗浄した後、ヤギ抗ヒトI g G - F c - F I T C (F 9512 - 2 M L、S i g m a)を加え、4で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B Sで洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター(A c c u r i - C 6、B D)により蛍光値を検出した。

【0204】

R a j i細胞表面に発現C D 2 0およびC D 4 7抗原が同時に発現されるので、抗C D 2 0抗体O f a t u m u m a b、O b i n u t u z u m a b、抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4およびS I R P - D 1 - F cはすべて、R a j i細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度は、それぞれ異なる。

【0205】

試験結果は、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2もR a j i細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することを示す。

【0206】

以上の試験データは、同じ過飽和タンパク質サンプル能動環境において、抗C D 2 0抗体O f a t u m u m a b、O b i n u t u z u m a bおよび/または抗C D 4 7抗体H u 5 F 9 - G 4および/またはS I R P - D 1 - F cと比較して、本発明の組換えタンパク質は、腫瘍細胞に特異的に結合することができ、且つ有意な分子量の利点を示すことを証明した。好ましくは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、本発明の組換えタンパク質と腫瘍細胞の飽和結合度は、抗C D 2 0抗体およびS I R P - D 1 - F cと腫瘍細胞の飽和結合度の合計よりも大きい。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 7 】

【 表 4 】

抗体／組換えタンパク質と R a j i 細胞結合の最大の平均蛍光強度および E

C 5 0 (nM)

サンプル	O f a t u m u m a b	O f a - F c 1 - D 1 - F c 2	H u 5 F 9 - G 4	S I R P α D 1 - F c
最大の平均蛍光強度	2 5 2 0 6 5 . 1 0	6 9 0 7 0 5 . 9 0	9 3 7 8 4 . 5 9	1 0 4 9 9 7 . 5 0
E C 5 0 (nM)	1 . 5 8 6	1 4 . 0 6	0 . 2 5 8	1 2 . 5 3

10

20

【 0 2 0 8 】

例えば、図 8 A と表 4 に示したように、抗 C D 2 0 抗体 O f a t u m u m a b 、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 と S I R P D 1 - F c は、すべて R a j i 細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度はそれぞれ異なり、同時に O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 も R a j i 細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することから、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、R a j i 細胞が特異的に結合することができる O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 タンパク質の数がそれぞれ抗 C D 2 0 抗体 O f a t u m u m a b または抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 または S I R P D 1 - F c の分子の数より高く、抗 C D 2 0 抗体 O f a t u m u m a b と抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 分子の数の合計より高く、および抗 C D 2 0 抗体 O f a t u m u m a b と S I R P D 1 - F c 分子の数の合計より高いことを示唆する。

30

【 0 2 0 9 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、抗 C D 4 7 抗体または S I R P D 1 - F c と他の抗腫瘍標的治療抗体を組み合わせる使用することと比較して、本発明の腫瘍標的抗原と C D 4 7 抗原が同時結合した組換えタンパク質を使用することにより、より多くの腫瘍細胞を結合することができ、これによりさらに有意な抗腫瘍効果を獲得することを示唆した。

40

【 0 2 1 0 】

フローサイトメトリーにより標的 H e r 2 と C D 4 7 の二重特異性の結合状況を検出：

S K B R - 3 細胞（ヒト乳癌細胞）（上海科学院細胞バンクから購入）、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、P B S + 2 % F B S で細胞を 2×10^6 個の細胞 / m l の濃度に再懸濁した。細胞を $100 \mu l$ / ウェルで 96 ウェルプレート U プレート（商品番号：3799、C o r n i n g）に加え、少なくとも 15 分間放置し、遠心して上清を吸引し、10 希釈度の A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2 、T r a s t u z u m a b および H u 5 F 9 - G 4 (433 . 2 n M から開始、4 倍勾配希釈、合計 10 濃度) をそれぞれに加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄した後、ヤギ抗ヒト I g G F c - F I T C (F 9 5 1 2 - 2 M L 、S i g m a) をに加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄および再懸濁した後、

50

フローサイトメーター (Accuri C6、BD) により蛍光値を検出した。

【0211】

SKBR-3細胞表面にHer2およびCD47抗原が同時に発現されるので、抗Her2抗体Trastuzumab、Pertuzumab、抗CD47抗体Hu5F9-G4およびSIRPD1-Fcは、すべてSKBR-3細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度は、それぞれ異なる。

【0212】

試験結果は、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2もSKBR-3細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することを示す。

10

20

【0213】

以上の試験データは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、抗Her2抗体Trastuzumab、Pertuzumabおよび/または抗CD47抗体Hu5F9-G4および/またはSIRPD1-Fcと比較して、本発明の組換えタンパク質は、腫瘍細胞に特異的に結合することができ、且つ有意な分子の数の利点を示すことを証明した。好ましくは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、本発明の組換えタンパク質と腫瘍細胞の飽和結合度は、抗Her2抗体およびSIRPD1-Fcと腫瘍細胞の飽和結合度の合計よりも大きい。

30

【0214】

【表 5】

抗体／組換えタンパク質とSKBR-3細胞結合の最大の平均蛍光強度およびEC50 (nM)

サンプル	Anti-Her2 (T)-Fc1-D1 -Fc2	Hu5F9 -G4	Trastuzumab
最大の平均蛍光強度	3465348.00	21325 1.50	184178 3.00
EC50 (nM)	10.03	0.455 7	3.204

10

20

【0215】

例えば、図8Bと表5に示したように、抗Her2抗体Trastuzumabおよび抗CD47抗体Hu5F9-G4は、すべてSKBR-3細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度はそれぞれ異なり、同時にAnti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2もSKBR-3細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することから、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、SKBR-3細胞が特異的に結合することができるAnti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2タンパク質の数が、それぞれ抗Her2抗体Trastuzumabまたは抗CD47抗体Hu5F9-G4の分子量より高く、抗Her2抗体Trastuzumabおよび抗CD47抗体Hu5F9-G4分子量の合計より高いことを示唆する。

30

【0216】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、抗CD47抗体またはSIRPD1-Fcと他の抗腫瘍標的治療抗体を組み合わせる使用することと比較して、本発明の腫瘍標的抗原およびCD47抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質を使用することにより、より多くの腫瘍細胞を結合することができ、これによりさらに有意な抗腫瘍効果を獲得することを示唆した。

【0217】

フローサイトメトリーにより標的EGFRとCD47の二重特異性の結合状況を検出：

A431細胞（ヒト表皮癌細胞）（中国医学科学院の基礎医学研究所から購入）、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、PBS+2%FBSで細胞を 2×10^6 個の細胞/mlの濃度に再懸濁した。細胞を100 μ l/ウェルで96ウェルプレートUプレート（商品番号：3799、Corning）に加え、少なくとも15分間放置し、遠心して上清を吸引し、11希釈度のAnti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、JMT101、SIRPD1-FcおよびHu5F9-G4（216.6nMから開始、4倍勾配希釈、合計11個の濃度）をそれぞれ加え、4で1時間インキュベートし、PBS+2%FBSで洗浄した後、ヤギ抗ヒトIgG Fc-FITC（F9512-2ML、Sigma）を加え、4で1時間インキュベートし、PBS+2%FBSで洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター（Accuri C6、BD）により蛍光値を検出した。

40

50

【0218】

A431細胞表面にEGFRおよびCD47抗原が同時に発現されるので、抗EGFR抗体JMT101、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRPD1-Fcは、すべてA431細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度は、それぞれ異なる。

【0219】

試験結果は、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2もA431細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することを示す。

10

【0220】

以上の試験データは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、抗EGFR抗体JMT101および/または抗CD47抗体Hu5F9-G4および/またはSIRPD1-Fcと比較して、本発明の組換えタンパク質は、腫瘍細胞に特異的に結合することができ、且つ有意な分子量の利点を示すことを証明した。好ましくは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、本発明の組換えタンパク質と腫瘍細胞の飽和結合度は、抗EGFR抗体およびSIRPD1-Fcと腫瘍細胞の対応する飽和結合度の合計よりも大きい。

20

【0221】

【表6】

抗体／組換えタンパク質とA431細胞結合の最大の平均蛍光強度およびE

C50 (nM)

サンプル	JMT 101	Anti-EG FR-Fc1- D1-Fc2	Hu5F9 -G4	SIRPα D 1-Fc
最大の平均蛍光強度	901 868	1511274	68665 8	429788
EC50 (nM)	0.5 98	1.217	0.865	3.677

30

【0222】

例えば、図8Cと表6に示したように、抗EGFR抗体JMT101、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRPD1-Fcは、すべてA431細胞に特異的に結合することができるが、最大の平均蛍光強度はそれぞれ異なり、且つEC₅₀はそれぞれEC₅₀(JMT101)=0.598nM、EC₅₀(SIRPD1-Fc)=3.677nM、EC₅₀(Hu5F9-G4)=0.865nMであることから、JMT101とA431細胞の結合親和性は、SIRPD1-FcとA431細胞の結合親和性の6倍以上であることが分かり、同時にAnti-EGFR-Fc1-D1-Fc2もA431細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することから、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、A431細胞が特異的に結合することができるAnti-EGFR-Fc1-D1-Fc2タンパク質の数がそれぞれ抗EGFR

40

50

抗体 J M T 1 0 1 または S I R P D 1 - F c または抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 的分子量より有意に高く、且つ抗 E G F R 抗体 J M T 1 0 1 および S I R P D 1 - F c の分子量の合計より高いことを示唆した。

【 0 2 2 3 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、抗 C D 4 7 抗体または S I R P D 1 - F c と他の抗腫瘍標的治療抗体を組み合わせる使用することと比較して、本発明の腫瘍標的抗原および C D 4 7 抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質を使用することにより、より多くの腫瘍細胞を結合することができ、これによりさらに有意な抗腫瘍効果を獲得することを示唆した。

【 0 2 2 4 】

フローサイトメトリーにより標的 P D - L 1 と C D 4 7 の二重特異性の結合状況を検出
:

