

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7492336号
(P7492336)

(45)発行日 令和6年5月29日(2024.5.29)

(24)登録日 令和6年5月21日(2024.5.21)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	19/00 (2006.01)	F I	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)		C 0 7 K	14/54	Z N A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)		C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)		A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	Y

請求項の数 4 (全120頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-521081(P2019-521081)
 (86)(22)出願日 平成29年10月21日(2017.10.21)
 (65)公表番号 特表2019-533449(P2019-533449)
 A)
 (43)公表日 令和1年11月21日(2019.11.21)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/057757
 (87)国際公開番号 WO2018/075989
 (87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)
 審査請求日 令和2年9月10日(2020.9.10)
 審判番号 不服2022-11863(P2022-11863/J
 1)
 審判請求日 令和4年8月1日(2022.8.1)
 (31)優先権主張番号 62/411,216
 (32)優先日 平成28年10月21日(2016.10.21)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 最終頁に続く

(73)特許権者 504090190
 アルター・バイオサイエンス・コーポレーション
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33025
 ミラマー ノース・コマース・パークウェイ 2810号
 (73)特許権者 518203696
 ナントセル、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 90232, カルバー シティ, 99200
 ジェファーソン ブールバード
 (74)代理人 100189131
 弁理士 佐伯 拓郎
 (74)代理人 100182486
 弁理士 中村 正展
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多量体 IL - 15 に基づく分子

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 2 の可溶性タンパク質を含む単離された可溶性融合タンパク質複合体であって、

第一の可溶性タンパク質がインターロイキン - 15 (IL - 15) ポリペプチドドメインを含み、かつ第二の可溶性タンパク質がイムノグロブリン Fc ドメインと融合した可溶性の IL - 15 受容体 スシ結合ドメイン (IL - 15 R_Su) であって、

第一の可溶性タンパク質が結合ドメインを含み、免疫チェックポイント分子又は免疫シグナル分子と特異的に結合し、配列番号 2 または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一であって、

第一の可溶性タンパク質の IL - 15 ポリペプチドドメインが第二の可溶性タンパク質の IL - 15 R_Su ドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する、可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2】

第一又は第二の可溶性タンパク質のうちの 1 つが疾患の抗原、免疫チェックポイント分子又は免疫シグナル分子と特異的に結合する第二の結合ドメインをさらに含む、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 3】

前記第二の結合ドメインが、プログラム細胞死リガンド (PD-L1)、プログラム細胞死 1 (PD-1)、細胞傷害性 T リンパ球に関連したタンパク質 4 (CTLA-4)、

分化抗原群 33 (C D 33)、分化抗原群 47 (C D 47)、グルココルチコイドに誘発される腫瘍壞死因子受容体 (T N F R) 群に関する遺伝子 (G I T R)、リンパ球機能に関連した抗原 1 (L F A - 1)、組織因子 (T F)、デルタ様タンパク質 4 (D L L 4)、一本鎖 D N A 又は T 細胞イムノグロブリン及びムチンドメイン含有 - 3 (T i m - 3) を含む 1 又はそれ以上の分子と特異的に結合する、請求項 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 4】

第二の可溶性タンパク質が配列番号 : 4、8、12、14、16、22、26、30、34、36、40、42、44、46、51、52、53 又は 54 のうちの 1 つに示されたアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2017年6月1日に出願された米国特許仮出願第 62 / 513,964 号及び 2016 年 10 月 21 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 411,216 号の優先権を主張する。これらの出願の全内容は参考によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は概して多量体融合分子の分野に関する。

20

【背景技術】

【0003】

本明細書に記載の発明に先立ち、疾患の部位に対して多様なエフェクター分子を標的化し、非特異的免疫活性と関連のある副作用を伴わずに治療上の利益を提供するための新たな戦略を発展させることが急務であった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、少なくとも部分的には、複数特異的な I L - 15 に基づくタンパク質複合体が免疫細胞の刺激を高め、疾患細胞に対してそれらの活性を促進させ、それにより疾患の低減又は予防をもたらすという驚くべき発見に基づく。これらの I L - 15 に基づくタンパク質複合体は疾患及び標的抗原との増加した結合をまた示す。本明細書では、I L - 15 又は機能性多様体を含む 1 つのドメイン、及び疾患抗原、免疫チェックポイント又はシグナル分子に特異的な結合ドメインを有する複数特異的なタンパク質複合体を提供する。具体的には、本明細書に記載のタンパク質複合体は、プログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1)、プログラム細胞死 1 (P D - 1)、細胞傷害性 T リンパ球に関連したタンパク質 4 (C T L A - 4)、分化抗原群 47 (C D 47)、T 細胞イムノグロブリン及びムチンドメイン含有 - 3 (T i m - 3 、 T i m 3)、若しくはグルココルチコイドに誘発された腫瘍壞死因子受容体 (T N F R) 群に関する遺伝子 (G I T R) を認識する結合ドメインと融合した I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u - I g F c 骨格 (スキヤフオールド) を含む。これらの複合体は I L - 15 活性を介して N K 細胞及び T 細胞反応を誘発し、抗 P D - L 1 、 P D - 1 、 C T L A - 4 、 C D 47 、 T i m 3 又は G I T R 結合ドメインを介して免疫チェックポイント阻害を通じ免疫反応を増加させる (図 1)。一部の場合では、これらの複合体は疾患細胞上に発現した抗原、例えば P D - L 1 、一本鎖デオキシリボ核酸 (s s D N A) 、 C D 20 、ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 (H E R 2) 、上皮細胞成長因子受容体 (E G F R) 、 C D 19 、 C D 38 、 C D 52 、ジシアロガングリオシド (G D 2) 、 C D 33 、 N o t c h 1 、細胞間接着分子 1 (I C A M - 1) 、組織因子又は H I V エンベロープをまた認識し、 F c 結合ドメインを介して疾患細胞に対し抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 及び補体依存性細胞傷害 (C D C) を刺激する。

30

【課題を解決するための手段】

40

50

【0005】

本明細書に提供される単離された可溶性融合タンパク質複合体は、少なくとも2つの可溶性タンパク質を含む。例えば、第一のタンパク質はインターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド、例えば、N72D変異を含む多様体IL-15ポリペプチド(IL-15N72D)を含む。第二のタンパク質はイムノグロブリンFcドメイン(IL-15R_{Su}/Fc)と融合した可溶性IL-15受容体スシ結合ドメイン(IL-15R_{Su})を含む。単離された可溶性融合タンパク質複合体の第三の成分は、疾患抗原、免疫チェックポイント分子又はシグナル分子、例えばPD-L1、PD-1、CTLA-4、CD47、TIM3又はGITRを認識する結合ドメインを含み、そこで該結合ドメインはIL-15N72D又はIL-15R_{Su}/Fcタンパク質のどちらかと融合している。一部の場合では、これらの結合ドメインはIL-15N72D及びIL-15R_{Su}/Fcタンパク質の両方と結合している。他の場合では、これらの結合ドメインのうちの1つが、IL-15N72D又はIL-15R_{Su}/Fcタンパク質と融合しており、第二の結合ドメイン、すなわち免疫チェックポイント又はシグナル分子又は疾患抗原に特異的な結合ドメインは他のタンパク質と融合している。一態様において、疾患抗原は新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患と関連している。一部の場合では、第一又は第二の可溶性タンパク質は、疾患細胞上に発現した疾患抗原、例えばPD-L1、ssDNA、CD20、HER2、EGFR、CD19、CD38、CD52、GD2、CD33、Notch1、細胞間接着分子1(ICAM-1)、組織因子又はHIVエンベロープ又は他の既知の抗原を認識する結合ドメインをさらに含む。あるいは、IL-15N72D又はIL-15R_{Su}/Fcタンパク質のどちらかが疾患抗原、免疫チェックポイント又はシグナル分子に特異的な結合ドメインを含み、他方のタンパク質(それぞれIL-15R_{Su}/Fc又はIL-15N72Dタンパク質)が追加の融合した結合ドメインを含まない。第一のタンパク質のIL-15N72Dドメインは第二のタンパク質の可溶性IL-15R_{Su}ドメインと結合し、可溶性融合タンパク質複合体を形成する。例示的な融合タンパク質複合体は、IL-15N72D及び/又はIL-15R_{Su}/Fc融合タンパク質と共に結合した抗PD-L1抗体を含む(図1及び図2)。あるいは、第一のタンパク質がイムノグロブリンFcドメインと融合した可溶性IL-15受容体スシ結合ドメイン(IL-15R_{Su})と共に結合した抗PD-L1抗体を含む一方、第二のタンパク質はN72D変異を含む多様体インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド(IL-15N72D)と共に結合した疾患抗原を認識する結合ドメインを含む。

【0006】

一部の場合では、該結合ドメインが一本鎖抗体(scaAb又はscFv)を含み、そこでイムノグロブリン軽鎖可変ドメインがポリペプチドリンクー配列によってイムノグロブリン重鎖可変ドメインと共に結合している。あるいは、該結合ドメインは免疫チェックポイント阻害剤又は免疫アゴニストとして作用可能な可溶性又は細胞外リガンド又は受容体ドメインを含む。

【0007】

例示的な第一のタンパク質は配列番号：2、6、10、18、20、24、28、32又は38に示されたアミノ酸配列を含む。例示的な第二のタンパク質は配列番号：4、8、12、14、16、22、26、30、34、36、40、42、44、46、51、52、53又は54に示されたアミノ酸配列を含む。第一のタンパク質をコードする例示的な核酸配列は、配列番号：1、5、9、17、19、23、27、31又は37に示された配列を含む。第二のタンパク質をコードする例示的な核酸配列は配列番号：3、7、11、13、15、21、25、29、33、35、39、41、43、45、47、48、49又は50に示された配列を含む。一態様において、該核酸配列は該融合タンパク質をコードする配列と作動可能に結合されたプロモーター、翻訳開始シグナル及びリーダー配列をさらに含む。本明細書に記載の核酸配列を含むDNAベクターもまた提供される。例えば、該核酸配列は複製、発現又はその両方のためにベクター内に存在する。

10

20

30

40

50

【0008】

第二の可溶性融合タンパク質複合体と共有結合した第一の可溶性融合タンパク質複合体を含む可溶性融合タンパク質複合体もまた提供される。例えば、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は多量体化され、例えば、二量体化、三量体化又はその他に多量体化（例えば、4つの複合体、5つの複合体等）される。例えば、多量体はホモ多量体又はヘテロ多量体である。該可溶性融合タンパク質複合体は共有結合、例えばジスルフィド結合、化学架橋剤によって結合される。一部の場合では、ある可溶性融合タンパク質は、第一の可溶性タンパク質のFcドメインと第二の可溶性タンパク質のFcドメインを結合するジスルフィド結合によって、別の可溶性融合タンパク質と共有結合している。

【0009】

該Fcドメイン又はその機能性フラグメントは、IgG Fcドメイン、ヒトIgG1 Fcドメイン、ヒトIgG2 Fcドメイン、ヒトIgG3 Fcドメイン、ヒトIgG4 Fcドメイン、IgA Fcドメイン、IgD Fcドメイン、IgE Fcドメイン及びIgM Fcドメイン；マウスIgG2Aドメインからなる群から選択されるFcドメイン、又はそれらの任意の組み合わせを含む。任意選択的に、該Fcドメインは、変化した相補体若しくはFc受容体結合特性、又は変化した二量体化又はグリコシル化プロフィールを有するFcドメインをもたらすアミノ酸変化を含む。変化した相補体若しくはFc受容体結合特性、又は変化した二量体化又はグリコシル化プロフィールを有するFcドメインを産生するアミノ酸変化が当該分野において知られている。例えば、IgG1 CH2の234位と235位のロイシン残基（抗体コンセンサス配列に基づくナンバリング）（すなわち、.....PELLGG.....）とアラニン残基（すなわち、.....PEAAGG.....）の置換は、Fc受容体結合の損失をもたらす一方、IgG1 CH2の322位のリジン残基（抗体コンセンサス配列に基づくナンバリング）（すなわち、.....KCKSLS.....）とアラニン残基（すなわち、.....KCASL.....）の置換は、補体活性化の損失をもたらす。一部の場合では、かかる変異は組み合わさっている。

【0010】

一部の態様において、該結合ドメインはポリペプチドリンカー配列によってIL-15ポリペプチド（又はその機能性フラグメント）と共有結合している。同様に、該結合ドメインはポリペプチドリンカー配列によってIL-15Rポリペプチド（又はその機能性フラグメント）と共有結合している。任意選択的に、該IL-15Rポリペプチド（又はその機能性フラグメント）はポリペプチドリンカー配列によって該Fcドメイン（又はその機能性フラグメント）と共有結合している。各ポリペプチドリンカー配列は独立して選択され得る。任意選択的に、ポリペプチドリンカー配列は同一である。あるいは、それらは異なる。

【0011】

任意選択的に、少なくとも1つの可溶性融合タンパク質が検出可能な標識を含む本発明の可溶性融合タンパク質複合体が提供される。検出可能な標識は、限定されないが、ビオチン、ストレプトアビシン、酵素、又はその触媒活性フラグメント、放射性核種、ナノ粒子、常磁性金属イオン、又は蛍光、リン光性若しくは化学発光分子、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0012】

一部の実施形態では、第一の可溶性タンパク質をコードする核酸配列は配列番号：1、5、9、17、19、23、27、31又は37に示された配列を含む。一部の実施形態では、第二の可溶性タンパク質をコードする核酸配列は配列番号：3、7、11、13、15、21、25、29、33、35、39、41、43、45、47、48、49又は50に示された配列を含む。

【0013】

一部の実施形態では、核酸配列は配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、48、49又は50を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

該核酸配列は、該可溶性タンパク質をコードする配列と作動可能に結合されたプロモーター、翻訳開始シグナル及びリーダー配列をさらに含む。

【 0 0 1 5 】

他の実施形態では、ポリペプチドは配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、51、52、53又は54を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法を提供する。該方法は以下の段階を含む：a) 第一の宿主細胞内に第一のタンパク質をコードする適切な制御配列を有するDNAベクターを導入すること、b) 第一のタンパク質が細胞内又は培地内で発現するのに十分な状況下で宿主細胞を培地で培養すること、c) 宿主細胞又は培地から第一のタンパク質を精製すること、d) 第二の宿主細胞内に第二のタンパク質をコードする適切な制御配列を有するDNAベクターを導入すること、e) 第二のタンパク質が細胞内又は培地内で発現するのに十分な状況下で宿主細胞を培地で培養すること；及びf) 宿主細胞又は培地から第二のタンパク質を精製すること、及びg) 第一と第二のタンパク質を、第一のタンパク質のIL - 15ドメインと第二のタンパク質の可溶性IL - 15Rドメイン間が結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成するのに十分な状況下で精製すること。

10

【 0 0 1 7 】

一部の場合では、該方法は発現ベクターから発現したポリペプチド間のジスルフィド結合を形成するのに十分な状況下で第一と第二のタンパク質を混合することをさらに含む。

20

【 0 0 1 8 】

あるいは、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法は、a) 宿主細胞内に第一のタンパク質をコードする適切な制御配列を有するDNAベクター、及び第二のタンパク質をコードする適切な制御配列を有するDNAベクターを導入すること、b) タンパク質が細胞内又は培地内で発現し、第一のタンパク質のIL - 15ドメインと第二のタンパク質のIL - 15Rドメイン間を関連させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な状況下で宿主細胞を培地で培養すること、及びc) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製することによって実行される。

30

【 0 0 1 9 】

一態様において、該方法は発現ベクターから発現されたポリペプチド間のジスルフィド結合を形成するのに十分な状況下で第一及び第二のタンパク質を混合することをさらに含む。

【 0 0 2 0 】

以下を含む可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法がまた提供される：a) 宿主細胞に第一及び第二のタンパク質をコードする適切な制御配列を有するDNAベクターを導入すること、b) タンパク質が細胞内又は培地内で発現し、第一のタンパク質のIL - 15ドメインと第二のタンパク質のIL - 15Rドメイン間を関連させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させ、ポリペプチド間のジスルフィド結合を形成させるのに十分な状況下で宿主細胞を培地で培養すること；c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること。

40

【 0 0 2 1 】

任意選択的に、該方法は発現ベクターから発現されたポリペプチド間のジスルフィド結合を形成するのに十分な状況下で第一及び第二のタンパク質を混合することをさらに含む。

【 0 0 2 2 】

治療を必要とする対象の新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患を治療する方法は、本明細書に記載の可溶性融合タンパク質複合体、例えば可溶性抗PD - L1 scAb / IL - 15N72D：抗PD - L1 scAb / IL - 15R Su / Fc 融合タンパク質複合体を含む有効量の医薬組成物を対象に投与し、それにより新生組織形成、感染症又

50

は自己免疫性疾患を治療することにより実行される。例えば、治療を必要とする対象の固形又は血液悪性腫瘍を治療する方法は、可溶性抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質複合体を対象に投与し、それにより悪性腫瘍を治療することにより実行される。例示的な抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D タンパク質は、配列番号：2 及び 6 に示されたアミノ酸配列を含む。例示的な抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c タンパク質は、配列番号：4 及び 8 に示されたアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載の方法による治療に適した新生組織形成は、膠芽腫、前立腺癌、急性骨髓性白血病、B 細胞新生物、多発性骨髄腫、B 細胞リンパ腫、B 細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、皮膚 T 細胞性リンパ腫、T 細胞リンパ腫、充実性腫瘍、尿路上皮 / 膀胱腫瘍、黒色腫、肺癌、腎細胞癌、乳癌、胃癌及び食道癌、頭部及び頸部癌、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、並びに頭部及び頸部の扁平上皮癌を含む。

10

【 0 0 2 4 】

本明細書に記載の方法を用いる治療のための例示的な感染は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) を有する感染である。例示的な核酸配列は、配列番号：4 7、4 8、4 9 又は 5 0 を含む。例示的なアミノ酸配列は、配列番号：5 1、5 2、5 3 又は 5 4 を含む。本明細書に記載の方法は細菌感染（例えばグラム陽性菌又はグラム陰性菌）を治療することにまた有用である (Oleksiewicz et al. 2012. Arch Biochem Biophys. 526:124-31)。本明細書に記載の方法を用いる治療のための例示的な自己免疫性疾患は、B 細胞によって介在される自己免疫性疾患である。かかる自己免疫性疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、突発性血小板増加症、I g M 介在性多発ニューロパチー、第 V I I I 因子欠乏症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、炎症性筋炎、尋常性天疱瘡、視神経脊髄炎、A N C A 関連血管炎、慢性炎症性脱髓性多発ニューロパチー、自己免疫性貧血、赤芽球瘍、血栓性血小板減少性紫斑病 (T T P)、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、エバンス症候群、血管炎（例えはかつてウェゲナー肉芽腫症と呼ばれた多発血管炎性肉芽腫症）、水疱性皮膚疾患（例えは天疱瘡、類天疱瘡）、1 型糖尿病、抗 N M D A 受容体抗体脳炎及びデビック病、グレイブス眼病、自己免疫性膀胱炎、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群 (O M S) 並びに I g G 4 に関する疾患を含む。

20

【 0 0 2 5 】

融合タンパク質複合体を含む医薬組成物は有効量で投与される。例えば、該医薬組成物の有効量は約 1 μ g / k g と約 1 0 0 μ g / k g の間、例えは 1、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5 又は 1 0 0 μ g / k g である。あるいは、T x M 複合体は固定用量又は体表面積（すなわち、m²あたり）に基づいて投与される。

30

【 0 0 2 6 】

該融合タンパク質複合体を含む医薬組成物は少なくとも 1 ヶ月に 1 回、例えは 1 ヶ月に 2 回、1 週間に 1 回、1 週間に 2 回、1 日に 1 回、1 日に 2 回、8 時間ごとに、4 時間ごとに、2 時間ごとに又は 1 時間ごとに投与される。該医薬組成物のための適した投与の様式は全身投与、静脈内投与、局所投与、皮下投与、筋肉内投与、腫瘍内投与、吸入及び腹腔内投与である。

40

【 0 0 2 7 】

好ましくは、該融合タンパク質複合体はインターフェロン (I F N -) の血中濃度を増加させる、及び / 又は C D 4⁺ 細胞及び C D 8⁺ 細胞及び N K 細胞を刺激して対象の疾患細胞又は腫瘍細胞を殺傷する。

【 0 0 2 8 】

本発明の可溶性タンパク質複合体の一部の態様において、該 I L - 1 5 ポリペプチドは天然の I L - 1 5 ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を有する I L - 1 5 R 多様体であ

50

る。ヒトのIL-15ポリペプチドは、本明細書中ではhuIL-15、hIL-15、huIL15、hIL15、IL-15野生型(wt)を指し、それらの多様体は天然のアミノ酸を用いること、成熟配列中のその位置及び多様体アミノ酸を指す。例えば、huIL15N72Dは72位においてNのDへの置換を含むヒトIL-15を指す。一態様において、IL-15アゴニストとしてのIL-15多様体機能は、例えば天然のIL-15ポリペプチドと比較してIL-15/IL-2Fc受容体(IL-15R)の増加した結合活性によって明らかにされている。あるいは、IL-15アンタゴニストとしてのIL-15多様体機能は、例えば天然のIL-15ポリペプチドと比較してIL-15Rの減少した結合活性によって明らかにされている。

【0029】

10

標的細胞を殺傷する方法は、a)複数の細胞を本発明の可溶性融合タンパク質と接触させ、そこで複数の細胞がIL-15ドメインによって認識されるIL-15R鎖を保有する免疫細胞、又はチェックポイント阻害剤若しくは免疫アゴニスト結合ドメインによって調節されるチェックポイント又はシグナル分子を保有する免疫細胞、及び標的疾患細胞をさらに含むこと；b)IL-15R若しくはシグナル分子を介して、又はチェックポイント分子の阻害を介して免疫細胞を活性化させること；c)活性化免疫細胞によって標的疾患細胞を殺傷することによって実行される。例えば、該標的細胞は腫瘍細胞、自己免疫性細胞又はウイルス感染細胞である。一部の場合では、該結合ドメインは抗PD-L1抗体を含む。

【0030】

20

標的細胞を殺傷する方法は、a)複数の細胞を本発明の可溶性融合タンパク質複合体に接触させ、そこで複数の細胞がFcドメインによって認識されるFc受容体鎖を保有する免疫細胞、及び結合ドメイン、例えば抗原に特異的なscAbによって認識される抗原を保有する標的疾患細胞をさらに含むこと；b)免疫細胞を結合して活性化させるのに十分な標的細胞上の抗原と免疫細胞上のFc受容体鎖間の特異的な結合複合体(架橋)を形成させること；c)結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷することをさらに含む。例えば、該標的細胞は腫瘍細胞、自己免疫性細胞又はウイルス感染細胞である。一部の場合では、該結合ドメインは抗PD-L1抗体を含む。

【0031】

患者の疾患を予防又は治療する方法がまた提供され、該方法は以下の段階を含む：a)本発明の可溶性融合タンパク質複合体を患者に投与すること；b)患者の免疫細胞を活性化すること；c)患者の疾患を予防又は治療するのに十分な活性化免疫細胞を介して疾患細胞を損傷又は殺傷すること。

30

【0032】

本発明により、疾患細胞を有する患者の疾患を予防又は治療する方法であって、以下の段階を含む方法がまた提供される：a)IL-15R鎖又はチェックポイント又はシグナル分子を保有する免疫細胞を本発明の可溶性融合タンパク質と混合すること；b)免疫細胞を活性化させること；c)活性化免疫細胞を患者に投与すること；及びd)患者の疾患を予防又は治療するのに十分な活性化免疫細胞を介して疾患細胞を損傷又は殺傷すること。

【0033】

40

本発明の融合タンパク質複合体の投与は対象の免疫反応を誘発する。例えば、本発明の融合タンパク質複合体の投与は新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患と関連した細胞に対して免疫反応を誘発する。一態様において、本発明の融合タンパク質複合体は免疫細胞増殖を増加させる。

【0034】

本発明により、本発明の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳類に投与することによって哺乳類の免疫反応を刺激する方法が提供される。本発明により、本発明のいずれかの可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳類に投与することによって哺乳類の免疫反応を抑制する方法がまた提供される。

【0035】

50

他に定義されていない限り、本明細書に使用されているすべての技術及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解される意味を有する。以下の参考文献は本発明で使用されている多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)及びHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書に使用されているように、以下の用語は、他に指定されていない限り、以下のそれらが帰する意味を有する。

【0036】

「剤」はペプチド、核酸分子又は小さな化合物を意味する。

10

【0037】

「T × M」は結合ドメインに結合されたIL-15N72D : IL-15R Su/Fc骨格を含む複合体を意味する（図2）。例示的なT × Mは、PD-L1を特異的に認識する結合ドメインとの融合を含むIL-15N72D : IL-15R Su複合体である（PD-L1 T × M）。

【0038】

「改善する」は疾患の発展又は進行を減少させること、抑制させること、衰えさせること、減退させること、阻止させること又は安定させることを意味する。

【0039】

「類似体」は、同一でないが類似の機能的又は構造的特徴を有する分子を意味する。例えば、ポリペプチド類似体は対応する自然発生的なポリペプチドの生物学的活性を保有する一方、自然発生的なポリペプチドと関連した類似体の機能を高める特定の生化学的修飾を有する。かかる生化学的修飾は類似体のプロテアーゼ抵抗性、膜透過性、又は半減期を、例えばリガンド結合を変化させることなしに増加させることができる。類似体は非天然アミノ酸を含んでいてもよい。

20

【0040】

用語「結合ドメイン」は抗体、一本鎖抗体、Fab、Fv、T細胞受容体結合ドメイン、リガンド結合ドメイン、受容体結合ドメイン又は当該分野に知られている他の抗原に特異的なポリペプチドを包含することを意図している。

30

【0041】

本発明は、抗体又はかかる抗体のフラグメントであって、それらが望ましい生物学的活性を示す限りのものを含む。本発明にはキメラ抗体、例えばヒト化抗体もまた含まれる。概して、ヒト化抗体は非ヒトである源から導入される1又はそれ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば当該分野に記載の方法を用いて、齧歯類の相補性決定領域の少なくとも一部をヒト抗体の対応する領域に置き換えることによって実行される。

【0042】

用語「抗体」又は「イムノグロブリン」はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を包含することを意図している。好ましい抗体は抗原に反応性のあるモノクローナル抗体である。用語「抗体」は1つ以上の抗原に反応性のある抗体の混合物（例えば、抗原に反応性のある異なった型のモノクローナル抗体のカクテル）を包含することをまた意図している。用語「抗体」は全抗体、その生物学的に機能性のあるフラグメント、一本鎖抗体及び遺伝子操作された抗体、例えば1種以上からの部分を含むキメラ抗体、バイオリンクショナル抗体、抗体共役体、ヒト化抗体及びヒト抗体を包含することをさらに意図している。生物学的に機能性のある抗体フラグメントをまた使用することができ、それらは抗原との結合に十分な抗体に由来するペプチドフラグメントである。本明細書に使用される「抗体」は目的のエピトープ、抗原又は抗原性フラグメントを結合可能な完全な抗体及び任意の抗体フラグメント（例えば、Fab'2、Fab'、Fab、Fv）を含むことを意味する。

40

【0043】

50

「結合している」はその分子に対して物理化学的親和性を有する分子を意味する。

【0044】

「検出する」は検出されるべき検体の存在、非存在又は量を特定することを指す。

【0045】

「疾患」は細胞、組織又は器官の通常の機能を損傷又は干渉する任意の状態又は障害を意味する。疾患の例には新生組織形成、自己免疫性疾患及びウイルス感染が含まれる。

【0046】

製剤又は製剤の成分の用語「有効量」及び「治療上の有効量」は、単独又は組み合わせで望ましい効果を提供するのに十分な製剤又は成分の量を意味する。例えば、「有効量」は単独又は組み合わせで未治療の患者に関連する疾患の症状を改善するために必要な化合物の量を意味する。疾患の治療的処置に本発明を実践するために使用される活性化合物の有効量は、投与の様式、対象の年齢、体重及び全体的な健康状態によって異なる。最終的には、主治医又は主治獣医が適切な量と投薬量のレジメンを決定するであろう。かかる量は「有効」量として称される。

10

【0047】

「フラグメント」はポリペプチド又は核酸分子の一部を意味する。この一部は、好みくは参考核酸分子又はポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%を含む。例えば、フラグメントは10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100、200、300、400、500、600、700、800、900又は1000のヌクレオチド又はアミノ酸を含んでいてもよい。しかしながら、本発明はポリペプチド及び核酸フラグメントを、それらがそれぞれ全長のポリペプチド及び核酸の望ましい生物学的活性を示す範囲内でまた含む。ほとんどいかなる長さの核酸フラグメントも用いられる。例えば、実例として、長さにして約10,000、約5,000、約3,000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50の塩基対の全長（すべての中間の長さを含む）を有するポリヌクレオチドのセグメントが本発明の多くの実施に含まれる。同様に、ほとんどいかなる長さのポリペプチドのフラグメントも用いられる。例えば、実例として、長さにして約10,000、約5,000、約3,000、約2,000、約1,000、約500、約1,000、約50、約1,000、約500、約200、約100又は約50のアミノ酸の全長（すべての中間の長さを含む）を有するポリヌクレオチドのセグメントが本発明の多くの実施に含まれる。

20

【0048】

用語「単離された」、「精製された」及び「生物学的に純粋な」は、その天然状態中に見いだせるような通常それに付随する成分とは異なる度合の含まれていない物質を指す。

「単離する」は元の源又は環境からの分離の度合を意味する。「精製する」は単離より高度な分離の度合を意味する。

30

【0049】

「精製された」又は「生物学的に純粋な」タンパク質は、任意の不純物が実質的にそのタンパク質の生物学的特性に影響したり、他の反する結果を引き起こしたりするのに十分なほどの他の物質を含まない。すなわち、本発明の核酸又はポリペプチドは、組み換えDNA技術によって産生される際の細胞物質、ウイルス物質若しくは培養培地、又は化学合成された際の化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に伴わない場合に精製される。純度及び均一性は、典型的には分析的化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動法又は高パフォーマンス液体クロマトグラフィーを用いて決定される。用語「精製された」は核酸又はタンパク質が電気泳動ゲルに実質的に1つのバンドを生じさせることを意味してもよい。修飾、例えばリン酸化反応又はグリコシル化を受けたタンパク質では、異なる修飾が異なる単離されたタンパク質を生じ得るし、それらは分離して精製され得る。

40

【0050】

同様に、「実質的に純粋な」は自然に付隨する成分から分離したヌクレオチド又はポリペプチドを意味する。典型的には、該ヌクレオチド及びポリペプチドは少なくとも重量に

50

して 60%、70%、80%、90%、95% 又は 99% でさえあり、それらが自然に関連するタンパク質及び自然発生的な有機分子を伴わない場合、実質的に純粋である。

【0051】

「単離された核酸」はその核酸が由来する生物の自然発生的なゲノム中で、その側面に位置する遺伝子を伴わない核酸を意味する。該用語は例えば以下をカバーする：(a) 自然発生的なゲノム DNA 分子の一部である DNA だが、自然に発生する生物のゲノム中では分子のその部分の側面に位置している核酸配列の両方が側面に位置していない；(b) ある様式で原核生物又は真核生物のベクター又はゲノム DNA に組み込まれた核酸で、生じる分子がいずれの自然発生的なベクター又はゲノム DNA とも同一でない核酸；(c) 分離された分子、例えば cDNA、ゲノムフラグメント、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって産生されたフラグメント、又は制限フラグメント；(d) ハイブリッド遺伝子、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組み換えスクレオチド配列。単離された核酸分子は、本発明によって合成により産生された分子及び化学的に変化された、及び / 又は修飾された骨格を有する任意の核酸をさらに含む。例えば、単離された核酸は精製された cDNA 又は RNA ポリヌクレオチドである。単離された核酸分子はメッセンジャー RNA (mRNA) 分子をまた含む。

【0052】

「単離されたポリペプチド」は自然に付随する成分から分離された本発明のポリペプチドを意味する。典型的には、該ポリペプチドは少なくとも重量にして 60% であり、自然に付随するタンパク質及び自然発生的な有機分子を伴わない場合に単離されている。好ましくは、調製は重量にして本発明のポリペプチドの少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 99% である。本発明の単離されたポリペプチドは、例えば自然源からの抽出により、かかるポリペプチドをコードする組み換え核酸の発現により、又はタンパク質の化学合成により入手され得る。任意の適切な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又は HPLC 分析によって純度を測定することができる。

【0053】

「マーカー」は、疾患又は障害に関連している発現レベル又は活性に変化を有する任意のタンパク質又はポリヌクレオチドを意味する。

【0054】

「新生組織形成」は、過剰な増殖又は減少したアポトーシスによって特徴づけられる疾患又は障害を意味する。本発明を使用できる例示的な新生組織形成は、限定されないが、白血病（例えば急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、急性骨髓芽球性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性骨髓单球性白血病、急性单球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病）、真性赤血球增加症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、及び充実性腫瘍、例えば肉腫及び癌腫（例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーワング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、囊胞腺癌、髓様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌（nipple duct cancer）、絨毛腫、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫（oligodenroglioma）、神経鞘腫、髓膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫及び網膜芽腫）を含む。特定の実施形態では、該新生組織形成は多発性骨髓腫、細胞リンパ腫、尿路上皮 / 膀胱癌又は黒色腫である。本明細書で使用されているように、「剤を入手する」の「入手する」はその剤を合成すること、購入すること、又は他の方法で獲得することを含む。

【0055】

「減少する」は少なくとも 5%、10%、25%、50%、75% 又は 100% の負の

10

20

30

40

50

変化を意味する。

【 0 0 5 6 】

「参考」は標準的な、又は対照の状態を意味する。

【 0 0 5 7 】

「参考配列」は配列比較のための基準として用いられる定義された配列である。参考配列は特定の配列の全体のサブセット；例えば、全長の c D N A 又は遺伝子配列のセグメント、又は完全な c D N A 又は遺伝子配列であってもよい。ポリペプチドでは、参考ポリペプチド配列の長さは概して少なくとも約 16 のアミノ酸、好ましくは少なくとも約 20 のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約 25 のアミノ酸、さらにより好ましくは約 35 のアミノ酸、約 50 のアミノ酸又は約 100 のアミノ酸であろう。核酸では、参考核酸配列の長さは概して少なくとも約 50 のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 60 のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約 75 のヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも約 100 のヌクレオチド又は約 300 のヌクレオチド又はおよその整数又はそれらの間であろう。10

【 0 0 5 8 】

「特異的に結合する」は、本発明のポリペプチドを認識して結合するが、実質的に試料、例えば本発明のポリペプチドを自然に含む生物学的試料内の他の分子を認識して結合するのではない、化合物又は抗体を意味する。

【 0 0 5 9 】

本発明の方法において有用な核酸分子は、本発明のポリペプチド又はそのフラグメントをコードする任意の核酸分子を含む。かかる核酸分子は内因性核酸配列と 100 % 同一である必要はないが、典型的には実質的な同一性を示すであろう。内因性配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは、典型的には二本鎖核酸分子の少なくとも一本鎖をハイブリダイゼーションすることができる。「ハイブリダイゼーションする」は、様々な緊縮の状況下で、相補的なポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載の遺伝子）又はその部分間で二本鎖の核酸分子を形成する組を意味する。（例えば、Wahl, G.M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507 を参照されたい）。20

【 0 0 6 0 】

例えば、緊縮塩分濃度は通常 750 mM の NaCl 及び 75 mM のクエン酸三ナトリウム未満、好ましくは 500 mM の NaCl 及び 50 mM のクエン酸三ナトリウム未満、より好ましくは 250 mM の NaCl 及び 25 mM のクエン酸三ナトリウム未満であろう。低緊縮のハイブリダイゼーションは有機溶媒、例えばホルムアミドの非存在下で入手され得る一方、高緊縮のハイブリダイゼーションは少なくとも約 35 % のホルムアミド、好ましくは少なくとも約 50 % のホルムアミドの存在下で入手され得る。緊縮温度状態は通常少なくとも約 30 °C、より好ましくは少なくとも約 37 °C、最も好ましくは少なくとも約 42 °C の温度を含む。異なる追加のパラメーター、例えばハイブリダイゼーションの時間、洗浄剤の濃度、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、及びキャリア D N A の内包又は排除が当該分野の当業者によく知られている。好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは 30 °C の 750 mM の NaCl、75 mM のクエン酸三ナトリウム及び 1 % の SDS 内で生じるであろう。より好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは 37 °C の 500 mM の NaCl、50 mM のクエン酸三ナトリウム、1 % の SDS、35 % のホルムアミド及び 100 µg / ml の変性したサケの精子 D N A (ss D N A) 内で生じるであろう。最も好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは 42 °C の 250 mM の NaCl、25 mM のクエン酸三ナトリウム、1 % の SDS、50 % のホルムアミド及び 200 µg / ml の ss D N A 内で生じるであろう。これらの状況における有用な多様性が当業者には容易に明白であろう。3040

【 0 0 6 1 】

多くの適用では、ハイブリダイゼーションに続く洗浄段階は緊縮においてまた異なるであろう。洗浄緊縮状態は塩分濃度によって、及び温度によって定義され得る。上記のよう

に、洗浄緊縮は塩分濃度を下げるこ¹⁰とによって、又は温度を上げることによって増加され得る。例えば、洗浄段階の緊縮塩分濃度は、好ましくは約30 mMのNaCl及び3 mMのクエン酸三ナトリウム未満、最も好ましくは約15 mMのNaCl及び1.5 mMのクエン酸三ナトリウム未満であろう。洗浄段階の緊縮温度状態は通常少なくとも約25℃、より好ましくは少なくとも約42℃、さらにより好ましくは少なくとも約68℃の温度を含むであろう。好ましい実施形態では、洗浄段階は25℃の30 mMのNaCl、3 mMのクエン酸三ナトリウム、0.1%のSDS内で生じるであろう。より好ましい実施状況では、洗浄段階は42℃の15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウム、及び0.1%のSDS内で生じるであろう。より好ましい実施状況では、洗浄段階は68℃の15 mMのNaCl、1.5 mMのクエン酸三ナトリウム、及び0.1%のSDS内で生じるであろう。これらの状況における追加の多様性が当業者には容易に明白であろう。

ハイブリダイゼーション技術は当該分野の当業者にはよく知られており、例えば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977), Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York)及びSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0062】

「実質的に同一な」は参考アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のいずれか1つのアミノ酸配列）又は核酸配列（例えば、本明細書に記載のいずれか1つの核酸配列）に対して少なくとも50%の同一性を示すポリペプチド又は核酸分子を意味する。好ましくは、かかる配列は比較のために用いられる配列に対して少なくとも60%、より好ましくは80%又は85%、より好ましくは90%、95%又は99%さえもアミノ酸レベル又は核酸が同一である。²⁰

【0063】

配列同一性は典型的に配列分析ソフトウェア（例えば、Sequencher, Gene Codes Corporation, 775 Technology Drive, Ann Arbor, MI; Vector NTI, Life Technologies, 3175 Staley Rd. Grand Island, NY）を用いて測定される。かかるソフトウェアは多様な置換、欠失及び/又は他の修飾に対する相同的の度合を割り当てることによって同一又は類似の配列とマッチングさせる。同類置換は典型的に以下の群の範囲内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン。同一性の度合を決定するための例示的なアプローチでは、密接に関連した配列を示すe⁻³とe⁻¹⁰⁰間の可能性スコアを用いてBLASTプログラムを使用してもよい。³⁰

【0064】

「対象」は限定されないが、ヒト又は非ヒト哺乳類、例えばウシ属、ウマ科、イヌ科、ヒツジ属又はネコ科を含む哺乳類を意味する。該対象は、好ましくはかかる治療を必要とする哺乳類、例えばB細胞リンパ腫又はその傾向があると診断された対象である。該哺乳類は任意の哺乳類であり、例えばヒト、靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ及び家畜又は食品消費のために育てられる動物、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ及びヤギである。好ましい実施形態では、該哺乳類はヒトである。⁴⁰

【0065】

本明細書に提供される範囲は、範囲内のすべての値の簡潔な表現であることが理解される。例えば、1~50までの範囲は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50からなる群からの任意の数字、数字の組み合わせ又はサブ範囲を含むと理解される。⁵⁰

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される用語「治療する」や「治療」は逆の状態、障害又は疾患に苦しめられる臨床的な症状を示す個体に対して、症状の重篤さ及び／又は頻度の減少に影響するための、症状及び／又は根本原因を取り除くための、及び／又は損傷の改良又は改善を容易にするための剤又は製剤の投与を指す。排除できないとしても、疾患又は状態を治療することが、それらと関連した障害、状態又は症状を完全に取り除くことが要求されるわけではないことが理解されるであろう。

【 0 0 6 7 】

用語「予防する」又は「予防」は特定の逆の状態、障害又は疾患に感染しやすい又は罹患しやすい臨床的な症状を示す個体への、剤又は組成物の投与を指し、それゆえに症状及び／又は根本原因の発生を予防することに関する。 10

【 0 0 6 8 】

具体的に記載されている、又は内容から明白である場合を除き、本明細書に使用されるように、用語「又は」は包括的であると理解される。具体的に記載されている、又は内容から明白である場合を除き、本明細書に使用されるように、用語「1の」(“a,” “a n ”)及び「その」(“t h e”)は単数又は複数であると理解される。

【 0 0 6 9 】

具体的に記載されている、又は内容から明白である場合を除き、本明細書に使用されるように、用語「約」は当該分野において通常の許容範囲内、例えば平均値の2の標準偏差内として理解される。約は記載された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%又は0.01%と理解されてもよい。内容から明らかでない場合は、本明細書に記載のすべての数値は用語「約」で修飾される。 20

【 0 0 7 0 】

本明細書の変数の任意の定義における化学基のリストの列挙は、その変数がリストアップされた基の任意の単独の基又は組み合わせであるという定義を含む。本明細書の変数又は態様のための一実施形態の列挙は、その実施形態が任意の単独の実施形態又は任意の他の実施形態又はその部分との組み合わせであるものを含む。

【 0 0 7 1 】

本明細書に提供される組成物又は方法は、本明細書に提供される1又はそれ以上の任意のその他の組成物及び方法と組み合わせができる。 30

【 0 0 7 2 】

暫定的な用語「含む」(comprising)は、「含む」(including)、「含む」(containing)又は「によって特徴づけられる」と類義語であり、包括的又は制限がなく、追加の、列挙されていない要素又は方法段階を除外しない。対照的に、暫定的な語句「からなる」(consisting of)は請求項で具体的に述べられていない任意の要素、段階又は材料を除外する。暫定的な語句「本質的に……からなる」(consisting essentially of)は本発明の請求項に具体的に述べられた物質又は段階「及び基本かつ新たな特徴に物質的に影響しないもの」に請求項の範囲を限定する。 40

【 0 0 7 3 】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の好ましい実施形態の記述から、及び請求項から明白であろう。他に定義されていない場合、本明細書に使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者に通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は等価の方法及び物質を本発明の実践又は試験において使用することができるが、適した方法と物質が下記に記載されている。本明細書に引用されているすべての公開された外国特許及び特許出願は参照により本明細書中に組み込まれる。

【 0 0 7 4 】

本明細書にアクセション番号によって引用されるG e n b a n k 及びN C B I 寄託が参照により本明細書中に組み込まれる。本明細書に引用される他のすべての公開された参 50

考文献、文書、原稿及び科学文献は参照により本明細書中に組み込まれる。不一致があった場合、定義を含む本明細書は制御されるであろう。加えて、物質、方法及び例示は説明のためだけのものであり、限定することを意図しない。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】図1は、抗PD-L1 scAb/huIL-15N72D及び抗PD-L1 scAb/huIL-15R Su/Fc融合タンパク質を含むPD-L1 TxM複合体の活性、並びにPD-L1抗原を発現する疾患細胞に対するその免疫介在性効果を示した概略図である。

【図2】図2は、免疫チェックポイント分子、免疫シグナル分子及び/又は疾患抗原を認識する結合ドメインと融合したIL-15/IL-15R Su/Fc骨格を含む異なるTxM複合体を示した概略図である。

【図3】図3は、ジスルフィド結合の減少に続くTxM複合体のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)分析を示した写真である。右側レーン：PD-L1 TxM；左側レーン：マーカー。

【図4】図4Aは、ヒトIL-15及びヒトIgGに特異的な抗体に対する抗ヒトPD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図4Bは、ヒトIL-15及びヒトIgGに特異的な抗体に対する第二の抗ヒトPD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図4Cは、ヒトIL-15及びマウスIgGに特異的な抗体に対する抗マウスPD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図5】図5Aは、ヒトMB231腫瘍細胞を有するPD-L1に対するPD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図5Bは、ヒトMB231腫瘍細胞上に発現したPD-L1のPD-L1 TxM複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。図5Cは、ヒトMB231腫瘍細胞を有するPD-L1に対するPD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図6】図6Aは、マウス5T33P腫瘍細胞上に発現したPD-L1のPD-L1 TxM複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。図6Bは、マウスマB491uc腫瘍細胞上に発現したPD-L1のPD-L1 TxM複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。

【図7】図7A及び図7Bは、マウスA20腫瘍細胞上に発現したPD-L1の抗PD-L1 Ab及びPD-L1 TxM複合体の阻害活性を比較する折れ線グラフである。

【図8】図8は、PD-L1 TxM複合体によって介在されるIL-15依存性32D細胞の増殖を示した折れ線グラフである。

【図9】図9Aは、「四頭」及び「二頭」のPD-L1 TxM複合体を示した概略図である。図9Bは、四頭及び二頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体の、ジスルフィド結合の減少に続くSDS-PAGE分析を示した写真である。図9C及び図9Dは、分析的サイズ排除カラム上の溶出に続く、二頭及び四頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体のクロマトグラフィープロフィールを表している折れ線グラフをそれぞれ示しており、タンパク質会合体からのTxM複合体の分離を明らかにしている。

【図10】図10Aは、IL-2R β を保有する32D細胞に対する二頭及び四頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図10B及び図10Cは、5T33P骨髄腫細胞上に発現したPD-L1の二頭及び四頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体の阻害活性を明らかにした折れ線グラフを示している。

【図11】図11Aは、ALT-803と比較した、二頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体に介在されたIL-15依存性32D細胞の増殖を示した折れ線グラフである(IL-15N72D: IL-15R / Fc複合体)。図11Bは、ALT-803と比較した、四頭のマウス特異的PD-L1 TxM複合体に介在されたIL-15依存性32D細胞の増殖を示した折れ線グラフである。

【図12】図12Aは、ジスルフィド結合の減少に続く二頭及び四頭のヒト特異的PD-L1 TxM複合体のSDS-PAGE分析を示した写真である。図12B及び図12C

10

20

30

40

50

は、分析的サイズ排除カラム上の溶出に続く、二頭及び四頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M 複合体のクロマトグラフィープロフィールを表している折れ線グラフをそれぞれ示しており、タンパク質会合体からの T × M 複合体の分離を明らかにしている。

【図 13】図 13 は、P C - 3 ヒト前立腺癌細胞上に発現した P D - L 1 の二頭及び四頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M 複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。

【図 14】図 14 A は、A L T - 8 0 3 と比較して、二頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M 複合体によって介在される I L - 1 5 依存性 3 2 D 細胞の増殖を示した折れ線グラフである。図 14 B は、A L T - 8 0 3 と比較して、四頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M 複合体によって介在される I L - 1 5 依存性 3 2 D 細胞の増殖を示した折れ線グラフである。

【図 15】図 15 A は、P B S、A L T - 8 0 3、四頭のマウス特異的 P D - L 1 T × M (T 4 M - m P D - L 1) 及び二頭のマウス特異的 P D - L 1 T × M (T 2 M - m P D - L 1) で処置されたマウスの脾臓重量を示した棒グラフである。図 15 B 及び図 15 C は、P B S、A L T - 8 0 3、四頭のマウス特異的 P D - L 1 T × M (T 4 M - m P D - L 1) 及び二頭のマウス特異的 P D - L 1 T × M (T 2 M - m P D - L 1) で処置されたマウスの脾臓及びリンパ節内の異なる免疫細胞サブセットの百分率をそれぞれ示した棒グラフである。

【図 16】図 16 は、P D - L 1 T × M、抗 P D - L 1 A b 又は A L T - 8 0 3 によって誘発された 5 T 3 3 骨髄腫細胞に対する免疫細胞の細胞傷害性を示した棒グラフである。

【図 17】図 17 は、培地単独と比較して、抗ヒト P D - L 1 A b、二頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M (T 4 M - m P D - L 1) 又は四頭のヒト特異的 P D - L 1 T × M (T 2 M - m P D - L 1) によって誘発された P D - L 1 陽性 S W 1 9 9 0 ヒト肺癌細胞に対するヒト免疫細胞の細胞傷害性を示した棒グラフである。

【図 18】図 18 は、P D - L 1 T × M 複合体、A L - 8 0 3、A L T - 8 0 3 + 抗 P D - L 1 A b 又は P B S を用いた処置に続く 5 T 3 3 骨髄腫腫瘍を保有するマウスの生存を示した折れ線グラフである。

【図 19】図 19 は、2 H P D - L 1 T × M 複合体、A L - 8 0 3、A L T - 8 0 3 + 抗 P D - L 1 A b 又は P B S を用いた処置に続く同所性 M B 4 9 1 u c 膀胱腫瘍を保有するマウスの生存を示した折れ線グラフである。

【図 20】図 20 は、分析的サイズ排除カラム上の溶出に続く異なる精製された T × M タンパク質のクロマトグラフィープロフィールを表している折れ線グラフであり、タンパク質会合体からの T × M 複合体の分離を明らかにしている。

【図 21】図 21 A は、マウスリンパ球上に発現した C T L A - 4 の C T L A - 4 T × M 複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。図 21 B は、ヒトリンパ球上に発現した C T L A - 4 の C T L A - 4 T × M 複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。

【図 22】図 22 A は、マウス 5 T 3 3 P 腫瘍細胞上に発現した P D - L 1 の P D - L 1 / C T L A - 4 T × M 複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。図 22 B は、マウスリンパ球上に発現した C T L A - 4 の P D - L 1 / C T L A - 4 T × M 複合体の阻害活性を示した折れ線グラフである。

【図 23】図 23 A は、C D 4 7 を保有するマウス B 1 6 F 1 0 黒色腫腫瘍細胞に対する C D 4 7 T × M 複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図 23 B は、C D 4 7 を保有するヒト J u r k a t T 細胞に対する C D 4 7 T × M 複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図 24】図 24 A は、一本鎖 D N A に対する T N T s c A b T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフである。図 24 B は、一本鎖 D N A に対する T N T s c A b / 抗 P D - L 1 s c A b T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフである。

【図 25】図 25 A は、透過性ヒト M B 2 3 1 乳癌細胞に対する T N T s c A b T × M 、T N T s c A b / 抗 P D - L 1 s c A b T × M 及び二頭の抗 P D - L 1 s c A b T × M 複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。図 25 B は、透過性ヒト A 5 4 9 肺癌細胞に対する T N T s c A b T × M 、T N T s c A b / 抗 P D - L 1 s c A b

10

20

30

40

50

T × M 及び二頭の抗 P D - L 1 s c A b T × M 複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図 26】図 26 は、ヒト T F 陽性 P D - L 1 陽性 S W 1 9 9 0 ヒト臍癌細胞に対する二頭の h O A T s c A b T × M、抗ヒト P D - L 1 s c A b / h O A T s c A b T × M、二頭の抗ヒト P D - L 1 s c A b T × M 複合体及び h O A T 及び抗ヒト P D - L 1 対照 A b s の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図 27】図 27 A は、ヒト I L - 1 5 及びヒト I g G に特異的な抗体に対する L F A - 1 T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフである。図 27 B は、I C A M - 1 に対する L F A - 1 T × M 複合体の結合活性を示した棒グラフである。

【図 28】図 28 は、ヒト I L - 1 5 及びヒト I g G に特異的な抗体に対する N o t c h 1 特異的 T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフである。

【図 29】図 29 は、ヒト I L - 1 5 及びヒト I g G に特異的な抗体に対する抗ヒト T I M 3 s c A b T × M 複合体の結合活性を示した折れ線グラフである。

【図 30】図 30 A 及び図 30 B は、ヒト I L - 1 5 及びヒト I g G に特異的な抗体に対する H I V 特異的 b N A b s c F v T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフである。図 30 C から図 30 F は、H I V エンベロープタンパク質に対する H I V 特異的 b N A b T × M 複合体の結合活性を明らかにした折れ線グラフを示している。

【図 31】図 31 は、培地単独と比較して、二頭の h O A T s c A b T × M 又は h O A T 対照 A b に誘発されたヒト T F 陽性 S W 1 9 9 0 ヒト臍癌細胞に対するヒト免疫細胞の細胞傷害性を示した棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0076】

本発明は、少なくとも一部は、複数特異的な I L - 1 5 に基づくタンパク質複合体が免疫細胞の活性を高め、疾患細胞に対するそれらの活性を促進し、それにより疾患の低減又は予防をもたらすという驚くべき発見に基づいている。これらのタンパク質複合体は、疾患及び標的抗原への増加した結合をまた示す。I L - 1 5 又は機能性多様体を含む 1 つのドメイン、及び疾患特異的結合ドメイン、免疫チェックポイント阻害剤又は免疫アゴニストを含む結合ドメインを有する複数特異的タンパク質複合体が本明細書に提供される。かかるタンパク質複合体は対象の新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患を治療するための方法に有用性がある。具体的には、以下に詳細に記載されているように、可溶性抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体（「P D - L 1 T × M」）が免疫細胞を刺激して腫瘍標的細胞を殺傷した（図 1）。このように、P D - L 1 T × M を取り上げた組成物、及び新生組織形成（例えば、充実性及び血液腫瘍）に対して免疫反応を高めるためにかかる組成物を用いる方法が本明細書に提供される。

【0077】

本明細書に記載のように、宿主免疫認識及び反応のための疾患細胞を標的化する能力を有するタンパク質の使用は、がん、感染症及び自己免疫性疾患に効果的な戦略である。米国特許第 8,507,222 号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、I L - 1 5 及び I L - 1 5 受容体 ドメインを含むタンパク質骨格は、疾患細胞上の抗原及び免疫細胞上の受容体を認識できる複数特異的タンパク質を生成するために使用されてきた。米国特許第 8,507,222 号の実施例 15 を参照されたい。免疫チェックポイント又はシグナル分子を認識する 1 又はそれ以上の結合ドメインと結合した I L - 1 5 及び I L - 1 5 受容体 を含む可溶性複数特異的タンパク質複合体の生成が本明細書に記載される。一部の場合では、これらの複合体は疾患細胞上に発現する抗原、例えば P D - L 1、s s D N A、C D 2 0、H E R 2、E G F R、C D 1 9、C D 3 8、C D 5 2、G D 2、C D 3 3、N o t c h 1、細胞間接着分子 1 (I C A M - 1)、組織因子、H I V エンベロープ又は他の腫瘍抗原を認識する結合ドメインをまた含む。

【0078】

一部の場合では、該結合ドメインは一本鎖抗体を含み、そこでイムノグロブリン軽鎖可

10

20

30

40

50

変ドメインがポリペプチドリンカー配列によってイムノグロブリン重鎖可変ドメインと共有結合している。該一本鎖抗体ドメインはV H - リンカー - V L 又はV L - リンカー - V H フォーマットのどちらかで配置される。あるいは、該結合ドメインは免疫チェックポイント阻害剤又は免疫アゴニストとして作用することができる可溶性若しくは細胞外リガンド又は受容体ドメインを含む。免疫チェックポイント又はシグナル分子を認識する結合ドメインは、結合活性が維持される限り、追加のリンカー配列を伴う又は伴わないI L - 1 5 又はI L - 1 5 受容体 タンパク質のN末端又はC末端のどちらかと結合する。好ましくは、該結合ドメインはヒトI L - 1 5 N 7 2 D スーパーアゴニストタンパク質 (h u I L - 1 5 N 7 2 D) のN末端と結合している。あるいは、該結合ドメインはヒトI L - 1 5 N 7 2 D タンパク質のC末端と結合している。好ましくは、該結合ドメインはヒトI L - 1 5 受容体 スシドメイン (h u I L - 1 5 R S u) のN末端と結合している。あるいは、該結合ドメインはh u I L - 1 5 R S u F c タンパク質のC末端と結合している。一部の場合では、本発明の複数特異的タンパク質複合体は、免疫細胞上のタンパク質二量化及びC D 1 6 受容体の認識のためのI g G F c ドメインをさらに含む。かかるドメインは、標的細胞に対して、抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) 、抗体依存性細胞食作用 (A D C P) 及び補体依存性細胞傷害性 (C D C) の刺激を介在する。一部の例では、高められた、又は減少したC D 1 6 結合活性を有するF c ドメインを用いることが有用である。一態様では、該F c ドメインはA D C C 活性を低減するが、ジスルフィド結合二量体を形成する能力を保有するアミノ酸置換L 2 3 4 A 及びL 2 3 5 A (L A L A) (F c コンセンサス配列に基づく番号) を含む。

10

20

【 0 0 7 9 】

インターロイキン - 1 5

インターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) はエフェクターN K 細胞及びC D 8 + 記憶T 細胞の発展、増殖及び活性化のための重大なサイトカインである。I L - 1 5 はI L - 1 5 受容体 (I L - 1 5 R) と結合し、エフェクター細胞上のI L - 2 / I L - 1 5 受容体 コモン 鎖 (I L - 1 5 R c) 複合体にトランスで提供される。I L - 1 5 及びI L - 2 はI L - 1 5 R c との結合を共有し、S T A T 3 及びS T A T 5 経路を通してシグナルを送る。しかしながら、I L - 2 とは異なり、I L - 1 5 はC D 4 + C D 2 5 + F o x P 3 + 調節T (T r e g) 細胞の維持を支持しないし、活性化C D + 8 T 細胞の細胞死、多発性骨髄腫に対してI L - 2 の治療的活性を制限していたかもしれない効果を誘発しない。さらに、I L - 1 5 はエフェクターC D 8 + T 細胞へ抗アポトーシスシグナルを提供することが知られている唯一のサイトカインである。単独又はI L - 1 5 R との複合体としてのどちらかで投与されるI L - 1 5 は、実験動物モデル内に定着した充実性腫瘍に対する潜在的抗腫瘍活性を示し、このように、潜在的にがんを治癒することができる最も有望な免疫治療薬の1つとして特定された。

30

【 0 0 8 0 】

I L - 1 5 に基づくがん治療の臨床的発展を容易にするために、I L - 1 5 と比較して増加した生物学的活性を有するI L - 1 5 変異体 (I L - 1 5 N 7 2 D) が特定された (Zhu et al., J Immunol, 183: 3598-3607, 2009)。このI L - 1 5 スーパーアゴニスト (I L - 1 5 N 7 2 D) の薬物動態学及び生物学的活性は、I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R / F c 融合複合体 (A L T - 8 0 3) の創出によってさらに改良され、該スーパーアゴニスト複合体がインビボでの天然のサイトカインの少なくとも2 5 倍の活性を有するほどである (Han et al., Cytokine, 56:804-810, 2011)。

40

【 0 0 8 1 】

免疫チェックポイント阻害剤及び免疫アゴニストドメイン

他の実施形態では、該結合ドメインは免疫チェックポイント又はシグナル分子又はそのリガンドに特異的であり、免疫チェックポイント抑制活性の阻害剤として、又は免疫刺激活性のアゴニストとして作用する。かかる免疫チェックポイント及びシグナル分子及びリガンドは、P D - 1 、P D - L 1 、P D - L 2 、C T L A - 4 、C D 2 8 、C D 8 0 、C D 8 6 、B 7 - H 3 、B 7 - H 4 、B 7 - H 5 、I C O S - L 、I C O S 、B T L A 、C

50

D 1 3 7 L、C D 1 3 7、H V E M、K I R、4 - 1 B B、O X 4 0 L、C D 7 0、C D 2 7、C D 4 7、C I S、O X 4 0、G I T R、I D O、T I M 3、G A L 9、V I S T A、C D 1 5 5、T I G I T、L I G H T、L A I R - 1、シグレック (S i g l e c s) 及びA 2 a Rを含む (Pardoll DM. 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264, Thaventhiran T, et al. 2012. J Clin Cell Immunol S12:004)。さらに、本発明の好ましい抗体ドメインは、イピリムマブ及び/又はトレメリムマブ(抗C T L A 4)、ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ビジリズマブ、T S R - 0 4 2、A N B 0 1 1、A M P - 5 1 4 及びA M P - 2 2 4(リガンド-F c融合)(抗P D 1)、アテゾリズマブ(M P D L 3 2 8 0 A)、アベルマブ(M S B 0 0 1 0 7 1 8 C)、デュルバルマブ(M E D I 4 7 3 6)、M E D I 0 6 8 0 及びB M S - 9 3 6 5 5 6 9(抗P D L 1)、M E D I 6 4 6 9(抗O X 4 0アゴニスト)、B M S - 9 8 6 0 1 6、I M P 7 0 1、I M P 7 3 1、I M P 3 2 1(抗L A G 3)及びG I T Rリガンドを含んでいてもよい。

【0082】

抗体特異的結合ドメイン

抗体特異的結合ドメインは疾患細胞上の標的と特異的に結合するポリペプチドからなる。あるいは、これらのドメインは疾患状態を支持する他の細胞上の標的、例えば腫瘍の成長を支持する間質細胞上の標的又は疾患介在性免疫抑制を支持する免疫細胞上の標的と結合してもよい。抗原特異的結合ドメインは当該分野で知られている抗体、一本鎖抗体、F a b s、F v、T細胞受容体結合ドメイン、リガンド結合ドメイン、受容体結合ドメイン、ドメイン抗体、單ードメイン抗体、ミニボディ、ナノボディ、ペプチボディ又は多様な他の抗体模倣体(例えばアフィマー(affimers)、アフィチン(affitins)、アルファボディ(alphabodies)、アトリマー(atrimers)、C T L A - 4に基づく分子、アドネクチン(adnectins)、アンチカリン(anticalins)、クニツツ(Kunitz)ドメインに基づくタンパク質、アビマー(avimers)、ノッチン(knottins)、フィノマー(fynomers)、ダルピン(darpins)、アフィボディ(affibodies)、アフィリン(affilins)、モノボディ及びアルマジロ反復タンパク質に基づくタンパク質(Weidle, UH, et al. 2013. Cancer Genomics & Proteomics 10:155-168))を含む。

【0083】

特定の実施形態では、抗原特異的結合ドメインのための抗原は、細胞表面受容体又はリガンドを含む。さらなる実施形態では、該抗原はC D抗原、サイトカイン又はケモカイン受容体又はリガンド、成長因子受容体又はリガンド、組織因子、細胞間接着分子、M H C / M H C 様分子、F c受容体、トル(T o l l)様受容体、N K受容体、T C R、B C R、陽性/陰性共刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍に関連した抗原又はウイルスがコードした抗原を含む。

【0084】

好ましくは、抗原特異的結合ドメインは腫瘍細胞上の抗原と結合することができる。腫瘍特異的結合ドメインはがんを有する患者の治療のために承認された抗体に由来していくともよく、以下のものを含む: リツキシマブ、オファツムマブ及びオビヌツズマブ(抗C D 2 0 A b s)；トラスツズマブ及びペルツズマブ(抗H E R 2 A b s)；セツキシマブ及びパニツムマブ(抗E G F R A b s)；並びにアレムツズマブ(抗C D 5 2 A b)。同様に、C D 2 0 (⁹⁰ Y 標識化イブリツモマブチウキセタン、¹³¹ I 標識化トシツモマブ)、H E R 2 (アド-トラスツズマブエムタンシン)、C D 3 0 (ブレンツキシマブベドチン)及びC D 3 3 (ゲムツズマブオゾガマイシン)(Sliwkowski MX, Mellman I. 2013 Science 341:1192)に特異的な承認された抗体-エフェクター分子複合体からの結合ドメインを使用し得る。

【0085】

さらに、本発明の好ましい結合ドメインは当該分野で知られている多様な他の腫瘍特異的抗体ドメインを含んでいてもよい。がんの治療のための抗体及びそれらの各標的は、限定されないが以下を含む:ニボルマブ(抗P D - 1 A b)、T A 9 9(抗g p 7 5)、

10

20

30

40

50

3 F 8 (抗G D 2)、8 H 9 (抗B 7 - H 3)、アバゴボマブ (抗C A - 1 2 5 (模造))、アデカツムマブ (抗E p C A M)、アフツズマブ (抗C D 2 0)、アラシズマブペゴル (抗V E G F R 2)、ペンテト酸アルツモマブ (抗C E A)、アマツキシマブ (抗メソテリン)、A M E - 1 3 3 (抗C D 2 0)、アナツモマブマフェナトックス (抗T A G - 7 2)、アポリズマブ (抗H L A - D R)、アルシツモマブ (抗C E A)、バビツキシマブ (抗ホスファチジルセリン)、ベクツモマブ (抗C D 2 2)、ベリムマブ (抗B A F F)、ベシレソマブ (抗C E A 関連抗原)、ベバシズマブ (抗V E G F - A)、ビバツズマブメルタンシン (抗C D 4 4 v 6)、ブリナツモマブ (抗C D 1 9)、B M S - 6 6 3 5 1 3 (抗C D 1 3 7)、ブレンツキシマブペドチン (抗C D 3 0 (T N F R S F 8))、カンツズマブメルタンシン (抗ムチンC a n A g)、カンツズマブラブタンシン (抗M U C 1)、カプロマブベンデチド (抗前立腺癌細胞)、カルルマブ (抗M C P - 1)、カツマキソマブ (抗E p C A M 、C D 3)、c B R 9 6 - ドキソルビシン免疫抱合体 (抗ルイスY抗原)、C C 4 9 (抗T A G - 7 2)、セデリズマブ (抗C D 4)、C h . 1 4 . 1 8 (抗G D 2)、c h - T N T (抗D N A関連抗原)、シタツズマブボガトックス (抗E p C A M)、シキスツムマブ (抗I G F - 1 受容体)、クリバツズマブテトラキセタン (抗M U C 1)、コナツムマブ (抗T R A I L - R 2)、C P - 8 7 0 8 9 3 (抗C D 4 0)、ダセツズマブ (抗C D 4 0)、ダクリズマブ (抗C D 2 5)、ダロツズマブ (抗インスリン様成長因子I受容体)、ダラツムマブ (抗C D 3 8 (環状A D Pリボースヒドロラーゼ))、デムシズマブ (抗D L L 4)、デツモマブ (抗B リンパ腫細胞)、ドロジツマブ (抗D R 5)、ズリゴツマブ (抗H E R 3)、ズシギツマブ (抗I L G F 2)、エクロメキシマブ (抗G D 3 ガングリオシド)、エドレコロマブ (抗E p C A M)、エロツズマブ (抗S L A M F 7)、エルシリモマブ (抗I L - 6)、エナバツズマブ (抗T W E A K受容体)、エノチクマブ (抗D L L 4)、エンシツキシマブ (抗5 A C)、エピツモマブシツキセタン (抗エピシアリン)、エプラツズマブ (抗C D 2 2)、エルツマキソマブ (抗H E R 2 / n e u 、C D 3)、エタラシズマブ (抗インテグリン 3)、ファラリモマブ (抗インターフェロン受容体)、ファルレツズマブ (抗葉酸受容体1)、F B T A 0 5 (抗C D 2 0)、フィクラツズマブ (抗H G F)、フィギツムマブ (抗I G F - 1 受容体)フランボツマブ (抗T Y R P 1 (糖タンパク質7 5))、フレソリムマブ (抗T G F)、フツキシマブ (抗E G F R)、ガリキシマブ (抗C D 8 0)、ガニツマブ (抗I G F - 1)、ゲムツズマブオゾガマイシン (抗C D 3 3)、ギレンツキシマブ (抗炭酸脱水酵素9 (C A - I X))、グレムバツムマブペドチン (抗G P N M B)、グセルクマブ (抗I L 1 3)、イバリズマブ (抗C D 4)、イブリツモマブチウキセタン (抗C D 2 0)、イクルクマブ (抗V E G F R - 1)、イゴボマブ (抗C A - 1 2 5)、I M A B 3 6 2 (抗C L D N 1 8 . 2)、I M C - C S 4 (抗C S F 1 R)、I M C - T R 1 (T G F R I I)、イムガツズマブ (抗E G F R)、インクラクマブ (抗セレクチンP)、インダツキシマブラブタンシン (抗S D C 1)、イノツズマブオゾガマイシン (抗C D 2 2)、インテツムマブ (抗C D 5 1)、イビリムマブ (抗C D 1 5 2)、イラツムマブ (抗C D 3 0 (T N F R S F 8))、K M 3 0 6 5 (抗C D 2 0)、K W - 0 7 6 1 (抗C D 1 9 4)、L Y 2 8 7 5 3 5 8 (抗M E T)、ラベツズマブ (抗C E A)、ラムブロリズマブ (抗P D C D 1)、レキサツムマブ (抗T R A I L - R 1)、リンツズマブ (抗C D 3 3)、リリルマブ (抗K I R 2 D)、ロルボツズマブメルタンシン (抗C D 5 6)、ルカツムマブ (抗C D 4 0)、ルミリキシマブ (抗C D 2 3 (I g E受容体))、マバツムマブ (抗T R A I L - R 1)、マルゲツキシマブ (抗c h 4 D 5)、マツズマブ (抗E G F R)、マブリリムマブ (抗G M C S F受容体鎖)、ミラツズマブ (抗C D 7 4)、ミンレツモマブ (抗T A G - 7 2)、ミツモマブ (抗G D 3 ガングリオシド)、モガムリズマブ (抗C C R 4)、モキセツモマブパストックス (抗C D 2 2)、ナコロマブタフエナトックス (抗C 2 4 2抗原)、ナツモマブエスタフェナトックス (抗5 T 4)、ナルナツマブ (抗R O N)、ネシツムマブ (抗E G F R)、ネスバクマブ (抗アンジオポイエチン2)、ニモツズマブ (抗E G F R)、ニボルマブ (抗I g G 4)、ノフェツモマブメルペンタン、オクレリズマブ (抗C D 2 0)、オカラツズマブ (抗C D 2 0)、オララ

10

20

30

40

50

ツマブ(抗P D G F - R)、オナルツズマブ(抗c - M E T)、オンツキシズマブ(抗T E M 1)、オポルツズマブモナトックス(抗E p C A M)、オレゴボマブ(抗C A - 1 2 5)、オトレルツズマブ(抗C D 3 7)、パンコマブ(M U C 1 の抗腫瘍特異的グリコシリ化)、パルサツズマブ(抗E G F L 7)、パスコリズマブ(抗I L - 4)、パルチツマブ(抗H E R 3)、ペムツモマブ(抗M U C 1)、ペルツズマブ(抗H E R 2 / n e u)、ピジリズマブ(抗P D - 1)、ピナツズマブベドチン(抗C D 2 2)、ピンツモマブ(抗腺癌抗原)、ポラツズマブベドチン(抗C D 7 9 B)、プリツムマブ(抗ビメンチン)、P R O 1 3 1 9 2 1 (抗C D 2 0)、キリズマブ(抗I G H E)、ラコツモマブ(抗N グリコリルノイラミン酸)、ラドレツマブ(抗フィプロネクチンエキストラドメイン - B)、ラムシルマブ(抗V E G F R 2)、リロツムマブ(抗H G F)、ロバツムマブ(抗I G F - 1 受容体)、ロレスマブ(抗R H D)、ロベリズマブ(抗C D 1 1 & C D 1 8)、サマリズマブ(抗C D 2 0 0)、サツモマブベンデチド(抗T A G - 7 2)、セリバンツマブ(抗E R B B 3)、S G N - C D 1 9 A (抗C D 1 9)、S G N - C D 3 3 A (抗C D 3 3)、シブロツズマブ(抗F A P)、シルツキシマブ(抗I L - 6)、ソリトマブ(抗E p C A M)、ソンツズマブ(抗エビシアリン)、タバルマブ(抗B A F F)、タカツズマブテトラキセタン(抗 フェトプロテイン)、タブリツモマブパプトックス(抗C D 1 9)、テリモマブアリトックス、テナツモマブ(抗テネイシンC)、テネリキシマブ(抗C D 4 0)、テプロツムマブ(抗C D 2 2 1)、T G N 1 4 1 2 (抗C D 2 8)、チシリムマブ(抗C T L A - 4)、チガツズマブ(抗T R A I L - R 2)、T N X - 6 5 0 (抗I L - 1 3)、トシツモマブ(抗C S 2 0)、トベツマブ(抗C D 1 4 0 a)、T R B S 0 7 (抗G D 2)、トレガリズマブ(抗C D 4)、トレメリムマブ(抗C T L A - 4)、T R U - 0 1 6 (抗C D 3 7)、ツコツズマブセルモロイキン(抗E p C A M)、ウブリツキシマブ(抗C D 2 0)、ウレルマブ(抗4 - 1 B B)、バンチクツマブ(抗フリズルド(F r i z z l e d)受容体)、バパリキシマブ(抗A O C 3 (V A P - 1))、バテリズマブ(抗I T G A 2)、ベルツズマブ(抗C D 2 0)、ベセンクマブ(抗N R P 1)、ビシリズマブ(抗C D 3)、ボロシキシマブ(抗インテグリン 5 1)、ボルセツズマブマフォドチン(抗C D 7 0)、ボツムマブ(抗腫瘍抗原C T A A 1 6 . 8 8)、ザルツムマブ(抗E G F R)、ザノリムマブ(抗C D 4)、ザツキシマブ(抗H E R 1)、ジラリムマブ(抗C D 1 4 7 ベイシジン(b a s i g i n))、R G 7 6 3 6 (抗E T B R)、R G 7 4 5 8 (抗M U C 1 6)、R G 7 5 9 9 (抗N a P i 2 b)、M P D L 3 2 8 0 A (抗P D - L 1)、R G 7 4 5 0 (抗S T E A P 1)及びG D C - 0 1 9 9 (抗B c 1 - 2)。