N C I - H 4 4 1 細胞 (ヒト肺腺癌細胞) (北京北納創聯生物技術研究院から購入)、
1 0 n g / m l h I F N - (B D、商品番号 : 5 5 4 6 1 6) で 2×10^7 個の細胞
を 1 8 時間刺激し、細胞を消化して収集し、且つカウントし、遠心分離し、P B S + 2 %
F B S で細胞を 3×10^6 個の細胞 / m l の濃度に再懸濁した。細胞を 1 0 0 μ l / ウェル
で 9 6 ウェルプレート U プレート (商品番号 : 3 7 9 9、C o r n i n g) に加え、少
なくとも 1 5 分間放置し、遠心して上清を吸引し、1 2 希釈度の A n t i - P D - L 1 (
A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2 および A t e z o l i z u m a b (4 3 3 . 2 n M、2
1 6 . 6 n M、そして 4 倍勾配希釈、合計 1 2 個の濃度) をそれぞれ加え、4 で 1 時間
インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄した後、ヤギ抗ヒト I g G F c - F I T
C (F 9 5 1 2 - 2 M L、S i g m a) を加え、4 で 1 時間インキュベートし、P B S
+ 2 % F B S で洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター (A c c u r i C 6、
B D) により蛍光値を検出した。

【 0 2 2 5 】

N C I - H 4 4 1 細胞表面に発現 P D - L 1 および C D 4 7 抗原が同時に発現されるの
で、抗 P D - L 1 抗体 A t e z o l i z u m a b、1 3 G 4、1 2 A 4、抗 C D 4 7 抗体
H u 5 F 9 - G 4、S I R P D 1 - F c は、N C I - H 4 4 1 細胞に特異的に結合する
ことができる。

【 0 2 2 6 】

試験結果は、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P
D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c
1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F
c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i
- P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4)
- F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 -
F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i
- P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1
(1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D
1^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n
t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1
(1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 もすべて N C I - H 4 4 1 細胞に結合
することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することを示す。

【 0 2 2 7 】

以上の試験データは、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、抗 P D - L 1
抗体 A t e z o l i z u m a b、1 3 G 4、1 2 A 4 と比較して、本発明の組換えタンパ
ク質は、腫瘍細胞に特異的に結合することができ、且つ一定の分子の数の利点を示すこと
を証明した。例えば、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、抗 P D - L 1 抗
体 A t e z o l i z u m a b と比較して、本発明の組換えタンパク質は腫瘍細胞により多
く結合し、有意な分子の数の利点を示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 8 】

【 表 7 】

抗体／組換えタンパク質とNCI-H441細胞結合の最大の平均蛍光強度
およびEC50 (nM)

サンプル	Anti-PD-L1 (Atezolizumab)-Fc1-D1-Fc2	Atezolizumab	Hu5F9-G4	SIRPα-D1-Fc
最大の平均蛍光強度	156541	64038	100973	83200
EC50 (nM)	1.565	0.2006	0.3865	1.643

10

20

【 0 2 2 9 】

例えば、図8Dと表7に示したように、抗PD-L1抗体AtezolizumabはNCI-H441細胞に特異的に結合することができ、同時にAnti-PD-L1 (Atezolizumab)-Fc1-D1-Fc2もNCI-H441細胞に結合することができ、且つより高い最大の平均蛍光強度を有することから、同じ過飽和タンパク質サンプル濃度環境において、NCI-H441細胞が特異的に結合することができるAnti-PD-L1 (Atezolizumab)-Fc1-D1-Fc2タンパク質の数が抗PD-L1抗体Atezolizumabの分子量より高いことを示唆した。EC₅₀はそれぞれEC₅₀ (Atezolizumab) = 0.2006 nM、EC₅₀ (SIRPα-D1-Fc) = 1.643 nM、EC₅₀ (Hu5F9-G4) = 0.3865 nMであることから、AtezolizumabとNCI-H441細胞の結合親和性は、SIRPα-D1-FcとNCI-H441細胞の結合親和性の6倍以上であることが分かる。

30

【 0 2 3 0 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、抗CD47抗体と他の抗腫瘍標的治療抗体を組み合わせる使用することと比較して、本発明の腫瘍標的抗原およびCD47抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質を使用することにより、より多くの腫瘍細胞を結合することができ、これによりさらに有意な抗腫瘍効果を獲得することを示唆した。

40

【 0 2 3 1 】

2、標的の競合的結合の検出

以下の方法では、Ofa-Fc1-D1-Fc2またはAnti-EGFR-Fc1-D1-Fc2を例として、ELISAにより標的CD47とSIRPの結合の競合的結合を測定した。

【 0 2 3 2 】

50

E L I S A により O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 の競合的結合を検出：

酵素プレートを100 μ lの1 μ g/mlのCD47-His(12283-H08H-200、Sino Biological)でコーティングし、4で一晚放置し、PBSTで洗浄した後、PBS+1%BSAで室温で2時間ブロックし、洗浄した後、コーティングされた酵素プレートに希釈された異なる濃度の(1000ng/mlから、3倍勾配希釈、合計11個濃度)O f a - F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2とビオチン標識されたSIRP D1-Fc(ビオチン標識キット、21925、Thermo、サンプル濃度は100ng/mlである)混合液を1ウェル当たり100 μ lにそれぞれ加え、25で1時間インキュベートし、サンプルを捨てて、PBST溶液で3回洗浄し、100 μ lの希釈されたストレプトアビジン-HRP(1:10000)(ML-0437P-HRP、Z1501-1研域化学試薬)を加えた後、25で1時間インキュベートし、溶液を捨てて、PBST溶液で3回洗浄し、TMB(P0209, beyotime)を加えて約20分間遮光して発色させた後、H₂SO₄で反応を停止し、マイクロプレートリーダーでOD(450-650nm)値を読み取った。

10

【0233】

試験結果は、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP D1-Fc、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2が、ビオチン標識されたSIRP D1-Fcと異なる程度でCD47抗原に競合的に結合して、競合的結合を発揮することができることを示した。

20

30

【0234】

例えば、図9に示したように、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP D1-Fc、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2およびA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2はすべて、ビオチン標識されたSIRP D1-FcとCD47抗原に競合的に結合して、競合的結合活性を発揮することができ、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2とCD47の競合的結合力はそれぞれ、抗CD47抗体Hu5F9-G4またはSIRP D1-Fcより弱く、これは、本実施例で前述した親和性の結果と一致する。

40

【0235】

実施例4 組換えタンパク質の初期インビトロ免疫安全性の評価実験

組換えタンパク質：O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1^m - F c 2、A n t

50

i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2の初期インビトロ免疫安全性の評価実験において、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2を例とし、右アームにS I R P 細胞外トランケーション高親和性変異体を含む組換えタンパク質の検出に適した。

【 0 2 3 6 】

O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2の初期インビトロ免疫安全性の評価実験において、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2を例とし、右アームにS I R P 細胞外トランケーションを含む組換えタンパク質の検出に適した。

【 0 2 3 7 】

フローサイトメトリーにより二重抗体特異的右アーム突然変異の前後のC D 4 7 との特異的結合状況を検出：

N C I - H 4 4 1 細胞（ヒト肺腺癌細胞）（北京北納創聯生物技術研究院から購入）、細胞を消化して収集し、且つカウントし、遠心分離し、P B S + 2 % F B S で細胞を 3×10^6 個の細胞 / m l の濃度に再懸濁した。細胞を $100 \mu\text{l}$ / ウェルで96ウェルプレートUプレート（商品番号：3799、C o r n i n g）に加え、少なくとも15分間放置し、遠心して上清を吸引し、12希釈度のO f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、H u 5 F 9 - G 4、O f a t u m u m a b（433.2 nM、216.6 nM、そして4倍勾配希釈、合計12個の濃度）をそれぞれに加え、4 で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄した後、ヤギ抗ヒトI g G F c - F I T C（F9512 - 2 M L、S i g m a）を加え、4 で1時間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター（A c c u r i C 6、B D）により蛍光値を検出した。

【 0 2 3 8 】

【表 8】

フローサイトメトリーにより二重抗体特異的右アーム突然変異前後のCD47との特異的結合状況を検出

サンプル	O f a - F c 1 - D 1 - F c 2	O f a - F c 1 - D 1 m - F c 2	H u 5 F 9 - G 4	O f a t u m u m a b
最大の平均蛍光強度	1 7 2 9 4 4 . 9 0	2 7 2 7 3 4 . 8 0	1 2 0 1 3 3 . 4 0	3 4 9 7 . 1 7
EC50 (nM)	8 . 6 8 0	0 . 5 2 9 2	0 . 2 8 6 1	NA

10

20

【0239】

例えば、図10と表8に示したように、抗CD20抗体OfatumumabがCD47に結合できない以外に、抗CD47抗体Hu5F9-G4、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1m-Fc2はすべてCD47に結合することができ、且つOfa-Fc1-D1m-Fc2 (EC₅₀ = 0.529 nM)とNCI-H441細胞の結合親和性は、Ofa-Fc1-D1-Fc2 (EC₅₀ = 8.68 nM)より高く、ここで、D1^mは、D1領域でのSIRPの高親和性変異体(即ち、CN106519036Aの配列番号10)である。

30

【0240】

組換えタンパク質の初期インビトロ免疫安全性の評価実験

(1) ヒトエフェクター細胞懸濁液を製造：

CD16aの安定且つ高発現する成長が良好なヒトNK92MI-CD16aエフェクター細胞(華博バイオから購入)を取り、遠心分離して(201g、5min)、上清を捨て、5ml MEM(フェノールレッドフリー)基礎培地(Gibcoから購入、51200-038)に再懸濁し、カウントした後、MEM(フェノールレッドフリー)基礎培地で標的細胞密度を 2.4×10^6 個の細胞/mlまで調整して、ヒトエフェクター細胞懸濁液として使用した。

40

【0241】

(2) エフェクター細胞と抗体のインキュベーション：

50 µl / ウェルのMEM(フェノールレッドフリー)基礎培地を96ウェル黒底移植プレートの対応するウェルに分注し、希釈されたOfa-Fc1-D1-Fc2またはOfa-Fc1-D1m-Fc2二重特異性抗体をそれぞれ希釈勾配25 µl / ウェルに加え、マルチウェルを設定した。(1)で製造されたヒトエフェクター細胞懸濁液25 µl (60000個の細胞/ウェル)を加えた。均一に混合した後、Ofa-Fc1-D1-Fc2またはOfa-Fc1-D1^m-Fc2二重特異性抗体が最終濃度勾配(433.2 nMから開始、4倍勾配希釈、合計10の濃度)に達し、そして37℃で5.5時間反応させ、溶解バッファー(Promega由来キット、G7891)を対照群に加えて0