【 0 0 8 6 】

本発明に有用な他の抗体ドメイン又は腫瘍標的結合タンパク質(例えばT C R ドメイン)は、限定されないが、以下の抗原を結合するものを含む(表示されているがんの表示は限定しない例を表していることに注意されたい)：アミノペプチダーゼN (C D 1 3)、アネキシンA 1 、B 7 - H 3 (C D 2 7 6 、様々がん)、C A 1 2 5 (卵巣癌)、C A 1 5 - 3 (がん)、C A 1 9 - 9 (がん)、L 6 (がん)、ルイスY (がん)、ルイスX (がん)、フェトプロテイン(がん)、C A 2 4 2 (結腸直腸癌)、胎盤アルカリ性ホスファターゼ(がん)、前立腺特異的抗原(前立腺)、前立腺酸性ホスファターゼ(前立腺)、上皮細胞成長因子(がん)、C D 2 (ホジキン病、N H L リンパ腫、多発性骨髄腫)、C D 3 (T 細胞リンパ腫、肺癌、乳癌、胃癌、卵巣癌、自己免疫性疾患、悪性腹水)、C D 1 9 (B 細胞悪性腫瘍)、C D 2 0 (非ホジキンリンパ腫、B 細胞新生組織形成(n e o p l a s m a s)、自己免疫性疾患)、C D 2 1 (B 細胞リンパ腫)、C D 2 2 (白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、S L E)、C D 3 0 (ホジキンリンパ腫)、C D 3 3 (白血病、自己免疫性疾患)、C D 3 8 (多発性骨髄腫)、C D 4 0 (リンパ腫、多発性骨髄腫、白血病(C L L))、C D 5 1 (転移性黑色腫、肉腫)、C D 5 2 (白血病)、C D 5 6 (小細胞肺癌、卵巣癌、メルケル細胞がん、液体腫瘍、多発性骨髄腫)、C D 6 6 e (がん)、C D 7 0 (転移性腎細胞癌及び非ホジキンリンパ腫)、C D 7 4 (多発性骨髄腫)、C D 8 0 (リンパ腫)、C D 9 8 (がん)、C D 1 2 3 (白血病)、ムチン

10

20

30

40

50

(がん)、CD221(充実性腫瘍)、CD227(乳癌、卵巣癌)、CD262(NSCLC及び他のがん)、CD309(卵巣癌)、CD326(充実性腫瘍)、CEACAM3(直腸結腸癌、胃癌)、CEACAM5(CEA、CD66e)(乳癌、直腸結腸癌及び肺癌)、DLL4(A様4)、EGFR(多様ながん)、CTLA4(黒色腫)、CXCR4(CD184、ヘム腫瘍学(heme-oncology)、充実性腫瘍)、エンドグリン(CD105、充実性腫瘍)、EPCAM(上皮細胞間接着分子、膀胱癌、頭部癌、頸部癌、結腸癌、NHL前立腺癌及び卵巣癌)、ERBB2(肺癌、乳癌、前立腺癌)、FCGR1(自己免疫性疾患)、FOLR(葉酸受容体、卵巣癌)、FGFR(がん)、GD2ガングリオシド(がん)、G-28(細胞表面抗原糖脂質、黒色腫)、GD3イディオタイプ(がん)、ヒートショックプロテイン(がん)、HER1(肺癌、胃癌)、HER2(乳癌、肺癌及び卵巣癌)、HLA-DR10(NHL)、HLA-DRB(NHL、B細胞白血病)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(がん)、IGF1R(充実性腫瘍、血液のがん)、IL-2受容体(T細胞白血病及びリンパ腫)、IL-6R(多発性骨髄腫、RA、キャッスルマン病、IL6依存性腫瘍)、インテグリン(3、5
10
1、6、4、11、3、5、5、5、多様ながん)、MAGE-1(がん)、MAGE-2(がん)、MAGE-3(がん)、MAGE4(がん)、抗トランスフェリン受容体(がん)、p97(黒色腫)、MS4A1(膜貫通4ドメイン亞科A構成員1、非ホジキンB細胞リンパ腫、白血病)、MUC1(乳癌、卵巣癌、頸癌、気管支癌及び消化管癌)、MUC16(CA125)(卵巣癌)、CEA(直腸結腸癌)、gp100(黒色腫)、MART1(黒色腫)、MPG(黒色腫)、MS4A1(膜貫通4ドメイン亞科A、小細胞肺癌、NHL)、ヌクレオリン、Neuがん遺伝子産物(がん)、P21(がん)、ネクチン-4(がん)、抗(Nグリコリルノイラミン酸、乳癌、黒色腫癌)のパラトープ、PLAP様精巣アルカリ性ホスファターゼ(卵巣癌、精巣癌)、PSMA(前立腺腫瘍)、PSA(前立腺)、ROB04、TAG72(腫瘍関連糖タンパク質72、AML、胃癌、直腸結腸癌、卵巣癌)、T細胞膜貫通タンパク質(がん)、Tie(CD202b)、組織因子、TNFRSF10B(腫瘍壞死因子受容体上科構成員10B、がん)、TNFRSF13B(腫瘍壞死因子受容体上科構成員13B、多発性骨髄腫、NHL、他のがん、RA及びSLE)、TPBG(トロホブラスト糖タンパク質、腎細胞癌)、TRAIL-R1(リガンド受容体1、リンパ腫、NHL、直腸結腸癌、肺癌を含む腫瘍壞死アポトーシス)、VCAM-1(CD106、黒色腫)、VEGF、VEGF-A、VEGF-B(CD309)(多様ながん)。一部の他の腫瘍関連抗原標的が精査されている(Gerber, et al, mAbs 2009 1:247-253; Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 2005 54:187-207, Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15:459-76, Guo, et al., Adv Cancer Res. 2013; 119:421-475, Parmiani et al. J Immunol. 2007 178:1975-9)。これらの抗原の例は分化抗原群(CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD12w、CD14、CD15、CD16、CDw17、CD18、CD21、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD31、CD32、CD34、CD35、CD36、CD37、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49b、CD49c、CD49c、CD53、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD68、CD69、CD71、CD72、CD79、CD81、CD82、CD83、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD95、CD96、CD100、CD103、CD105、CD106、CD109、CD117、CD120、CD127、CD133、CD134、CD135、CD138、CD141、CD142、CD143、CD144、CD147、CD151、CD152、CD154、CD156、CD158、CD163、CD166、CD168、CD184、CDw186、CD195、CD202(a、b)、CD209、CD235a、CD271、CD303、CD304)、アネキシンA1、ヌクレオリン、エンドグリン(CD105)、ROB04、アミノペプチダーゼN、様4(DLL4)、VEGF
20
30
40
50

R - 2 (C D 3 0 9) 、 CX C R 4 (C D 1 8 4) 、 T i e 2 、 B 7 - H 3 、 W T 1 、 M U C 1 、 L M P 2 、 H P V E 6 E 7 、 E G F R v I I I 、 H E R - 2 / n e u 、 イディオタイプ、 M A G E A 3 、 p 5 3 非変異体 (n o n m u t a n t) 、 N Y - E S O - 1 、 G D 2 、 C E A 、 M e l a n A / M A R T 1 、 R a s 変異体、 g p 1 0 0 、 p 5 3 変異体、 プロテイナーゼ 3 (P R 1) 、 b c r - a b 1 、 チロシナーゼ、 スルビピン、 h T E R T 、 肉腫転座切断点、 E p h A 2 、 P A P 、 M L - I A P 、 A F P 、 E p C A M 、 E R G (T M P R S S 2 E T S 融合遺伝子) 、 N A 1 7 、 P A X 3 、 A L K 、 アンドロゲン受容体、 サイクリン B 1 、 ポリシアル酸、 M Y C N 、 R h o C 、 T R P - 2 、 G D 3 、 フコシル G M 1 、 メソテリン、 P S C A 、 M A G E A 1 、 s L e (a) 、 C Y P I B I 、 P L A C 1 、 G M 3 、 B O R I S 、 T n 、 G l o b o H 、 E T V 6 - A M L 、 N Y - B R - 1 、 R G S 5 、 S A R T 3 、 S T n 、 炭酸脱水酵素 IX 、 P A X 5 、 O Y - T E S 1 、 精子タンパク質 1 7 、 L C K 、 H M W M A A 、 A K A P - 4 、 S S X 2 、 X A G E 1 、 B 7 H 3 、 レグマイン、 T i e 2 、 P a g e 4 、 V E G F R 2 、 M A D - C T - 1 、 F A P 、 P D G F R - 、 M A D - C T - 2 、 N o t c h 1 、 I C A M 及び F o s 関連抗原 1 を含む。

【 0 0 8 7 】

さらに、本発明の好ましい結合ドメインは、当該分野で知られている感染した細胞に関連する抗原及びエピトープ標的に特異的なものを含む。かかる標的は、限定されないが、以下の目的の病原菌に由来するものを含む：H I V ウィルス（特に H I V エンベローブスパイク及び / 又は g p 1 2 0 及び g p 4 1 エピトープに由来する抗原）、ヒトパピローマウイルス（ H P V ）、ヒト結核菌、 S t r e p t o c o c c u s a g a l a c t i a e 、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、 L e g i o n e l l a p n e u m o p h i l i a 、化膿レンサ球菌、大腸菌、淋菌、髄膜炎菌、肺炎球菌、 C r y p t o c o c c u s n e o f o r m a n s 、 H i s t o p l a s m a c a p s u l a t u m 、 H i s t o p l a s m a i n f l u e n z a e B 、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、ハンセン菌、 B r u c e l l a a b o r t u s 、狂犬病ウィルス、インフルエンザウィルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス I 、単純ヘルペスウイルス II 、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、水痘帯状ヘルペスウイルス、 B 型肝炎ウイルス、 C 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウィルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、疣ウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、シミアンウイルス 4 0 、マウス乳腺腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ウエストナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、 T r y p a n o s o m a r a n g e l i 、 T r y p a n o s o m a c r u z i 、 T r y p a n o s o m a r h o d e s i e n s e i 、 T r y p a n o s o m a b r u c e i 、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、 B a b e s i a b o v i s 、 E l m e r i a t e n e l l a 、回旋糸状虫、熱帯リーシュマニア、旋毛虫、 T h e i l e r i a p a r v a 、 T a e n i a h y d a t i g e n a 、 T a e n i a o v i s 、無鉤条虫、单包条虫、 M e s o c e s t o i d e s c o r t i 、 M y c o p l a s m a a r t h r i t i d i s 、 M . h y o r h i n i s 、 M . o r a l e 、 M . a r g i n i n i 、 A c h o l e p l a s m a l a i d l a w i i 、 M . s a l i v a r i u m 及び M . p n e u m o n i a e 。

【 0 0 8 8 】

T 細胞受容体 (T C R s)

T 細胞は他の免疫細胞型（多核白血球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、 B 細胞、 N K 細胞）とともに、免疫系の細胞成分を構成する細胞のサブグループである。生理学的状態下で、 T 細胞は免疫学的監視及び外来抗原の除外において機能する。しかしながら、病的状態下では、 T 細胞が疾患の因果関係及び伝播において主要な役割を果たしているとの有力な証拠がある。これらの障害において、中央又は末梢いずれかの T 細胞の免疫寛容の故

10

20

30

40

50

障が自己免疫性疾患の因果関係における基本的な経過である。

【0089】

該 T C R 複合体は少なくとも 7 の膜貫通タンパク質から構成される。ジスルフィド結合 (　又は　) ヘテロ二量体は单一型抗原認識ユニットを形成する一方、 、 、 、 及び 鎖を含む C D 3 の不变鎖は、 T 細胞活性化及び細胞性免疫反応の生成をもたらすシグナル経路と結合しているリガンドと結合することに責任を負う。 T C R 鎖の遺伝子多様性にかかわらず、 2 の構造特性はすべての知られているサブユニットに共通である。第一に、それらは単独の膜貫通ドメインを有する膜貫通タンパク質 推定するに ヘリックスである。第二に、すべての T C R 鎖は予測された膜貫通ドメイン内に荷電アミノ酸を保有するという普通でない特徴を有する。該不变鎖はマウスとヒトの間で保たれる単独の負電荷を有し、該可変鎖は 1 つ (T C R -) 又は 2 つ (T C R -) の正電荷を有する。 T C R - の膜貫通配列は多くの種に高度に保存されており、それゆえに系統発生学的に重大な機能的役割を果たしてもよい。親水性アミノ酸アルギニン及びリジンを含むオクタペプチド配列はそれらの種の間で同一である。

10

【0090】

T 細胞反応は T C R と結合する抗原によって調節される。 T C R の 1 つの型はイムノグロブリン可変 (V) 及び不变 (C) 領域に類似した 及び 鎖からなる膜結合ヘテロ二量体である。該 T C R 鎖は共有結合した V - 及び C - 鎖を含み、該 鎖は C - 鎖と共に結合した V - 鎖を含む。該 V - 鎖及び V - 鎖は、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) (ヒトにおいては H L A 複合体として知られる) との関連で、スーパー抗原又は抗原と結合できるポケット又は裂け目を形成する。 Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. N New York (1993) を参照されたい。

20

【0091】

T C R 鎖 (　又は　) の細胞外ドメインは、細胞表面上での発現のために異種膜貫通ドメインとの融合としてまた設計されてもよい。かかる T C R s は C D 3 、 C D 2 8 、 C D 8 、 4 - 1 B B 及び / 又はキメラ活性化受容体 (C A R) 膜貫通又は活性化ドメインとの融合を含んでいてもよい。 T C R s は 又は 鎖の 1 又はそれ以上の抗原結合ドメインを含む可溶性タンパク質であってもまたよい。かかる T C R s は T C R 不变ドメインを有する、又は有さない T C R 可変ドメイン又はその機能フラグメントを含んでいてもよい。可溶性 T C R s はヘテロ二量体又は一本鎖分子であってもよい。

30

【0092】

F c ドメイン

本発明のタンパク質複合体は F c ドメインを含んでいてもよい。例えば、 P D - L 1 T x M は抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合複合体を含む。 I g G の F c 領域と別のタンパク質のドメインを結合させる融合タンパク質、例えば多様なサイトカイン及び可溶性受容体が報告されている (例えば、 Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996) ; 米国特許第 5 , 1 1 6 , 9 6 4 号及び第 5 , 5 4 1 , 0 8 7 号を参照されたい) 。該プロトタイプ融合タンパク質は I g G F c のヒンジ領域でシステイン残基を介して結合したホモ二量体タンパク質であり、重鎖可変及び C H 1 ドメイン及び軽鎖を伴わない、 I g G 分子と類似した分子をもたらす。 F c ドメインを含む融合タンパク質の二量体の性質は、他の分子との高次相互作用 (二価結合又は二重特異性結合) を提供するのに好都合であり得る。構造的相同性のために、 F c 融合タンパク質は、類似のアイソトープを有するヒト I g G のそれと比較可能な、薬物動態プロフィールをインビボで示す。 I g G クラスのイムノグロブリンはヒトの血液中で最も豊富なタンパク質であり、循環半減期は 2 1 日にも届くことがある。 I L - 1 5 又は I L - 1 5 融合タンパク質の循環半減期を引き伸ばすため、及び / 又は、その生物学的活性を増加させるために、ヒト重鎖 I g G タンパク質の F c 部分と共有結合した I L - 1 5 と非共有結合した I L - 1 5 ドメインを含む融合タンパク質複合体が本明細書に記

40

50

載される。

【 0 0 9 3 】

用語「F c」はF c受容体と呼ばれる細胞表面受容体及び補体系の一部のタンパク質と相互作用する抗体の不变領域であるフラグメント結晶化可能領域を指す。かかる「F c」は二量体形である。天然のF cの元のイムノグロブリン源は好ましくはヒト由来であり、Ig G 1及びIg G 2が好ましいが、任意のイムノグロブリンであってもよい。天然のF c'sは共有会合(すなわちジスルフィド結合)及び非共有会合によって二量体形又は多量体形と結合していてもよい単量体ポリペプチドから構成される。天然のF c分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えばIg G、Ig A、Ig E)又はサブクラス(例えばIg G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig A 1、Ig G A 2)によって1から4の幅がある。天然のF cの一例はIg Gのパパイン分解から生じるジスルフィド結合二量体である(Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9を参照されたい)。プロテインA、プロテインG、多様なF c受容体及び補体タンパク質の結合部位を含むF cドメイン。一部の実施形態では、該複合体のF cドメインはF c受容体と相互作用して抗体依存性細胞介在性細胞傷害性(ADCC)及び/又は抗体依存性細胞食作用(ADCP)を介在することができる。他の適用では、該複合体は効果的にADCC又はADCPを介在することのできないF cドメイン(例えば、Ig G 4 F c)を含む。

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、用語「F c変異体」は天然のF cから修飾された分子又は配列を指すが、サルベージ受容体FcRnのための結合部位をまだ含んでいる。参照によって本明細書に組み込まれる公開PCT出願第WO 97 / 34631号及び第WO 96 / 32478号により、例示的なF c多様体及びサルベージ受容体との相互作用が記載されている。このように、用語「F c多様体」は非ヒト天然F cからヒト化された分子又は配列を含む。さらに、天然のF cは本発明の融合分子には必要とされない構造特性又は生物学的活性を提供するために、除去されてもよい部位を含む。このように、特定の実施形態では、用語「F c多様体」は、(1)ジスルフィド結合構造、(2)選択された宿主細胞との不和合性、(3)選択された宿主細胞における発現のN末端異質性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のF c受容体との結合、(7)抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、若しくは(8)抗体依存性細胞食作用(ADCP)に影響する、又は関与する1又はそれ以上の天然のF c部位若しくは残基を変更する分子又は配列を含む。かかる変化は、これらのF c特性の任意の1つ又はそれ以上を増加又は減少させことがある。F c多様体は以下にさらに詳細に記載される。

【 0 0 9 5 】

用語「F cドメイン」は、上記に定義された天然のF c及びF c多様体分子及び配列を包含する。F c多様体及び天然のF c'sと同様に、用語「F cドメイン」は、全抗体から分解されるか、又は組み換え遺伝子発現により產生されるか、又は他の方法のいずれかによって、単量体形又は多量体形の分子を含む。

【 0 0 9 6 】

融合タンパク質複合体

本発明は融合タンパク質複合体を提供する(図1及び図2)。一部の場合では、第一のタンパク質がインターロイキン-15(IL-15)又はその機能性フラグメントと共有結合した第一の生物学的に活性なポリペプチドを含み；第二のタンパク質が可溶性インターロイキン-15受容体(IL-15R)ポリペプチド又はその機能性フラグメントと共有結合した第二の生物学的に活性なポリペプチドを含み、そこで第一のタンパク質のIL-15ドメインが第二のタンパク質の可溶性IL-15Rドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する。本発明の融合タンパク質複合体は、第一及び第二のタンパク質の1つ又は両方と結合したイムノグロブリンF cドメイン又はその機能性フラグメントをまた含む。好ましくは、該融合タンパク質と結合したF cドメインは相互作用して融合タンパク質複合体を形成する。かかる複合体はイムノグロブリンF cドメイン間

10

20

30

40

50

のジスルフィド結合構造によって安定していてもよい。一態様において、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は I L - 1 5 ポリペプチド、I L - 1 5 多様体又はその機能性フラグメント及び可溶性 I L - 1 5 R ポリペプチド又はその機能性フラグメントを含み、そこで I L - 1 5 及び I L - 1 5 R ポリペプチドの 1 つ又は両方がイムノグロブリン F c ドメイン又はその機能性フラグメントをさらに含む。

【 0 0 9 7 】

特定の例では、第一又は第二のタンパク質の 1 つ又は両方が抗体又はその機能性フラグメントを含む。例えば、結合ドメインの 1 つが可溶性抗 P D - L 1 一本鎖抗体又はその機能性フラグメントを含む。別の例では、他の、又は第二の結合ドメインが抗 C T L A 4 一本鎖抗体又は疾患抗原特異的抗体又はそれらの機能性フラグメントを含む。一実施形態では、本発明により可溶性抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質複合体を含む P D - L 1 T x M が提供される。この複合体では、h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u ドメインは 2 つの抗 P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質の h u I g G 1 F c ドメインと相互作用し、複数鎖融合タンパク質複合体を形成する。

【 0 0 9 8 】

本明細書に使用されているように、用語「生物学的に活性なポリペプチド」又は「エフェクター分子」は、本発明に論じられる望ましい効果を提供することができるアミノ酸配列、例えばタンパク質、ポリペプチド、又はペプチド；糖類又は多糖；脂質又は糖脂質、糖タンパク質又はリボタンパク質を意味する。エフェクター分子は化学薬品をまた含む。生物学的に活性なタンパク質又はエフェクタータンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするエフェクター分子核酸配列がまた意図される。それゆえに、適した分子は制限因子、酵素、抗体又は薬剤並びに D N A 、 R N A 及びオリゴヌクレオチドを含む。生物学的に活性なポリペプチド又はエフェクター分子は自然発生的であってもよく、又はそれは、例えば組み換え又は化学合成によって、既知の成分から合成されていてもよく、異種成分を含んでいてもよい。生物学的に活性なポリペプチド又はエフェクター分子は概して約 0 . 1 から 1 0 0 K D の間、より大きくは約 1 0 0 0 K D まで、好ましくは約 0 . 1 、 0 . 2 、 0 . 5 、 1 、 2 、 5 、 1 0 、 2 0 、 3 0 及び 5 0 K D の間であり、標準的な細胞サイジング技術、例えば遠心分離又は S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって判断される。本発明の望ましい効果は、限定されないが、例えば、増加した結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を形成すること、標的細胞を殺傷すること、例えば疾患を予防又は治療することにおいて、細胞増殖又は細胞死を誘発させて、免疫反応を開始させるか、又は診断目的で検出分子として作用させることのどちらかを含む。かかる検出のために、アッセイ、例えば増殖させるために細胞を培養すること、そして本発明の融合複合体に該細胞を接触させること、それから該融合複合体が細胞のさらなる発展を示すかどうかを評価することの逐次段階を含むアッセイを用いることができる。

【 0 0 9 9 】

本発明と関連してエフェクター分子を本発明の融合タンパク質複合体と共有結合させることは、多くの有意な利益を提供する。既知の構造のペプチドを含む、単独のエフェクター分子を含む本発明の融合タンパク質複合体を產生することができる。加えて、類似の D N A ベクターで広範囲のエフェクター分子を產生することができる。すなわち、異なるエフェクター分子のライブラリーが感染細胞又は疾患細胞の認識のための融合タンパク質複合体と結合していてもよい。さらに、治療上の適用として、本発明の融合タンパク質複合体の対象への投与よりもむしろ、該融合タンパク質複合体をコードする D N A 発現ベクターを、該融合タンパク質複合体のインビオ発現のために投与することができる。かかるアプローチは組み換えタンパク質の調製と典型的に関連している高価な精製段階を回避し、慣例的なアプローチと関連した抗原の取り込み及びプロセシングの複雑性を回避する。

【 0 1 0 0 】

言及したように、本明細書に開示される融合タンパク質の成分、例えばエフェクター分

10

20

30

40

50

子、例えばサイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク質毒素、イムノグロブリンドメイン又は他の生物活性分子及び任意のペプチドリンカーを、該融合タンパク質がその意図された機能を有する条件下において、ほとんどいかなる方法でも組織化することができる。特に、該融合タンパク質の各成分は、望ましい場合、少なくとも1つの可溶性ペプチドリンカー配列によって、別の成分から間隔を空けていてもよい。さらに、該融合タンパク質は、例えば該融合タンパク質の修飾、同定及び／又は精製を容易にするためのタグを含み得る。より具体的な融合タンパク質は下記に記載の実施例中にある。

【0101】

リンカー

本発明の融合複合体は、好ましくはIL-15又はIL-15R ドメインと生物学的に活性なポリペプチドの間に介入したフレキシブルリンカー配列をまた含む。該リンカー配列は、IL-15又はIL-15R ドメインに関連した生物学的に活性なポリペプチドの効果的な配置を許容し、両方のドメインの機能的活性を許容するべきである。

10

【0102】

一部の場合では、該可溶性融合タンパク質複合体はリンカーを有し、そこで第一の生物学的に活性なポリペプチドはポリペプチドリンカー配列によってIL-15（又はその機能性フラグメント）と共有結合している。他の態様では、本明細書に記載の該可溶性融合タンパク質複合体はリンカーを有し、そこで第二の生物学的に活性なポリペプチドはポリペプチドリンカー配列によってIL-15R ポリペプチド（又はその機能性フラグメント）と共有結合している。

20

【0103】

該リンカー配列は、好ましくは、提示抗原の認識のためのTCR分子の結合グループ、又は抗原の認識のための抗体分子の結合ドメインを効果的に配置できるペプチドをもたらすヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書に使用されるように、語句「該IL-15又はIL-15R ドメインに関して生物学的に活性なポリペプチドの効果的な配置」又は他の類似の語句は、IL-15又はIL-15R ドメインと結合した生物学的に活性なポリペプチドが、IL-15又はIL-15R ドメインがお互いに相互作用してタンパク質複合体を形成することが可能であるように配置されていることを意味することが意図される。例えば、該IL-15又はIL-15R ドメインは、免疫細胞との相互作用が免疫反応を開始又は阻害すること、あるいは細胞の発展を阻害又は刺激することを許容するために効果的に配置されている。

30

【0104】

本発明の融合複合体は、好ましくは、IL-15又はIL-15R ドメインとイムノグロブリンFcドメイン間に介入したフレキシブルリンカー配列をまた含む。該リンカー配列は、該Fcドメイン、生物学的に活性なポリペプチド及びIL-15又はIL-15R ドメインの効果的な配置を許容し、各ドメインに機能的活性を許容するべきである。例えば、該Fcドメインは、オプソニン化、細胞溶解、マスト細胞、好塩基球及び好酸球の脱顆粒、並びに他のFc受容体依存性プロセスを含むFc介在性効果を刺激する、適した融合タンパク質複合体の形成、及び／又は補体系の免疫細胞又はタンパク質のFc受容体との相互作用；補体経路の活性化；該融合タンパク質複合体の高められたインビボ半減期を許容するために効果的に配置される。

40

【0105】

生物学的に活性なポリペプチドの2又はそれ以上のポリペプチドと結合して望ましい機能的活性を有する一本鎖分子を生成するために、リンカー配列をまた使用することができる。

【0106】

好ましくは、該リンカー配列は約7から20のアミノ酸、より好ましくは約10から20のアミノ酸を含む。該リンカー配列は、単独の望ましくない構造において生物学的に活性なポリペプチド又はエフェクター分子を保有しないように、好ましくはフレキシブルである。例えば、融合した分子から認識部位に間隔を空けるために該リンカー配列を使用す

50

することができる。具体的には、該ペプチドリンカー配列は、例えば同じものと化学的に架橋して分子フレキシビリティを提供するために、該生物学的に活性なポリペプチド及び該エフェクター分子の間に位置することができる。該リンカーは、好ましくは、フレキシビリティを提供する小さい側鎖、例えばグリシン、アラニン、及びセリンを有するアミノ酸を主に含む。好ましくは、該リンカー配列の約 80 又は 90 パーセント又はそれ以上が、グリシン、アラニン又はセリン残基、特にグリシン及びセリン残基を含む。

【0107】

抗体可変領域と共に加わることに成功して用いられた多くのフレキシブルリンカー設計のいずれかを含む、異なるリンカー配列を使用することができる (Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105 を参照されたい)。10

【0108】

薬物療法

本発明により、治療剤としての使用のための融合タンパク質複合体を含む医薬組成物が提供される。一態様では、本発明の融合タンパク質複合体は、例えば薬学的に許容できるバッファー、例えば生理食塩水中に製剤化されて、全身投与される。好ましい投与経路は、例えば、患者における継続的な、持続した又は効果的なレベルの組成物を提供する、膀胱への点滴注入、皮下注射、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、腫瘍内注射、皮内注射を含む。ヒトの患者又は他の動物の治療は、生理的に許容できる担体内の本明細書に特定された治療剤の治療上の有効量を用いて実行される。適した担体及びその製剤が、例えば E. W. Martin による Remington's Pharmaceutical Sciences に記載されている。投与されるべき治療剤の量は、投与形式、患者の年齢及び体重、新生組織形成の臨床症状によって多様である。特定の例では化合物の増加した特異度のために低用量が必要となるであろうが、概して、量は新生組織形成、自己免疫性疾患又は感染症と関連した他の疾患の治療において使用される他の剤のために使用されるものの範囲内であろう。対象の免疫反応を高める、又は当業者に知られている方法によって決定された新生細胞、感染細胞又は自己免疫性細胞の増殖、生存又は侵襲性を低減する用量で化合物は投与される。20

【0109】

医薬組成物の製剤

新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患の治療のための本発明の融合タンパク質複合体の投与は、他の成分と組み合わせて、前記新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患を改善、低減、又は安定させるのに有効な治療剤内の濃度をもたらす任意の適した方法による。本発明の融合タンパク質複合体は任意の適した担体物質内で適した量で含まれてもよいし、概して該組成物の全体量の重量にして 1 ~ 95 % の量で存在する。該組成物は非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、膀胱内、腫瘍内又は腹腔内）投与経路に適している投薬形態で提供されてもよい。例えば、該医薬組成物は慣例的な医薬実務によって製剤化される（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 及び Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York を参照されたい）。30

【0110】

動物モデルと比較してヒトのための用量を修正することが当該分野ではルーティンであると当業者が認識するように、ヒト投薬量はマウス又は非ヒトの類人猿において使用される化合物の量から推定することによってまず決定される。例えば、該用量は約 1 μg 化合物 / kg 体重から約 5000 mg の化合物 / kg 体重まで；又は約 5 mg / kg 体重から約 4,000 mg / kg 体重まで、又は約 10 mg / kg 体重から約 3,000 mg / kg 体重まで；又は約 50 mg / kg 体重から約 2000 mg / kg 体重まで；又は約 100 mg / kg 体重から約 1000 mg / kg 体重まで；又は約 150 mg / kg 体重から約 500 mg / kg 体重まで多様である。例えば、該用量は約 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500,40

550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,050、1,100、1,150、1,200、1,250、1,300、1,350、1,400、1,450、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500又は5,000mg/kg体重である。あるいは、用量は約5mg化合物/Kg体重から約20mg化合物/kg体重の幅内である。別の例では、該用量は約8、10、12、14、16又は18mg/kg体重である。好ましくは、該融合タンパク質複合体は0.5mg/kgから約10mg/kg(例えば、0.5、1、3、5、10mg/kg)で投与される。もちろん、この用量はかかる治療プロトコルにおいてルーティンでなされているように、初めの臨床試験の結果及び特定の患者の必要によって上方又は下方に調整されてもよい。

【0111】

医薬組成物は、投与時に制御された方法で治療剤を開放する医薬組成物内に、適した賦形剤とともに製剤化される。例としては単独又は複数ユニット錠剤又はカプセル組成物、油剤、懸濁剤、乳剤、マイクロカプセル、ミクロスフェア、分子複合体、ナノ粒子、パッチ及びリポソームが含まれる。好ましくは、該融合タンパク質複合体は非経口投与に適した賦形剤内に製剤化される。

【0112】

非経口投与

本発明の融合タンパク質複合体を含む医薬組成物は、投薬形態、剤形においては注射、注入又は移植(皮下、静脈内、筋肉内、腫瘍内、膀胱内、腹腔内)によって、又は慣例的な、非毒性の薬学的に許容できる担体及びアジュバントを含む、適した送達装置又は移植片を介して、非経口で投与される。かかる組成物の製剤化及び調製は製剤処方の分野における当業者にはよく知られている。剤形化は上記のRemington: The Science and Practice of Pharmacy内に見出すことができる。

【0113】

非経口使用のための本発明の融合タンパク質複合体を含む組成物は、ユニット投薬形態(例えば、単回投与アンプル内で)で提供される。あるいは、該組成物は、適した保存料を添加してもよい複数回分の用量を含むバイラルで提供される(下記を参照)。該組成物は溶剤、懸濁剤、乳剤、注入装置又は移植のための送達装置の形態であり、あるいは使用前に水又は他の適した媒体とともに戻されるべき乾燥粉末として提示される。新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患を低減又は改善させる活性剤とは別に、該組成物は適した非経口の許容できる担体及び/又は賦形剤を含む。該活性治療剤は制御された放出のためのミクロスフェア、マイクロカプセル、ナノ粒子、リポソームに組み込まれていてもよい。さらに、該組成物は懸濁化剤、可溶化剤、安定剤、pH調整剤、等張化剤及び/又は分散剤を含んでいてもよい。

【0114】

上記に示されたように、本発明の融合タンパク質複合体を含む該医薬組成物は、滅菌注射に適した形態であってもよい。かかる組成物を調製するために、その適した活性治療剤は非経口の許容できる液体媒体内で溶解又は懸濁している。用いられ得るのに許容できる媒体及び溶媒には、水、適した量の塩酸の添加により適したpHに調節された水、水酸化ナトリウム又は適したバッファー、1,3-ブタンジオール、リンガー溶液及び生理食塩水及びデキストロース溶液が含まれる。その水性の製剤は1又はそれ上の保存料(例えばメチル、エチル又はn-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル)をまた含んでいてもよい。該化合物の1つが水にやや溶けにくい、又はわずかしか溶けないだけの場合、薬剤を高める又は可溶化する溶解剤が添加されることがあり、又は該溶剤は10~60%w/wのプロピレングリコールを含んでいてもよい。

【0115】

本発明により新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患又はそれらの症状を治療する方法が提供され、それには本明細書の化学式の化合物を含む医薬組成物の治療上の有効量を

10

20

30

40

50

対象（例えば哺乳類、例えばヒト）に投与することが含まれる。このように、一実施形態は新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患又はその症状に罹患した、又はその疑いのある対象を治療する方法である。該方法は、疾患又は障害が治療される状況下で、疾患又は障害又はその症状を治療するのに十分な治療量の本明細書の化合物の量を哺乳類に投与する段階を含む。

【0116】

本明細書の方法は対象（かかる治療が必要であると同定された対象を含む）に本明細書に記載の化合物、又はかかる効果を提供する本明細書に記載の組成物の有効量を投与することを含む。かかる治療が必要な対象を同定することは、対象又はヘルスケア専門家の判断においてあり得、主観的（例えば意見）又は客観的（例えば試験又は診断方法によって測定可能）であり得る。

10

【0117】

本発明の治疗方法（予防的治療を含む）は、概して、本明細書の化合物、例えば該化学式の化合物の治療上の有効量を、哺乳類、特にヒトを含む治療を必要とする対象（例えば動物、ヒト）に投与することを含む。かかる治療は新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患、障害、又はその症状に罹患した、それらを有する、それらの疑いのある又はそれらのリスクのある対象、特にヒトに適して投与されるであろう。これらの「リスクのある」対象の決定は、診断試験、又は対象若しくはヘルスケア提供者の意見（例えば、遺伝子試験、酵素又はタンパク質マーカー、Marker（本明細書に定義される）、家族歴等）によって、任意の主観的又は客観的決定によってなされてもよい。本発明の融合タンパク質複合体を、免疫反応における増加が望ましい任意の他の疾患の治療に使用してもよい。

20

【0118】

本発明により治療プロセスを測定する方法もまた提供される。該方法は、対象が疾患又はその症状を治療するのに十分な本明細書の化合物の治療量を投与されている、新生組織形成と関連した障害又はその症状に罹患した、若しくはその疑いのある対象において、診断マーカー（Marker）（例えば、本明細書の化合物、タンパク質又はその指標等によって調節される本明細書に描写された任意の標的）のレベルを決定する段階又は診断的測定（例えば、スクリーニング、アッセイ）を含む。該方法で決定されるMarkerのレベルを、健康な通常対照又は他の罹患した患者におけるMarkerの既知のレベルと比較して、該対象の疾患状態を確立してもよい。一部の場合では、該対象におけるMarkerの第二のレベルを第一のレベルの決定より遅い時点で決定し、2つのレベルは疾患の経過又は該治療の有効性を測定するために比較される。特定の態様では、対象のMarkerの前治療レベルが本発明による治療の開始に先立って決定される；それからこのMarkerの前治療レベルを治療開始後の対象のMarkerのレベルと比較して、治療の有効性を決定することができる。

30

【0119】

組み合わせ療法

任意選択的に、本発明の融合タンパク質複合体は、任意の他の標準的治療と組み合わせて投与される；かかる方法は当業者には知られており、E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。望ましい場合は、本発明の融合タンパク質複合体は、限定されないが免疫療法、治療抗体、標的療法、手術、放射線治療、又は化学療法を含む、任意の慣例的な抗新生組織形成療法と組み合わせて投与される。

40

【0120】

キット又は医薬システム

本発明の融合タンパク質複合体を含む医薬組成物は、新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患の改善における使用のためにキット又は医薬システムに組み入れられてもよい。本発明のこの態様によるキット又は医薬システムは、その中に厳重に密閉された1又はそれ以上の容器手段、例えばバイアル、チューブ、アンプル、ボトル等を有する輸送手段、例えば箱、カートン、チューブを含む。本発明のキット又は医薬システムは、本発明の融合タンパク質複合体の使用に関連した指示書をまた含んでいてもよい。

50

【0121】**組み換えタンパク質発現**

概して、本発明の融合タンパク質複合体（例えばT × M複合体の成分）の調製は本明細書に記載の手順によって、及び認識された組み換えDNA技術によって完成され得る。

【0122】

概して、組み換えポリペプチドは、適した宿主細胞と、適した発現媒体中のポリペプチドをコードする核酸分子又はそのフラグメントの全部又は一部の形質転換によって產生される。分子生物学分野の当業者は、発現システムの幅広い多様性のいずれかが該組み換えタンパク質を提供するために使用され得ることを理解するであろう。使用される的確な宿主細胞は本発明にとって重大ではない。組み換えポリペプチドは事実上任意の真核生物宿主（例えばSaccharomyces cerevisiae、昆虫細胞、例えばSf21細胞、又は哺乳類の細胞、例えばNIH 3T3、HeLa又は好ましくはCOS細胞）内で產生され得る。かかる細胞は広範囲の源から入手可能である（例えば、the American Type Culture Collection, Rockland, Md.; 例えば、Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997もまた参考されたい）。トランスフェクションの方法及び発現媒体の選択は、選択される宿主系によるであろう。形質転換の方法は、例えばAusubel et al.（上記）に記載されており；発現媒体は例えばCloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987) に提供されるものから選択されてもよい。

10

【0123】

組み換えポリペプチドの產生のために発現システムの多様性が存在する。かかるポリペプチドを產生するために有用な発現ベクターは、限定されないが、染色体ベクター、エピソームベクター、ウイルス由来ベクター、例えば細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルスに由来するベクター、並びにその組み換えに由来するベクターを含む。

20

【0124】

組み換えポリペプチドが発現すると、それを例えば親和性クロマトグラフィーを使用して単離する。一例では、該ポリペプチドに対して生じる抗体（例えば本明細書に記載されているように產生されたもの）を、カラムと付着させて、該組み換えポリペプチドを単離するために使用することがある。親和性クロマトグラフィーに先立つ、ポリペプチドを保有する細胞の溶解及び分画は、標準的方法によって実行され得る（例えば、上記のAusubel et al.を参考されたい）。単離されると、望ましい場合、例えば高パフォーマンス液体クロマトグラフィーによって該組み換えタンパク質をさらに精製することができる（例えばFisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980を参考されたい）。

30

【0125】

本明細書に使用されているように、本発明の生物学的に活性なポリペプチド又はエフェクター分子は因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク質毒素、イムノグロブリンDメイン又は他の生物活性タンパク質、例えば酵素を含んでいてもよい。また、生物学的に活性なポリペプチドは他の化合物、例えば非タンパク質毒素、細胞傷害剤、化学療法剤、検出可能標識、放射性物質等との共役体を含んでいてもよい。

40

【0126】

本発明のサイトカインは、他の細胞に影響する細胞によって產生される任意の因子により定義され、細胞性免疫の任意の数の多重効果の原因となる。サイトカインの例としては、限定されないが、IL-2群、インターフェロン（IFN）、IL-10、IL-1、IL-17、TGF及びTNFサイトカイン群、並びにIL-1からIL-35、IFN-、IFN-、IFN-、TGF-、TNF-及びTNF-が含まれる。

【0127】

50

本発明の一態様では、第一のタンパク質はインターロイキン - 15 (IL-15) ドメイン又はその機能性フラグメントと共有結合した第一の生物学的に活性なポリペプチドを含む。IL-15 は T 細胞活性化及び増殖に影響するサイトカインである。基本的な差異はよく特性化されているが、免疫細胞の活性化及び増殖に影響する IL-15 活性は一部の点で IL-2 に類似している (Waldmann, T A, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:5 95-601)。

【0128】

本発明の別の態様では、第一のタンパク質が IL-15 多様体（本明細書では IL-15 变異体とも称される）であるインターロイキン - 15 (IL-15) ドメインを含む。該 IL-15 多様体は、好ましくは天然の（又は野生型の）IL-15 タンパク質とは異なるアミノ酸配列を含む。該 IL-15 多様体は、好ましくは IL-15R ポリペプチドと結合して IL-15 アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する。好ましくは、アゴニスト活性を有する IL-15 多様体はスーパー・アゴニスト活性を有する。該 IL-15 多様体は IL-15R との関連から独立した IL-15 アゴニスト又はアンタゴニストとしても機能することができる。IL-15 アゴニストは野生型 IL-15 と比較可能な、又は増加した生物学的活性によって例示される。IL-15 アンタゴニストは野生型 IL-15 と比較して減少した生物学的活性によって、あるいは IL-15 介在性反応を阻害する能力によって例示される。一部の例では、該 IL-15 多様体は、増加又は減少した活性で IL-15R C 受容体と結合する。一部の場合では、IL-15 多様体の配列は天然の IL-2 配列と比較して、少なくとも 1 のアミノ酸変化、例えば置換又は欠失を有し、かかる変化が IL-15 アゴニスト又はアンタゴニスト活性をもたらす。好ましくは、該アミノ酸置換 / 欠失は IL-15R 及び / 又は C と相互作用する IL-15 ドメイン内に存在する。より好ましくは、該アミノ酸置換 / 欠失は IL-15R ポリペプチドとの結合、又は IL-15 多様体を産生する能力には影響しない。IL-15 多様体を生成するのに適したアミノ酸置換 / 欠失は、本明細書又は他の経験による方法によって提供される、合理的又は無作為な変異生成及び機能的アッセイを通して、推測又は既知の IL-15 構造、相同分子、例えば既知の構造を有する IL-2 を有する IL-15 との比較に基づいて特定され得る。さらに、適したアミノ酸置換は保存変化又は非保存変化、及び追加のアミノ酸の挿入であってもよい。好ましくは、本発明の IL-15 多様体は成熟ヒト IL-15 配列の 6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111 又は 112 位での 1 又は 1 以上のアミノ酸置換 / 欠失を含む；特に、D8N（「D8」は天然の成熟ヒト IL-15 配列におけるアミノ酸及び残基位置を指し、「N」は IL-15 多様体におけるその位置で置換されたアミノ酸残基を指す）、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P 又は Q108A 置換はアンタゴニスト活性を有する IL-15 多様体をもたらし、N72D 置換はアゴニスト活性を有する IL-15 多様体をもたらす。

【0129】

ケモカインは、サイトカインに類似しており、他の細胞にさらされると細胞性免疫の任意の数の多重効果の原因となる任意の化学因子又は分子として定義される。適したケモカインは、限定されないが、CXC、CC、C 及び CX₃C ケモカイン群並びに CCL-1 から CCL-28、CXC-1 から CXC-17、XCL-1、XCL-2、CX3CL1、MIP-1b、IL-8、MCP-1 及びランテス (Rantes) を含んでいてよい。

【0130】

成長因子は特定の細胞にさらされると、その影響した細胞の増殖及び / 又は分化を誘発する任意の分子を含む。成長因子はタンパク質及び化学分子を含み、その一部は GM-CSF、G-CSF、ヒト成長因子及び幹細胞成長因子を含む。追加の成長因子が本明細書に記載の使用にまた適していることがある。

【0131】

毒剤又は細胞傷害剤は、細胞にさらされると致死効果又は成長の阻害効果を有する任意

10

20

30

40

50

の物質を含む。より具体的には、該エフェクター分子は、例えば植物起源又は細菌起源の細胞毒素、例えば、ジフテリア毒素（D T）、志賀毒素、アブリン、コレラ毒素、リシン、サポリン、綠膿菌外毒素（P E）、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質又はゲロニンであってもよい。かかる毒素の生物学的に活性なフラグメントは当該分野にはよく知られており、例えば D T A 鎮及びリチン A 鎮を含む。さらに、該毒素は細胞表面で活性な薬剤、例えばホスホリパーゼ酵素（例えばホスホリパーゼ C）であってもよい。

【 0 1 3 2 】

さらに、該エフェクター分子は化学療法剤、例えばビンデシン、ビンクリスチン、ビンプラスチニン、メトトレキサート、アドリアマイシン、プレオマイシン及びシスプラチニンであってもよい。

10

【 0 1 3 3 】

さらに、該エフェクター分子は、診断研究又は画像研究に適している、検出可能に標識化された分子であってもよい。かかる標識はビオチン又はストレプトアビジン／アビジン、検出可能なナノ粒子又はクリスタル、酵素又はその触媒的に活性なフラグメント、蛍光標識、例えば緑色蛍光タンパク質、F I T C、フィコエリトリリン、サイコム（c y c h o m e）、テキサスレッド又は量子ドット；放射性核種、例えばヨウ素 131、イットリウム 90、レニウム 188、ビスマス 212；リン光性分子若しくは化学発光分子、又は P E T、超音波又は M R I、例えば G d - M R I 又は常磁性金属イオンに基づく造影剤によって検出可能な標識を含む。エフェクター又はタグを含むタンパク質の製造及び使用に関する開示には、例えば、Moskaug, et al. J. Biol. Chem. 264, 15709(1989); Pastan, I. et al. Cell 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982)；公開 P C T 出願第 WO 94 / 29350 号；公開 P C T 出願第 WO 94 / 04689 号；公開 P C T 出願第 WO 2005046449 号及び米国特許第 5,620,939 号を参照されたい。

20

【 0 1 3 4 】

共有結合した I L - 15 及び I L - 15 R ドメインを含むタンパク質融合又は共役複合体は、複数の重要な用途を有する。例えば、I L - 15 : I L - 15 R 複合体を特定の細胞、例えば P D - L 1 を発現する腫瘍細胞へ送達するために、抗 P D - L 1 s c A b を含むタンパク質融合又は共役複合体を用いることができる。それゆえに、該タンパク質融合又は共役複合体により、該リガンドを含む細胞を選択的に損傷又は殺傷する方法が提供される。該タンパク質融合又は共役複合体によって損傷又は殺傷することが可能な細胞又は組織の例は、1 又はそれ以上のリガンドを発現する腫瘍、及びウイルス感染細胞又は細菌感染細胞を含む。損傷又は殺傷したと疑われる細胞又は組織は、本明細書に記載の方法で容易に検査することができる。

30

【 0 1 3 5 】

本発明の I L - 15 及び I L - 15 R ポリペプチドは、自然発生的な I L - 15 及び I L - 15 R 分子、例えばヒト、マウス若しくはその他の齧歯類、又は他の動物の I L - 15 及び I L - 15 R 分子に対してアミノ酸配列が適切に対応する。これらのポリペプチドの配列及びコーディング核酸は参考文献にて知られており、ヒトインターロイキン 15 (I L 15) mRNA GenBank : U 14407 . 1 (参照によって本明細書に組み込まれる)、Mus 筋肉インターロイキン 15 (I L 15) mRNA GenBank : U 14332 . 1 (参照によって本明細書に組み込まれる)、ヒトインターロイキン - 15 受容体 鎮前駆体 (I L 15 RA) mRNA GenBank : U 31628 . 1 (参照によって本明細書に組み込まれる)、Mus 筋肉インターロイキン 15 受容体、鎮 GenBank : BC 095982 . 1 (参照によって本明細書に組み込まれる)を含む。

40

【 0 1 3 6 】

一部の環境下では、本発明のタンパク質融合又は共役複合体を多価化すること、例えば s c 抗体の価数を増やすことが有用であってもよい。特に、該融合タンパク質複合体の I

50

L - 15 と I L - 15 R ドメイン間の相互作用により、多価複合体を生成する方法が提供される。さらに、例えば標準的なビオチン - ストレプトアビシン標識化付与技術の使用によって、又は適した固体支持体、例えばラテックスビーズとの接合による共有結合又は非共有結合によって、1 ~ 4 間のタンパク質と共に多価の融合タンパク質を製造することができる。化学的に架橋しているタンパク質（例えばデンドリマーと架橋している）がまた適した多価の種である。例えば、該タンパク質は修飾され得るタグ配列、例えばビオチン化 B i r A タグ又は化学反応性の側鎖、例えば C y s 又は H i s を有するアミノ酸残基をコードする配列を含むことによって修飾されてもよい。かかるアミノ酸タグ又は化学反応性のアミノ酸は、該融合タンパク質の多様な位置、好ましくは生物学的に活性なポリペプチド又はエフェクター分子の活性部位の末端に配置されていてもよい。例えば、可溶性融合タンパク質の C 末端は、かかる反応性アミノ酸を含むタグ又は他の融合タンパク質と共有結合していてもよい。適した側鎖は 2 又はそれ以上の融合タンパク質と適したデンドリマー又は他のナノ粒子を化学結合して、多価分子を生じさせるために含まれていてもよい。デンドリマーはその表面に任意の数の異なる機能性グループを有することができる合成化学ポリマーである（D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101(1993)）。本発明と関連した使用のための例示的なデンドリマーは、例えば、シスチン残基と連結することができる E 9 スターバーストポリアミンデンドリマー及び E 9 コンバストポリアミンデンドリマーを含む。例示的なナノ粒子はリボソーム、コアシェル粒子又は P L G A に基づく粒子を含む。

【 0 1 3 7 】

別の態様では、該融合タンパク質の 1 又は両方のポリペプチドがイムノグロブリンドメインを含む。あるいは、タンパク質結合ドメイン - I L - 15 融合タンパク質がイムノグロブリンドメインとさらに結合していてもよい。好ましいイムノグロブリンドメインは他のイムノグロブリンドメインと相互作用を許容して、上記に提供されるような複数鎖タンパク質を形成する領域を含む。例えば、該イムノグロブリン重鎖領域、例えば I g G 1 C H 2 - C H 3 は安定的に相互作用して F c 領域を創出することができる。F c ドメインを含む好ましいイムノグロブリンドメインは、F c 受容体若しくは補体タンパク質結合活性を含む、及び / 又はグリコシリ化部位を有するエフェクター機能を有する領域をまた含む。一部の態様では、該融合タンパク質複合体のイムノグロブリンドメインは、F c 受容体若しくは補体結合活性若しくはグリコシリ化又は二量化を低減又は増加させる変異を含み、それによりもたらされるタンパク質の生物学的活性に影響する。例えば、F c 受容体との結合を低減する変異を含むイムノグロブリンドメインは、F c 受容体を保有する細胞との低い結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を生成するために使用され得るし、それは特異的な抗原を認識又は検出するために設計される試薬にとって有益であってもよい。

【 0 1 3 8 】

核酸及びベクター

本発明により、本発明の融合タンパク質（例えば T × M の成分）をコードする核酸配列、特に D N A 配列がさらに提供される。好ましくは、該 D N A 配列は染色体外複製、例えばファージ、ウイルス、プラスミド、ファージミド、コスマド、Y A C 又はエピソームに適したベクターによって運搬される。特に、本明細書に記載の調製方法を容易にするため、及び該融合タンパク質の有意な量を入手するために望ましい融合タンパク質をコードする D N A ベクターを使用することができる。該 D N A 配列は、適した発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質をコードする配列の転写及び翻訳に必要な要素を含むベクターに挿入されてもよい。該タンパク質をコードする配列を発現するために多様な宿主ベクター系を活用してもよい。これらはウイルス（例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス等）に感染した哺乳類細胞系；ウイルス（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；微生物、例えば酵母ベクターを含む酵母、又はバクテリオファージ D N A、プラスミド D N A 又はコスマド D N A で形質転換された細菌を含む。活用する宿主ベクター系によって、任意の数の適した転写及び翻訳要素を使用してもよい。上記の Sambrook et al. 及

10

20

30

40

50

び上記のAusubel et al.を参照されたい。

【0139】

本発明には、可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法であって、本明細書に記載の第一及び第二のタンパク質をコードするDNAベクターを宿主細胞に導入すること、宿主細胞を細胞又は培地において該融合タンパク質を発現させるのに十分な状況下の培地で培養すること、第一のタンパク質のIL-15ドメインと第二のタンパク質の可溶性IL-15Rドメインの関連を許容して該可溶性融合タンパク質複合体を形成すること、宿主細胞又は培地から該融合タンパク質複合体を精製することを含む方法が含まれる。

【0140】

概して、本発明による好ましいDNAベクターは、エフェクター分子をコードする配列と作動可能に結合した、生物学的に活性なポリペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列の導入のための第一のクローニング部位を5'から3'の方向に含む、ホスホジエステル結合によって結合したヌクレオチド配列を含む。

10

【0141】

該DNAベクターによってコードされる融合タンパク質成分はカセット形式で提供され得る。用語「カセット」は標準的組み換え方法によって各成分を容易に別の成分と置換できることを意味する。特に、カセット形式で構成されるDNAベクターは、コードされた融合複合体が血清型を有するか、又は血清型を発展させる能力を有する病原体に対して使用されるべき時に、特に望ましい。

【0142】

融合タンパク質複合体をコードするベクターを製造するために、生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列は、適したリガーゼの使用によってエフェクターペプチドをコードする配列と結合される。本発明のペプチドのためのDNAコーディングを天然源、例えば適した細胞株からDNAを単離することによって、又は既知の合成方法、例えばリン酸トリエステル方法によって入手することができる。例えば、Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984)を参照されたい。市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機を用いて合成オリゴヌクレオチドを調製してもまたよい。単離すると、生物学的に活性なポリペプチドをコードする遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 又は他の当該分野に既知の方法によって増幅することができる。生物学的に活性なポリペプチド遺伝子を増幅するのに適したPCRプライマーは、該PCR産物に制限部位を加えてよい。該PCR産物は、好ましくは生物学的に活性なポリペプチド-エフェクター融合複合体の適した発現及び分泌に必要なエフェクターペプチド及びリーダー配列のためのスライス部位を含む。該PCR産物は、好ましくはリンカー配列をコードする配列、又はかかる配列のライゲーションのための制限酵素部位をまた含む。

20

【0143】

本明細書に記載の融合タンパク質は、好ましくは標準的な組み換えDNA技術によって產生される。例えば、生物学的に活性なポリペプチドをコードするDNA分子が単離されると、配列はエフェクターポリペプチドをコードする別のDNA分子にライゲーションされる。生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸配列は、直接エフェクターペプチドをコードするDNA配列に加わってもよく、また、より典型的には、本明細書に論じられるリンカー配列をコードするDNA配列は、生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列とエフェクターペプチドをコードする配列の間に介入して、適したリガーゼを用いて加わってもよい。得られたハイブリッドDNA分子は適した宿主細胞内に発現され、該融合タンパク質複合体を產生し得る。該DNA分子は5'から3'の方向へ互いにライゲーションされ、ライゲーション後にはコードされたポリペプチドの翻訳フレームに変化はない(すなわち、DNA分子はインフレームで互いにライゲーションされている)。もたらされるDNA分子はインフレーム融合タンパク質をコードする。

30

【0144】

他のヌクレオチド配列が遺伝子構造内にまた含まれ得る。例えば、エフェクターペプチドと融合した生物学的に活性なポリペプチドをコードする配列の発現を制御するプロモー

40

50

ター配列、又は該融合タンパク質を細胞表面又は培養培地に向かわせるリーダー配列が、該構築物に含まれ得るか、該構築物が挿入される発現ベクター内に存在していてもよい。イムノグロブリン又はCMVプロモーターは特に好ましい。

【0145】

多様体の生物学的に活性なポリペプチド、IL-15、IL-15R 又はFcドメインコーディング配列入手するために、当該分野の当業者は該ポリペプチドが特定のアミノ酸置換、添加、欠失、及び翻訳後の修飾によって、生物学的活性の喪失又は低減なしに修飾され得ることを認識するであろう。特に、同類アミノ酸置換、すなわち1つのアミノ酸を類似の大きさ、電荷、極性及び構造の別のアミノ酸との置換が、タンパク質機能を有意に変化させる見込みのないことはよく知られている。タンパク質の構成物質である20の標準アミノ酸を以下の4つの基の同類アミノ酸におおまかに分類することができる：アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンを含む非極性（疎水性）基；アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニン及びチロシンを含む極性基（非荷電、中性）基；アルギニン、ヒスチジン及びリジンを含む正電荷（塩基性）基；並びにアスパラギン酸及びグルタミン酸を含む負電荷（酸性）基。タンパク質において1つのアミノ酸を同じ基内の別のものへ置換することは、該タンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼす見込みがない。他の例では、アミノ酸配置への修飾は該タンパク質の生物学的活性を低減又は強化させるためになされてもよい。かかる変化は無作為に、又は標的化された残基の既知又は推定される構造的又は機能的特性に基づいた部位特異的変異を介して、導入され得る。多様体タンパク質の発現に続く、該修飾に起因する生物学的活性における変化を、結合又は機能的アッセイを用いて容易に評価することができる。10

【0146】

ヌクレオチド配列間の相違はDNAハイブリダイゼーション分析によって決定されてもよく、そこで二本鎖DNAハイブリッドの安定性は生じる塩基対合の範囲によって変化する。高温及び／又は低塩含有量の状態は、ハイブリッドの安定性を低減させ、多様化して選択された相同性の度合未満のものを有する配列のアニールを防ぐことがある。例えば、約55%のG-C含有量を有する配列には、ハイブリダイゼーション及び40～50°C、6×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウムバッファー）及び0.1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の洗浄状態が約60～70%の相同性を示し、ハイブリダイゼーション、50～65°C、1×SSC及び0.1%のSDSの洗浄状態が約82～97%の相同性を示し、並びにハイブリダイゼーション、52°C、0.1×SSC及び0.1%のSDSの洗浄状態が約99～100%の相同性を示す。ヌクレオチドとアミノ酸配列を比較する（及び相同性の度合を測定する）広範囲のコンピュータプログラムがまた利用可能であり、市販及びフリーのソフトウェアの両方の源を提供するリストがAusubel et al.(1999)に見出される。すでに利用可能な配列比較及び複数配列アラインメントアルゴリズムは、それぞれBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., 1997)及びClustalWプログラムである。BLASTはワールドワイドウェブでncbi.nlm.nih.govにて利用可能であり、ClustalWのあるバージョンは2.ebi.ac.ukで利用可能である。20

【0147】

該融合タンパク質の成分は、各々が意図された機能を実行することができる場合、ほとんどいかなる順序においても組織化され得る。例えば、一実施形態において、生物学的に活性なポリペプチドは該エフェクター分子のC又はN端末側終端に位置する。30

【0148】

本発明の好ましいエフェクター分子は、これらのドメインが意図する機能に導電性のあるサイズを有するであろう。本発明のエフェクター分子を製造し、よく知られた化学架橋方法を含む多様な方法によって生物学的に活性なポリペプチドと融合させることができる。Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974) in Chemical Modification of Proteins, Holden-Dayを参照されたい。S. S. Wong (1991) in Chemistry of Protein Conjugates40

tion and Cross-Linking, CRC Pressもまた参照されたい。しかしながら、組み換え操作を使用して該インフレーム融合タンパク質を製造することが概して好まれる。

【0149】

言及したように、本発明と合致した融合分子又は共役分子を複数の方法で組織化することができる。例示的な構造において、該生物学的に活性なポリペプチドのC末端は、該エフェクター分子のN末端と作動可能に結合されている。このリンクージは望ましい場合、組み換え方法によって獲得され得る。しかしながら、他の構造では、該生物学的に活性なポリペプチドのN末端が該エフェクター分子のC末端に連結している。

【0150】

あるいは、又はさらに、1又はそれ以上の追加のエフェクター分子を生物学的に活性なポリペプチド又は共役複合体に必要に応じて挿入することができる。

10

【0151】

ベクター及び発現

本発明の融合タンパク質複合体（例えばT×M）の成分を発現するために複数の戦略を用いることができる。例えば、本発明の融合タンパク質複合体の1又はそれ以上の成分をコードする構築物を、制限酵素を用いて適したベクターに組み込み、該構築物の挿入のために該ベクターに切れ目を入れ、続いてライゲーションすることができる。該遺伝子構築物を含むベクターを、それから該融合タンパク質の発現のために適した宿主に組み込む。概して上記のSambrook et al.を参照されたい。適したベクターの選択を、クローニングプロトコルに関する因子に基づいて経験的に行うことができる。例えば、該ベクターは用いられる宿主細胞と比較され、それに適したレプリコンを有するべきである。該ベクターは発現されるべき融合タンパク質複合体をコードするDNA配列と適合することが可能でなければならない。適した宿主細胞は真核細胞及び原核細胞を含み、好ましくは容易に形質転換することができ、培養培地で迅速な成長を示す細胞を含む。具体的には、好ましい宿主細胞は原核細胞、例えば大腸菌、枯草菌等、及び真核細胞、例えば動物細胞及び酵母菌株、例えばS. cerevisiaeを含む。哺乳類の細胞、特にJ558、NSO、SP2-O又はCHOが概して好まれる。他の適した宿主は、例えば昆虫細胞、例えばSf9を含む。慣例的な培養状態が用いられる。上記のSambrookを参照されたい。適した形質転換又はトランスフェクション細胞株をそれから選択することができる。本発明の融合タンパク質複合体を発現する細胞を既知の手順によって決定することができる。例えばイムノグロブリンと結合した融合タンパク質複合体の発現を、結合したイムノグロブリンに特異的なELISAによって、及び/又はイムノプロッティングによって決定することができる。IL-15又はIL-15Rドメインと結合した生物学的に活性なポリペプチドを含む融合タンパク質を検出する他の方法が実施例において開示される。

20

【0152】

上記に概して述べたように、望ましい融合タンパク質をコードする核酸を増殖させるための調製目的で、宿主細胞を使用することができる。それゆえに、宿主細胞は該融合タンパク質の産物が具体的に意図する原核細胞又は真核細胞を含むことができる。それゆえに、宿主細胞は、具体的には該融合をコードする核酸を増殖させることができ可能な酵母、ハエ、虫、植物、カエル、哺乳類の細胞及び器官を含む。使用できる哺乳類の細胞株の限定されない例は、CHO dhfr細胞(Urlaub and Chasman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))、293細胞(Graham et al., J Gen. Virol., 36:59 (1977))又はSP2若しくはNSOのような骨髄腫細胞(Galfre and Milstein, Meth. Enzymol., Virol., 73(B):3 (1981))を含む。

30

【0153】

望ましい融合タンパク質複合体をコードする核酸を増殖させることができる宿主細胞は、非哺乳類の真核細胞もまた包含し、昆虫(例えばSp. frugiperda)、酵母(例えばS. cerevisiae、S. pombe、P. pastoris、K. lactis、H. polymorpha; Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486-496 (1992)によって概して精査されたもの)、真菌及び植物細胞を含む。特

40

50

定の原核細胞、例えば大腸菌及び桿菌がまた考慮される。

【0154】

細胞をトランスフェクションする標準的な技術によって望ましい融合タンパク質をコードする核酸を宿主細胞に導入することができる。用語「トランスフェクションする」又は「トランスフェクション」は核酸を宿主細胞に導入するためのすべての慣例的な技術を包含することが意図され、リン酸カルシウム共沈殿法、D E A E - デキストラノン介在性トランスクレオニン、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ウイルスのトランスタクション及び/又はインテグレーションを含む。宿主細胞をトランスフェクションするための適した方法を上記のSambrook et al. 及び他の実験テキストに見出すことができる。

10

【0155】

多様なプロモーター（転写開始調節領域）を本発明により使用してもよい。適切なプロモーターの選択は、提示された発現細胞による。選ばれた宿主において機能性があるかぎり、異種の源からのプロモーターを使用してもよい。

【0156】

プロモーターの選択はペプチド又はタンパク質の産生の望ましい能率及びレベルによってまた変化する。大腸菌におけるタンパク質発現レベルを劇的に増加させるために、誘導プロモーター、例えばtacがしばしば用いられる。タンパク質の過剰発現は宿主細胞にとって有害なこともある。結果として、宿主細胞の成長は制限され得る。誘導プロモーター系の使用によって、遺伝子発現の誘発に先立って宿主細胞を許容できる密度まで育成することができ、それによりさらに高い産生収率が容易になる。

20

【0157】

多様なシグナル配列を本発明により使用してもよい。生物学的に活性なポリペプチドコードィング配列と相同であるシグナル配列を使用してもよい。あるいは、発現細胞における効率的な分泌及びプロセシングのために選択又は設計されたシグナル配列をまた使用してもよい。例えば、適したシグナル配列/宿主細胞の組は枯草菌における分泌のための枯草菌sacBシグナル配列、及びP. pastoris分泌のためのSaccharomyces cerevisiae - 交配因子又はP. pastoris酸性ホスファターゼphoIシグナル配列を含む。該シグナル配列は、シグナルペプチダーゼ開裂部位をコードする配列を通して、あるいは通常は10未満のコドンからなる短いヌクレオチド架橋を通して、タンパク質コードィング配列に直接加えられてもよく、そこで該架橋は下流TCR配列の正確なリーディングフレームを保証する。

30

【0158】

真核タンパク質発現系では転写及び翻訳を高める要素が特定されている。例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーターの1,000bpを異種プロモーターの両側に配置することは、植物細胞における転写レベルを10~400倍高めることができる。該発現構築物は適した翻訳開始配列をまた含むべきである。適切な翻訳開始のためのコザックコンセンサス配列を含む発現構築物の修飾は、翻訳レベルを10倍増加させることがある。

【0159】

選択性マーカーがしばしば用いられ、それは発現構築物の一部であり得るか、又はそれから分離していてもよく(例えば発現ベクターによって運搬され)、そのために該マーカーは目的の遺伝子とは異なる部位にインテグレートしてもよい。例としては、抗生物質への抵抗性を与えるマーカー(例えばblaは大腸菌宿主細胞にアンピシリンに対する抵抗性を与え、nptIIは多種多様な原核細胞及び真核細胞にカナマイシン抵抗性を与える)、又は宿主が最小限の培地で成長することを認めるマーカー(例えばHIS4はP. pastoris又はHis-S. cerevisiaeをヒスチジンの非存在下で成長させる)が含まれる。該選択性マーカーは自己の転写及び翻訳開始領域並びに調節領域を有し、それによってマーカーの独立した発現を可能にする。抗生物質の抵抗性がマーカーとして用いられる場合、選択のための抗生物質の濃度は該抗生物質によって多様化し、概し

40

50

て培地の抗生物質 / mL の 10 から 600 µg まで及ぶであろう。

【 0 1 6 0 】

該発現構築物は既知の組み換え DNA 技術を用いて集められる (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999)。制限酵素の消化及びライゲーションは、DNA の 2 つのフラグメントを加えるために用いられる基礎的な段階である。DNA フラグメントの両末端はライゲーション前に修飾を必要とすることがある、このことはオーバーハングにおいて果たすこと、スクレアーゼ (例えば Exo I II)、部位指向性変異を有する該フラグメントの末端部分を欠失させること、又は新しい塩基対を PCR によって追加することによって達成されてもよい。選択されたフラグメントの加入を容易にするためにポリリンカー及びアダプターを用いてもよい。該発現構築物は、典型的には大腸菌の制限、ライゲーション及び形質転換の期間を用いる段階で集められる。発現構築物の構築に適した多数のクローニングベクターが当該分野に知られており (ZAP 及び pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI, Ausubel et al., 1999 から引用)、特定の選択が本発明に重大なわけではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物の宿主細胞への導入のために選択される遺伝子送達システムによって影響されるであろう。各段階の終わりに、結果として生じる構築物を制限、DNA 配列、ハイブリダイゼーション及び PCR 分析を用いて分析してもよい。

10

【 0 1 6 1 】

発現構築物は、線型ベクター又は環状ベクターのどちらかのクローニングベクター構築物として宿主細胞に形質転換されてもよく、該クローニングベクターから除去され、そのままで使用され若しくは送達ベクターに導入されてもよい。該送達ベクターは選択された宿主細胞型において発現構築物の導入及び維持を容易にする。該発現構築物は任意の数の既知の遺伝子送達システム (例えば天然の能力、化学的に介在された形質転換、プロトプラス形質転換、エレクトロポレーション、バイオリストイック形質転換、トランスフェクション又は接合) によって宿主細胞に導入される (Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989)。選択される遺伝子送達システムは、使用される宿主細胞及びベクターシステムによる。

20

【 0 1 6 2 】

例えば、該発現構築物をプロトプラス形質転換又はエレクトロポレーションによって *S. cerevisiae* 細胞に導入することができる。*S. cerevisiae* のエレクトロポレーションは容易に達成され、スフェロプラス形質転換と比較可能な形質転換効率を生じる。

30

【 0 1 6 3 】

本発明により、目的の融合タンパク質を単離するための产生プロセスがさらに提供される。該プロセスでは、調節配列と作動可能に結合された目的のタンパク質をコードする核酸を導入された宿主細胞 (例えば酵母、真菌、昆虫、細菌又は動物細胞) を、产生スケールで培養培地にて成長させ、目的の融合タンパク質をコードするスクレオチド配列の転写を刺激する。続いて、採取された宿主細胞から、又は培養培地から目的の融合タンパク質を単離する。目的のタンパク質を培地から又は採取された細胞から単離するために、標準的なタンパク質精製技術を使用できる。特に、ローラーボトル、スピナーフラスコ、組織培養プレート、生物反応器又は発酵槽を含む多様な実施からラージスケール (すなわち少なくともミリグラム量) での望ましい融合タンパク質を発現させて精製するために、該精製技術を使用することができる。

40

【 0 1 6 4 】

発現した融合タンパク質複合体を既知の技術により単離して精製することができる。典型的には、培養培地を遠心分離又は濾過し、それから親和性又は免疫親和性クロマトグラフィー、例えばプロテイン A 若しくはプロテイン G 親和性クロマトグラフィー、又は発現された融合複合体と結合するモノクローナル抗体の使用を含む免疫親和性プロトコルによって上清を精製する。既知の技術の適切な組み合わせによって本発明の融合複合体を分離して精製することができる。これらの方法は、例えば溶解度を活用する方法、例えば塩沈

50

殿及び溶媒沈殿、分子量における差異を活用する方法、例えば透析、限外濾過、ゲル濾過及びSDSポリアクリラミドゲル電気泳動、電荷における差異を活用する方法、例えばイオン交換カラムクロマトグラフィー、特異的親和性を活用する方法、例えば親和性クロマトグラフィー、疎水性における差異を活用する方法、例えば逆相高パフォーマンス液体クロマトグラフィー、及び等電点における差異を活用する方法、例えば等電点電気泳動、金属親和性カラム、例えばNi-NTAを含む。これらの方法に関する開示には上記のSambrook et al.及びAusubel et al.を概して参照されたい。

【0165】

本発明の融合タンパク質は実質的に純粋であることが好ましい。すなわち、該融合タンパク質は、それに天然に付随する細胞置換基から単離されているため、該融合タンパク質は好ましくは少なくとも80%又は90%から95%の均質性(w/w)で存在する。少なくとも98%から99%の均質性(w/w)を有する融合タンパク質が、多くの医薬、臨床又は研究の適用にはもっとも好ましい。実質的に精製されると、該融合タンパク質は治療適用にとっての混入物質を実質的に有するべきではない。部分的に精製又は実質的に精製すると、該可溶性融合タンパク質を治療的に使用でき、本明細書に開示されるインビボアッセイ又はインビトロアッセイにおいて実行できる。実質的な精製は多様な標準技術、例えばクロマトグラフィー及びゲル電気泳動によって決定される。

10

【0166】

本発明の融合タンパク質複合体は、がんである、又は感染した細胞である、又は1若しくはそれ以上の疾患に感染しているかもしれない多様な細胞を有するインビボ又はインビトロでの使用に適している。

20

【0167】

ヒトインターロイキン-15(IL-15)は、抗原提示細胞に発現したヒトIL-15受容体鎖(huIL-15R)によって、免疫エフェクター細胞に対してトランスで存在する。IL-15Rは、細胞外スシドメイン(huIL-15RSu)を通して、初めは高い親和性(38pM)でhuIL-15と結合する。本明細書に記載のように、huIL-15及びhuIL-15RSuドメインを、マルチドメイン融合複合体を構築するための骨格として使用することができる。