50

・ 5 時間インキュベートした。

【 0 2 4 2 】

(3) A D C C 活性を検出：

インキュベーションが完了した後、プレートに安全キャビネットに置き、蓋を開けて、約 1 5 分間自然に室温まで冷却した。室温で 3 0 分間平衡化した L D H 基質反応溶液 (P r o m e g a 由来キット、G 7 8 9 1) をウェルあたり 1 0 0 μ l に加え、穏やかに混合し、室温で 1 5 分間インキュベートした後、すぐに停止溶液 (P r o m e g a 由来キット、G 7 8 9 1) 5 0 μ l / ウェルを加え、均一に混合した後、マイクロプレートリーダーにより蛍光値を読み取った。

【 0 2 4 3 】

試験結果は、NK 細胞上に C D 4 7 抗原の発現があるので、A D C C 活性を有する C D 4 7 を標的とする組換えタンパク質および / または抗体は、NK 細胞の相互殺傷作用をもたらした。従って、S I R P 細胞外トランケーション高親和性変異体を含む O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または O f a - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 または O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 と比較して、C D 4 7 抗原との弱い親和作用により、NK 細胞によって引き起こされる毒性副作用を有意に低減させ、毒性副作用を少なくとも 1 0 0 0 倍低減させることを示した。

【 0 2 4 4 】

例えば、図 1 1 に示したように、抗体 / 組換えタンパク質の濃度が 1 0 ⁻¹ n M に達した場合、O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 では細胞溶解が開始し、抗体 / 組換えタンパク質の濃度が 1 0 ⁻³ n M に達した場合、O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 の細胞分解率は 1 5 . 2 5 % に達し、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 が 1 0 ⁻³ n M である場合、細胞溶解を観察できなかった。

【 0 2 4 5 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の A D C C 活性を有し、且つ低親和性の C D 4 7 を標的とする抗原の組換えタンパク質がより高い免疫安全性を有することを示唆した。

【 0 2 4 6 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の最適化した後の A D C C 活性検出を使用した方法（即ち、初期のインビトロ免疫安全性の評価実験）は、C D 4 7 を標的とし、且つ A D C C 活性を有する組換えタンパク質（一価または多価を含む）または抗体（一価または多価を含む）の初期免疫安全性を評価するために使用することができ、当該評価方法は、簡単で迅速であり、血液源によって制限されないことを示唆した。

10

【 0 2 4 7 】

実施例 5 組換えタンパク質のインビボで腫瘍細胞の成長を阻害する実験

組換えタンパク質：O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 インビボで腫瘍細胞の成長を阻害する実験において、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 を例とし、右アームに S I R P 細胞外トランシェーションを含む組換えタンパク質の検出に適した。

20

30

【 0 2 4 8 】

オス N S G マウス（I D M O から購入）にヒト B 細胞リンパ腫 R a j i 細胞を皮下接種し、腫瘍細胞を接種して、腫瘍組織が $80\text{ mm}^3 - 150\text{ mm}^3$ に達した後、以下の 2 群（1 群当たり 6 匹のマウス、各群に標識用量を腹腔内に注射した）に分けた：1）溶媒対照群（トリスクエン酸塩、pH 6.5）、2）O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 群（ $150\text{ }\mu\text{g / 匹}$ ）、週 2 回、合計 2 週間投与した。投与前（0 日）、投与後第 3 日、第 5 日、第 7 日、第 10 日、第 12 日、第 14 日に、それぞれ腫瘍の成長状況を観察し、腫瘍の大きさを測定して、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の抗腫瘍効果を評価した。

40

【 0 2 4 9 】

試験結果は、R a j i リンパ腫皮下移植の N S G マウスモデルで、組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 -

50

F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 は、C D 4 7 - S I R P シグナル伝達経路をブロックすることにより、マクロファージを標的とする食作用および/またはマクロファージを介した抗体依存性細胞の食作用 (A n t i b o d y d e p e n d e n t c e l l u l a r p h a g o c y t o s i s , A D C P) を活性化して、有意な腫瘍阻害効果を示す。

【 0 2 5 0 】

例えば、図 1 2 に示したように、横軸は、R a j i リンパ腫皮下移植した N S G マウスが薬物処理を受けた時間 (日) であり、縦軸は、腫瘍体積 (mm^3) である。図 1 2 は、一定の薬物 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 治療期間後、溶媒対照群と比較して、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 群は、有意な腫瘍阻害傾向を示し、ここで、第 1 4 日目の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 群の阻害率は、6 3 . 1 4 % に達することができた。

【 0 2 5 1 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍を標的とする抗原および C D 4 7 抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質が、腫瘍細胞皮下移植した N S G マウスインビボで有意な腫瘍抑制効果を得ることができることを示唆した。

【 0 2 5 2 】

実施例 6 組換えタンパク質のインビボ初期免疫安全性の評価実験

組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 ^m - D 2 - F c 2 のインビボで初期免疫安全性の評価において、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 ^m - F c 2 を例とし、右アームに S I R P 細胞外トランケーション高親和性変異体を含む組換えタンパク質の検出に適した。

【 0 2 5 3 】

組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R

- F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 インビボ初期免疫安全性の評価、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 を例とし、右アームに S I R P 細胞外トランケーションを含む組換えタンパク質の検出に適した。

【 0 2 5 4 】

B 細胞での C D 2 0 抗原の高発現のために、本実験では B 細胞含有量を測定することにより、腫瘍細胞の殺傷状況を代表した。他の腫瘍抗原および C D 4 7 抗原を標的とする組換えタンパク質インビボ初期免疫安全性を評価する場合、本実施例に記載の実験マウスに対応する腫瘍細胞を皮下移植する必要がある。

【 0 2 5 5 】

腫瘍特異的標的化作用：

ヒト C D 3 4 ⁺ H S C 移植メス N S G (H u - N S G) マウス (I D M O から購入) を選択し、以下の 3 群に (1 群あたり 3 匹のマウス、各群に標識用量に静脈注射した) 分けた：1) 0 . 9 % の生理食塩水対照群、2) H u 5 F 9 - G 4 (6 . 7 μ g / 匹) 群、3) O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (5 μ g / 匹) 群、1 回投与し、投与して 9 6 時間後に、ヘパリンナトリウムを含む抗凝固剤チューブに、8 0 μ l の血液をマウスの尾静脈から採取し、新たに調製した赤血球溶解液で赤血球を溶解し (ここで、赤血球溶解液は溶解液である (B D P h a r m L y s e ^{T M}、商品番号：5 5 5 8 9 9) : ダブル蒸し水等量に混合して調製)、残りの細胞を P B S + 2 % F B S で洗浄して再懸濁し、蛍光抗体 (P E a n t i - h u m a n C D 4 5 (商品番号：3 0 4 0 3 9) / F I T C a n t i - h u m a n C D 1 9 (商品番号：3 0 2 2 0 6) / A P C a n t i - h u m a n C D 3 (商品番号：3 0 0 3 1 2)、B i o L e g e n d から購入) と細胞と共に 3 0 分間インキュベートし、P B S + 2 % F B S で洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター (A c c u r i ^{T M} C 6、B D) により検出した。

【 0 2 5 6 】

試験結果は、同じ用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 と抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 を H u - N S G マウスモデルに使用し、投与 9 6 時間後、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 が発現 C D 2 0 抗原を発現する B 細胞 (即ち、標的細胞) を優先的に除去し、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 は、C D 4 7 抗原との高親和性作用により、T 細胞などの高い C D 4 7 発現量を持つ非標的細胞を優先的に除去することを示した。

【 0 2 5 7 】

例えば、図 1 3 に示したように、0 . 9 % の生理食塩水 (図 1 3 A) と比較して、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (図 1 3 B) は、C D 4 7 発現量が比較的に高い非標的細胞 (例えば、T 細胞) が有意に除去し (すべての検出細胞において、B 細胞、即ち、C D 2 0 抗原標的細胞の割合が投与前の 4 0 . 9 % から投与 9 6 時間後の 7 3 . 5 % に上昇した)、0 . 9 % の生理食塩水 (図 1 3 A) と比較して、組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (図 1 3 C) は、B 細胞 (即ち、C D 2 0 抗原標的細胞) が有意に除去され、即ち、投与 9 6 時間後、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 は、B 細胞 (すべての検出細胞において、B 細胞の割合が投与前の 4 0 . 9 % から投与 9 6 時間後の 3 . 7 % に低下した) を優先的に除去した。

【 0 2 5 8 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍標的抗原および C D 4 7 抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質が、同じ用量条件下で腫瘍

標的抗原が位置される細胞および／または腫瘍細胞を優先的に除去することを示唆した。

【0259】

低用量での免疫安全性：

ヒトCD34⁺ HSC移植NSG (Hu-NSG) メスマウス (IDMOから購入) を選択し、以下の2群に (1群あたり3匹のマウス、各群に標識用量に静脈注射した) 分けた：1) Ofa-Fc1-D1-Fc2 (1μg/匹) 群、2) Ofa-Fc1-D1^m-Fc2 (1μg/匹) 群、1回投与し、投与して27時間後に、ヘパリンナトリウムを含む抗凝固剤チューブに80μlの血液をマウスの尾静脈から採取し、新たに調製した赤血球溶解液で赤血球を溶解し (ここで、赤血球溶解液は溶解液である (BD Pharm LysateTM、商品番号：555899)：ダブル蒸し水等量に混合して調製)、残りの細胞をPBS+2%FBSで洗浄して再懸濁し、蛍光抗体 (PE anti-human CD45 (商品番号：304039) / FITC anti-human CD19 (商品番号：302206) / APC anti-human CD3 (商品番号：300312)、BioLegendから購入) と細胞と共に30分間インキュベートし、PBS+2%FBSで洗浄および再懸濁した後、Ofa-Fc1-D1-Fc2 (1μg/匹) 群サンプルをフローサイトメーター (AccuriTM C6、BD) により検出し、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2 (1μg/匹) 群サンプルをフローサイトメーター (NovoCytTM 3130、ACEA) により検出した。