【0168】

IgGドメイン、特にFcフラグメントは、認可されたバイオ医薬品を含む複数の治療分子のための二量体骨格として成功して使用されている。例えば、エタネルセプトはヒトIgG1のFcドメインと結合した可溶性ヒトp75腫瘍壞死因子-(TNF-)受容体(sTNFR)の二量体である。この二量化によってエタネルセプトはTNF-活性を阻害するのに单量体のsTNFRよりも1,000倍まで強力であることができ、单量体形態より5倍長い血清半減期を有する融合を提供する。結果として、エタネルセプトはインビボでのTNF-の前炎症性活性の中和に効果的であり、複数の異なる自己免疫性兆候に対する患者の結果を好転させる。

30

【0169】

その二量化活性に加えて、該Fcフラグメントは補体活性化並びにナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、食細胞又は樹枝状細胞に表示されたFc受容体との相互作用を通じて、細胞傷害性エフェクター機能をまた提供する。抗がん治療抗体及び他の抗体ドメイン-Fc融合タンパク質と関連して、これらの活性は動物腫瘍モデルにおいて、及びがん患者において観察される有効性におそらく重要な役割を演じる。しかしながら、この細胞傷害性エフェクター反応は複数の治療適用には十分ではないこともある。それゆえに、Fcドメインのエフェクター活性を改良して拡大し、標的化された治療分子を介して疾患部位にT細胞活性を含む細胞溶解性免疫反応を採用する他の方法を発展させることに少なからぬ関心が払われている。IgGドメインは二重特異性抗体を形成し、伝統的なハイブリドーマ融合技術によって生成される産物の質と量を改良するための骨格として使用してきた。これらの方法は他の骨格の欠点を回避するが、哺乳類の細胞において臨床開発及び使用を支えるのに十分なレベルの二重特異性抗体を產生することは難しかった。

40

50

【0170】

ヒト由来の免疫刺激性多量体骨格を発展させようと努力して、ヒトIL-15(huIL-15)及びIL-15受容体ドメインを使用した。huIL-15は高い結合親和性(平衡解離定数(KD)~ 10^{-11} M)を有するhuIL-15受容体鎖(huIL-15R)と関連したサイトカインの小さな4のヘリックスバンドル群の構成員である。結果として生じる複合体はそのときT細胞及びNK細胞の表面上に表示されるヒトIL-2/15受容体/コモン鎖(huIL-15R_C)複合体に対してトランスに存在する。このサイトカイン/受容体相互作用は、ウイルスに感染した細胞又は悪性細胞を根絶させるのに重大な役割を演じるエフェクターT細胞及びNK細胞の拡大及び活性化をもたらす。通常、huIL-15及びhuIL-15Rは樹枝状細胞内で共産生され、複合体を細胞内で形成し、該複合体は続けて細胞表面にヘテロ二量体分子として分泌され表示される。それゆえに、huIL-15及びhuIL-15R相互作用の特性は、これらの鎖間結合ドメインがヒト由来の免疫刺激性骨格として機能し、標的特異的結合が可能な可溶性二量体分子を製造することを示唆する。

10

【0171】

下記に詳細に記載されているように、PD-L1-T_XMを創出するためにhuIL-15:huIL-15R_{Su}に基づく骨格を使用した。該二量体融合タンパク質複合体はhuIL-15ドメインと結合ドメインの免疫刺激性及び標的特異的生物学的活性を保有しており、huIL-15及びhuIL-15Rの添加が該融合タンパク質の空間的配置を有意に変化させなかったことと、サイトカイン活性に影響を与えることなく適正な度合の立体配座フレキシビリティを提供したことを示した。このように、この骨格を、多価融合複合体、例えばPD-L1-T_XMを形成し、分子の全体的な結合親和性を増加させるのに使用することができた。該可溶性融合タンパク質を組み換えCHO細胞培養において比較的高いレベルで产生し(広範囲の細胞株スクリーニング又は最適化を伴わない細胞培養上清内でリットル当たりmg/s)、該細胞培養上清から容易に精製することができた。

20

【0172】

本発明の実施には、他に示されていない限り、分子生物学(組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の慣例的な技術が用られ、これらは当業者の十分な範囲内である。かかる技術は参考文献、例えば、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)に十分に説明されている。これらの技術は本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの产生に適用可能であり、及びそのようなものが本発明を製造及び実施するのに考慮されてもよい。特に、特定の実施形態のために有用な技術は以下のセクションにて論じられるであろう。

30

【0173】

リンパ腫

リンパ腫はBリンパ球又はTリンパ球が正常細胞より速く分裂する、又は意図されるより長生きるときに発生する血液のがんの一類である。例えば、B細胞リンパ腫はホジキンリンパ腫及び多くの非ホジキンリンパ腫の両方を含む。B細胞リンパ腫はCD20を発現する。

40

【0174】

リンパ腫はリンパ節、脾臓、骨髄、血液及び他の器官で発展することがある。これらの悪性細胞はリンパ節をしばしば起源とし、節の増大、すなわちリンパ球様細胞の充実性腫瘍として現れる。リンパ腫はリンパ節生検、すなわちリンパ節の部分的又は全体切除によって決定的に診断され、顕微鏡で検査される。この検査はリンパ腫を示し得る組織病理学

50

的特徴を明らかにすることがある。治療は化学療法、放射線療法及び／又は骨髄移植を含んでいてもよい。

【0175】

以下の実施例は本発明のアッセイ、スクリーニング及び治療方法を製造及び使用する方法の完全な開示及び記述を当業者に提供するために示され、発明者が本発明とみなすものの範囲を制限することを意図するものではない。

【0176】

実施例

実施例1：抗P D - L 1結合ドメイン(P D - L 1 T × M)を含むI L - 1 5に基づく融合タンパク質複合体の生成及び特性化

がん細胞は免疫チェックポイント分子及びリガンド、例えばP D - L 1によって調節される多様な免疫阻害経路を刺激することが可能である。これらのチェックポイント分子を阻害する抗体は抗腫瘍免疫を高めることが示されている。I L - 1 5はN K細胞及びC D 8⁺細胞を活性化させ、拡大させる一方で、それらの細胞溶解性活性を増加させる。I g分子のF c領域はN K細胞及びマクロファージのF c受容体と相互作用することができ、標的疾患細胞に対して抗体依存性細胞傷害(ADC C)又は抗体依存性細胞食作用(ADC P)を介在する。下記に詳細に記載されているように、抗P D - L 1結合ドメインと融合したI L - 1 5 N 7 2 D:I L - 1 5 R S u / F c骨格を含むタンパク質複合体が生成される。これらの複合体は抗P D - L 1結合ドメインを介して腫瘍細胞を認識し、I L - 1 5活性を介してN K細胞及びT細胞反応を誘発させ、F c結合ドメインを介してADC C及びCDCを刺激する。

【0177】

具体的には、一本鎖抗P D - L 1抗体とh u I L - 1 5 N 7 2 D及びI L - 1 5 R S u / F c鎖を結合する構築物を製造した。該抗P D - L 1一本鎖抗体(抗P D - L 1 s c A b)配列は、フレキシブルリンクマー配列を介して結合した重鎖及び軽鎖V抗体ドメイン抗体のコーディング領域を含む。該一本鎖抗体ドメインはV H - リンカー - V L又はV L - リンカー - V Hフォーマットのどちらかで配置され得る。一部の場合では、該抗P D - L 1 s c A bがI L - 1 5 N 7 2 D及び／又はI L - 1 5 R S u / F c鎖のC末端と結合する。他の場合では、該抗P D - L 1はI L - 1 5 N 7 2 D及び／又はI L - 1 5 R S u / F c鎖のN末端と結合する。マウス又はヒトP D - L 1分子のどちらかに特異的な抗P D - L 1 s c A b sをこれらの構築物中で使用した。

【0178】

1) h u I L - 1 5 N 7 2 D及びh u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c鎖のN末端と結合した抗ヒトP D - L 1 s c A bを含む構築物の核酸配列及びタンパク質配列が以下に示される。抗ヒトP D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列及び終止コドンを含む)は以下の通りである(配列番号:1)：
(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(抗ヒトP D - L 1 s c A b)
(V L)

10

20

30

40

50

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCGGCCTCCGTGGGAGATCGGGTG
 ACCATCACCTGTAGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCCTGGTACCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCCTGCAGTCCCGA
 GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCATCTCC
 TCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCACTCCAGGTT
 TCCATCACCTCGGCCAGGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGG

10

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGGTGGAGGTGGAGG

(V H)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAG
 GCTGTCCTGTGCCGTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACGGTGAG
 GCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTACATCTCCAGCTCCTCCAC
 CATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGGACAACGCCA
 AGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGGGCGACTATTACTACGGCATGGACGTGTGGGCCAGGGAACCAC
 CGTGACCGTGTCCCTCC

20

(ヒト I L - 1 5 N 7 2 D)

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTGATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTCAGAGTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

30

【 0 1 7 9 】

抗ヒト P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のアミノ酸配列（シ
 グナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：2）：

40

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(抗ヒト P D - L 1 s c A b)

(V L)

NIQMTQSPSSVSASVGDRVITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFALTISLQPEDFATYYCQQQADSRSITFGQGTRLEIKR

(リンカー)

50

GGGGSGGGSGGGGS

(V H)

EVQLVQSGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSLSTIQ
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDYYGMDVWGQGTTVT
VSS

(ヒト I L - 1 5 N 7 2 D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

10

【 0 1 8 0 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 1 8 1 】

抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 構築物の核
酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：3）：

（リーダー配列）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

20

(抗ヒト P D - L 1 s c A b)

(V L)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGAGATGGGTG
ACCATCACCTGTAGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCCTGGTACCAAGCAG
AAGCCCCGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCCTGCAGTCCGGA
GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCATCTCC
TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCACTCCAGGTT
TCCATCACCTTCGGGCCAGGGCACCAAGGCTGGAGATCAAGAGG

30

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

(V H)

GAGGTGCAGCTGGTGAGTCCGGAGGAGGTGGCAGCCTGGCGGATCCCTGAG
GCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACGGTGAG
GCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCATCTCCAGCTCCTCCAC
CATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGGACAACGCCA
AGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCCAGGGCGACTATTACTACGGCATGGACGTGTGGGCCAGGAAACCAC
CGTGACCGTGTCCCTCC

40

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

50

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCGTGGAACACGGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト Ig G 1 CH 2 - CH 3 (Fc) ドメイン)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGT
GCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCCTGCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
CGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

10

20

【0182】

抗ヒトPD-L1 scAb/huIL-15R Su/huIgG1 Fc融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：4）：

（リーダー配列）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

30

（抗ヒトPD-L1 scAb）

（VL）

NIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFALTISSLQPEDFATYYCQQQADSRESITFGQGTRLEIKR

40

（リンカー）

GGGGSGGGSGGGGS

（ VH ）

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSLSTIQ
YADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDYYYYGMDVWGQGTVT
VSS

50

(ヒトIL-15Rスシドメイン)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(ヒトIgG1CH2-CH3(Fc)ドメイン)

EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【0183】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0184】

2) huIL-15N72D及びhuIL-15R Su/huIgG1 Fc鎖のN末端と結合した第二の抗ヒトPD-L1(アベルマブ)を含む構築物の核酸配列及びタンパク質配列が以下に示される。抗ヒトPD-L1 scAb/IL-15N72D構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列及び終止コドンを含む)は以下の通りである(配列番号: 5):

20

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(抗ヒトPD-L1 scAb)

(VL)

CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCTGGACAGTCCATCACC
ATCTCCTGTACCGGCACCTCCCTCCGATGTGGGGGGCTACAACACTACGTGTCCCTGGTAC
CAGCAGCACCCGGCAAAGCCCCAAGCTGATGATCTATGACGTGTCCAACCGGCC
CTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGAACACCGCCTCCCTGAC
AATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTGCTCCTCCTACACCTC
CTCCTCCACCAGGGTGTCCGCACCGGACCAAGGTGACCGTGCTG

30

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGC GGACTGGTGACGCCTGGAGGATCCCTGAG
GCTGTCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGG
CAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATC
ACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACCTCAAG
AACACCCCTGTACCTGCAGATGAACCTGAGGGCTGAGGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAGGATCAAGCTGGGCACCGTGACCACAGTGGACTACTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACCGTGTCCCTCC

40

50

(ヒトIL-15N72D)

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTGATGATACTAGAAGAACTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTGCAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

10

【0185】

抗ヒトPD-L1 scAb / IL-15N72D融合タンパク質のアミノ酸配列(シ

グナルペプチド配列を含む)は以下の通りである(配列番号:6):

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(抗ヒトPD-L1 scAb)

(VL)

20

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
 VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(VH)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPGGITF
 YADTVKGRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWQGTLVT
 VSS

30

(ヒトIL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASH
 DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0186】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

40

【0187】

抗ヒトPD-L1 scAb / huIL-15R Su / huIgG1 Fc構築物の核
 酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号:7):

(リーダー配列)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(抗ヒトPD-L1 scAb)

(VL)

50

CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCCCTGGACAGTCCATCACC
 ATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGATGTGGGCGGCTACAACACTACGTGTCCCTGGTAC
 CAGCAGCACCCCGGCAAAGCCCCAAGCTGATGATCTATGACGTGTCCAACCGGCC
 CTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGAC
 AATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCTCCTACACCTC
 CTCCCTCCACCAGGGTGTTCGGCACCGCACCAAGGTGACCGTGCTG

10

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGG

(V H)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAG
 GCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGG
 CAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATC
 ACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACCTCAAAG
 AACACCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCGTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTA
 CTGCGCCAGGATCAAGCTGGCACCGTACCCAGTGGACTACTGGGGACAGGGCA
 CCCTGGTGACCGTGTCCTCC

20

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

30

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

40

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCAGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
 AAGCCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
 GCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【 0 1 8 8 】

抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：8）：
 （リーダー配列）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（抗ヒト P D - L 1 s c A b ）
 （ V L ）

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P G K A P K L M I Y D V S N R P S G
 V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G T G T K V T V L

（ リンカー ）
 G G G G S G G G G S G G G G S

（ V H ）
 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G K G L E W V S S I Y P S G G I T F
 Y A D T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G T V T T V D Y W G Q G T L V T
 V S S

（ ヒト I L - 1 5 R スシドメイン ）
 I T C P P P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S
 L K C I R

（ ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン ）

10

20

30

40

50

EPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KITPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 1 8 9 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 1 9 0 】

3) h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u / m u I g G 2 A F c 鎌の N 末端と結合した抗マウス P D - L 1 s c A b を含む構築物の核酸配列及びタンパク質配列が以下に示される。抗マウス P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列及び終止コドンを含む）は以下の通りである（配列番号：9）：

（シグナルペプチド）

ATGACATGGACTCTACTATTCCCTGCCTCCTCATCACTAACAGGGTCATGTGCC
 AGTTTGTGCTTACTCAGCCAACTCT

10

（抗マウス P D - L 1 s c A b ）

（ V L ）

GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTGCACCCGCAGCACTGGTAAC
 ATTGGAAACAATTATGTGAACCTGGTACCAAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCCACCAC
 TCTGATTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGGAGTTCCCTGACAGGTTCTCTGGCTC
 CATTGACAGATCTCCAACTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTGAGGA
 TGAAACTGACTACTTCTGTCAGTCTACAGTAGTGGTATGTATATTTCGGCGGTGG
 AACCAAGCTCACTGTCTTA

20

30

（ リンカー ）

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

（ V H ）

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTAAA
 GTTGTCTGCAAAACTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTGAA
 GCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGGAAACATTATGGTGGAAATGGTG
 GTGCTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACAGTGGACAAATCT
 TCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCTCTGCAGTCTAT
 TTTTGTGCAAGGGTCGGACTTCCCGGCCTTTGATTACTGGGGCCAGGGAGTCATG
 GTCACAGTCTCCTCA

40

（ヒト I L - 1 5 N 7 2 D ）

50

AACTGGGTGAATGTAATAAGTATTGAAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTTATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCGGAGATGCA
 AGTATTGATGATACTGAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAACAGAATCTGGATGCAAAGAACATGTGAGGAACGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTCAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

10

【0191】

抗マウス P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：10）：
 （シグナルペプチド）

MTWTLLFLAFLHHLTGSCAQFVLTQPNS

（抗マウス P D - L 1 s c A b ）
 （V L）

VSTNLGSTVKLSCRNSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDFSGSID
 RSSNSALLTINNVQTEDETDXFCQSYSSGMYIFGGGKLTVL

20

（リンカー）
 GGGGGGGGGGGGGGG

（V H）
 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFNSYYMSWLKQMPGQNIEWIGNIYGGNGGA
 GYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGQGVMT
 VSS

30

（ヒト I L - 1 5 N 7 2 D ）
 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
 DTVENLJILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0192】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0193】

抗マウス P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / m u I g G 2 A F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：11）：
 （シグナルペプチド）

ATGACATGGACTCTACTATTCCCTGCCTCCTCATCACTAACAGGGTCATGTGCC
 AGTTTGTGCTTACTCAGCCAAACTCT

40

（抗マウス P D - L 1 s c A b ）
 （V L）

50

GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTCAACCGCAGCACTGGTAAC
ATTGGAAACAATTATGTGAACCTGGTACCAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCCACCAC
TCTGATTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGGAGTTCTGACAGGTTCTGGCTC
CATTGACAGATCTTCCAACTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTGAGGA
TGAAACTGACTACTCTGTCACTACAGTAGTGGTATGTATATTCGGCGGTGG
AACCAAGCTCACTGTCTA

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTCTGGTGGAGGTGGAGT

10

(V H)
GAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTAAA
GTTGTCCTGCAAAACTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTTGAA
GCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGGAAACATTATGGTGGAAATGGTG
GTGCTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACAGTGGACAAATCT
TCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCCTGCAGTCTAT

20

TTTGTCAGGGTCGGACTTCCGGCTTTGATTACTGGGCCAGGGAGTCATG
GTCACAGTCTCCTCA

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)
ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

30

(マウス I g G 2 a C H 2 - C H 3 ドメイン)

40

50

GAACCAAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCATGCAAATGCCAGCACCTAA
 CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG
 ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
 GATGTCCAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
 AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
 GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC
 TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
 CAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCT
 GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACA
 ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
 TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
 TAGCTACTCCTGTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAG
 CTTCTCCCGGACTCCAGGTAAATAA

【0194】

抗マウス P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / m u I g G 2 A F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：12）：

（シグナルペプチド）

MTWTLFLAFLHHLTGSCAQFVLTQPNS

（抗マウス P D - L 1 s c A b ）

（ V L ）

VSTNLGSTVKLSCNRSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDFRSGSID
 RSSNSALLTINNVQTEDETDYFCQSYSSGMYIFGGGTKLTVL

（リンカー）

GGGGSGGGGGGGGS

（ V H ）

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFNSYYMSWLKQMPGQNIEWIGNIYGGNGA
 GYNQKFKKGATLTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGQQGMVT
 VSS

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）

ITCPPPMVSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

（マウス I g G 2 a C H 2 - C H 3 ドメイン）

10

20

30

40

50

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISL SPIVTCVV DVSEDDPDVQIS
 WFVNNEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIER
 TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKQVTL CMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
 NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSF SRTPGK

【0195】

一部の場合では、該リーダーベブチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0196】

抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 及び抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 R S u / F c 配列を、以前（米国特許第 8,507,222 号、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように発現ベクターにクローニングし、該発現ベクターを C H O 細胞にトランスフェクションした。C H O 細胞内での 2 つの構築物の共発現により、可溶性抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D : 抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 R S u / F c 複合体の形成及び分泌が許容され、プロテイン A クロマトグラフィーを用いて C H O 細胞培養上清からそれを精製した。

10

【0197】

精製された抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D : 抗 P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 R S u / F c タンパク質複合体の SDS - PAGE 分析が図 3 に示される。可溶性抗マウス P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / m u I g G 2 A 及び抗マウス P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D タンパク質に対応するバンドが、それぞれ ~ 60 kDa 及び ~ 40 kDa で観察された。

20

【0198】

実施例 2 : P D - L 1 T x M の活性のインピトロ特性化

E L I S A に基づく技術により P D - L 1 T x M 複合体の形成が裏付けられた。図 4 A では、トランスフェクションされた C H O 細胞に由来する細胞上清中の抗ヒト P D - L 1 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D : 抗ヒト P D - L 1 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質複合体を、捕捉抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 及び検出抗体、ビオチン化抗ヒト I L - 1 5 抗体 (BAM 247, R & D Systems) を有する h u I g G 1 / h u I L - 1 5 に特異的な E L I S A を用いて検出した。

30

【0199】

マウス特異的 P D - L 1 T x M では、捕捉抗体、 a f f i n i p u r e 口バ抗ネズミ I g G (Jackson ImmunoResearch) 又はヒト / 類人猿 I L - 1 5 抗体 (MAB647, R & D Systems) 、及び検出抗体ホースラディッシュペルオキシダーゼ - a f f i n i p u r e 口バ抗ネズミ I g G (Jackson ImmunoResearch) 又はビオチン化抗ヒト I L - 1 5 抗体 (BAM 247, R & D Systems) をそれぞれ有する m I g G 2 a 特異的又は h u I L - 1 5 特異的 E L I S A を用いて、該融合タンパク質複合体を検出した (図 4 C)。陽性対照と比較して、精製されたマウス特異的 P D - L 1 T x M への抗体反応性により該複合体の構造が立証された。

40

【0200】

腫瘍細胞においてこれらの融合タンパク質の P D - L 1 と結合する能力をまた調査した。M B 2 3 1 腫瘍細胞を保有する受容体を用いるフローサイトメトリーによって、ヒト特異的 P D - L 1 T x M の結合を評価した。これらの調査において、 1×10^5 の細胞を P D - L 1 T x M 複合体で染色した。図 5 A に示したように、 A P C 共役マウス抗ヒト F c A b (Biolegend) を用いて検出すると、フローサイトメトリー分析により P D - L 1 T x M 複合体の M B 2 3 1 細胞との結合が明らかになった。図 5 B では、 P D - L 1 T x M 複合体を用いてこの結合の特異性を試験し、市販の A P C 共役抗ヒト P D - L 1 A b (Biolegend) を有する M B 2 3 1 細胞の染色を阻害した。同様に、フローサイトメトリー分析によりアベルマップに基づく P D - L 1 T x M 複合体の M B 2 3 1 腫瘍細胞と

50

の結合が明らかになった(図5C)。

【0201】

マウス特異的PD-L1-TxM複合体の結合を評価するために、PD-L1陽性5T33P骨髄腫及びMB491uc膀胱腫瘍細胞(5×10^5 細胞/試験)をPE又はB
r
i
l
l
i
a
n
t
V
i
o
l
e
tで標識化した抗マウスPD-L1Ab(100 μ L中2 μ g/試験)で初めに染色した(図6A及び図6B)。精製されたマウス特異的PD-L1TxM複合体の追加によってこの結合の特異性を試験し、PD-L1リガンドと結合している抗体を阻害した。精製された抗mPD-L1Ab(S1-PD-L1)を陽性対照として使用した。興味深いことに、該PD-L1TxM複合体が腫瘍細胞上のPD-L1染色を、同量の抗PD-L1Abよりもよく阻害することを見出した。このことをA
10
20
B細胞リンパ腫細胞を用いる阻害調査においてさらに評価した。滴定分析により、PD-L1TxMが抗PD-L1Abの少なくとも5倍、腫瘍細胞表面に発現したPD-L1との相互作用を阻害するのに効果的であったことが示された(図7A及び図7B)。

【0202】

PD-L1TxM複合体のIL-15免疫刺激性活性を評価するために、IL-15依存性32D細胞(マウス造血細胞株)の増殖を評価した。増加したレベルのPD-L1TxMを32D細胞(10^4 細胞/ウェル)に添加し、2日後にWST-1増殖試薬を用いて細胞増殖を決定した。図8に示すように、32D細胞増殖における用量に依存的な増加はPD-L1TxMによって介在され、該複合体の免疫刺激性活性を立証した。

【0203】

異なる形態のPD-L1TxM複合体の特性及び活性を評価するためにさらなる調査を行った。PD-L1scAb/IL-15N72D及び抗PD-L1scAb/IL-15R Su/Fcタンパク質を含む複合体は4つの抗PD-L1scAb結合ドメイン(すなわち、四頭(4H))を有することが期待される一方、IL-15N72D及び抗PD-L1scAb/IL-15R Su/Fcタンパク質を含む複合体は2つの抗PD-L1scAb結合ドメイン(すなわち、二頭(2H))を有することが期待される(図9A)。これらの複合体は、2HTxMと比較して4HTxMの標的細胞を結合する高い結合活性に基づく、異なる活性を有することが期待される。IL-15N72Dとのタンパク質融合は、IL-15の生物学的活性を低減することがまた示されている。それゆえに、4HTxMフォーマットは2HTxMと比較して低いIL-15活性を有することが期待される。高い(抗体様)標的化及び低い免疫刺激性活性が好まれる場合(すなわち4HTxMフォーマット)、又は低い標的化及び高い免疫刺激性活性(免疫サイトカイン)が好まれる場合には、これらの差異により利点が提供されることが期待される。

【0204】

これらのフォーマットを評価するために、4Hマウス特異的PD-L1TxM(2C2)及び2Hマウス特異的PD-L1TxM(PDN3)を、抗マウスPD-L1scAb/IL-15N72D及び抗マウスPD-L1scAb-/IL-15R Su/Fc発現ベクター又はIL-15N72D及び抗マウスPD-L1scAb-/IL-15R Su/Fc発現ベクターをそれぞれ用いてCHO細胞をトランスフェクションすることによって生成した。それからトランスフェクションされたCHO細胞上清からプロテインAクロマトグラフィーによって該TxM複合体を精製し、精製されたタンパク質を低減したSDS-PAGEによって評価した(図9B)。可溶性抗マウスPD-L1scAb/huIL-15R Su/muIgG2A、抗マウスPD-L1scAb/IL-15N72D及びIL-15N72Dタンパク質と対応するバンドを、~60kDa、~40kDa及び~16kDaでそれぞれ観察した。さらに、精製した4H PD-L1TxM(2C2)及び2H PD-L1TxM(PDN3)複合体は、分析的サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって分析した際に、単独のタンパク質ピークとして移動した(図9C及び図9D)。これらの結果により、2つの異なるPD-L1TxM複

10

20

30

40

50

合体を産生でき、期待される構造特性を有する可溶性タンパク質として精製できることが示される。

【0205】

上記に記載の調査と同様に、これらの融合タンパク質複合体の、免疫細胞の IL - 2 R / 及び腫瘍細胞の PD - L1 と結合する能力を調査した。IL - 2 R / 陽性 32D 細胞を 4H PD - L1 TXM (2C2)、2H PD - L1 TXM (PDN3) 又は対照の ALT - 803 複合体でインキュベートした。洗浄段階に続いて、抗ヒト IL - 15 Ab - PE (又はイソタイプ対照 Ab) を添加し、フローサイトメトリーによって結合した TXM / ALT - 803 複合体を検出した。図 10A に示されるように、4H PD - L1 TXM (2C2)、2H PD - L1 TXM (PDN3) 及び ALT - 803 タンパク質は、対照と比較して 32D 細胞の能力がある。PD - L1、PD - L1 陽性 5T33P 骨髄腫細胞との結合を評価するために、Brilliant Violet 421 (BV421) で標識化した抗マウス PD - L1 Ab (10F.9G2) で初めに染色した。精製した 4H PD - L1 TXM (2C2) 及び 2H PD - L1 TXM (PDN3) 複合体の追加によってこの結合の特異性を試験し、PD - L1 リガンドと結合している BV421 抗体を阻害した (図 10B 及び図 10C)。精製した抗 mPD - L1 Ab (NJ16) を陽性対照として使用した。高い結合活性と一致して、1 μg の 4H PD - L1 TXM は 6 μg の 2H PD - L1 TXM と同じくらい、抗 PD - L1 Ab 染色を阻害するのに効果的であった。これらの結果により、4H PD - L1 及び 2H PD - L1 TXM 複合体が IL - 2 R / 及び PD - L1 標的結合能力を保有することが裏付けられた。

10
20

【0206】

上記に記載のように、マウス特異的 4H PD - L1 及び 2H PD - L1 TXM 複合体の IL - 15 免疫刺激性活性を、IL - 15 依存性 32D 細胞の増殖に基づいて決定した。図 11A 及び図 11B に示されるように、32D 細胞増殖における用量依存性増加は 4H PD - L1 及び 2H PD - L1 TXM 複合体のどちらかによって介在されており、これらの TXM フォーマットの免疫刺激性活性を立証する。2H PD - L1 TXM 複合体 (PDN - 3) は、ALT - 803 と比較すると IL - 15 生物活性においてわずかな減少を示す一方、4H PD - L1 TXM 複合体 (2C2) は IL - 15 生物活性において約 30 倍の減少を示す。このことは以前の結合ドメイン - IL - 15 N72D 融合タンパク質の低い IL - 15 活性と一致する。

30

【0207】

4H ヒト特異的 PD - L1 TXM 及び 2H ヒト特異的 PD - L1 TXM 複合体で同様の調査を行った。抗ヒト PD - L1 scAb / IL - 15 N72D 及び抗ヒト PD - L1 scAb - / IL - 15 R Su / Fc 発現ベクター又は IL - 15 N72D 及び抗ヒト PD - L1 scAb / IL - 15 R Su / Fc 発現ベクターで CHO 細胞をそれぞれトランスフェクションすることによりこれらのタンパク質を生成し、続いてプロテイン A クロマトグラフィーを介して細胞培養上清から精製した。低減した SDS - PAGE 分析により、精製した 4H ヒト特異的 PD - L1 TXM 及び 2H ヒト特異的 PD - L1 TXM 調製内に期待されたタンパク質バンドが裏付けられた (図 12A)。同様に、分析的 SEC により、精製した 4H ヒト特異的 PD - L1 TXM 及び 2H ヒト特異的 PD - L1 TXM 複合体が単独のタンパク質ピークとして移動することが示された (図 12B 及び図 12C)。

40

【0208】

これらの融合タンパク質複合体の、腫瘍細胞の PD - L1 と結合する能力を調査した。PD - L1 陽性 PC - 3 ヒト前立腺癌細胞を、10 nM の精製したヒト特異的 4H PD - L1 TXM、2H PD - L1 TXM 又は対照 2H 抗 CD20 scAb (2B8) TXM 複合体の存在下、又は非存在下で、APC で標識化した抗マウス PD - L1 Ab で染色した (図 13)。その結果により、ヒト特異的 4H PD - L1 及び 2H PD - L1 TXM 複合体が、ヒト腫瘍細胞と結合する抗 PD - L1 Ab を阻害する能力がある一方

50

、対照の T × M 複合体にはその能力がないことが示されている。以前の結果と一致して、4 H P D - L 1 T × M 複合体は 2 H P D - L 1 T × M 複合体よりよい結合活性を示した。これらの結果により、ヒト特異的 4 H P D - L 1 及び 2 H P D - L 1 T × M 複合体が、ヒト腫瘍細胞に関して P D - L 1 標的結合活性を保有することが裏付けられる。

【 0 2 0 9 】

上記に記載のように、ヒト特異的 4 H P D - L 1 及び 2 H P D - L 1 T × M 複合体の I L - 1 5 免疫刺激性活性を、I L - 1 5 依存性 3 2 D 細胞の増殖に基づいて決定した。図 1 4 A 及び図 1 4 B に示されるように、3 2 D 細胞増殖における用量依存性增加が、4 H P D - L 1 と 2 H P D - L 1 T × M 複合体のどちらかによって介在され、これらの T × M フォーマットの免疫刺激性活性を立証した。2 H P D - L 1 T × M 複合体が A L T - 8 0 3 と比較して I L - 1 5 生物活性においてわずかな減少を示す一方、4 H P D - L 1 T × M 複合体は A L T - 8 0 3 と比較して I L - 1 5 生物活性において約 5 倍の減少を示す。このことは以前の結合ドメイン - I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質の低い I L - 1 5 活性と一致する。

【 0 2 1 0 】

実施例 3：インビトロ及びインビボでの P D - L 1 T × M の免疫刺激性及び抗腫瘍活性 P D - L 1 T × M がインビボで免疫反応を刺激する能力をマウス内で評価した。C 5 7 B L / 6 マウスに 2 0 0 μ l の P B S、A L T - 8 0 3 (0 . 4 m g / k g、対照)、4 H マウス特異的 P D - L 1 T × M (2 0 0 μ g、2 C 2 (T 4 M - m P D - L 1)) 又は 2 H マウス特異的 P D - L 1 T × M (2 0 0 μ g、P D N 3 (T 2 M - m P D - L 1)) を皮下注射した。処置から 3 日後、脾臓及びリンパ節を採取した。抗 C D 4、C D 8、N K 及び C D 1 9 A b s を用いる免疫細胞サブセットの染色に続くフローサイトメトリーのために脾細胞及びリンパ球を調製した。図 1 5 A に示されるように、A L T - 8 0 3、2 H P D - L 1 T × M 及び 4 H P D - L 1 T × M での処置はこれらのタンパク質の免疫刺激性活性と一致して脾臓重量の増加を誘発した。特に、2 H P D - L 1 T × M 処置は、これらの複合体で観察される I L - 1 5 活性における差異と一致して、4 H P D - L 1 T × M と比較して脾臓重量における重大な増加を誘発した。2 H P D - L 1 T × M 及び 4 H P D - L 1 T × M での処置は、P B S 対照群と比較して、マウスの脾臓及びリンパ節における C D 8 T 細胞及び N K 細胞のパーセンテージの増加をまたもたらした（図 1 5 B 及び図 1 5 C）。これらの免疫反応はこれらの T × M 複合体の I L - 1 5 生物活性と一致している。

【 0 2 1 1 】

さらに、P D - L 1 T × M の、腫瘍細胞に対して細胞傷害性を刺激する能力をインビボで評価した。P D - L 1 陽性細胞を製造者の指示に従って C e l l T r a c e V i o 1 e t (Invitrogen) で標識化し、免疫エフェクター細胞（すなわち脾細胞）と、R 1 0 培地 (1 0 % のウシ胎児血清を有する R P M I - 1 6 4 0) において 1 0 : 1 のエフェクター : 5 T 3 3 P 骨髄腫標的の比率で、3 7 かつ 5 % の C O 2 内で培養した。P - m e 1 マウス脾細胞の刺激によって 3 日間、抗 C D 3 A b (2 C 1 1 : 4 μ g / m l) を用いてエフェクター細胞を調製した。腫瘍細胞及びエフェクター細胞を 4 日間、マウス特異的 P D - L 1 T × M でインキュベートし、それからフローサイトメトリーによって分析し、標的細胞の生存を決定した。P B S は陰性対照として機能し、A L T - 8 0 3 (I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R / F c)、抗 P D - L 1 A b 及び A L T - 8 0 3 + 抗 P D - L 1 A b は陽性対照として機能した。図 1 6 に示されるように、5 T 3 3 P 腫瘍細胞の有意な殺傷を、P B S 処置と比較して 2 . 1 μ g の P D - L 1 T × M を含む群において見出した。

【 0 2 1 2 】

同様にインビトロでの抗腫瘍活性を、ヒト特異的 2 H P D - L 1 T × M 及び 4 H P D - L 1 T × M 複合体を用いて評価した。2 人の異なるドナーからのヒト N K 細胞を、S temcell Technologies の N K 細胞単離キットを用いて血液バフィーコートから精製し、エフェクター細胞として使用した。P D - L 1 陽性ヒト脾臓腫瘍細胞 (S W 1 9 9 0) を

10

20

30

40

50

Cell trace - violetで標識化し、標的細胞として使用した。ヒトNK細胞及びSW1990腫瘍細胞を5:1のE:T比率で、培地単独又は50nMの抗ヒトPD-L1 Ab(対照)、ヒト特異的2H PD-L1 T×M複合体又は4H PD-L1 T×M複合体を含む培地で混合した。40時間後、標的細胞の死滅のパーセントを、violetで標識化した標的細胞のヨウ化プロピジウム染色に基づくフローサイトメトリーによって評価した。図17に示されるように、ヒト特異的2H PD-L1 T×M又は4H PD-L1 T×M複合体のどちらかでインキュベートしたヒトNK細胞は、未処置のNK細胞又は抗ヒトPD-L1 Ab(すなわち伝統的なADC)で処置されたNK細胞よりも、PD-L1陽性ヒト腫瘍細胞に対して重大な細胞傷害性を介在することができた。これらの結果は抗PD-L1 Absと比較してPD-L1 T×M複合体における免疫細胞介在性の標的化抗腫瘍活性の有意な改良を表している。

10

【0213】

同所性5T33P骨髄腫モデルを使用して、腫瘍を保有する動物におけるPD-L1 T×Mの有効性を評価した。メスのC57BL/6NHsdマウス(4匹のマウス/群)に5T33P骨髄腫細胞(1×10^7 /マウス)を0日目に静脈内注射した。低用量のPD-L1 T×M(0.11mg/kg、0.05mg/kgのALT-803に対するモル当量用量)又は高用量のPD-L1 T×M(52.5μg/用量、25μg/用量の抗PD-L1 Abに対するモル当量用量)を、それから7日目と14日に皮下投与した。ALT-803(0.15mg/kg)及びALT-803(0.05mg/kg)+抗PD-L1 Ab(25μg/用量)は陽性対照として機能し、PBSは陰性対照として機能した。生存(又は後肢麻痺による病的状態)を研究終点として観測した。明らかに、高用量のPD-L1 T×M(52.5μg/マウス)処置はPBS処置と比較して腫瘍を保有するマウスの生存を長引かせることが見出された(図18)。この効果は比較可能なALT-803+抗PD-L1 Abの組み合わせの治療で観察されたものと等しかった。腫瘍を保有する動物のPD-L1 T×M処置に続く明らかな毒性は観察されなかった。

20

【0214】

さらに、同所性MB491uc腫瘍を保有するマウスにおけるPD-L1 T×M複合体の抗腫瘍活性を評価した。C57BL/6NHsdマウス(6マウス/群)の膀胱に、MB491uc膀胱腫瘍細胞(3×10^4 /マウス)を0日目に膀胱内注入した。腫瘍を保有するマウスをマウス特異的2H PD-L1 T×M(2.8mg/kg)で7日目、11日目、14日目及び18日目に皮下で処置した。ALT-803処置(0.2mg/kg、subQ)及びALT-803(0.2mg/kg、subQ)+抗PD-L1 Ab(50μg/用量、subQ)が陽性対照として機能し、PBSが陰性対照として機能した。生存(又は病的状態)を研究終点として観測した。図19に示されるように、2H PD-L1 T×M処置がPBS処置と比較してMB491uc腫瘍を保有するマウスの生存を長引かせることを見出した。2H PD-L1 T×Mの抗腫瘍効果はALT-803及びALT-803+抗PD-L1 Ab陽性対照で観察されたものと同じくらい良いか、それより良かった。

30

【0215】

実施例4：抗CTLA4結合ドメイン(CTLA4 T×M)及び抗PD-1結合ドメイン(PD-1 T×M)を含むIL-15に基づく融合タンパク質複合体の生成

40

実施例1~3に記載された融合タンパク質複合体と同様に、CTLA4及びPD-L1を認識する結合ドメインを含む本発明の融合タンパク質を生成した。具体的には、一本鎖抗CTLA4抗体とhuIL-15N72D及びIL-15R Su/Fc鎖を結合する構築物を製造した。抗CTLA4一本鎖抗体(抗CTLA4scAb)配列はフレキシブルリンカー配列を介して結合した重鎖及び軽鎖V抗体ドメイン抗体のコーディング領域を含む。一本鎖抗体ドメインはVH-リンカー-VL又はVL-リンカー-VHフォーマットのどちらかに配置されていてもよい。一部の場合では、抗CTLA4scAbはIL-15N72D及び/又はIL-15R Su/Fc鎖のC末端と結合している。他の場合

50

では、抗 C T L A 4 は I L - 1 5 N 7 2 D 及び / 又は I L - 1 5 R S u / F c 鎮の N 末端と結合している。これらの構築物において、マウス又はヒト C T L A 4 分子のいずれかに特異的な抗 C T L A 4 s c A b s を使用した。

【 0 2 1 6 】

抗ヒト C T L A - 4 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号： 1 3 ）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTATCTCCCTGCTGTTCCCTGCTCCGCCTACAGC-

10

（抗ヒト C T L A - 4 s c A b ）

（ V L ）

ATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCTAGCGTGGAGACC GG GTGAC
CATCACCTGTCGGGCCTCCAGAGCATTCCAGCTACCTGAAC TG GT ACC AG CAG AA
GCC CGG CAAGG CCCC TAAG CTG CTG AT TT AC G CTG CC AG CAG CCTG CAG TCC CGG AGT
GCCT CCC AGG TT AG CGG CT CC GG AT CC GG ACC G AG TT CAC C CT G ACC AT CT C CTC
CCT GCAG CCC GAGG ACT CG CCAC CT ACT ACT GTC AG CAGG CCA AC AG CTT CCCCC
CAC CTT GG CC AAG GAAC CAAG GT GG AC AT CAAG AGG ACC GT GG CC

20

（ リンカ - ）

GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGC GG CTCCGGCGGCGGCTCC

（ V H ）

CTGGTGAGTCCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTG
CGAGGCCTCCGGCTACACCTCACCAACTACTACATCCACTGGCTGAGGCAGGCTCC
TGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGATCATCAACCCCTCCGGAGGGCTCCACCAACCT
ACGCCAGAGTTCCAGGGCAGGATCACCATGACAAGGGACACCTCCACCAACACC
CTGTACATGGA ACT GT CCT C C T C C G T C C G A G G A C A C C G C C A T C T A C T A C T G C G C C
AGGAGGGATTGCAGGGCCCTAGCTGCTACTTCGCTTACTGGGCCAGGGAACCAC
CGTGACCGTGT CCT C C G C C T C C A C C A A G G G C

30

（ ヒト I L - 1 5 R スシドメイン ）

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC

40

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGC GT GT GAACAAGGCCACGAATGT CG CCC ACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

（ ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン ）

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCAGCAGCACCTGA
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
 GCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【 0 2 1 7 】

ヒト C T L A - 4 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：14）：
 （シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS-

10

20

（抗ヒト C T L A - 4 s c A b ）
 （ V L ）

IVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLIYAASSLQSGVPPRF
 SGSGSGTEFTLTSSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGQGTKVDIKRTVA

30

（ リンカー ）
 GGGGGGGGGGGGGGG

（ V H ）
 LVQSGAEVKPGASVKVSCEASGYTFTNYYIHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTTYA
 QKFQGRITMTRDTSTNTLYMELSSLRSEDTAIYYCARRDCRGPSYCAYWGQGTTVTVS
 SASTKG

40

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）
 ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

（ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン）

50

EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 1 8 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 2 1 9 】

同様に、抗マウス C T L A - 4 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / m I g G 2 a 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：15）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGTAACCTTATTCCCTCTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC

（抗マウス C T L A - 4 s c A b ）

（ V L ）

GACATCATGATGACCCAGTCCCCCTCCCTCCGTGAGCGCTGGCGAGAAGGCT
 ACCATCAGCTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGTTAACAGCAACGCCAAGACCAACTAC
 CTGAACCTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCTATTACGCT
 AGCACCAAGGCATAACCGCGTGCCGACAGGTTAGGGGATCCGGCAGCGGCACCGA
 CTTCACCCCTGACCATCTCCAGCGTGAGGACGAGGACCTCGCTTCTACTACTGCCA
 GCAATGGTACGATTACCCCTACACCTTCGGCGCTGGCACCAAGGTGGAGATTAAGA
 GG

（ リンカー ）

GGCGGAGGCGGATCCGGCGGCCGGCTCCGGCGGAGGCTCC

（ V H ）

CAGATTCAAGCTGCAGGAGTCCGGCCCTGGACTGGTCAACCCCTAGCCAGTCCCTGAGC
 CTGTCCTGTTCCGTACAGGCTATAGCATACCCAGCGGCTACGGCTGGAACTGGATC
 AGGCAGTTCCCGGCCAGAAAGTGGAGTGGATGGCTTCATCTACTACGAGGGCTC
 CACCTACTATAACCCCTCCATCAAGTCCGGATCAGCATACCAAGGGATACCTCCAA

GAACCAGTTCTCCTGCAAGTCAACTCCGTGACCACCGAAGACACCGCCACCTACTA
 CTGCGCCAGGCAGACAGGCTACTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCG
 TCAGCAGCGCC

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）

10

20

30

40

50

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(マウス IgG2a CH2 - CH3ドメイン)
GAACCAAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAA
CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTA
10 ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
GATGTCCAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAACAAAGACC
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
CAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTACGTGGAGTGGACCAACA
ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
TAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAG
20 CTTCTCCCGGACTCCAGGTAAATAA

【0220】

抗マウス CTLA-4 scAb / huIL-15R Su / mIgG2a 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：16）：
30 (シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS-

(抗マウス CTLA-4 scAb)
(VL)

DIMMTQSPSSLSVSAGEKATISCKSSQSLFNSNAKTNYLNWYLQKPGQSPKLLIYYASTR
HTGPVPDRFRGSGSGTDFTLTISSVQDEDLAFYYCQQWYDYPYTFGAGTKVEIKR

(リンカー)
GGGGSGGGGSGGGGS

(VH)
QIQLQESGPGLVNPSQSLSLCSVVTGYSITSGYGNWIRQFPQKVEWMGFIYYEGSTY
YNPSIKSRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDTATYYCARQTGYFDYWQQGTMVTVSSA-

(ヒトIL-15R スシドメイン)

10

20

30

40

50

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(マウス I g G 2 a C H 2 - C H 3 ドメイン)
EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMIISPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPPPEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFRTPGK

10

【0221】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0222】

上記に示されるように、抗ヒト及びマウス CTLA4 scAb ドメインを IL-15 N72D タンパク質との融合としてまた生成した。

【0223】

同様に、抗ヒト PD1 scAb / IL-15 N72D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列及び終止コドンを含む）は以下の通りである（配列番号：17）：

20

（シグナルペプチド）

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCCTGTTCTGTCCGTGACCAACCGGTGTCCACTCC

（抗ヒト PD1 scAb）

（VL）

CTGCCTGTGCTGACTCAACCACCCCTGGTGTCTGAAGTCCCCGGCAGAGGGTCACC
ATTTCCTGTTCTGGAGGCATCTCCAACATCGGAAGCAATGCTGTAAACTGGTACCAAG
CACTTCCCAGGAAAGGCTCCAAACTCCTCATCTATTATAATGATCTGCTGCCCTCA
GGGGTCTCTGACCGATTCTCTGCCCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC

30

AGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAA
TCTGAGTGCTTATGTCTCGCAACTGGACCAAGGTCACCGTCCTGAGT

（リンカー）

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

40

（ VH ）

50

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAA
 GGTCTCCTGCAAGGCTCTGGTTACACCTTACCAAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCG
 ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATCAGCGCTACAATGGTA
 ACACAAACTATGCACAGAACGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCC
 ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA
 TTACTGTGCGAGAGGGTTACCGGTGACGAGGACTACTGGGCCAGGAAACCTGG
 TCACCGTGAGCTCA

10

(ヒトIL-15N72D)

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAAT
 CTATGCATATTGATGCTACTTTATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAG
 TAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAG
 ATGCAAGTATTGATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGT
 CTTCTAATGGGAATGTAACAGAAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAA
 AAAAATATTAAAGAATTTGCAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTTCATCAAC
 ACTTCTTAA

20

【0224】

抗PD-L1 scAb - IL-15N72D融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：18）：

(シグナルペプチド)

MEWSWVFLFFLSVTGVHS-

30

(抗ヒトPD-1 scAb)

(VL)

LPVLTQPPSVSEVPQQRVTISCSGGISNIGSNAVNWYQHFPGKAPKLLIYYNDLLPSGVSD
 RFSASKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDNL SAYVFATGTKVTVLS

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(VL)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
 TNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCARGLYGDEDYWGQQTLVT
 VSS

40

(ヒトIL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
 DTVENLJILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

50

【0225】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。上記に示されるように、抗ヒトPD-L1 scAbドメインをhuIL-15R Su/Fc構築物の融合としてまた生成した。

【0226】

実施例1及び以前(米国特許第8,507,222号の実施例1及び2、参照によって本明細書に組み込まれる)に記載のように、該配列を発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターをCHO細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、同じ又は異なる(すなわち抗PD-L1及び抗CTLA4 scAb)結合ドメインを有するhuIL-15N72D及びhuIL-15R Su/Fc融合タンパク質の両方をコードするベクターで該CHO細胞をトランスフェクションした。該融合タンパク質複合体を、CHO細胞培養上清からプロテインA親和性クロマトグラフィーを用いて上記に記載のように精製した。

10

【0227】

上記に記載の抗ヒトPD-L1 scAb / 抗ヒトCTLA-4 scAb TxM複合体に加えて、抗PD-L1 scAb / 抗ヒトCTLA-4 scAb TxM複合体を、抗ヒトPD-L1 scAb / IL-15N72D(配列番号:1)及び抗ヒトCTLA-4 scAb / huIL-15R Su/huIgG1 Fc(配列番号:15)構築物を含む発現ベクターでCHO細胞を共トランスフェクションすることによって生成した。これらの融合タンパク質複合体を、CHO細胞培養上清からプロテインA親和性クロマトグラフィーを用いて上記に記載のように精製した。

20

【0228】

実施例5:他の結合ドメインを含むIL-15に基づく融合タンパク質複合体の生成
実施例1~4に記載の融合タンパク質複合体と同様に、CD47、GITR、ssDN A及び他の疾患関連標的(すなわちCD20、CD19等)を認識する結合ドメインを含む、本発明の融合タンパク質複合体を生成した。

【0229】

CD47は、マクロファージの抑制性受容体として機能するシグナル調節タンパク質(SIRP)と関与することによって免疫回避を促進する細胞表面分子である。この「私を食べないで(don't eat me)シグナル」は、CD47及びSIRPの相互作用を阻害することによって中断せざることがあり、それゆえにマクロファージによる抗体依存性細胞食作用(ADCP)を回復させる。本発明のIL-15ドメインはNK細胞及びCD8⁺細胞を活性化させ拡大させる一方、それらの細胞傷害性活性を増加させる。十分に高い濃度で、本発明のFc領域はNK細胞及びマクロファージのFc受容体と、それぞれADCC又はADCPに相互作用してもよい。この例により、CD47/SIRP経路、IL-15ドメインを通じたNK細胞及びCD8⁺細胞の活性化を阻害し、Fc介在性ADCC/ADCPを介した腫瘍のクリアランスを許容するナノボディのVh領域(NbVh; PNAS 2016 113(19) E2646-E2654)を含む融合タンパク質複合体の生成及び初めの特性化が記載される。下記に詳細に記載のように、抗マウスCD47 NbVh / huIL-15N72D及び抗マウスCD47 NbVh / huIL-15R Su/mIgG2a Fcを含むタンパク質複合体を生成した。

30

【0230】

具体的には、抗マウスCD47 NbVhをhuIL-15N72D鎖と結合させる構築物を製造した。該抗マウスCD47 NbVh配列はアルパカナノボディの重鎖可変ドメインのコーディング領域を含む。該抗マウスCD47 NbVhはhuIL-15N72DのN末端と結合している。huIL-15N72DのN末端と結合した抗マウスCD47 NbVhを含む構築物の核酸配列及びタンパク質配列を下記に示した。

40

【0231】

抗マウスCD47 NbVh / huIL-15N72D構築物の核酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は以下の通りである(配列番号:19):

50

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTTCCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ナノボディの抗マウス CD47 Vh鎖)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGGAGCCTGGAGGAATCCCTGAG
GCTGTCCTGTGCCGCCAGCGGCATCATCTTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCG
GCAGGCCCCCTGGCAAAGGAGGGAGTGGGTGGCCGCTTCCACAGGGAGGCGATGAG
GCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTACCACATCTCCAGGGACGCCAAGAA
CTCCGTGTTCTGCAGATGAACCTCCCTGAAGGCCAGGATACCGCCGTGTACTACTG
CACCGCCGTGATCTCCACCGATAAGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGCC
AGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC

10

(ヒトIL-15N72D)

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGAATTGAAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACCTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTGATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAACAGGATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTGTCAGAGTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTC
TTAA

20

【0232】

抗マウスCD47 NbVh / IL-15N72D融合タンパク質のアミノ酸配列(シグナルペプチド配列を含む)は以下の通りである(配列番号:20):

30

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ナノボディの抗マウスCD47 Vh鎖)

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAI
YRDSVKDRFTISRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTEWRRYWGQQTQ
VTVSSGG

40

(ヒトIL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLJILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0233】

抗マウスCD47 NbVh / huIL-15R Su / mIgG2a Fc構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号:21):

50

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTTCCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ナノボディの抗マウス C D 4 7 V h 鎖)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGGAGCCTGGAGGGATCCCTGAG
 GCTGTCCTGTGCCGCCAGCGGCATCATCTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCG
 GCAGGCCCTGGCAAAAGGAGGGAGTGGGTGGCGCTTCCACAGGAGGGATGAG
 GCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTACCATCTCCAGGGACGCCAAGAA
 CTCCGTGTTCCCTGCAGATGAACCTCCCTGAAGCCCAGGGATACCGCCGTGTACTACTG
 CACCGCCGTGATCTCCACCGATAGGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGCC
 AGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC 10

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA 20

(マウス I g G 2 a C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

GAACCAAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAA
 CCTCTGGGTGGACCATCCGTCTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG
 ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
 GATGTCCAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
 AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
 GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC
 TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
 CAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
 GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACA
 ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
 TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
 TAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCAACACGACTAAGAG
 CTTCTCCGGACTCCAGGTAAA 30

【 0 2 3 4 】

抗マウス C D 4 7 N b V h / h u I L - 1 5 R S u / m I g G 2 a F c 融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号: 2 2):

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ナノボディの抗マウス C D 4 7 V h 鎖)

10

20

30

40

50

QVQLVESGGGLVEPGSSLRLSCAASGIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAI
 YRDSVKDRFTISRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTEWRYYWGQGTQ
 VTVSSGG

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

10

(マウス Ig G 2 a C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)
 EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
 WFVNNVEVHTAQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
 TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
 NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFRTGK

【 0 2 3 5 】

上記に示されるように、一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

20

【 0 2 3 6 】

ヒト C D 4 7 に特異的な抗体に由来する一本鎖抗体ドメインを用いて、同様の構築物を生成した。抗ヒト C D 4 7 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号： 2 3 ）：

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(抗ヒト C D 4 7 s c A b)

(V L)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTCCGCCATGAGCGCTCCGTGGCGACAGGGTG
 ACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCCTGGTCCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGTGCCAAGCACCTGATCTACAGGGCTAACAGGCTGGTGTCCGG
 CGTGCCTTCCAGGTTTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCTGACCATCTCC
 AGCCTGCAGCCCGAGGACTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTTCCCC
 TACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

30

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

40

(V H)

50

CAGATGCAGCTGGTACAGTCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAA
 GGTGCTCTGCAAGGCCTCCGGCTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACTGGGTGAG
 GCAGGCCCTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGCTGGATCGACCCGACAACGGCG
 ACACCGAGTACGCCAGAAGTCCAGGACAGGGTACCATCACCAGGGACAGGTCC
 ATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTAC
 TACTGCAACGCCGCTACGGCTCCTCCTACCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC
 ACCACCGTGACCGTG

10

(ヒトIL-15N72D)
 AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCAGTTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACCTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTCTATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTCAGAGTTGTACATATTGTCAAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

20

【0237】

抗ヒトCD47 scAb / huIL-15N72D融合タンパク質のアミノ酸配列（
 シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：24）：
 （シグナルペプチド）
 MKWVTFISLLFLFSSAYS

(抗ヒトCD47 scAb)
 (VL)
 NIQMTQSPSAMSASVGDRVITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVP
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKEIK

30

(リンカー)
 GGGGSGGGGSGGGGS

(VH)
 QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNG
 DTEYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSYPMDYWGQQ
 TTVTV

40

(ヒトIL-15N72D)
 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESDASIH
 DTVENLJILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0238】

50

抗ヒト C D 4 7 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：25）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（抗ヒト C D 4 7 s c A b ）

（V L ）

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCGCCATGAGCGCTTCCGTGGCGACAGGGTG
 ACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCCCTGGTCCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGTGCCAAGCACCTGATCTACAGGGCTAACAGGGCTGGTGTCCGG
 CGTGCCTTCCAGGTTTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCC TGACCATCTCC
 AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTTCCCC
 TACACCTCGCGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

10

（リンカー）

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

（V H ）

20

CAGATGCAGCTGGTACAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAA
 GGTGTCCCTGCAAGGCCTCCGGCTTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACGGTGAG
 GCAGGCCCCCTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGCTGGATCGACCCCGACAACGGCG
 ACACCGAGTACGCCCCAGAAGTCCAGGACAGGGTGACCATCACCAAGGGACAGGTCC
 ATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTAC
 TACTGCAACGCCGCCTACGGCTCCTCCTACCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC
 ACCACCGTGACCGTG

30

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）

ATCACGTGTCCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

40

（ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン）

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCATGAT
 CTCCCAGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【 0 2 3 9 】

抗ヒト C D 4 7 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：26）：
 （シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（抗ヒト C D 4 7 s c A b ）
 （ V L ）

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVP
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK

（ リンカー ）
 GGOGSGGGGSGGGGS

（ V H ）
 QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNG
 DTEYAQKFQDRVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYCCNAAYGSSSYPMDYWGQG
 TTIVTV

（ ヒト I L - 1 5 R スシドメイン ）
 ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

（ ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン ）

10

20

30

40

50

EPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0240】

G I T R リガンドと G I T R 間の相互作用が免疫細胞に刺激性シグナルを提供することが知られており、それゆえに G I T R リガンド (G I T R L) が I L - 1 5 の免疫刺激性活性と潜在的に協力して作用することができる免疫アゴニスト分子であることが知られている。それゆえに、ヒト G I T R L と h u I L - 1 5 N 7 2 D 鎌を結合する構築物を製造した。

10

【0241】

ヒト G I T R L / h u I L - 1 5 N 7 2 D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：27）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（ヒト G I T R L ）

ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGAT
 GGCCCTCCTCCGAGCCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCGACTGGAAGCTGGAGATCCT
 GCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGCCAGGTGGCCCCAACGCCAACTACAACG
 ACGTGGCCCCCTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAAAGGACATGATCCAGACCCTG
 ACCAACAAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGCGA
 CACCATCGACCTGATCTCAACTCCGAGCACCAAGGTGCTGAAGAACACACCTACTG
 GGGCATC

20

（ヒト I L - 1 5 N 7 2 D ）

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTGATGATACTGAGTAGAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAACCTGGATGCAAAGAACATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTCAGAGTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

30

40

【0242】

ヒト G I T R L / I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：28）：

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（ヒト G I T R L ）

50

TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDV
APFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVEGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGI

(ヒト I L - 1 5 N 7 2 D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【 0 2 4 3 】

ヒト G I T R L / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リード配列を含む）は以下の通りである（配列番号：29）：

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(ヒト G I T R L)

ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGAT
GGCCTCCTCCGAGCCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCGACTGGAAGCTGGAGATCCT
GCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGTGGCCCCAACGCCAACTACAACG
ACGTGGCCCCCTTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAGGACATGATCCAGACCCCTG
ACCAACAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGCGA

CACCATCGACCTGATCTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGAACAAACACCTACTG
GGGCATC

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

10

20

30

40

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGA
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGTC
 GCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACACTACACGCAGAACAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【0244】

ヒトGTRL/huIL-15R_{Su}/hIgG1Fc融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：30）：
 （シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（ヒトGTRL）
 TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDV
 APFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDIDLIFNSEHQVLKNNTYWGI

（ヒトIL-15Rスシドメイン）
 ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVVAHWTPS
 LKCIR

（ヒトIgG1 CH2-CH3(Fc)ドメイン）
 EPKSCDKHTCPGCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
 NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0245】

疾患細胞によって発現される抗原を標的化する結合ドメインを含む本発明の融合タンパク質複合体を生成することがまた可能である。かかる抗原は腫瘍細胞を含む疾患細胞によって放出された一本鎖DNA(ssDNA)を含むことができる。それゆえに、本発明の融合タンパク質複合体を、ssDNAを認識する一本鎖Abドメインを用いて生成した(Hu51-4抗体からのTNTscAb)。

【0246】

10

20

30

40

50

T N T s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：31）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（T N T s c A b）

（V L）

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCTGTCCTGGCGAGAGGGCT
ACCCCTGTCCTGCAGGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACGGTACCAAGCAG
AAACCTGGCCAGGGCCCCCAGGCTGCTGATCTACTACGCCCTCCCAGTCCATCTCCGGC
ATCCCTGACAGGTTCAAGCGGATCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCC
AGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACTCCTGGCCT
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

10

（リンカー）

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

（V H）

20

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCGGAGCCTCCGTGAA
GGTGTCCCTGCAAGGCCTCCGGTACACCTTCACCAAGGTACTGGATGCCACTGGGTGAG

GCAGGGCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGCGCCATCTACCCGGCAACTCCG
ACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCC
ACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCTAGGGCGAGGAGATCGCGTGAGGAGGTGGTTCGCCACTGGGGACA
GGGCACCCCTGGTACCGTGTCCAGC

30

（ヒトIL-15N72D）

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATACGGAAAGTGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTCTTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTGATGATACTGAGTAAAGATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAA
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACGGAGGAA
ATATTAAAGAATTTCAGAGTTGTACATATTGTCCTAAATGTTCATCAACACTTC
TTAA

40

【0247】

T N T s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：32）：

（シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

50

(T N T s c A b)
(V L)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSISNYLHWYQQKPGQAPRLIYYASQSISGIPDRF
SGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQNSWPLTFQGTKVEIKR

(リンカー)
GGGGSGGGGSGGGS

(V H)
EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSD
TSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEELGVRRWFAYWGQGT
LTVSS

(ヒト I L - 1 5 N 7 2 D)
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLQVISLESGDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【 0 2 4 8 】
T N T / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：33）：
(シグナルペプチド)
ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(T N T s c A b)
(V L)
GAGATCGTGCACCCAGTCCCTGCTACCCCTGCTCCCTGCTCCCTGGCGAGAGGGCT
ACCCCTGCTGCAGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACTGGTACCAGCAG
AAACCTGGCCAGGCCAGGCTGCTGATCTACTACGCCTCCCAGTCCATCTCCGGC
ATCCCTGACAGGTTCAGCGGATCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCC
AGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCT
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

(リンカー)
GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT
(V H)

10

20

30

40

50

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCCGGAGCCTCCGTGAA
 GGTGTCTGCAAGGCCTCCGGTACACCTTCAACCAGGTACTGGATGCACGGTGAG
 GCAGGCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATCTACCCCGAACCTCG
 ACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCC
 ACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTAC
 TACTGCGCTAGGGCGAGGAGATCGGCGTGAGGAGGTGGTCGCCTACTGGGACA
 GGGCACCCCTGGTACCGTGTCCAGC

10

(ヒトIL-15Rスシドメイン)
 ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒトイgG1CH2-CH3(Fc)ドメイン)
 GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCAGCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAAAG
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGTCCT
 GCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGAGC
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

20

30

【0249】
 TNT scAb/huIL-15R Su/hIgG1 Fc融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：34）：
 （シグナルペプチド）
 MKWVTFISLLFLFSSAYS

40

(TNT scAb)
 (VL)

50

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSISGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNWPLTFQGQTKVEIKR

(リンカー)

GGGGSGGGGGSGGGGS

(V H)

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSD
TSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEELGVRRWFAYWGQGT
LTVSS

10

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPS
LKCIR

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVTLPPIDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【 0 2 5 0 】

疾患細胞によって発現される他の抗原を標的化する結合ドメインを含む本発明の融合タンパク質複合体をまた生成することができる。かかる抗原は腫瘍細胞を含む疾患細胞に発現した組織因子若しくは C D 3 3 、又は免疫細胞に発現したチェックポイント阻害剤を含むことができる。

30

【 0 2 5 1 】

組織因子 (T F) は複数の腫瘍細胞型で過剰発現することが報告されている膜貫通糖タンパク質である。重要なことに、増加した T F 発現は、高められた転移の可能性に繋がるがん細胞のシグナリング、腫瘍細胞の移動及び減少したアポトーシスと関係している。それゆえに、 T F の標的化はこのタンパク質を過剰発現する腫瘍細胞型に対する免疫療法戦略において有益であることがある。キメラ抗組織因子抗体 (A L T - 8 0 3) がかつて生成され、臨床的に試験してきた。この抗体のヒト化された可変鎖 (h O A T) がまた特性化された。それゆえに、ヒト組織因子を認識する一本鎖 A b ドメイン (h O A T s c A b) を有する本発明の融合タンパク質複合体を生成した。

40

【 0 2 5 2 】

h O A T s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 構築物の核酸配列 (リーダー配列を含む) は以下の通りである (配列番号 : 3 5) :

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(h O A T s c A b)

(V L)

50

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTGCTTCCCTGTCCGCTTCCGTGGCGACAGGGTG
 ACCATCACCTGCCTGGCCTCCCAGACCATCGACACCTGGCTGGCTGGTACCTGCAG
 AAGCCCGGAAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACGCCGCTACCAACCTGGCCGACGG
 CGTGCCTAGCAGGTTTCCGGCTCCGGCACCGACTTCTCCTTCACCATCTCC

TCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCTCCCCC
 TTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG 10

(リンカー)
 GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

(V H)
 CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGGAAGTAAAAAGCCCGGCCAGCGTGAG
 GGTGTCCCTGTAAGGCCTCCGGCTACTCCTCACCGACTACAACGTGTACTGGTGAG
 GCAGTCCCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCCTACAACGGCA
 TCACCATCTACGACCAGAACTCAAGGGCAAGGCCACCCGTGACCGTGGACAAGTCC
 ACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCCCTGGACTTCTGGGGACAGGGCACCCGTGTAC
 TTCTGCCAGGGACGTGACCACCGCTCTGGACTTCTGGGGACAGGGCACCCGT
 GACCGTGAGCTCC 20

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)
 ATCACGTGTCCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA 30

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCAGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAACCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCCTGCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAA

10

【0253】

20

h O A T s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：36）：
 （シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(h O A T s c A b)
 (V L)

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLIYAA
 TNLADGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDFATYYCQQVYSSPFTFGQGTKLEIK

30

（リンカー）
 GGGGGGGGGGGGGGGGG

(V H)
 QIQLVQSGGEVKPGASVRVSCKASGYSFTDYNVYWVRQSPGKGLEWIGYIDPYNGITI
 YDQNFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYPCARDVTTALDFWGQGTTVTVSS

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）
 ITCPPPMsVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

40

（ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン）

50

EPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDLGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 5 4 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 2 5 5 】

h O A T s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質を発現する、同様の構築物をまた生成することができる。

【 0 2 5 6 】

実施例 1 及び以前（米国特許第 8 , 5 0 7 , 2 2 2 号の実施例 1 及び 2 、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように、発現ベクターに該配列をクローニングし、該発現ベクターを C H O 細胞にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有する h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質の両方をコードするベクターを用いて該 C H O 細胞をトランスフェクションした。上記に記載のように、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーを用いて C H O 細胞培養上清から融合タンパク質複合体を精製した。

【 0 2 5 7 】

本発明の融合タンパク質複合体を、 C D 3 3 を認識する一本鎖 A b ドメイン（ C D 3 3 s c A b ）を用いてまた生成した。 C D 3 3 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D 構築物の核酸配列（シグナルペプチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号： 3 7 ）：

（シグナルペプチド）

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAACATCAGTGCTTCAGTCATAATGT
 CAAGAGGA

（ C D 3 3 s c A b ）

（ V L ）

CAGGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGCTCTCCGTGAA
 AGTTAGCTGCAAAGCGTCTGGTTACACCTCACCGACTACAACATGCACTGGTCCG
 CCAGGCCAGGCCAGGGTCTGGAATGGATCGTTATTTACCCGTACAACGGTGG
 CACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCCAAGCTACCATCACTGCGGACGAAAGCA
 CCAACACCGCATATATGGAATTGTCTCTCGTAGCGAAGATAACCGCGGTTACT
 ATTGCGCTCGTGGTCGTCCAGCGATGGATTACTGGGTCAGGGCACCTGGTGACCG
 TGAGCTCT

（ リンカー ）

GGCGGAGGC GGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGC GGAAAGC

（ V H ）

10

20

30

40

50

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGCGACCGCGTG
 ACTATCACCTGCCGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTCCTTATGAAC
 TGGTTCCAGCAGAAACCAGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGATTATGCCGCCTCAAC
 CAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGTTTCCGGCAGCGGTTGGGGACCGATTCACT
 CTGACCATTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCT
 AAAGAAGTTCCGTGGACCTCGGTCAAGGTACCAAAGTTGAAATTAAA

(ヒト IL - 15N72D)

10

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACA

GCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTICATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTITGCAGAGTTGTACATATTGTCCAATGTTCATCAACACTTC
 TTAA

20

【0258】

C D 3 3 s c A b / I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペ
 プチド配列を含む）は以下の通りである（配列番号：38）：

(シグナルペプチド)

MDFQVQIISFLLISASVIMSRG

(C D 3 3 s c A b)

(V L)

30

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGG
 TGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQQTLVTVS
 S

(リンカー)

GGGGSGGGSGGGGS

(V H)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASESVNDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFQGQTKVEIK

40

(ヒト IL - 15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASH
 DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【0259】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

50

【0260】

C D 3 3 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：39）：
 （シグナルペプチド）

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGT
 CAAGAGGA

(C D 3 3 s c A b)
 (V L)

CAGGTGCAGCTGGTTAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGCTCTTCCGTGAA
 AGTTAGCTGCAAAGCGTCTGGTTATACCTTCACCGACTACAACATGCACTGGTCCG
 CCAGGCCCGAGGCCAGGGTCTGGAATGGATCGGTTATATTACCCGTACAACGGTGG
 CACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCAAAGCTACCATCACTGCGGACGAAAGCA
 CCAACACCGCATATATGGAATTGTCTCTGCGTAGCGAAGATAACCGCGGTTACT
 ATTGCGCTCGTGGTCGTCCAGCGATGGATTACTGGGTCAGGGCACCTGGTGACCG
 TGAGCTCT

10

(リンカー)
 GGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGAAGC

20

(V H)
 GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGCGACCGCGTG
 ACTATCACCTGCCGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTCCCTTATGAAC
 TGGTTCCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGATTATGCGGCTCTAAC
 CAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGCTTTCCGGCAGCGGTTGGGACCGATTCACT
 CTGACCATTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCT
 AAAGAAGTTCCGTGGACCTCGGTCAAGGTACCAAAGTTGAAATTAAA

30

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)
 ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

40

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)
 GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT

50

GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCTGCCCTGCCCTATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【 0 2 6 1 】

C D 3 3 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：40）：
 （シグナルペプチド）
 MDFQVQIISFLLISASVIMSRG

(C D 3 3 s c A b)
 (V L)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFIDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGG
 TGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWQGTLVTVS
 S

（ リンカー ）
 GGGGSGGGGGGGGGGS

(V H)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYASNQGS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPDDFATYYCQQSKKEVPWTFGQGTKVEIK

（ ヒト I L - 1 5 R スシドメイン ）
 ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

（ ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン ）
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
 NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 6 2 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 2 6 3 】

10

20

30

40

50

該配列を実施例 1 及び以前（米国特許第 8,507,222 号の実施例 1 及び 2、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターを CHO 細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有する huIL-15N72D 及び huIL-15R-Su/Fc 融合タンパク質の両方をコードするベクターで該 CHO 細胞をトランスフェクションした。該融合タンパク質複合体を CHO 細胞培養上清から上記に記載のようにプロテイン A 親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。

【0264】

細胞間接着分子 1 (ICAM-1) はイムノグロブリン上科の細胞表面糖タンパク質である。細胞表面上の ICAM-1 タンパク質発現のレベルが、多様な充実性腫瘍の転移能と正に相関していることが明らかにされた。リンパ球機能と関連した抗原 1 (LFA-1) はすべての T 細胞及び B 細胞、マクロファージ、好中球並びに NK 細胞上に見いだせる。これが ICAM-1 と、具体的にはその「IDメイン」を通じて結合し、細胞間接着（免疫学的 / 細胞傷害性シナプス形成）又はローリング（管外遊出に先立って血流中の細胞の動作を遅くすること）を維持することができる。そのため、腫瘍を標的化し、huIL-15N72D : huIL-15R-Su 複合体を介してエフェクター免疫分子の活性化及び局在化を容易にするために、変異体を有する LFA-1 IDメインを含む TxM を創出した。

【0265】

ヒト LFA-1 IDメイン (K287C / K294C) / huIL-15R-Su / huIgG1 Fc 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：41）：

（シグナルペプチド）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

（ヒト LFA-1 IDメイン (K287C / K294C)）

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTC
CGATTTAGTGTCTGTTGACGGCTCCATGTCTTACAGCCCGATGAGTTCCAGAAG
ATTAGACTTCATGAAGGACGTGATGAAGAAACTGTCCAACACCAGCTACCAAGTTC