10

【0260】

試験結果は、Hu-NSGマウスモデルで低用量の組換えタンパク質を使用し、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2を一回投与して72時間後、左アーム抗原を発現する標的細胞 (例えば、腫瘍細胞) が有意に除去され、左アーム抗原を発現しない細胞 (例えば、T細胞、他の免疫細胞) では明らかな影響が見だされなく、SIRP 細胞外トランケーション高親和性変異体を含むOfa-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2またはAnti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-Fc2またはAnti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2を一回投与して72時間後、左アーム抗原

20

30

40

50

を発現する標的細胞（例えば、腫瘍細胞）は有意に除去されたが、左アーム抗原を発現しない細胞（例えば、T細胞、他の免疫細胞）も有意に除去されたことを示す。

【0261】

例えば、図14に示されたように、投与前（図14A、図14B）と比較して、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2を一回投与して72時間（図14C、図14D）において、B細胞（CD20抗原標的細胞）が有意に除去され（ほぼ完全に除去された）、CD20抗原を発現しない細胞（例えば、T細胞、他の免疫細胞）では明らかな影響が見だされなかった。投与前（図14E、図14F）と比較して、O f a - F c 1 - D 1^m - F c 2を一回投与して72時間（図14G、図14H）は、B細胞（CD20抗原標的細胞）は有意に除去されたが、CD20抗原を発現しない細胞（例えば、T細胞、他の免疫細胞）も有意に除去された。

10

【0262】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、同じ用量条件下で、右アームにSIRP細胞外トランケーション高親和性変異体を含む組換えタンパク質と比較して、右アームにSIRP細胞外トランケーションを含む組換えタンパク質は、より高い腫瘍特異的標的化作用を有し、より高い免疫安全性を示した。

【0263】

高用量下の免疫回復作用：

ヒトCD34⁺ HSC移植NSG（Hu-NSG）メスマウス（IDMOから購入）を選択し、以下の2群に（1群あたり3匹のマウス、各群に標識用量に静脈注射した）：
 1）Hu5F9-G4（200μg/匹）群、2）O f a - F c 1 - D 1 - F c 2（150μg/匹）群、1回投与し、投与4日後、投与14日後に、ヘパリンナトリウムを含む抗凝固剤チューブに80μlの血液をマウスの尾静脈から採取し、新たに調製した赤血球溶解液で赤血球を溶解し（ここで、赤血球溶解液は溶解液である（BD Pharm LysateTM、商品番号：555899）：ダブル蒸し水体积に混合して調製）、残りの細胞をPBS+2%FBSで洗浄して再懸濁し、蛍光抗体（PE anti-human CD45（商品番号：304039）/FITC anti-human CD19（商品番号：302206）/APC anti-human CD3（商品番号：300312）、BioLegendから購入）と細胞と共に30分間インキュベートし、PBS+2%FBSで洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター（AccuriTM C6、BD）により検出した。

20

30

【0264】

試験結果は、Hu-NSGマウスモデルで高用量のO f a - F c 1 - D 1 - F c 2またはO f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはO f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはO b i - F c 1 - D 1 - F c 2またはO b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはO b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - H e r 2（P）- F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - H e r 2（P）- F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - H e r 2（P）- F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - H e r 2（T）- F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - H e r 2（T）- F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（A t e）- F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（A t e）- F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（A t e）- F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（13G4）- F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（13G4）- F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（13G4）- F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（12A4）- F c 1 - D 1 - F c 2またはA n t i - P D - L 1（12A4）- F c 1 -

40

50

D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 および抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 を使用し、一回投与して 9 6 時間後、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 および抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 は、B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) および非標的細胞 (例えば、T 細胞および他の免疫細胞) の大部分が除去された状況が見だされることを示した。1 4 日後、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 または O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2 または A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 群のマウスにおいて、その B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) はまだ除去された状態であるが、C D 4 7 を発現する他の非標的細胞 (例えば、T 細胞) は有意に回復され、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 群のマウスにおいて、B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) または C D 4 7 を発現する非標的細胞にかかわらず回復されなかった。

【 0 2 6 5 】

例えば、図 1 5 に示されたように、高用量の抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (図 1 5 A) および O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (図 1 5 B) は、投与して 9 6 時間後にすべて B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) および C D 4 7 を発現する非標的細胞 (例えば、T 細胞) が大量に除去されたが、1 4 日後、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 (図 1 5 D) 群マウスは、B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) は除去された状態であるが、B 細胞 (C D 2 0 抗

原標的細胞)以下のCD47を発現する非標的細胞(例えば、T細胞)は、有意に回復され、抗CD47抗体Hu5F9-G4(図15C)群マウスにおいて、そのB細胞(CD20抗原標的細胞)、CD47を発現する非標的細胞(例えば、T細胞)はすべて回復兆候がなかった。

【0266】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍を標的とする抗原およびCD47抗原と同時に結合することができる組換えタンパク質において、そのCD47を発現する非標的細胞(例えば、T細胞などの免疫細胞)は、高用量投与条件下で、回復性を有し、当該組換えタンパク質はより高い免疫安全性を有することを示唆した。

【0267】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載のインビボ初期免疫安全性を使用して、CD47を標的とする組換えタンパク質(一価または多価を含む)または抗体(一価または多価を含む)の初期免疫安全性を評価することができることを示唆した。

【0268】

実施例7 標的親和性結合活性に対する異なるトランケーションの影響

組換えタンパク質Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2は、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2及びAnti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2(433,2nM)を例とし、左アームに同じ長さ、右アームに異なる長さのSIRP細胞外トランケーションを使用した組換えタンパク質に適用される。

【0269】

フローサイトメトリーにより標的Her2およびCD47の二重特異性結合状況を検出

SKBR-3細胞(ヒト乳癌細胞)(上海科学院細胞バンクから購入)、成長が良好な細胞を収集し、カウントし、遠心分離し、PBS+2%FBSで 2×10^6 個の細胞/mlの濃度に再懸濁した。細胞を100 μ l/ウェルで96ウェルプレートUプレート(商品番号:3799、Corning)に加え、少なくとも15分間放置し、遠心して上清を吸引し、11希釈度のAnti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2およびAnti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2(433,2nM)から開始、4倍勾配希釈、合計11濃度)をそれぞれ加え、4で1時間インキュベ

10

20

30

40

50

ートし、PBS + 2% FBSで洗浄した後、ヤギ抗ヒトIgG Fc - FITC (F9512 - 2ML、Sigma)を加え、4 で1時間インキュベートし、PBS + 2% FBSで洗浄および再懸濁した後、フローサイトメーター (Accuri C6、BD)により蛍光値を検出した。

【0270】

TrastuzumabとPertuzumabがそれぞれHer2抗原の異なるエピトープに作用し、且つ二つの抗原エピトープと細胞膜の間の距離に大きな違いがあるので、組換えタンパク質Anti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - Fc2、Anti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2、Anti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - Fc2、Anti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2は、すべてSKBR - 3細胞に特異的結合することができるが、結合親和性および達する最大の平均蛍光強度はそれぞれ異なる。

10

【0271】

試験結果は、TrastuzumabとHer2抗原エピトープ (Pedersen M W, et al. Targeting Three Distinct HER2 Domains with a Recombinant Antibody Mixture Overcomes Trastuzumab Resistance. Molecular Cancer Therapeutics, 2015, 14 (3) : 669 - 680)との距離が細胞膜表面により近いので、Anti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - Fc2とSKBR - 3細胞親和性は、Anti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2より優れたことを示す。PertuzumabとHer2抗原エピトープ (Her2細胞外第IIドメイン)との距離が細胞膜表面により遠いので、Anti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - Fc2とSKBR - 3細胞親和性は、Anti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2と同等である。

20

【0272】

以上の試験データは、右アームの異なる長さのトランケーションからなる組換えタンパク質は、組換えタンパク質と標的細胞の親和性を影響することを証明した。近位膜エピトープに結合する左アームにおいて、右アームが短いSIRP トランケーションを選択する場合、二重標的に結合する組換えタンパク質の能力が大幅に向上される。しかし、遠位膜エピトープに結合する左アームにおいて、右アームは、短いSIRP トランケーションを選択すると利点を失い、左アーム抗原標的が細胞膜から遠いほど、右アームのSIRP トランケーションは、長くなることにより最適な一致に達することができる。

30

【0273】

例えば、図16に示したように、SKBR - 3細胞に結合する能力は、Anti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - Fc2 ($EC_{50} = 2.04 \text{ nM}$)がAnti - Her2 (T) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2 ($EC_{50} = 25.95 \text{ nM}$) (図16A)より有意に優れている。SKBR - 3細胞に結合する能力 ($EC_{50} = 15.22 \text{ nM}$)は、Anti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - Fc2がAnti - Her2 (P) - Fc1 - D1 - D2 - Fc2 ($EC_{50} = 11.03 \text{ nM}$)に相当する (図16B)。

【0274】

40

当業者に知られているように、以上の試験結果は、標的抗原空間エピトープと標的細胞膜の表面の距離に従って、右アームが適切な長さのヒトSIRP 細胞外トランケーションを適合的に選択することにより、組換えタンパク質と標的細胞の結合能力を効果的に向上させることができることを示唆した。

【0275】

実施例8 組換えタンパク質急性毒性試験

組換えタンパク質Ofa - Fc1 - D1 - Fc2、Ofa - Fc1 - D1 - D2 - Fc2、Ofa - Fc1 - D1 - D2 - D3 - Fc2、Obi - Fc1 - D1 - Fc2、Obi - Fc1 - D1 - D2 - Fc2、Obi - Fc1 - D1 - D2 - D3 - Fc2、Anti - EGFR - Fc1 - D1 - Fc2、Anti - EGFR - Fc1 - D1 - D2 - Fc

50

2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2の急性毒性試験において、以下の方法では、Ofa-Fc1-D1-Fc2を例とし、右アームにSIRP 細胞外トランケーションを含む組換えタンパク質の検出に適した。