GCTGCCGTGCAGTTCTCACCTCCTACAAGACCGAGTTGACTTCTCCGACTACGTG
AAGCGGAAGGACCCCGATGCTTACTGAAGCACGTCAAGCACATGCTGCTGCTCAC
CAACACCTTGCGCCATCAAACACTACGTGGCCACCGAGGTGTTCTGAGGAACTGGG
AGCTCGGCCGATGCCACCAAGGTGCTGATTATCATACCGACGGCGAAGGCCACCG
ATAGCGGAAACATCGATGCCGCCAAGGACATCATCCGGTACATTATCGGCATCGGC
AAGCACTTCCAGACCAAGGAGAGCCAAGAGACTTACACAAGTTCGCCCTCCAAGCC
CGCTTCCGAGTTGCTGCAAGACACCTTCGAGTGTAAAGGATTATTTACC
GAGCTGCAGAAGAAGATCTACGTGATTGAGGGCACCAGCAAGCAAGATCTGACCTC
CTTCAACATGGAGCTGTCCAGCAGCGGCATTCCGCTGATTTATCTCGTGGCCACGC
C

（ヒト IL-15R スシドメイン）

10

20

30

40

50

ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト Ig G1 CH2 - CH3 (Fc) ドメイン)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAAC
CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAACCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACACTACACGCAGAACAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

10

20

30

【0266】

成熟ヒトLFA-1 イドメイン (K287C / K294C) / huIL-15R_S
u / huIgG1 Fc 融合タンパク質のアミノ酸配列 (リーダー配列を含む) は以下の通りである (配列番号 : 42) :
(シグナルペプチド)
MKWVTFISLLFLFSSAYS

(ヒトLFA-1 イドメイン (K287C / K294C))
DLVFLFDGSMSLQPDEFQKILDGMKDVKKLSNTSYQFAAVQFSTS YKTEFDFSDYVKR
KDPDALLKHVKHMLLTNTFGAINYVATEVFREELGARP DATKVLIITDGEATDSGNID
AAKDIIRYIIGIGKHFQT KESQETLHKFASKPASEFVCILDTECLKDLFTELQKKIYVIEGT
SKQDLTSFNME LSSSGISADLSRGHA

40

(ヒトIL-15R スシドメイン)
ITCPPPM SVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LK CIR

(ヒトIgG1 CH2 - CH3 (Fc) ドメイン)

50

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPQDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTQPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREGQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0267】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0268】

ヒトLFA-1 イドメイン (K287C / K294C) / huIL-15N72D 融合タンパク質を発現する、同様の構築物を生成することができる。 10

【0269】

実施例1及び以前(米国特許第8,507,222号の実施例1及び2、参照によって本明細書に組み込まれる)に記載のように該配列を発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターをCHO細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有するhuIL-15N72D及びhuIL-15R Su/Fc融合タンパク質の両方をコードするベクターで該CHO細胞をトランスフェクションした。該融合タンパク質複合体を、プロテインA親和性クロマトグラフィーを用いて該CHO細胞培養上清から精製した。 20

【0270】

例えば、CHO細胞をhuIL-15N72D発現ベクターでトランスフェクションした。細胞をヒトLFA-1 イドメイン (K287C / K294C) / huIL-15R Su / huIgG1 Fc構築物)を発現するベクターでまたトランスフェクションした。CHO細胞内の2つの構築物の共発現により、可溶性huIL-15N72D : ヒトLFA-1 イドメイン (K287C / K294C) / huIL-15R Su / huIgG1 Fc複合体 (2 * hLFA1 / TxMと称する)の形成と分泌を可能にした。

【0271】

Notch 1はI型膜貫通タンパク質群の構成員であり、複数の上皮細胞成長因子様(EGF)リピートからなる細胞外ドメインを含む構造的特性を共有している。その過剰発現は、いくつかの腫瘍型において、免疫療法のための魅力的な標的になる。デルタ様タンパク質4(DLL4)はNotch 1のいくつかのリガンドであり、高親和性を有することが示されている。それゆえに、DLL4の細胞外ドメイン(27~529位)を、TxM複合体の創出においてNotch 1の標的化に使用した。 30

【0272】

hDLL4 / huIL-15R Su / huIgG1 Fc構築物の核酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号: 43)：
 (シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(hDLL4)

40

20

30

40

50

AGCGGGCGTGTCCAGCTGCAGCTGCAAGAGTTATCAACGAGAGGGGGCGTGCTGGC
 TTCCGGTCGTCTTGTGAGCCCCGGTTGTAGGACCTTTCCGGGTGTGTTAAAGCAT
 TTTCAAGCTGTGGTGTCCCCCGGACCTTGTACCTTCGGCACCGTGTCCACCCCCGTT
 TGGGCACCAACTCCTCGCCGTTCGTACGACAGCTCCGGAGGAGGTGTAATCCTT
 TACAGCTGCCTTCAACTTAACTTGGCCCGCACCTTCTCCCTCATCATCGAAGCTTG
 GCATGCCCGGTGACGATCTGGCCCGAACGCTCTGCCCGATGCTTAATCAG
 CAAGATTGCCATTCAAGGTTCTTAGCCGTGGGCCAGAACTGGCTGCTGGACGAGCA
 GACCAGCACACTCACTCGTCTGAGGTACTCCTATCGTGTATCGCAGCGACAACTA
 CTACGGCGACAATTGCAGCCGGCTGTGCAAGAAGAGGAACGACCAACTCGGCCATT
 ACGTCTGCCAGCCCACGGCAATTATCTTGTCTGCCCGTTGGACCGGGAGTACT
 GTCAGCAGCCCACCGTGTGAGGTACTGCAACGAGCAGAACGGCTACTGCAGCAAG
 CCCGCTGAGTGTCTGTGAGGTACTGCAACGAGCAGAACGGCTACTGCAGCAAG
 CCCCACAATGGCTGTCGGCACGGCACTTGTCCACCCCTGGCAGTGCACTTGTGAC
 GAGGGCTGGGAGGTTATTCTGCGACCAAGATCTGAACACTGCACCCACCAACAG
 CCCTGTAAAGAACGGAGCTACTTGTCCAACAGCGGCCAGAGGTCTACACTGTAC

TTGTAGGCCCGTTACACCGCGTCGACTGCGAAGTGGAACTGAGCGAATGCGATA
 GCAACCCCTTGTGTAACGGCGGCAGCTGCAAGGACCAAGAACGGCTACCAACTGT
 TTATGCCCTCCGGATACTACGGTTACACTGCGAGCACTCCACACTGTCTTGTGCC
 GACTCCCCITGTTCAACGGCGGAAGCTGTCGTGAGAGGAACCAAGGTGCCAACTA
 CGCTTGTGAGTGCCCTCCAACTTCACCGGCTCCAAGTGTAAATAGGGGCCCTCCCG
 TTGACCTCCAACCCCTGCGCCAACGGCGGCCAGTGTAAATAGGGGCCCTCCCG
 GATGTGTCGTTGTCGTCCGGTTTACCGGCACCTACTGCGAGCTGCACGTCAGCGA
 TTGCGCCCGGAATCCTTGCCTCACGGCGGAACCTGTACGATTAGAGAACGGTT
 AATGTGCACCTGTCCTGGATTCAAGCGGTGAGGTGTGAGGTGAGGACCTCCAT
 CGACGCTTGTGCCAGCAGCCCTGCTCAATCGGCCACTGTACACCGATTATCC
 ACCGACACCTTGTGCAACTGCCCTACGGCTTGTGGATCTGTCGAGTT
 CCCGTTGGCCTGCCTCCTAGCTTCCCTGG

(ヒト I L - 15 R スシドメイン)

ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGA
 GCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAG
 CGGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGCGCCAC
 TGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト IgG1 CH2 - CH3 (Fc) ドメイン)

10

20

30

40

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCAGTGCAGCACCTGA
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCAGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【 0 2 7 3 】

成熟 h D L L 4 / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：44）：
 （シグナルペプチド）

MKWVTFISLLFLFSSAYS

（ h D L L 4 ）

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLT
 NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQG
 SLAVGQNWLDEQTSTLTRLRYSYRVCISDNYYGDNCNSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGN
 LSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTC
 STPWQCTCDEGWGGLFCDDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDC
 ELELSECDSNPCRNNGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRER
 NQGANAYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNSPCANGGQCLNRGSRMCRCRPGFTGYCE
 LHVSDCARNPCAHHGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFN RATCYT
 DLSTDFTVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSF

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
 LKCIR

（ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン）

10

20

30

40

50

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0274】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【0275】

h D L L 4 ドメイン / h u I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質を発現する、同様の構築物を生成することができる。

10

【0276】

実施例 1 及び以前（米国特許第 8,507,222 号の実施例 1 及び 2、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように該配列を発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターを C H O 細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有する h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質の両方をコードするベクターで該 C H O 細胞をトランスフェクションした。上記に記載のように、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーを用いて該融合タンパク質複合体を C H O 細胞培養上清から精製した。

20

【0277】

例えば、C H O 細胞内の h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h D L L 4 / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 発現ベクターの共発現によって、可溶性 T x M 複合体（2 * h D L L 4 / T x M と称する）の形成と分泌を可能にした。

【0278】

T 細胞イムノグロブリン及びムチンドメイン含有 - 3 (T i m - 3) は、I F N - 產生 C D 4 + T ヘルパー 1 (T h 1) 及び C D 8 + T 細胞傷害性 1 (T c 1) T 細胞に見出される免疫チェックポイントである。それゆえに、がんの免疫療法にとって魅力的な標的である。それゆえに、本発明の融合タンパク質複合体を、ヒト T i m - 3 を認識する一本鎖 A b ドメイン (h a T I M 3 s c F v) を用いて生成した。

30

【0279】

h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：45）：

（シグナルペプチド）

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTTCCTGTCAGTAACCACCGGTGTCCACTCC

（ h a T I M 3 s c F v : V L - リンカー - V H s c F v ）

（ V L ）

TCCTATGTGCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACC
ATCTCCTGCAGTGAAACCAGCAGTGACGTTGGTAATAAACTATGTCTCCTGGTAC
CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTATGATGTCAGTAATCGGCC
CTCAGGGGTTCTACTCGCTTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAC
CAGCAGTACTTATGTCTCGAACCTGGACCAAGCTGACCGTCCTGGGCAGCAA
AGGCG

40

（リンカー）

50

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

(V H)

CTGGTGAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCC

TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAACCTAACAGTGGTGGCACAAACT
ATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACA
GCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG
AGAGAGATGTATTACTATGGTTCGGGTACAACACTGGTTCGACCCCTGGGCCAGGG
AACCTGGTCACCGTGAGCTCA

10

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

20

(ヒト Ig G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCAACCGTGCCAGCACCTGAAC
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCC GG ACCC CTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCTATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCA
GACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

30

40

【 0 2 8 0 】

h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：46）：

（シグナルペプチド）

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

（ h a T I M 3 s c F v : V L - リンカー - V H s c F v ）

50

(V L)

SYVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGNNNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDDEADYYCSSYTTSTYVFGTGTKLTVLGQPKA

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(V H)

10

LVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNSGGTN
YAQKEQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAREMYYYGSGYNWFDPWGQG
TLVTVSS

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVVAHWTPS
LKCIR

20

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 8 1 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

30

【 0 2 8 2 】

h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質を発現する、同様の構築物を生成することができる。

【 0 2 8 3 】

実施例 1 及び以前（米国特許第 8,507,222 号の実施例 1 及び 2、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように該配列を発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターを C H O 細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有する h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質の両方をコードするベクターで該 C H O 細胞をトランスフェクションした。上記に記載のように、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーを用いて該融合タンパク質複合体を該 C H O 細胞培養上清から精製した。

40

【 0 2 8 4 】

例えば、h u I L - 1 5 N 7 2 D 発現ベクターで C H O 細胞をトランスフェクションした。細胞を h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 構築物を発現するベクターでまたトランスフェクションした。C H O 細胞内の 2 つの構築物の共発現により、可溶性 h u I L - 1 5 N 7 2 D : h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体（2 * h a T I M 3 / T x M と称する）の形成と分泌を可能にした。

【 0 2 8 5 】

腫瘍標的化分子に加えて、ウイルス感染した細胞を検出して、それに反した行動を取る

50

T × M 複合体を創出することができる。極めて強力な、広く中和する H I V 特異的モノクローナル抗体 (b N A b s) の近年の発見により、強力な治療剤の新しい種類が提供される。中和抗体が H I V エンベロープ (E n v) を標的化し、インビボでのウイルス複製を効率的に抑圧できることが以前から知られている。この A b 介在性の抑圧を、潜在的ウイルス複製を目覚めさせ、活性化したエフェクター細胞で (I L - 1 5 刺激を介して) 毒傷する「キック・アンド・キル」アプローチと組み合わせるために、b N A b s の一本鎖抗体ドメイン (s c F v s) を含む T × M 複合体を產生した。b N A b s N 6 、 2 G 1 2 、 V R C 0 7 及び 1 0 - 1 0 7 4 に由来する 4 つの異なる抗 H I V T × M の創出及び特性化を下記に記載した。

【 0 2 8 6 】

10

N 6 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 構築物の核酸配列 (リー

ダーア配列を含む) は以下の通りである (配列番号 : 4 7) :

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(N 6 s c F v : V L - リンカー - V H s c F v)

(V L)

TACATCCACGTGACCCAGTCCCCCTCCTCTTAAGCGTGAGCATCGGAGATCGTGTG
ACCATCAACTGCCAGACCTCCCAAGGTGTGGCTCCGATTACACTGGTACCAGCAC
AAGCCCCGGTCGGGCCCCAAGCTGCTGATCCACCAACACCAGCTCCGTGGAGGATGG
CGTGCCTCTCGTTCTCCGGCTCCGGCTTCCATACCTCCTCAATTAAACCATCAGC
GATTACAAGCTGACGACATGCCACCTACTACTGCCAAGTTCTCCAGTTCTCGGC
CGGGGCTCTCGTCTGCATATCAAG

20

(リンカー)

GGAGGCGGCGGATCCGGCGGAGGCAGCGCGGAGGCAG

30

(V H)

CGTGCTCATCTGGTGCAGAGCGGAACCGCCATGAAGAAGCCCGGTGCTAGCGTGCG
GGTGTCTTGTCAAGACCAGCGGATACACCTTCACCGCCCACATTATTCTGGTTTCTG
CAAGCTCCGGTGTGGACTGGAATGGGTGGCTGGATCAAGCCCCAGTATGGCGC

CGTGAACCTTGGCGGCGGCTTICGTGATCGGGTACTTAACTCGTGACGTGTATCG
GGAGATCGCCTACATGGACATTAGGGGTTAAAGCCCGACGATAACGCCGTGTACT
ACTGCGCTCGTGTGATCGTCTACGGCGATAGCAGCTGGCTTAGATGCTGGGGCC
AAGGTACCACAGTGTGGTCCGCC

40

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

50

ATCACGTGTCCTCCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGGCCGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト Ig G1 CH2 - CH3 (Fc) ドメイン)
GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAAC
CCTGGGGGGACCGTCAGTCCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCTATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

10

20

30

【0287】

2G12scFv / huIL-15R Su / huIgG1 Fc 構築物の核酸配列（
リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：48）：

(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(2G12 scFv : VL - リンカー - VH scFv)

(VL)

GTGGTGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCGTCCGCTTCCGTGGCGACACCATCACC
ATCACCTGCAGGGCCTCCCAGTCCATCGAGACCTGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAA
GCCCGGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCTCCACCCCTGAAGACCGGGCG
TGCCTCCAGGTTTCCGGATCCGGCTCCGGACCGAGTTCACCTGACCATCAGCG
GCCTGCAGTTGACGACTTCGCCACCTACCAACTGCCAGCACTACGCCGGTACTCCG
CCACCTTGGACAGGGACCCAGGGTGGAGATCAAG

40

(リンカー)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

(VH)

50

GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGAGGCGGCCTGGTGAAGACTGGCGGAAGCCTGAT
 CCTGAGCTGCCGTGTCCAACCTCAGGATCTCCGCCACACCATGAACTGGGTGAG
 GAGGGTGCCTGGAGGAGGACTGGAGTGGGTGGCCAGCATCTCACCTCCTCCACCT
 ACAGGGACTACGCCGACGCCGTGAAGGGCAGGTTCACCGTGAGCAGGGACGACCTG
 GAGGACTTCGTGTACCTGCAGATGCACAAGATGCGGGTGGAGGACACCGCCATCTA
 CTACTGCGCCAGGAAGGGCTCCGACAGGCTGTCCGACAACGACCCCTTGACGCCT
 GGGGCCCTGGAACCGTGGTACAGTGTCCCCC

10

(ヒトIL-15Rスシドメイン)
 ATCACGTGTCCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒトIgG1CH2-CH3(Fc)ドメイン)
 GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCT
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCAGCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGCCTCACCGCCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA

20

30

ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACGCAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

【0288】
 VRC07(523)scFv/huIL-15R Su/huIgG1 Fc構築物
 の核酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号:49):
 (シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(VRC07(523)scFv: VL - リンカー - VH scFv)
 (VL)

40

50

TCCTCCCTGACCCAGAGCCCCGGAACACTCTCCCTCTCCCCCGGTGAGACCGCTATC
 ATCTCTTGTAGGACCAGGCCAGTACGGCTCTTAGCTTGGTATCAACAGAGGCCGGC
 CAAGCTCCTAGGCTGGTCATTTACAGCGGCAGCACAAAGGGCCGCCGGCATCCCCGA
 TAGGTTCTCCGGCTCCCGTGGGGCCCCGATTACAATTAAACAATCTCCAATTAGA
 GTCCGGAGACTTCGGCGTCTACTACTGCCAGCAGTACGAGTTCTCGGCCAAGGTAC
 CAAAGTGCAAGTTGATATCAAG

10

(リンカー)

GGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCCGGATCCGGCGGAGGAGGATCC

(V H)

CAAGTTAGGCTGTCCCAGAGCGGAGGCCAGATGAAGAACGCCGGTACTCCATGCG
 GATCAGCTGTCGTGCCAGCGGCTACGAGTTCACTCAACTGCCCATCAACTGGATTCG
 TCTGGCCCCCGTAAGCGGCCCGAATGGATGGCTGGATGAAACCTCGTCACGGCG
 CTGTGTCTACGCTCGTCAGCTGCAAGGTGACCATGACTCGTACATGTACA 20
 GCGAGACCGCCTTTAGAGCTGAGGTCTTAACCTCCGACGACACCGCTGTGTACT
 TCTGCACCCGGGGCAAGTACTGCACCGCTCGGACTACTACAACACTGGACTTCGAG
 CACTGGGGCCAAGGTACACCCGTGACAGTGTCTCC

20

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACCGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC

30

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

40

50

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAAC
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTCCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACAGCACGTACCGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCTGCCCTGCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCA
GACCTGCCTGGCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
CGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0 2 8 9]

10 - 1074 sc Fv/huIL-15R Su/huIgG1 Fc 構築物の核酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：50）：
(シグナルペプチド)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTTCTCCAGGGCTACTCC

(1 0 - 1 0 7 4 s c F v : V L - リンカ - V H s c F v)
(V L)

TCCAGCTACGTGAGGCCTCTCCGTGGCTCTGGCGAAACAGCTCGTATCAGCTGC
GGCGTCAAGCTCTGGATCTCGTGCAGTGGTACCAGCACCGGCCGGTCAA
GCTCCCATTACTGATCTACAACAACCAAGATCGGCCCTCCGGCATCCCCGAAAGG
TTTAGCGGCACCCCCGATATCAACTTCGGCACAAGGGCCACTTAACCATTAGCGGA
GTGGAGGCCGGCAGCAGGGCCGACTACTACTGCCACATGTGGGACTCCCGGTCCGG
CTTTCTGGAGCTTGGCGCGCTACTCGTCTGACAGTGCTG

(リンカー)

GGCGGAGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGAGGAGGCGGATCC

(VII)

CAAGTTCAGCTGCAAGAATCCGGACCCGGTTAGTGAAGGCCAGCGAGACTTTAAG
 CGTGACTTGTAGCGTGAGCGCGACAGCATGAACAACTACTACTGGACTGGATTG
 TCAGAGCCCCGTAAGGGTTAGAGTGGATCGGCTACATCTCCGACCGGGAGTCCG
 CCACCTACAACCCCTTTAAACTCCC GGTTGATCTCTCGTACACACCTCCAAGA
 ACCAGCTGTCTTAAAGCTGAACCTCGTGACCCCCGCTGACACCGCCGTACTACT
 GCGCTACCGCTAGGCAGGGCCAGAGGATCTACGGCGTGGTGAAGCTTCGGCGAGTTC
 TTCTACTACTACAGCATGGACGTGTGGCAAAGGCACCACCGTGACCGTGTCTCC

10

(ヒトIL-15Rスシドメイン)
 ATCACGTGTCCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTGTAACCTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGC GTTTGAACAAAGGCCACGAATGTCGCCACTGGAC
 AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(ヒトIgG1CH2-CH3(Fc)ドメイン)
 GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCAACCGTGCCAGCACCTGAAC
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
 CTCCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACACGACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 CAGGTGTACACCCTGCCCTCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGGCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAA
 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

20

30

【0290】

成熟N6scFv/huIL-15Rsu/huIgG1Fc融合タンパク質のアミノ酸配列(リーダー配列を含む)は以下の通りである(配列番号:51):

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(N6 scFv: VL-リンカー-VH scFv)
 (VL)

YIHVTQSPSSLSVSIGDRV TINCQTSQGVGSDLHWYQHKPGRAPKLLIHHTSSVEDGVPS
 RFSGSGFHTSFNL TISDLQADDIATYYCQLQFFGRGSRLHIK

40

50

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(V H)

RAHLVQSGTAMKKPGASVRVSCQTSGYTFTHILFWFRQAPGRGLEWVGWIKPQYGA
VNFGGGFRDRVTLTRDVYREIAYMDIRGLKPDDTAVYYCARDRSYGDSSWALDAWGQ
GTTVWSA

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

10

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【 0 2 9 1 】

成熟 2 G 1 2 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：52）：

(シグナルペプチド)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(2 G 1 2 s c F v : V L - リンカー - V H s c F v)

(V L)

VVMTQSPTLSASVGDTITITCRASQSIETWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLKTGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISGLQFDDFATYHCQHYAGYSATPGQGTRVEIK

30

(リンカー)

GGGGSGGGGSGGGGS

(V H)

EVQLVESGGGLVKAGGSLILSCGVSNFRISAHTMNWVRRVPGGLEWVASISTSSTYRD
YADAVKGRFTVSRDDLEDVYLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSDNDPFDAWGP
TVVTVSP

40

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

50

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 2 9 2 】

成熟 V R C 0 7 (5 2 3) s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：5 3）：

（シグナルペプチド）
 MKWVTFISLLFLFSSAYS

(V R C 0 7 (5 2 3) s c F v : V L - リンカー - V H s c F v)
 (V L)

SSLTQSPGTLSSLSPGETAIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGS
 RWGPDYNLTISNLGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIK

10

（リンカー）

GGGGSGGGGGGGGGGS

（ V H ）

QVRLSQSGQMKPGDSMRISCRASGYEFINCPINWIRLAPGKRPEWMGWMKPRHGAV
 SYARQLQGRVTMTRDMYSETAFLELRSLTSDDTAVYFCTRGKYCTARDYYNWDFEHW
 GQGTPVTVSS

20

（ヒト I L - 1 5 R スシドメイン）

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVVAHWTTPS
 LKCIR

30

（ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン）

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【 0 2 9 3 】

成熟 1 0 - 1 0 7 4 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のアミノ酸配列（リーダー配列を含む）は以下の通りである（配列番号：5 4）：

（シグナルペプチド）
 MKWVTFISLLFLFSSAYS

(1 0 - 1 0 7 4) s c F v : V L - リンカー - V H s c F v)

50

(V L)

SSYVRPLSVALGETARISCGRQALGSRAVQWYQHRPGQAPIILLIYNNQDRPSGIPERFSG
TPDINFGRATLTISGVEAGDEADYYCHMWDSRSGFWSFGGATRLTVL

(リンカー)

GGGGSGGGGGSGGGGS

(V H)

QVQLQESGPGLVKPSETLSVTCSVSGDSMNNYYWTWIRQSPGKGLEWIGYISDRESATY
NPSLNSRVVISRDTSKNQLSLKLNSVTPADTAVYYCATARRGQRIYGVVSEEFFYYYS
MDVWGKGTTVTVSS

10

(ヒト I L - 1 5 R スシドメイン)

ITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

20

(ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 (F c) ドメイン)

EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

【 0 2 9 4 】

一部の場合では、該リーダーペプチドが成熟ポリペプチドから開裂される。

【 0 2 9 5 】

30

上記に記載の b N A b s c F v / h u I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質を発現する
、同様の構築物を生成することができる。

【 0 2 9 6 】

実施例 1 及び以前（米国特許第 8 , 5 0 7 , 2 2 2 号の実施例 1 及び 2 、参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように該配列を発現ベクター内にクローニングし、該発現ベクターを C H O 細胞内にトランスフェクションした。一部の場合では、本発明と同じ又は異なる結合ドメインを有する h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質の両方をコードするベクターで該 C H O 細胞をトランスフェクションした。上記に記載のように、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーを用いて該融合タンパク質複合体を C H O 細胞培養上清から精製した。

40

【 0 2 9 7 】

例えば、 C H O 細胞内の h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び N 6 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 発現ベクターの共発現によって、 2 * h N 6 / T x M と称する可溶性 T x M 複合体の形成と分泌を可能にした。 C H O 細胞内の h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び 2 G 1 2 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 発現ベクターの共発現によって、 2 * h 2 G 1 2 / T x M と称する可溶性 T x M 複合体の形成と分泌を可能にした。 C H O 細胞内の h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び V R C 0 7 (5 2 3) s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 発現ベクターの共発現によって、 2 * h V R C 0 7 (5 2 3) / T x M と称する可溶性 T x M 複合体の形成と分泌を可能にした。 C H O 細胞内の h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び 1 0 - 1 0 7 4 s c F v / h u I L - 1 5 R

50

Su/hu IgG1 Fc 発現ベクターの共発現によって、2* h10 - 1074/TxM と称する可溶性 TxM 複合体の形成と分泌を可能にした。

【0298】

上記に示されるように、プロテインAクロマトグラフィー又は他の分離法（すなわちイオン交換、疎水性及び/又はサイズ排除クロマトグラフィー、並びに濾過方法）によって該 TxM 複合体を CHO 細胞上清から精製することができる。さらに、精製したタンパク質はゲル、クロマトグラフィー及び他の分析方法によって特性化することができる。例えば、図 20 は 2 の scAb 若しくは結合ドメイン（すなわち二頭（2H）の IL-15N72D : 抗 PD-L1 scAb / IL-15R Su/Fc 複合体）又は 4 の scAb 若しくは結合ドメイン（すなわち四頭（4H）の抗 PD-L1 scAb / IL-15N72D : 抗 PD-L1 scAb / IL-15R Su/Fc 複合体）又は異なる標的化ドメインの組み合わせ（すなわち腫瘍標的化ドメイン / 抗 PDL1 scAb TxM 複合体）を含む多様な TxM 複合体のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示している。SEC クロマトグラフは、プロテインAで精製した TxM タンパク質が初めは IL-15N72D : IL-15R Su/Fc 複合体と一致した移動パターンを有する大きなタンパク質ピークに含まれることを示している。

【0299】

scAb 又は結合ドメインを含む類似の TxM 構築物を、他の CD 抗原、サイトカイン又はケモカイン受容体又はリガンド、成長因子受容体又はリガンド、細胞間接着分子、MHC/MHC 様分子、Fc 受容体、Toll 様受容体、NK 受容体、TCRs、BCRs、陽性/陰性共刺激性受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、ウイルスにコードされる又はバクテリアにコードされる抗原、及びバクテリアに特異的な抗原配列を用いて容易に生成することができる。特に関心を引くのは、CD4、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD51、CD52、CD70、CD74、CD80、CD123、CD152、CD147、CD221、EGFR、HER-2/neu、HER-1、HER-3、HER-4、CEA、OX40 リガンド、cMet、組織因子、ネクチン4、PSA、PSMA、EGFL7、FGFR、IL-6 受容体、IGF-1 受容体、GD2、CA-125、EpCam、死受容体5、MUC1、VEGFR1、VEGFR2、PDGFR、Trail R2、葉酸受容体、アンジオポイエチン2、alpha betaine 3 インテグリン受容体、HLA-DR 抗原及び本明細書に記載の他の疾患標的の抗原に対して疾患特異的に結合するドメイン（例えば scAbs）を有する TxM である。HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV、RSV 及び他のウイルスに由来するウイルス抗原に対する抗体ドメイン、特に HIV エンベロープスパイク及び/又は gp 210 及び gp 41 エピトープを認識するものが、また関心を引くものである。当該分野で知られている配列から、又は当該分野で知られている多様な源（すなわち脊椎動物の宿主又は細胞、組み合わせライブラリー、ランダム合成ライブラリー、コンピューターモデリング等）から単離されたデノボから、かかる抗体ドメインを生成することができる。

【0300】

実施例 6：他の TxM の活性の特性化

CTL A-4 陽性免疫細胞を用いて CTL A-4 TxM の結合活性を評価した。マウス特異的 CTL A-4 TxM の調査において、マウスのリンパ球における CTL A-4 の発現は、まず抗 CD3 Ab (2C11, 4 μg/ml) によって 4 日間にわたり誘発された。PE 抗マウス CTL A-4 抗体（クローン UC10-4B9）又は PE アルミニアンハムスター IgG アイソトープ対照での染色によって CTL A-4 発現を評価した。図 21A に示されるように、フローサイトメトリー分析によりマウス CTL A-4 が著しく誘発されたことが明らかになった。マウス特異的 CTL A-4 TxM (100 μl 上清) の添加により、陽性対照抗 m CTL A-4 抗体（クローン HB304）を行ったように、抗マウス CTL A-4 抗体結合を阻害することができた。ヒト特異的 CTL A-4 TxM の調査のために、ヒト PBMC 中の CTL A-4 の発現が抗 CD3 Ab (OKT3)

10

20

30

40

50

3 : 4 μ g / mL) によって 3 日間にわたり誘発された。それから PE 抗ヒト CTLA-4 抗体 (クローニ BN13、Biolegend) 又は PE マウス IgG2a、アイソタイプ対照で細胞を染色した。上記に記載の結果と一致して、ヒト特異的 CTLA-4 TxM (CL-8-100 μ L) はヒト免疫細胞の表面上の CTLA-4 を阻害することができた (図 21B)。これらの結果は CTLA-4 TxM 複合体の特異性を明らかにしている。

【0301】

同様に、PD-L1 陽性 5T33 黒色腫腫瘍細胞 (実施例 2 に記載の方法による) 及び CTLA-4 陽性免疫細胞上のマウス特異的 PD-L1 / CTLA-4 TxM 複合体の結合活性を評価した。図 22A 及び図 22B に示されるように、PD-L1 / CTLA-4 TxM (上清) は細胞表面上に発現した PD-L1 及び CTLA-4 両方との結合を阻害することができた。このことは複数特異的な TxM 複合体が、結合した結合ドメインの各々の反応性を保持することをまた示している。

10

【0302】

CD47 陽性細胞を用いて CD47 TxM 構築物の直接結合を評価した。図 23A 及び図 23B に示されるように、マウス及びヒトに特異的な CD47 TxM 複合体はマウス B16 F10 黒色腫及びヒト Jurkat T 細胞をそれぞれ染色することができた。これらの結果は、これらの複合体が CD47 結合活性を保持していることを示している。

【0303】

一本鎖 DNA ELISA 方法 (ALPCO ssDNA ELISA キット 35-SS SHU-E01) を、TNT scAb ドメインを含む TxM 複合体の結合を評価するために使用した。簡潔には、TNT scAb ドメインを含む精製した TxM タンパク質を逐次希釈し、100 μ L をヒト組み換え一本鎖 DNA でコーティングされた ELISA ウエルに追加した。30 分のインキュベーション後、該ウェルを洗浄し、100 μ L の HRP 抗ヒト IgG 抗体を添加した。さらなるインキュベーション及び洗浄段階後、結合した TxM タンパク質を TMB 基質で検出した。ウェルの吸収度は 450 nM と読めた。図 24A 及び図 24B に示したように、TNT scAb TxM 及び TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM 複合体は、潜在的に TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM 内の 2H TNT scAb と比較して TNT scAb TxM 内の 4H TNT scAb の高い結合活性のために、TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM (10279 pM) のものと比較して低い Kd (188 pM) を有する TNT scAb TxM と一本鎖 DNA を結合することができた。

20

【0304】

TNT scAb TxM 複合体の腫瘍細胞と結合する能力を、該細胞を固定し透過させることで腫瘍細胞の DNA をさらして、また評価した。初めの調査では、MB231 乳癌細胞を 1.5 % のパラホルムアルデヒドでまず固定し、0.1 % のサポニンで透過し、それから 10⁵ の細胞 (10⁶ 細胞 / mL) を 30 分間にわたり室温で、0.01 ~ 100 nM の TNT scAb TxM、TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM 又は 2H 抗ヒト PD-L1 scAb TxM (陰性対照) でインキュベートした。該細胞を洗浄し、抗ヒト IgG Fc - APC で染色し、それからフローサイトメトリーで分析した。図 25A は、異なる TxM 濃度での MB231 細胞染色の平均蛍光強度 (MFI) を示しており、透過した乳腫瘍細胞との TNT scAb TxM 及び TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM の特異的及び濃度依存性の結合を裏付けている。最小の結合は陰性対照の PD-L1 scAb TxM 複合体に見られ、MB231 細胞株上の PD-L1 の低いレベルの発現と一致した。固定し透過した PD-L1 陰性 A549 ヒト肺腫瘍細胞で類似の調査を行った。再度、その結果 (図 25B) により、透過した肺腫瘍細胞との TNT scAb TxM 及び TNT scAb / 抗ヒト PD-L1 scAb TxM の特異的かつ濃度依存性の結合が裏付けられた。

40

【0305】

さらに、hOAT scAb 及び / 又は抗ヒト PD-L1 scAb ドメインを含む TxM 複合体の、腫瘍細胞と結合する能力を評価した。SW1990 ヒト肺癌細胞株は高いレ

50

ベルのヒト T F 及び低いレベルの P D - L 1 を発現する。この調査では、 10^5 の S W 1 9 9 0 細胞 (10^6 細胞 / mL) を 30 分間にわたり室温で、0.01 ~ 100 nM の二頭 (h 2) の h O A T s c A b / T x M 、抗ヒト P D - L 1 s c A b / h O A T s c A b / T x M 、 h 2 * 抗ヒト P D - L 1 s c A b / T x M 又は対照の h O A T A b 又は対照の抗ヒト P D - L 1 A b (アベルマブ) とインキュベートした。該細胞を洗浄し、抗ヒト I g G F c - A P C で染色し、それからフローサイトメトリーで分析した。図 2 6 は、異なるタンパク質濃度での S W 1 9 9 0 細胞染色の平均蛍光強度 (M F I) を示している。その結果、h O A T s c A b (h 2 * h O A T s c A b / T x M 及び抗ヒト P D - L 1 s c A b / h O A T s c A b / T x M) を含む T x M 複合体が、対照の h O A T A b と類似した高いレベルの、S W 1 9 9 0 腫瘍細胞上のヒト T F の染色を示すことが裏付けられた。抗ヒト P D - L 1 s c A b (h 2 * 抗ヒト P D - L 1 s c A b / T x M) を含む T x M 複合体は、対照の抗ヒト P D - L 1 A b (アベルマブ) と類似して、S W 1 9 9 0 腫瘍細胞上のヒト P D - L 1 の低いレベルの染色を示す。

【 0 3 0 6 】

E L I S A に基づく方法を使用して、h u I L - 1 5 N 7 2 D : ヒト L F A - 1 I ドメイン (K 2 8 7 C / K 2 9 4 C) / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体の形成を裏付けた。h u I L - 1 5 N 7 2 D 及びヒト L F A - 1 I ドメイン (K 2 8 7 C / K 2 9 4 C) / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 発現ベクターで共トランスクレクションした C H O 細胞からの培養上清内の結合活性を評価した。図 2 7 A では、捕捉抗体、抗ヒト I L - 1 5 抗体 (R & D Systems) 及び検出抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を有する h u I L 1 5 / h u I g G 1 に特異的な E L I S A を用いて融合タンパク質複合体を検出した。この結合を、トランスクレクションされなかった C H O 細胞を含む培地の上清のみを用いて対照サンプルと比較した。その結果により、2 * h L F A 1 / T x M の産生及び適切な複合体の形成が示されている。

【 0 3 0 7 】

その上、I C A M - 1 との 2 * h L F A 1 / T x M 結合を E L I S A で評価した (図 2 7 B)。イムノプレートのウェルを $1 \mu g$ のヒト I C A M - 1 - F c (Biolegend) でコーティングした。洗浄段階後、2 * h L F A 1 / T x M を含む C H O 培養上清を該細胞に添加した。インキュベーション及びさらなる洗浄段階後、H R P 共役抗ヒト I L - 1 5 抗体 (R & D Systems) を用いて融合タンパク質複合体の結合を検出した。A B T S のインキュベーション後にウェルの吸収度は 405 nm と読めた。図 2 7 B の結果により、この複合体が I C A M - 1 を認識することが示される。