【0276】

注射用Ofa-Fc1-D1-Fc2緩衝液(トリスクエン酸塩、pH 6.5)で適切な量のOfa-Fc1-D1-Fc2溶液(4.02mg/mL)を0.25mg/mLおよび2.5mg/mLにそれぞれ希釈し、それぞれ実験動物第1群と第2群に投与した。

【0277】

健康な4匹のメスカニクイザルは、広西桂東霊長類開発実験有限公司から購入し、4歳であり、広西壮族自治区科学技术庁によって上記実験動物の生産が許可され、実験動物の製造ライセンス番号は、SCXK桂2016-0001である。投与前に、詳細な臨床観察と計量が行われ、異常は観察されなかった。体重の範囲は、投与当日は、2.47~2.85kgであった。

【0278】

【表9】

実験計画

群	試験サンプル	投与量 (mg /k g)*	投与濃 度(m g/m L)	投与体 積(m L/k g)	動物の数	
					オス	メス
1	Ofa-Fc1-D1-Fc2	0.5	0.25	2	0	2
2	Ofa-Fc1-D1-Fc2	5	2.5	2	0	2

* 静脈内注射により投与。

【0279】

4匹のメスカニクイザルを2群に分け、1群当たり2匹、静脈内注射により投与し、投与量は、 0.5 mg/kg 、 5 mg/kg であり、投与体積は、 2 mL/kg である。実験設計は、表9に示した。投与当日に一回投与し、投与後に28日間観察し続けた。カニクイザルは、ケージごとに1つずつ、ステンレス製の移動ケージで飼養した。毎日約12時間の明暗交互の照明を提供した。実験用のサル用配合飼料はBeijing Keao Xielix Feed Co., Ltd.から購入し、特定の絶食を除いて動物は試験中自由に食べさせた。特定の微生物、重金属、残留農薬について当該バッチの飼料は、上海ペニーテストテクノロジー有限公司(PONY)によって検出した。試験中にすべての動物は水筒を介して水を自由に飲み、飲料水は、逆浸透システムでろ過した純水を使用し、計量スタッフが飲料水のpH、硬度、重金属、微生物を検出した。

10

【0280】

試験中にすべての試験動物を1日2回(朝と午後に1回)観察し、観察は、罹患、損傷、死亡、および給水給食状況を含むがこれらに限定されない。すべての試験動物は、試験前に1回の詳細な臨床観察を受けた。試験中にすべての実験動物に対して、投与後、詳細な臨床観察を少なくとも1日1回実施した。観察内容は、罹患、死亡率、損傷、および給水給食状況、皮膚、毛、目、耳、鼻、口、胸、腹部、外性器、手足、呼吸器および循環器系、自律神経効果(例えば、唾液分泌)神経系(例えば、振戦、痙攣、ストレス反応、異常行動など)を含むが、これらに限定されない。動物の体重は、D-1(投与前)、D1、D4、D8、D11、D15、D18、D22、D25および解剖の前にそれぞれ測定した。24時間以内(24時間 \pm 1時間)の動物の食物消費量は、D2、D4、D8、D11、D15、D18、D22、D25でそれぞれ測定した。心電図測定は、D-1、D2、D14、およびD28で、 50 mm/秒 の記録速度で標準IIリード(8リード)を使用して実行した。

20

【0281】

臨床病理学サンプルの収集と血液学、凝固、血液生化学およびリンパ球タイピングは、投与前(D-1)、投与後D2、D7、D14およびD28で行った。28日目に尿サンプルを採取し、尿を分析した。

【0282】

サンプルを採取する前に、すべての動物を一晩(少なくとも10時間)絶食させたが、水は禁止されなかった。大腿静脈($4.5\sim6\text{ mL}$)から血液サンプルを収集し、そのうち約 1.8 mL の全血をクエン酸ナトリウムを含む抗凝固剤チューブに入れ、凝固分析に使用し、約 1 mL の全血を血液分析のためにK3-EDTAを含む抗凝固剤チューブに入れ、約 2 mL の全血を、血液生化学分析のために分離ゲル血液採取チューブ(抗凝固剤なし)に入れ、標準的な操作手順に従って血清を遠心分離した。同時に、投与前D-1、投与後D2分離した後の血清サンプルを、フローサイトメトリーによりT/B細胞タイピング検出を行った。

30

【0283】

D29で動物を安楽死させ、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓の組織、肝臓、肺(主気管支を含む)、腎臓、脾臓、心臓、副腎、下垂体、甲状腺、副甲状腺、胸腺、卵巣、子宮(子宮頸部を含む)、脳などの組織の重量を量った。

40

【0284】

Ofa-Fc1-D1-Fc2それぞれ 0.5 mg/kg および 5 mg/kg の用量で一回静脈内投与した場合、投与後に28日観察し続けた結果、動物に有意な薬物関連の異常は観察されず、この期間中、動物の摂食量と体重は正常範囲内で変動し、動物の血液凝固、尿、心電図関連の試験データは投与前と比較して、投与後に有意な変化を示されず、動物を解剖した後、すべての臓器は通常正常範囲内で観察され、動物の臓器重量、臓器係数、および臓器比率も正常範囲内にある。

【0285】

投与後D2、低用量群と高用量群のリンパ球数とリンパ球の割合は大幅に減少し、D7後に正常レベルに戻ったが、この変化は薬物効果に関連している可能性がある。

50

【0286】

組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 は、同じ用量で O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の上記結果と類似する。

10

20

【0287】

【表10】

カニクイザル赤血球に対する組換えタンパク質の数 (10^{12} 個の細胞/L)

の影響

群	平行試験	動物番号	投与前	投与後 2日	投与後 7日	投与後 14日	投与後 28日
1	1	101	4. 23	4.1 5	3.9 8	5.0 1	5.6 6
	2	102	4. 67	4.1 9	4.0 5	4.7 4	5.1 6
2	1	201	5. 27	4.6 9	4.0 4	4.9 9	5.5 9
	2	202	4. 71	4.0 2	4.2 6	4.9 9	5.7 2

30

40

【0288】

図18Aおよび表10に示したように、 0.5 mg/kg と 5 mg/kg の二つの用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 は、カニクイザル赤血球の数に影響を与えなかった。図18Bおよび表10に示したように、 0.5 mg/kg と 5 mg/kg の二つの用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 は、カニクイザルヘモグロビンに影響を与えなかった。

50

【 0 2 8 9 】

【 表 1 1 】

カニクイザルヘモグロビン (g/L) に対する組換えタンパク質の影響

群	平行試験	動物番号	投与前	投与後 2 日	投与後 7 日	投与後 1 4 日	投与後 2 8 日
1	1	1 0 1	9 7	9 7	8 9	1 1 5	1 2 9
	2	1 0 2	1 0 9	9 8	9 3	1 0 8	1 1 8
2	1	2 0 1	1 2 6	1 1 0	9 6	1 1 5	1 2 9
	2	2 0 2	1 0 7	9 0	9 5	1 1 2	1 2 8

10

【 0 2 9 0 】

組換えタンパク質 O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 は、同じ用量でカニクイザル赤血球の数およびヘモグロビンに対する影響は、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の上記結果と類似する。

20

30

【 0 2 9 1 】

図 1 9 に示したように、T / B 細胞タイピング検出結果によると、0 . 5 m g / k g と 5 m g / k g の 2 用量の O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 は、動物の B 細胞 (C D 2 0 抗原標的細胞) が有意に除去されることを引き起こすことができる。

40

【 0 2 9 2 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍標的抗原と C D 4 7 抗原と同時に結合することができる組を一回投与した後、動物に有意な薬物関連の異常は観察されず、この期間中、動物の摂食量と体重は正常範囲内で変動し、動物の血液凝固、尿、心電図関連の試験データは投与前と比較して、投与後に有意な変化を示されず、動物を解剖した後、すべての臓器は通常正常範囲内で観察され、動物の臓器重量、内臓係数、および臓脳比率も正常範囲内にあることを示唆した。

【 0 2 9 3 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍標的抗原と C D 4 7 抗原に同時に結合することができる組換えタンパク質は、一回投与した後、動物赤血

50

球の数およびヘモグロビンに影響を与えなかったことを示唆した。

【0294】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍標的抗原とCD47抗原に同時に結合することができる組換えタンパク質は、同じ用量下で腫瘍標的抗原が位置される細胞および/または腫瘍細胞を優先的に除去することを示唆した。

【0295】

実施例9 組換えタンパク質のインビボでの腫瘍成長阻害実験

組換えタンパク質O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2のインビボでの腫瘍成長阻害実験において、以下の方法では、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2を例とし、右アームにS I R P 細胞外ランケーションを含む組換えタンパク質の検出に適した。

【0296】

O f a - F c 1 - D 1 - F c 2：無色透明液体、濃度1 . 1 4 - 4 . 0 2 m g / m l、- 8 0 で分注して保存し、リツキシマブ<登録商標>（リツキシマブ単クローン注射液）：無色透明液体、仕様1 0 0 m g / 1 0 m l、ロット番号H 0 2 0 5、2 - 8 で遮光保存した。調製緩衝液（トリスクエン酸塩、p H 6 . 5）：無色透明液体、2 - 8 で保存した。調製方法：O f a - F c 1 - D 1 - F c 2、リツキシマブ<登録商標>はすべて調製緩衝液で希釈し；調製緩衝液を溶剤として直接投与した。

【0297】

細胞：CD20陽性ヒトB細胞リンパ腫D a u d i細胞は、中国科学院細胞バンクから購入した。培養条件は、R P M I 1 6 4 0培地に1 0 %ウシ胎仔血清およびペニシリン、ストレプトマイシンを加え、3 7 で5 % C O ₂ 空気を含むインキュベーターで培養した。週に2回継代した後、細胞が指数関数的増殖期にあるとき、細胞を収集し、カウントし、接種した。

【0298】

実験動物：メスN O D - S C I Dマウス、6 - 7週、上海L i n g c h a n g B i o t e c h n o l o g y C o . , L t d . から購入した。製造ライセンス番号：S C X K（滬）2 0 1 3 - 0 0 1 8；動物証明書番号2 0 1 3 0 0 1 8 2 9 4 6 3、2 0 1 3 0 0 1 8 2 7 5 4 5。飼養環境：S P Fレベル。本実験動物の使用と福祉は、「国際実験動物管理公認協会（A A A L A C）」の規定に従って実施した。動物の健康状態と死亡率を毎日監視し、定期検査には、行為活動、体重の変化、外観の兆候など、動物の毎日の行動に対する被験物質と薬物の効果の観察が含まれる。

【0299】

10

20

30

40

50

各マウスに 1.5×10^7 Daudi 細胞を皮下接種し、接種後 18 日目に平均腫瘍体積が $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したときに、腫瘍体積に応じて群分けて投与した (D0)。マウスに (IV) 薬剤を静脈内注射し、溶剤群には同量の溶剤を注射し、注射体積は $0.1 \text{ mL} / 10 \text{ g}$ 体重であり、投与量と投与スケジュールについては表 12 を参照する。

【0300】

ノギスで腫瘍径を週に 2 回測定し、腫瘍体積 (V) の計算式は以下の通りである。

【0301】

腫瘍体積 (V) 計算式：

$$V = 1/2 \times a \times b^2$$

ここで、a、b は、それぞれ長さ、広さを表す。

10

【0302】

$$T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$$

ここで、T、C は、実験終了時の腫瘍体積であり、 T_0 、 C_0 は、実験開始時の腫瘍体積であり、T は、投与群であり、C は、対照群である。

【0303】

$$\text{腫瘍抑制率 (TGI) (\%)} = 100 - T/C(\%)$$

【0304】

$$\text{腫瘍が消え始めると、腫瘍抑制率 (TGI) (\%)} = 100 - (T - T_0) / T_0 \times 100$$

腫瘍が初期体積よりも小さい場合、即ち、 $T < T_0$ または $C < C_0$ である場合、腫瘍部分的消失 (PR) と定義され、腫瘍が完全に消失した場合、完全腫瘍消失 (CR) と定義される。

20

【0305】

実験終了後、または当動物の腫瘍体積が 1500 mm^3 の安楽死エンドポイントに達したとき、二酸化炭素麻酔により動物を屠殺し、腫瘍を解剖して写真を撮った。

【0306】

2 群の腫瘍体積または腫瘍重量の比較は、両側 Student's t 検定を使用して行われ、 $P < 0.05$ は統計的に有意な差として定義された。

【0307】

Ofa - Fc1 - D1 - Fc2 ($5 \text{ mg} / \text{kg}$ 、IV、週 2 回、5 回) は、Daudi 皮下移植腫瘍の成長を有意に抑制し、腫瘍抑制率は 80.8% であり、1/6 マウスの腫瘍は部分的に消失した。Daudi 皮下移植腫瘍に対するリツキシマブ <登録商標> ($7 \text{ mg} / \text{kg}$ 、IV、週 2 回、5 回) の腫瘍抑制率は 24.5% である。腫瘍を有するマウスは、一般に上記の薬物により耐性が高かった (表 12、図 20、21、22)。

30

【0308】

【表 1 2】

ヒトB細胞リンパ腫D a u d i細胞皮下移植腫瘍に対するO f a - F c

1 - D 1 - F c 2、リツキシマブ<登録商標>の効果

群	投与	経路	平均腫瘍体積 (mm ³) D 0	S E M	平均腫瘍体積 (mm ³) D 1 8	S E M	% T / C	腫瘍抑制率 (%)	P 値	部分的消失	完全に消失	実験開始時の群ごとの動物数	実験終了時の群ごとの動物数
溶剤	D 0, D 3,	I V	1 0 3 . 3	± 1 . 7	1 5 5 8 . 7	± 3 7 4 . 6	—	—	—	0	0	6	6
O f a - F c	D 7, D 1		9 9 . 4	± 1 . 7	3 7 8 . 8	± 9 7 . 5	1 9 .	8 0 .	0 0	1	0	6	6

10

20

30

40

1 - 0,						2	8	1				
D 1 D 1								2				
- F 4								4				
c 2												
リ ツ		1 0	±	1 2	± 1	7	2	0	0	0	6	6
キ シ		1 .	1 .	0	7	5	4	.				
マ ブ		6	0	0 .	5 .	.	.	4				
< 登				8	7	5	5	0				
録 商								8				
標 >								9				
7												
m g												
/ k												
g												

10

20

注：ランダムに群分けして、最初の投与時間はD 0であり、I V：静脈注

射。

30

【0310】

O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 和リツキシマブ<登録商標>は、C D 2 0 陽性ヒトB細胞リンパ腫D a u d i細胞皮下移植腫瘍の成長に対して異なる阻害効果を有し、ここで、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2はリツキシマブ<登録商標>よりも有意に優れ、腫瘍を有するマウスは一般に上記の薬物により耐性が高いことが分かる。

【0311】

組換えタンパク質O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O f a - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、O b i - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (P) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - H e r 2 (T) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - E G F R - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (A t e) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D

40

50

1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 3 G 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - F c 2、A n t i - P D - L 1 (1 2 A 4) - F c 1 - D 1 - D 2 - D 3 - F c 2 は、同じ用量下で N O D - S C I D マウスにインビボ移植された腫瘍の抗腫瘍効果および組換えタンパク質に対するマウスの耐性は、O f a - F c 1 - D 1 - F c 2 の上記結果と類似する。

【 0 3 1 2 】

当業者に知られているように、以上の試験結果は、本発明に記載の腫瘍標的抗原と C D 4 7 抗原に同時に結合することができる組換えタンパク質は、同じ用量下で腫瘍を標的とする抗体と比較して、マウスインビボで予想外に有意な抗腫瘍効果を有することを示唆した。

10

【 0 3 1 3 】

本実験動物の使用と福祉は、「国際実験動物管理公認協会 (A A A L A C) 」の規定に従って実施した。動物の健康状態と死亡率を毎日監視し、定期検査には、行為活動、体重の変化、外観の兆候など、動物の毎日の行動に対する被験物質と薬物の効果の観察が含まれる。

【 0 3 1 4 】

本明細書で提供されるあらゆる実施例または例示的な言語 (例えば、「など」) の使用は、本発明をよりよく説明するためであり、特に請求されない限り、本発明の範囲を限定しない。明細書中の言語は、保護要求されていない要素が本発明の実施に不可欠であることを示すものとして解釈されるべきではない。

20

【 0 3 1 5 】

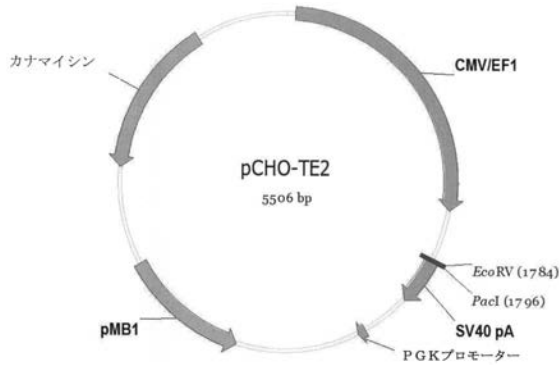
本明細書で引用されるすべての刊行物および特許出願は、個々の出版物または特許出願が、具体的かつ個別に参照により組み込まれるように、参照により本明細書に全体として組み込まれる。なお、本明細書に記載の理論、メカニズム、証拠、または発見は、本発明の理解をさらに高めることを意図しており、いずれかの方法によって本発明をそのような理論、メカニズム、証拠、または発見に限定されることを決して意図していない。本発明は、図面および前述の説明において詳細に示され説明されたが、本発明は例示的であり、限定的ではないとみなされるべきである。

30

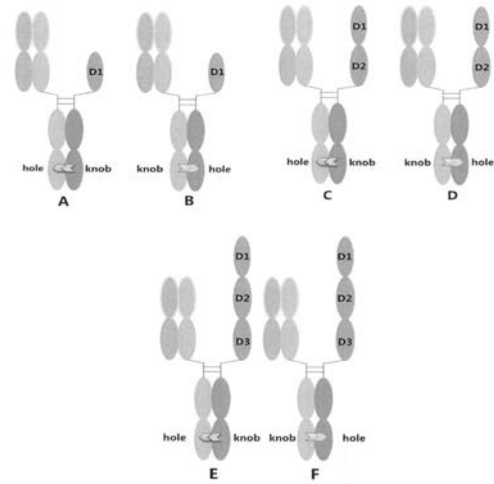
【図 1】



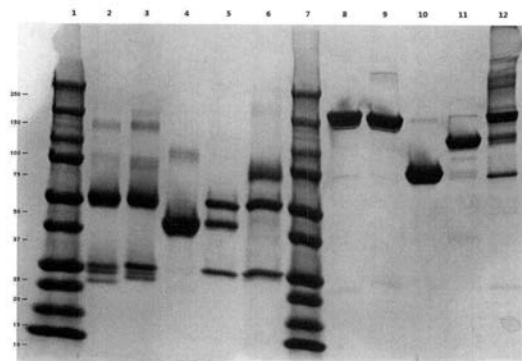
【図 2】



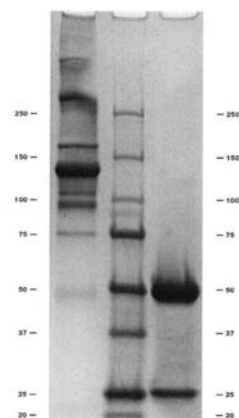
【図 3】



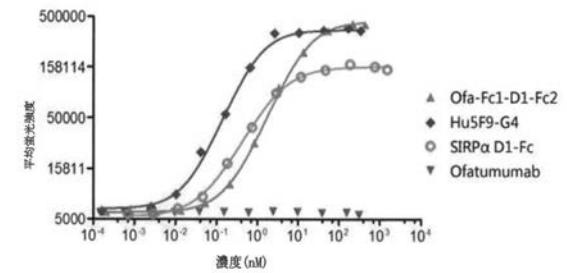
【図 4 A】



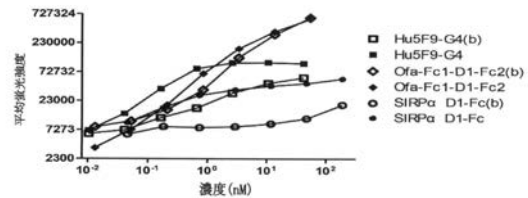
【図 4 B】



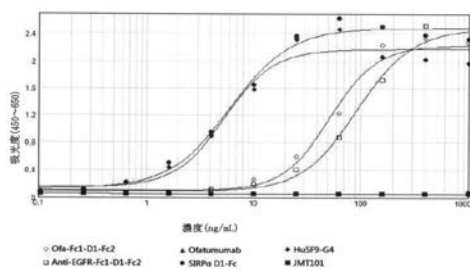
【図 6】



【図 7】

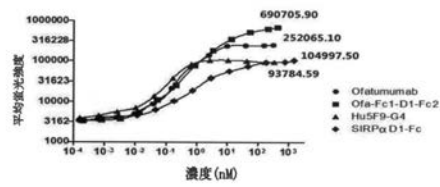


【図 5】

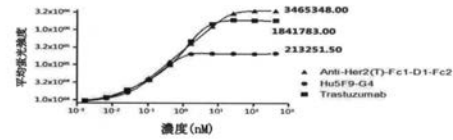


【図 8】

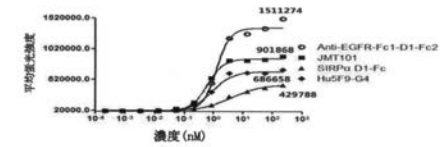
A



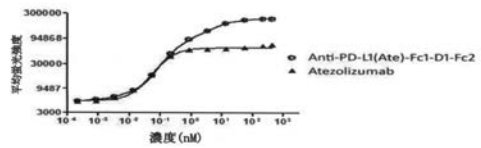
B



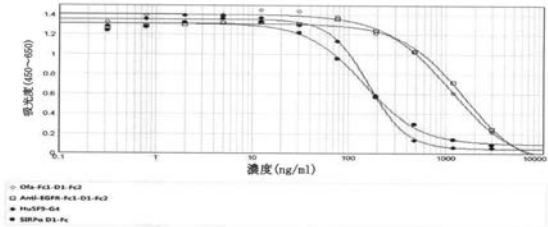
C



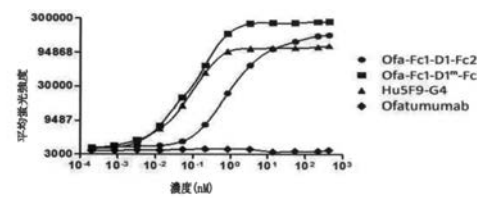
D



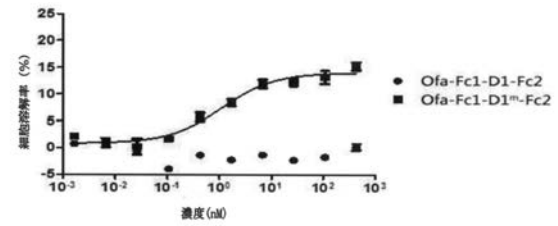
【図 9】



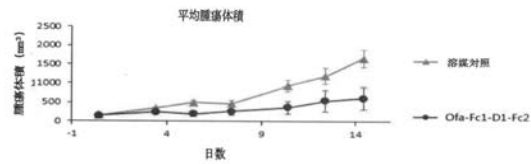
【図 10】



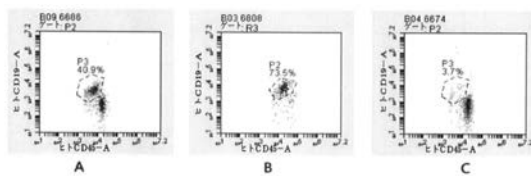
【図 11】



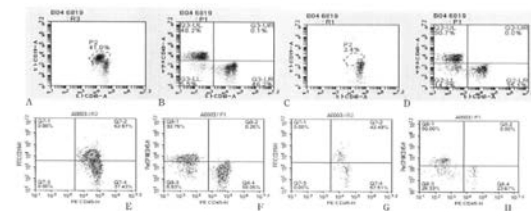
【図 12】



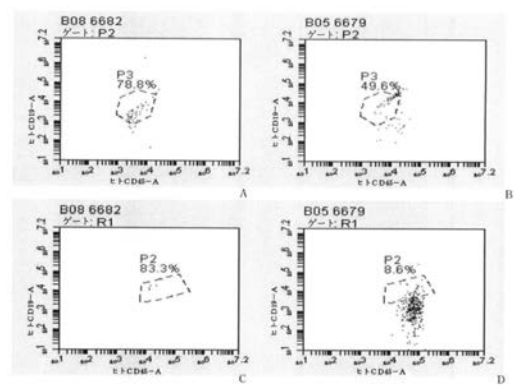
【図 13】



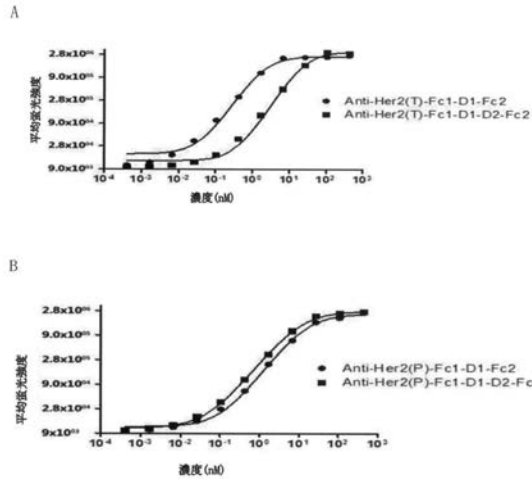
【図 14】



【図 15】



【 図 1 7 A 】

[illegible]

【 図 1 7 C 】

[illegible][illegible]

【配列表】

2020520249000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年1月9日(2020.1.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

高親和性の腫瘍を標的とするアームと、低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質とを含み、

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームはCD47に結合せず、かつ腫瘍細胞上の標的抗原に対する前記高親和性の腫瘍を標的とするアームに対応する抗体の結合親和性は、腫瘍細胞上のCD47に対する低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質に対応するモノマー融合タンパク質ホモダイマーの結合親和性の少なくとも6倍であり、

CD47に対する前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合親和性は、CD47に対するSIRP細胞外トランケーションを含むモノマー融合タンパク質のホモダイマーの結合親和性より高くなく、前記SIRP細胞外トランケーションは、ヒトSIRP野生型細胞外トランケーションまたはCD47非高親和性突然変異のヒトSIRP細胞外トランケーションを含む、二重特異性組換えタンパク質。

【請求項2】

前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、SIRP細胞外トランケーションを含み、前記SIRP細胞外トランケーションは下記a1) - a4)から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、a1)配列番号30、a2)配列番号31、a3)配列番号32、a4)前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのモノマーは、CD47タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、CD47タンパク質に対するa1)、a2)またはa3)モノマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項3】

前記二重特異性組換えタンパク質は、相対的に設定される左、右のアーム構造を有し、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、左アームの位置に位置され、前記低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、右アームの位置に位置され、好ましくは、前記左アームは、免疫グロブリンのFabまたはFab'形態であり、前記右アームは、SIRP細胞外トランケーションである、または、

前記右アームの長さは、標的細胞膜の表面から左アームが結合する必要がある抗原空間エピトープの距離に適合し、より好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームが標的細胞の近位膜エピトープに結合する必要がある場合、前記SIRP細胞外トランケーションは、a1)～a4)中の比較的短いアミノ酸配列を選択して含む、請求項1又は2に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項4】

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームの標的化の標的は、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA

、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138から選択され、

好ましくは、前記標的がCD20、EGFRまたはPD-L1である場合、前記SIRP細胞外トランシェーションは、a1)を選択し、前記標的がHER2である場合、前記SIRP細胞外トランシェーションは、a1)またはa2)を選択する、請求項1～3のいずれか1項に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項5】

高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、分子の間の作用力によって結合され、または鎖間ジスルフィド結合のような共有結合によって結合され、またはイオン結合によって結合され、または上記の結合方法における二つまたは三つの組み合わせによって結合され、

好ましくは、Fc領域をさらに含み、より好ましくは、前記Fc領域は、Fc領域天然配列またはFc非天然配列を含み、更に好ましくは、前記Fc領域は、ヒトFc領域であり、もっとも好ましくは、高親和性の腫瘍を標的とするアームと低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質の結合は、knobs-into-holesによって結合される、請求項1～4のいずれか1項に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項6】

前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、標的化の標的が、5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR-、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、ネクチン-4、Notch2、Notch1、PD-L1、PD-L2、PDGFR-、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138から選択される不完全抗体であり、好ましくは、IgG1抗体の不完全抗体であり、選択的に、ヒトマウスキメラ不完全抗体、ヒト化不完全抗体、完全ヒト不完全抗体であり、より好ましくは、ヒト化または完全ヒトIgG1抗体の不完全抗体である、請求項5に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項7】

低親和性のCD47とSIRPの相互作用をブロックする融合タンパク質は、下記b1)～b4)から選択されるいずれかの一つのアミノ酸配列を含み、b1)配列番号26、b2)配列番号27、b3)配列番号28、b4)前記アミノ酸配列のいずれかの一つのアミノ酸配列が例えば1～5個のアミノ酸残基を挿入、欠損、修飾および/または保守的置換することを経て獲得されるアミノ酸配列であって、そのホモダイマーは、CD47タンパク質に対する結合親和性を有し、且つ当該結合親和性は、CD47タンパク質に対するb1)、b2)またはb3)ホモダイマーの結合親和性より高くないアミノ酸配列を有する、請求項5又は6に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項8】

高親和性の腫瘍を標的とするアームがCD20を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍

を標的とするアームは、配列番号 16 と配列番号 17 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 を含み、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが EGFR を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 19 と配列番号 8 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 を含み、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが Her2 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 20 と配列番号 21、または配列番号 22 と配列番号 23 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 または配列番号 27 を含み、または、

高親和性の腫瘍を標的とするアームが PD-L1 を標的とする場合、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームは、配列番号 24 と配列番号 13 を含み、前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質は、配列番号 26 を含む、請求項 7 に記載の二重特異性組換えタンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項の二重特異性組換えタンパク質をコードする核酸分子であって、

好ましくは、前記高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、同じ DNA 鎖に位置され、または前記高親和性の腫瘍を標的とするアームをコードする核酸分子と前記低親和性の CD47 と SIRP の相互作用をブロックする融合タンパク質をコードする核酸は、異なる DNA 鎖に位置される、核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の細胞を用いて前記組換えタンパク質を発現させる、前記二重特異性組換えタンパク質の製造方法。

【請求項 13】

腫瘍を治療するための薬物の製造における請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の二重特異性組換えタンパク質の用途であって、

好ましくは、前記腫瘍は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽頭癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮細胞癌、皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫または骨髄異形成症候群などの血液腫瘍および固形腫瘍から選択される、用途。

【請求項 14】

a) 標的とされ、ADCC 活性を有する組換えタンパク質 / 抗体 (一価または多価を含む) を提供するステップと、

b) 前記組換えタンパク質 / 抗体の ADCC 活性を検出するステップと、

c) 前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含み、

好ましくは、ステップ a) とステップ b) の間に、

a1) ヒト NK92MI-CD16a エフェクター細胞などであるが、これに限定されないエフェクター細胞を製造するステップと、

a2) エフェクター細胞を組換えタンパク質 / 一価または多価抗体を含む抗体と接触させるステップとをさらに含み、

より好ましくは、前記 a1) において、獲得されたエフェクター細胞を 1×10^5 個の細胞 / ml 乃至 5×10^6 個の細胞 / ml の細胞密度に再懸濁させ、前記 a2) において、勾配希釈した組換えタンパク質 / 抗体を、a1) で製造されたエフェクター細胞と 0 .

5～5 h インキュベートし、前記 b) において、LDH 活性を測定し、細胞分解率を計算し、および / または、前記 c) において、細胞分解率に従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価し、ここで、細胞分解率を低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、CD47 を標的とし、且つ ADCC 活性を有する組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビトロ評価方法。

【請求項 15】

a) CD47 を標的とする組換えタンパク質 / 一価または多価抗体を含む抗体を提供するステップと、

b) Hu-NSG マウスを提供するステップと、

c) 前記組換えタンパク質 / 抗体を Hu-NSG マウスと接触させるステップと、

d) 前記 Hu-NSG マウスにおける前記組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価するステップとを含み、

好ましくは、前記 c) において、24～96 時間の投与後、マウス静脈血を採取し、赤血球を分解し、残りの細胞を蛍光標識した抗ヒト CD45、抗ヒト CD19 または抗ヒト CD3 の抗体とともに 15～60 min インキュベートし、フローサイトメトリー検出を行い、前記 d) において、細胞クリアランスに従って組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性を評価し、ここで、免疫細胞クリアランスを低下させる組換えタンパク質 / 抗体の免疫安全性が高い、CD47 を標的とする組換えタンパク質 / 抗体の初期免疫安全性のインビボ評価方法。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2018/086050
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/53 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; PUBMED; NCBI GENBANK; UNIPROT; EBIEMBL; GOOGLE; 序列, 双特异性, 抗体, CD47, SIRP α , 突变, Knob-in-hole, 癌, 肿瘤, Fc, 免疫安全性, bispecific? antibody, mutation, cancer, tumor, tumour, immunological safety		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2018075857 A1 (I-MAB), 26 April 2018 (26.04.2018), abstract, and claims 9-15	1, 3, 5, 11-15
PX	CN 107459579 A (TAIZHOU MAIBO TAIKE PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 12 December 2017 (12.12.2017), description, paragraphs 17-26, and figure 1	1, 3, 5-17
PY	CN 107459579 A (TAIZHOU MAIBO TAIKE PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 12 December 2017 (12.12.2017), description, paragraphs 17-26, and figure 1	1-15
X	CN 106519036 A (XINXIANG MEDICAL UNIVERSITY), 22 March 2017 (22.03.2017), description, paragraphs 12-14, 16-24, 29, 56 and 72, figure 1, and sequence 10	1, 3, 5-17
Y	CN 106519036 A (XINXIANG MEDICAL UNIVERSITY), 22 March 2017 (22.03.2017), description, paragraphs 12-14, 16-24, 29, 56 and 72, figure 1, and sequence 10	1-15
Y	LEE, W.Y. et al., "The Role of Cis Dimerization of Signal Regulatory Protein α (SIRP α) in Binding to CD47", The Journal of Biological Chemistry, 03 December 2010 (03.12.2010), 285(49), pages 37953-37963	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 July 2018		Date of mailing of the international search report 01 August 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451		Authorized officer GUO, Tingting Telephone No. 86-(10)-53961925

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/086050

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, W.Y. et al., "Novel Structural Determinants on SIRP α that Mediate Binding to CD47", The Journal of Immunology, 31 December 2007 (31.12.2007), vol. 179, pages 7741-7750	1-15
X	CN 105121467 A (NOVIMMUNE S.A.), 02 December 2015 (02.12.2015), abstract, claims 11-29, and embodiments 12-15	1, 3, 5, 11-17
A	CN 106146670 A (IMMUNEONCO BIOPHARMACEUTICALS (SHANGHAI) CO., LTD.), 23 November 2016 (23.11.2016), entire document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/086050

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018075857 A1	26 April 2018	KR 20180056682 A	29 May 2018
		AU 2017332960 A1	10 May 2018
		CA 2999058 A1	20 April 2018
CN 107459579 A	12 December 2017	None	
CN 106519036 A	22 March 2017	None	
CN 105121467 A	02 December 2015	RU 2015126533 A	12 January 2017
		EP 2925782 A2	07 October 2015
		WO 2014087248 A2	12 June 2014
		US 2014303354 A1	09 October 2014
		WO 2014087248 A3	06 November 2014
		JP 2015536351 A	21 December 2015
		CA 2892585 A1	12 June 2014
		AU 2013353763 A1	11 June 2015
CN 106146670 A	23 November 2016	JP 2018512850 A	24 May 2018
		EP 3287470 A1	28 February 2018
		US 2018141986 A1	24 May 2018
		WO 2016169261 A1	27 October 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086050

A. 主题的分类

C07K 16/46(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; Uniprot; EBI-EMBL; Google; 序列, 双特异性, 抗体, CD47, SIRP α , 突变, Knob-in-hole, 癌, 肿瘤, Pc, 免疫安全性, bispecific, antibody, mutation, cancer, tumor, tumour, immunological safety

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	WO 2018075857 A1 (I-MAB) 2018年 4月 26日 (2018-04-26) 摘要, 权利要求9-15	1, 3, 5, 11-15
PX	CN 107459579 A (泰州迈博太科药业有限公司) 2017年 12月 12日 (2017-12-12) 说明书第17-26段, 附图1	1, 3, 5-17
PY	CN 107459579 A (泰州迈博太科药业有限公司) 2017年 12月 12日 (2017-12-12) 说明书第17-26段, 附图1	1-15
X	CN 106519036 A (新乡医学院) 2017年 3月 22日 (2017-03-22) 说明书第12-14、16-24、29、56、72段, 附图1, 序列10	1, 3, 5-17
Y	CN 106519036 A (新乡医学院) 2017年 3月 22日 (2017-03-22) 说明书第12-14、16-24、29、56、72段, 附图1, 序列10	1-15
Y	LEE, W. Y. 等, "The Role of cis Dimerization of Signal Regulatory Protein α (SIRP α) in Binding to CD47." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., 第285卷, 第49期, 2010年 12月 3日 (2010-12-03), 第37953-37963页	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“B” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 7月 23日

国际检索报告邮寄日期

2018年 8月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

郭婷婷

传真号 (86-10)62019451

电话号码 86-(10)-53961925

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086050

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	LEE, W. Y. 等. "Novel Structural Determinants on SIRP α that Mediate Binding to CD47." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY., 第179卷, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第7741-7750页	1-15
X	CN 105121467 A (诺夫免疫股份有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 摘要, 权利要求11-29, 实施例12-15	1, 3, 5, 11-17
A	CN 106146670 A (宜明昂科生物医药技术上海有限公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 全文	1-17

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086050

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/086050

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2018075857	A1	2018年 4月 26日	KR	20180056682	A	2018年 5月 29日
				AU	2017332960	A1	2018年 5月 10日
				CA	2999058	A1	2018年 4月 20日
CN	107459579	A	2017年 12月 12日	无			
CN	106519036	A	2017年 3月 22日	无			
CN	105121467	A	2015年 12月 2日	RU	2016126533	A	2017年 1月 12日
				EP	2925782	A2	2015年 10月 7日
				WO	2014087248	A2	2014年 6月 12日
				US	2014303354	A1	2014年 10月 9日
				WO	2014087248	A3	2014年 11月 6日
				JP	2015536351	A	2015年 12月 21日
				CA	2892586	A1	2014年 6月 12日
				AU	2013353763	A1	2015年 6月 11日
CN	106146670	A	2016年 11月 23日	JP	2018512850	A	2018年 5月 24日
				EP	3287470	A1	2018年 2月 28日
				US	2018141986	A1	2018年 5月 24日
				WO	2016169261	A1	2016年 10月 27日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	E
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (72)発明者 クイ シャオティアン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 ワン ジャン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 ウ ハイシャン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 ジア ジアナ
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 ファン イ
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 ジャン ガンリアン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 リ タオ
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 シュ ホン
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201
- (72)発明者 シュ イシャ
中華人民共和国 201210 シャンハイ チャイナ(シャンハイ)パイロット フリー トレード ゾーン ジュリ ロード ナンバー300 ルーム 201

ード ゾーン ジュリ ロード ナンバー 3 0 0 ルーム 2 0 1

(72)発明者 ロン カイ

中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハイ チャイナ (シャンハイ) パイロット フリー トレ

ード ゾーン ジュリ ロード ナンバー 3 0 0 ルーム 2 0 1

F ターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ79 QR77 QX01

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA05

4C085 AA13 AA14 AA19 BB31 BB41 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01

GG10 HH20 KA03 KA04 KB82 LL18 LL20

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA22 EA28 FA74