【 0 3 0 8 】

類似の E L I S A に基づく方法により、トランスクレクションされた C H O 細胞培養上清内の h u I L - 1 5 N 7 2 D : h D L L 4 / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体の形成が裏付けられた。図 2 8 では、捕捉抗体、抗ヒト I L - 1 5 抗体 (R & D Systems) 及び検出抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を有する h u I L 1 5 / h u I g G 1 に特異的な E L I S A を用いて、培養上清内の融合タンパク質複合体を検出した。トランスクレクションされなかった C H O 細胞を含む培地の上清のみを用いて、該サンプルを対照サンプルと比較した。その結果により、2 * h D L L 4 / T x M 複合体の産生及び適切な複合体形成が示される。

【 0 3 0 9 】

E L I S A に基づく方法により、h u I L - 1 5 N 7 2 D : h a T I M 3 s c F v / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体の形成がまた裏付けられた。図 2 9 では、捕捉抗体、抗ヒト I L - 1 5 抗体 (R & D Systems) 及び検出抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を有する h u I L 1 5 / h u I g G 1 に特異的な E L I S A を用いて、トランスクレクションされた C H O 培養上清内の融合タンパク質複合体を検出した。トランスクレクションされなかった C H O 細胞を含む培地の上清のみを用いて、この結合を対照サンプルと比較した。その結果により、2 * h a T I M 3 / T x M 複合体の産生及び適切な複合体形成が示される。

10

20

30

40

50

【0310】

b N A b s c F v T × M 発現ベクターで共トランスフェクションした C H O 細胞からの上清を使用して、該 T × M 複合体の発現及び結合能力を決定した。E L I S A に基づく方法により、b N A b s c F v T × M 複合体の形成が裏付けられた。図 30 A 及び図 30 B では、捕捉抗体、抗ヒト I L - 15 抗体 (R&D Systems) 及び検出抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を有する h u I L 15 / h u I g G 1 に特異的な E L I S A を用いて、トランスフェクションされた C H O 培養上清内の融合タンパク質複合体を検出した。陽性対照の T × M は h C D 20 を認識するものの 1 つである。その結果により、4 つの異なる b N A b s c F v T × M 複合体の産生及び適した複合体形成が示される。

10

【0311】

その上、H I V タンパク質標的 (g p 120 (S F 162 . L S) 及び g p 140 (S F 162 . L S)) との b N A b s c F v T × M 結合を E L I S A で評価した。この調査のために、イムノプレートのウェルを 0.1 μg の H I V g p 120 (S F 162 . L S) 又は g p 140 (S F 162 . L S) (ProtTech, Inc.) でコーティングした。洗浄段階後、b N A b s c F v T × M を含む C H O 培養上清を該細胞に添加した。陰性対照の T × M は h C D 20 を認識するものの 1 つである。インキュベーション及びさらなる洗浄段階に続いて、H R P 共役抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いて融合タンパク質複合体の結合を検出した。A B T S でのインキュベーション後のウェルの吸収度は 405 nm と読めた。図 30 C から図 30 F の結果により、b N A b s c F v T × M 複合体が H I V タンパク質標的を認識することが示される。

20

【0312】

全体としてこれらの結果は、多様な免疫チェックポイント及びシグナル分子に特異的な結合ドメインを有する T × M 複合体を生成できることを明らかにし、分子を標的化するための高められた結合活性を提供する。これらの複合体は I L - 15 免疫刺激性活性を示し、細胞の標的抗原に対して免疫介在性細胞傷害性を向かわせることができる。これらの複合体は動物腫瘍モデルにおいてまた高い有効性がある。

【0313】

実施例 7：T × M 複合体の免疫刺激性及び抗腫瘍活性

実施例 2 に示されるように、T × M 複合体の I L - 15 免疫刺激性活性を、I L - 2 R / を保有する免疫細胞、例えば 32D 細胞株の増殖に基づいて評価した。簡潔には、増加する濃度の精製した T × M タンパク質を、200 μL の I M D M : 10% の F B S 培地内の 32D 細胞 (10⁴ 細胞 / ウェル) に添加し、細胞を 3 日間にわたり 37 °C インキュベートした。4 時間後、吸収度を (正常化のための 600 nm の参照波長で) 570 nm と測定し、代謝的に活性な細胞による P r e s t o B l u e 、すなわちレザズリンに基づく溶液の減少に基づいて細胞増殖を決定した。T × M 複合体の I L - 15 生物活性の半値有効濃度 (E C 50) を、吸収度と T × M タンパク質濃度間の関係に基づいてそれから決定した。表 1 は、本発明の結合ドメインを含む多様な T × M 複合体の I L - 15 E C 50 の値を示す。その結果により、2 つの s c A b / 結合ドメイン (すなわち二頭 (2 H) の抗 P D - L 1 s c A b / I L - 15 N 72 D : 抗 P D - L 1 s c A b / I L - 15 R S u / F c 複合体) 又は 4 つの s c A b / 結合ドメイン (すなわち四頭 (4 H) の抗 P D - L 1 s c A b / I L - 15 N 72 D : 抗 P D - L 1 s c A b / I L - 15 R S u / F c 複合体) 又は異なる標的化ドメインの組み合わせ (すなわち腫瘍標的化ドメイン / 抗 P D L 1 s c A b T × M 複合体) を有するものを含む、多様な精製された T × M 複合体の免疫刺激性活性が裏付けられた。

30

【0314】

40

50

【表1】

表1. TxM複合体のIL-15活性

	EC50 (pM TxM)
2H-抗ヒトPD-L1 scAb TxM	14
4H-抗ヒトPD-L1 scAb TxM	220
2H-抗マウスPD-L1 scAb TxM	58
抗ヒトCTLA-4 scAb/抗ヒトPD-L1 scAb TxM	73
TNT scAb TxM	1013
TNT scAb/抗ヒトPD-L1 scAb TxM	8498
2H-hOAT TxM	115
hOAT/抗ヒトPD-L1 scAb TxM	202

【0315】

hOAT scAb TxMの、腫瘍細胞に対する免疫細胞傷害性を刺激する能力をインピトロで評価した。ヒトNK細胞をStemcell TechnologiesによるNK細胞単離キットで血液バフィーコートから精製し、エフェクター細胞として使用した。TF陽性ヒト臍臓腫瘍細胞、すなわちSW1990をCell trace-violetで標識化し、標的細胞として使用した。ヒトNK細胞及びSW1990腫瘍細胞を1:1のE:T比で、培地単独又は10nMのhOAT Ab(対照)又は2H hOAT scAb TxM複合体を含む培地で混合した。40時間後、標的細胞死のパーセントをvioletで標識化された標的細胞のヨウ化プロピジウム染色に基づくフローサイトメトリーで評価した。図31に示されるように、2H hOAT scAb TxM複合体でインキュベートしたヒトNK細胞は、未処置のNK細胞又はhOAT Abで処置されたNK細胞(すなわち従来のADCC)よりも、TF陽性ヒト腫瘍細胞に対して高い細胞傷害性を介在することができた。これらの結果により、抗TF Absと比較して、免疫細胞介在性の標的化した抗TF TxM複合体の抗腫瘍活性に有意な改良が示される。

【0316】

TxM複合体の、T細胞活性のチェックポイント介在性阻害を克服する活性は以前に記載のインピトロアッセイで評価される(Steward, R, et al Cancer Immunol Res 2015 3(9)1052-1062)。例えば、単離したばかりの一次ヒトT細胞を抗CD3及び抗CD28でコーティングされたビーズと共に培養し、増加した免疫細胞増殖(BrdU取り込みによって測定)及びIFN放出(ELISAによって測定)を明らかにした。ビーズ上のPD-L1抗体の添加は、PD-L1/ PD-1相互作用の阻害シグナルのために、T細胞増殖及びIFN放出を有意に低減させた。抗CD3、抗CD28、PD-L1にコーティングされたビーズ及びT細胞と関連した可溶性PD-L1 TxM又はPD-1 TxMの添加は、PD-L1/ PD-1相互作用の阻害のためにT細胞増殖及びIFN放出を増加させる。抗CD3、抗CD28、抗CTLA-4にコーティングされたビーズ及びT細胞と関連してCTLA-4 TxMを用いる類似のアッセイは、CTLA-4 TxMの免疫チェックポイント阻害活性をまた明らかにする。

【0317】

これらの複合体の抗腫瘍活性をマウスの異種移植片モデルにおいて、ヒト腫瘍細胞株及び患者由来の腫瘍細胞を用いて評価する(Morton, J. J., et al. Cancer Research 2016 doi: 10.1158/0008-5472)。市販のヒト化されたマウスモデル(すなわちHu-CD34 NSGTM, Jackson laboratory)を発展させ、ヒト腫瘍細胞株及び患者由来の腫瘍細胞に由来する腫瘍に対してのヒト免疫細胞反応に関する免疫療法の活性を評価した。例えば、PD-L1陽性の皮下ヒトMDA-MB-231乳癌腫瘍を保有するHu-CD34 NSGTMマウスを、PBS又は増加するレベルのPD-L1 TxM又はPD-1 TxM(すなわち2週間にわたり、1週間に2回の皮下投与)で処置し、腫瘍成長

10

20

30

40

50

を評価する。腫瘍容積における用量依存性の減少は、P D - L 1 陽性ヒト腫瘍に対するP D - L 1 T x M 及び / 又は P D - 1 T x M の治療活性の証拠を提供する。充実性腫瘍マウスモデルが患者由来の P D - L 1 陽性腫瘍細胞（すなわち B R 1 1 2 6 (T M 0 0 0 9 8) 、 L G 1 3 0 6 (T M 0 0 3 0 2) ）を用いてまた使用可能である。B R 1 1 2 6 腫瘍を保有する H u - C D 3 4 N S G ^{T M} マウスの P D - L 1 T x M 及び / 又は P D - L 1 T x M の活性を、処置後の腫瘍成長又はマウス生存を判断して評価する。加えて、血液及び腫瘍ミクロ環境内の T 細胞反応の処置依存性変化をこれらのモデルにおいて評価した。P D - L 1 T x M 及び / 又は P D - 1 T x M 処置後の血液又は腫瘍中の T 細胞のレベル又は活性（すなわち I F N 陽性細胞）の増加により、腫瘍保有マウス内のこれらの複合体の免疫刺激性活性の証拠が提供される。併せて、これらの調査はインビボでのヒト腫瘍に対する P D - L 1 T x M 及び / 又は P D - 1 T x M の免疫細胞介在性活性を明らかにする。

【 0 3 1 8 】

他の実施形態

本発明はその詳細な記載と共に記載されている一方、前述の記載は説明を意図しており、本発明の範囲を限定することを意図しておらず、それは添付の請求項の範囲によって定義される。他の様様、便宜、修正が以下の請求項の範囲内に存在する。

【 0 3 1 9 】

本明細書に引用される特許文献及び科学文献は、当業者に入手可能である知識を証明する。本明細書に引用されるすべての米国特許及び公開公報又は非公開の米国特許出願は、参照によって組み込まれる。本明細書に引用されるすべての公開された外国特許及び特許出願は、参照によって組み込まれる。本明細書に引用されるアクセッション番号によって示される G e n b a n k 及び N C B I 寄託は、参照によって組み込まれる。本明細書に引用されるすべての他の公開文献、文書、原稿、及び科学文献は参照によって本明細書に組み込まれる。

【 0 3 2 0 】

本発明がその好ましい実施形態に関して詳細に示され記載されている一方で、添付の請求項によって包含される本発明の範囲から逸脱しない限り、形式上及び詳細において多様な変更がなされてもよいことが当業者には理解されよう。

また、本発明は以下の実施形態を含む。

[1]

少なくとも 2 の可溶性タンパク質を含む単離された可溶性融合タンパク質複合体であつて、

第一の可溶性タンパク質がインターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) ポリペプチドドメインを含み、かつ第二の可溶性タンパク質がイムノグロブリン F c ドメインと融合した可溶性の I L - 1 5 受容体 スシ結合ドメイン (I L - 1 5 R S u) であって、

第一又は第二の可溶性タンパク質のうちの 1 つが疾患の抗原、免疫チェックポイント分子又は免疫シグナル分子と特異的に結合する結合ドメインをさらに含むものであって、

第一の可溶性タンパク質の I L - 1 5 ドメインが第二の可溶性タンパク質の I L - 1 5 R S u ドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する、

可溶性融合タンパク質複合体。

[2]

第一又は第二の可溶性タンパク質のうちの 1 つが疾患の抗原、免疫チェックポイント分子又は免疫シグナル分子と特異的に結合する第二の結合ドメインをさらに含む、[1] に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[3]

前記 I L - 1 5 ポリペプチドが N 7 2 D 変異体を含む I L - 1 5 多様体 (I L - 1 5 N 7 2 D) である、[1] 又は [2] に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[4]

前記結合ドメインが、ポリペプチドリンク配列によってイムノグロブリン重鎖可変ド

10

20

30

40

50

メインと共有結合したイムノグロブリン軽鎖可変ドメインを含む、[1]～[3]のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[5]

前記結合ドメインが、プログラム細胞死リガンド(PD-L1)、プログラム細胞死1(PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球に関連したタンパク質4(CTLA-4)、分化抗原群33(CD33)、分化抗原群47(CD47)、グルココルチコイドに誘発される腫瘍壞死因子受容体(TNFR)群に関する遺伝子(GITR)、リンパ球機能に関連した抗原1(LFA-1)、組織因子(TF)、デルタ様タンパク質4(DLL4)、一本鎖DNA又はT細胞イムノグロブリン及びムチンドメイン含有-3(Tim-3)を含む1又はそれ以上の分子と特異的に結合する、[1]～[4]のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

[6]

第一の可溶性タンパク質が配列番号：2、6、10、18、20、24、28、32又は38のうちの1つに示されたアミノ酸配列を含む、[1]～[5]のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[7]

第二の可溶性タンパク質が配列番号：4、8、12、14、16、22、26、30、34、36、40、42、44、46、51、52、53又は54のうちの1つに示されたアミノ酸配列を含む、[1]～[5]のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

20

[8]

[1]～[7]のいずれか1項に記載の第二の可溶性融合タンパク質複合体と共有結合した[1]～[7]のいずれか1項に記載の第一の可溶性融合タンパク質複合体を含む、可溶性融合タンパク質複合体。

[9]

第一の可溶性融合タンパク質複合体が、第一の可溶性融合タンパク質複合体のFcドメインと第二の可溶性融合タンパク質複合体のFcドメインを結合するジスルフィド結合によって、第二の可溶性融合タンパク質複合体と共有結合される、[8]に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[10]

30

[6]に記載の第一の可溶性タンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が配列番号：1、5、9、17、19、23、27、31又は37のうちの1つに示された配列を含む核酸配列。

[11]

前記核酸配列が前記可溶性タンパク質をコードする配列と作動可能に結合されたプロモーター、翻訳開始シグナル及びリーダー配列をさらに含む、[10]に記載の核酸配列。

[12]

[7]に記載の第二の可溶性タンパク質をコードする核酸配列であって、前記核酸配列が配列番号：3、7、11、13、15、21、25、29、33、35、39、41、43、45、47、48、49又は50のうちの1つに示された配列を含む核酸配列。

40

[13]

前記核酸配列が、可溶性タンパク質をコードする配列と作動可能に結合されたプロモーター、翻訳開始シグナル及びリーダー配列をさらに含む、[12]に記載の核酸配列。

[14]

[11]及び/又は[13]に記載の核酸配列を含むDNAベクター。

[15]

前記疾患の抗原が新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患と関連している、[1]～[9]のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

[16]

標的細胞を殺傷する方法であって：

50

a) 複数の細胞を [1] に記載の可溶性融合タンパク質複合体に接触させ、そこで複数の細胞が [1] 又は [2] に記載の I L - 1 5 ドメインによって認識された I L - 1 5 受容体 (I L - 1 5 R) 鎖を保有する免疫細胞をさらに含むか、あるいは [1] 又は [2] に記載の結合ドメインによって認識された疾患の抗原、チェックポイント又はシグナル分子、及び標的細胞を保有する免疫細胞をさらに含むこと；

b) I L - 1 5 R 若しくはシグナル分子を介して、又はチェックポイント分子の阻害を介して、免疫細胞を活性化させること；

c) 活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷すること；
を含む方法。

[1 7]

10

標的細胞を殺傷する方法であって：

a) 複数の細胞を [2] に記載の可溶性融合タンパク質複合体に接触させ、そこで複数の細胞が [1] 又は [2] に記載の F c ドメインによって認識された F c 受容体鎖を保有する免疫細胞、及び [1] 又は [2] に記載の抗原に特異的な結合ドメインによって認識された抗原を保有する標的細胞をさらに含むこと；

b) 免疫細胞を結合し活性化させるのに十分な標的細胞上の抗原と免疫細胞上の F c 受容体鎖間の特異的な結合複合体（架橋）を形成すること；

c) 結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷すること；
を含む方法。

[1 8]

20

標的細胞が腫瘍細胞、感染細胞又は自己免疫性疾患に関連した細胞である、[1 6] 又は [1 7] に記載の方法。

[1 9]

結合ドメインが抗 P D - L 1 抗体を含む、[1 6] 又は [1 7] に記載の方法。

[2 0]

対象の免疫反応を刺激する方法であって、[1] ~ [9] 又は [1 5] のいずれか 1 項に記載の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を対象に投与することを含む方法。

[2 1]

30

治療を必要とする対象の新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患の治療方法であって、前記対象に [1] ~ [1 5] 又は [1 7] のいずれか 1 項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を含む医薬組成物の有効量を投与することを含み、それにより前記新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患を治療することを含む方法。

[2 2]

前記新生組織形成が、膠芽腫、前立腺癌、血液のがん、B 細胞新生物、多発性骨髄腫、B 細胞リンパ腫、B 細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、皮膚 T 細胞性リンパ腫、T 細胞リンパ腫、充実性腫瘍、尿路上皮 / 膀胱腫瘍、黒色腫、肺癌、腎細胞癌、乳癌、胃癌及び食道癌、前立腺癌、胰癌、結腸直腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、並びに頭部及び頸部の扁平上皮癌からなる群から選択される、[2 1] に記載の方法。

[2 3]

40

前記有効量が約 1 ~ 1 0 0 μ g / k g 間の前記融合タンパク質複合体である、[2 1] 又は [2 2] に記載の方法。

[2 4]

前記融合タンパク質複合体が少なくとも 1 週間に 1 回投与される、[2 1] 又は [2 2] に記載の方法。

[2 5]

前記医薬組成物が全身、局所、静脈内、皮下又は腫瘍内に投与される、[2 1] ~ [2 4] のいずれか 1 項に記載の方法。

[2 6]

50

前記融合タンパク質複合体が対象の免疫反応を誘発する、[2 1] ~ [2 5] のいずれ

か 1 項に記載の方法。

[2 7]

前記融合タンパク質複合体が免疫細胞の増殖を増加させる、[2 1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[2 8]

前記融合タンパク質複合体が、前記新生物形成、感染症又は自己免疫性疾患に関連した細胞に対する免疫細胞の反応を刺激する、[2 1] ~ [2 7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[2 9]

配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、
27、29、31、33、35、37、35、39、41、43、45、47、48、4
9又は50を含む核酸配列。

10

[3 0]

配列番号：2、4、6、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、
26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、51、52、5
3又は54を含むペプチド。

[3 1]

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染を予防又は治療する方法であって、配列番号：5
1、52、53又は54を含む可溶性融合タンパク質複合体の治療上の有効量を含む組成物を対象に投与することを含む方法。

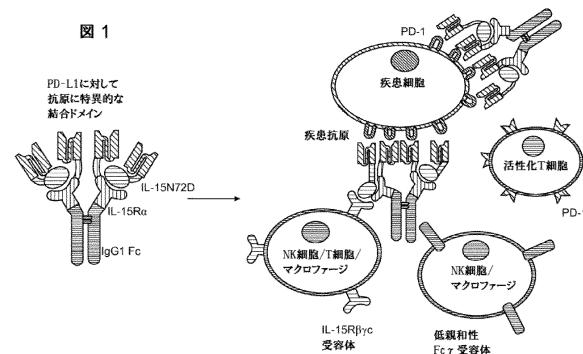
20

[3 2]

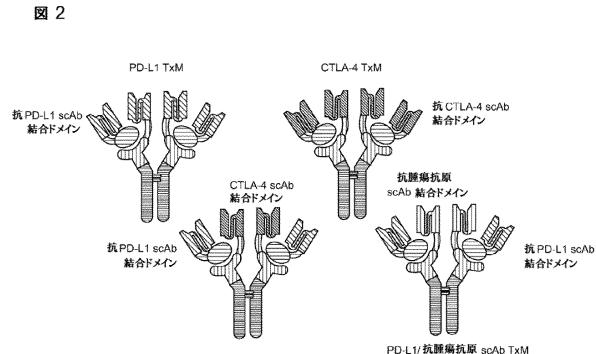
[1] ~ [9] 又は [15] のいずれか 1 項に記載の単離された可溶性融合タンパク質複合体、[10]、[12] 又は [29] のいずれか 1 項に記載の核酸配列、[14] に記載のDNAベクター、[30] に記載のペプチド配列を含む医薬組成物。

【図面】

【図 1】



【図 2】



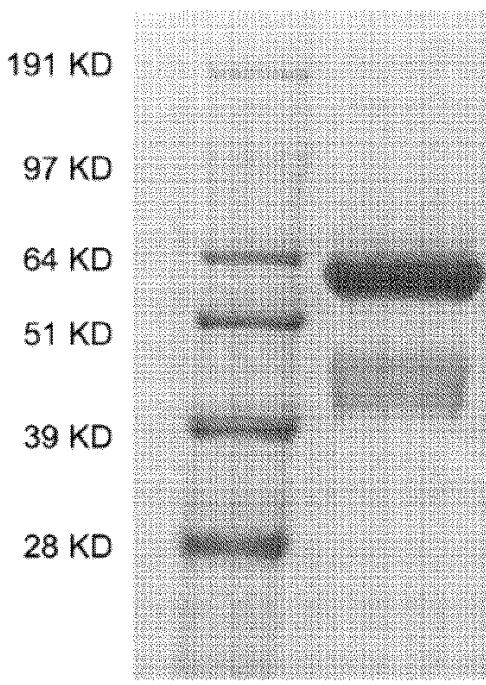
30

40

50

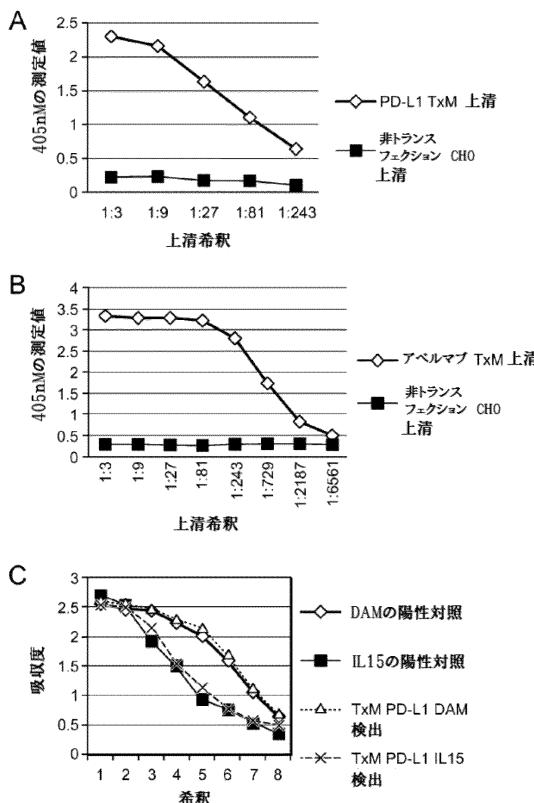
【図3】

図3



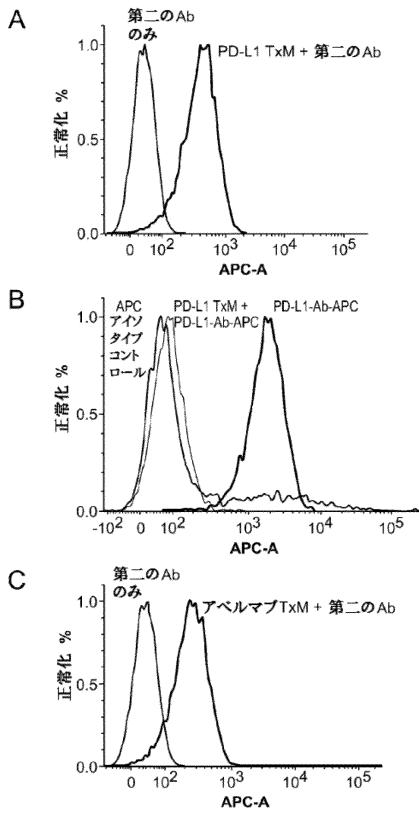
【図4】

図4



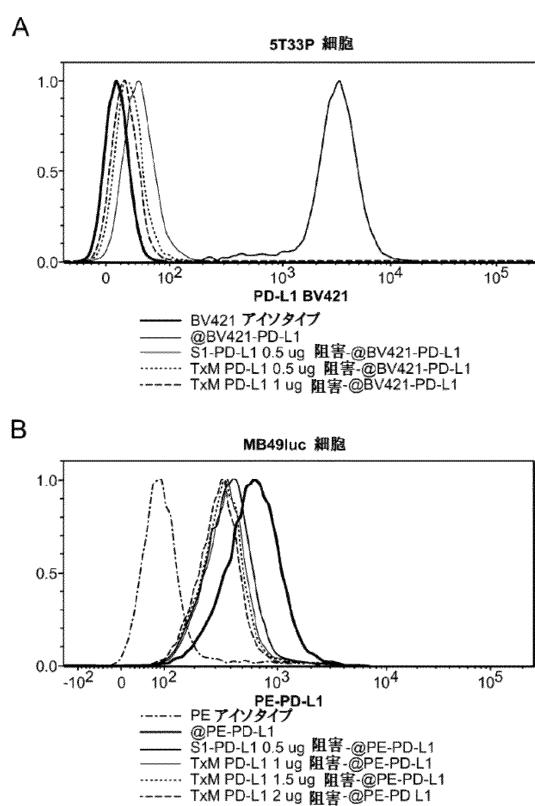
【図5】

図5



【図6】

図6



10

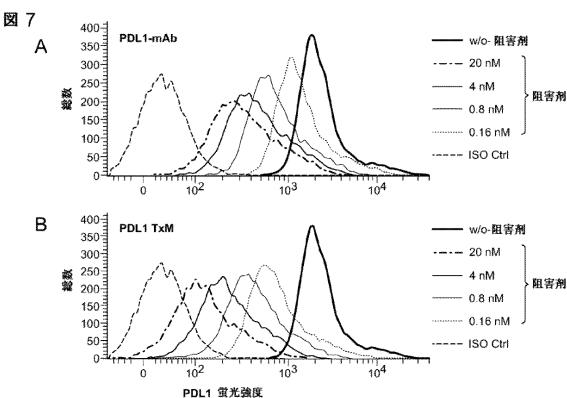
20

30

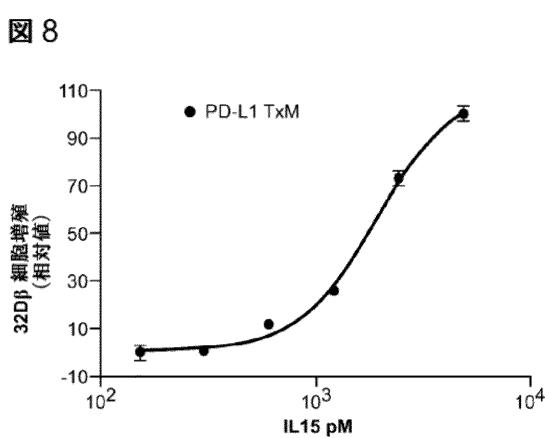
40

50

【図 7】



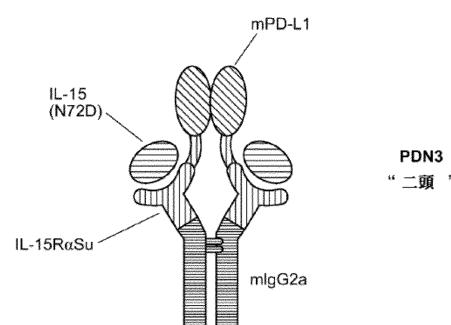
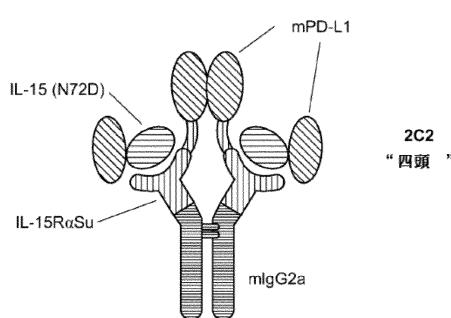
【図 8】



【図 9 - 1】

図 9-1

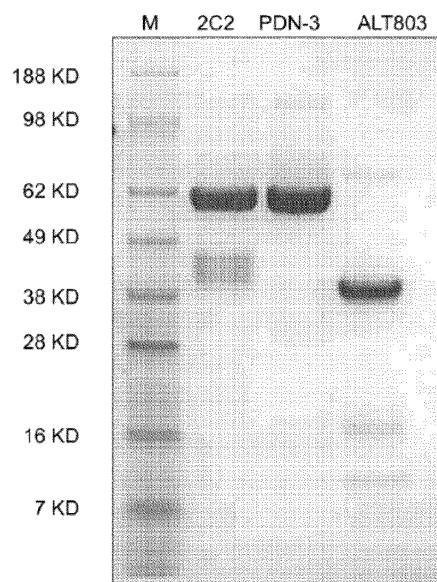
A



【図 9 - 2】

図 9-2

B



20

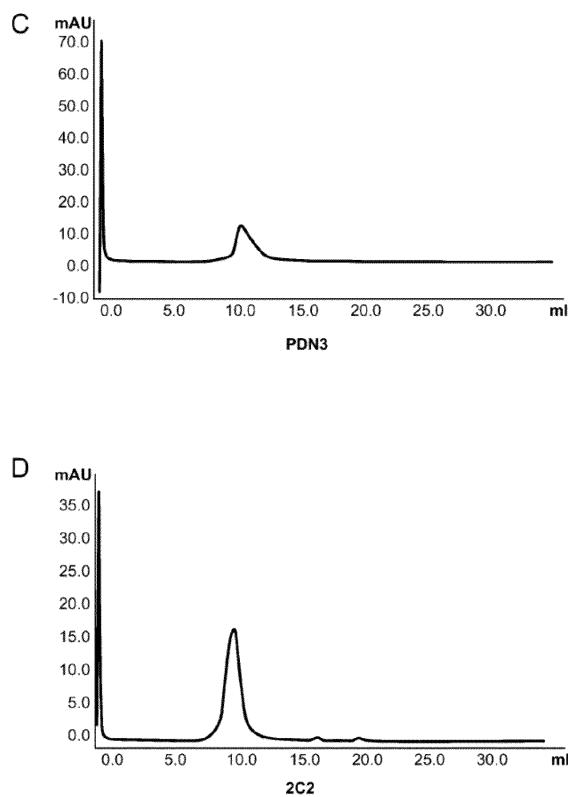
30

40

50

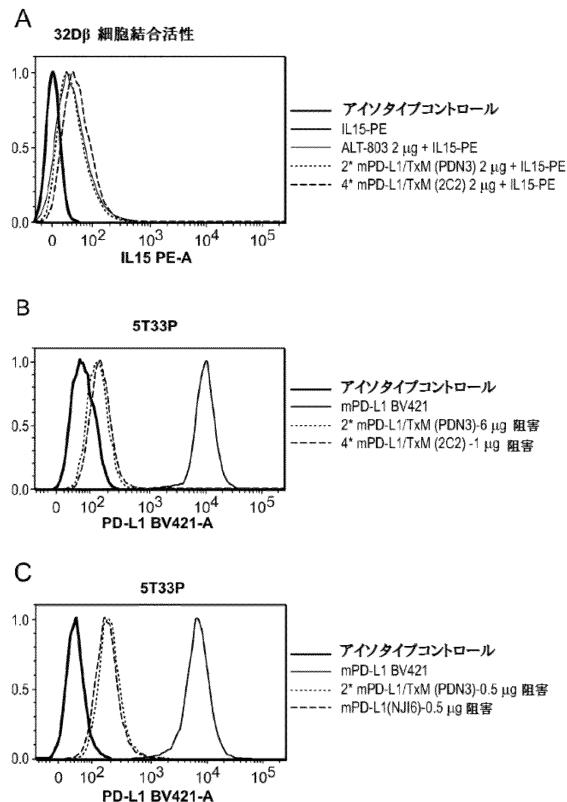
【図 9 - 3】

図 9-3



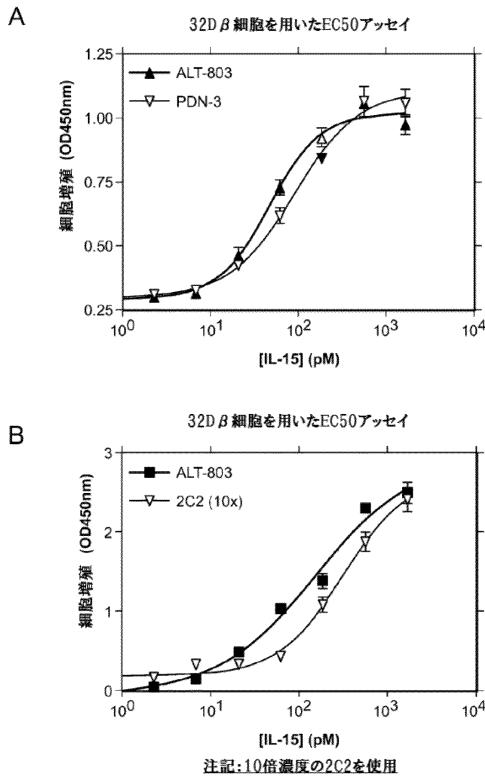
【図 10】

図 10



【図 11】

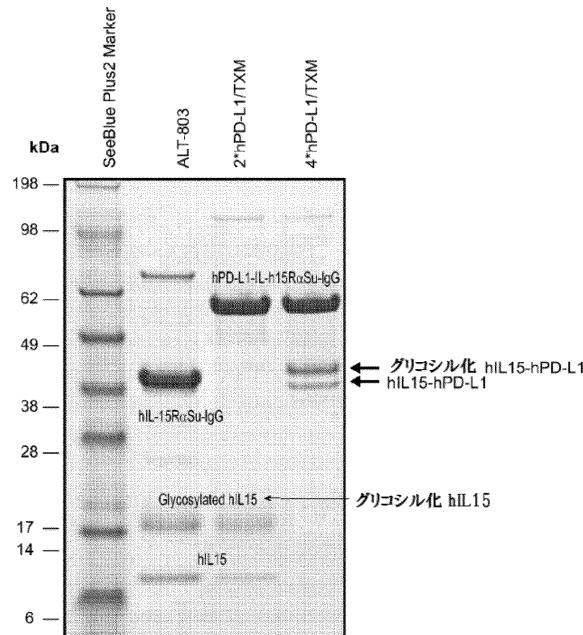
図 11



【図 12 - 1】

図 12-1

A



10

20

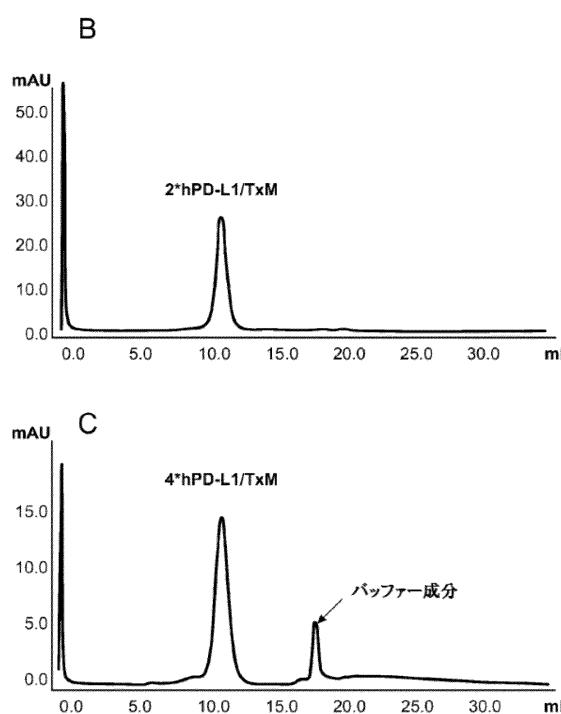
30

40

50

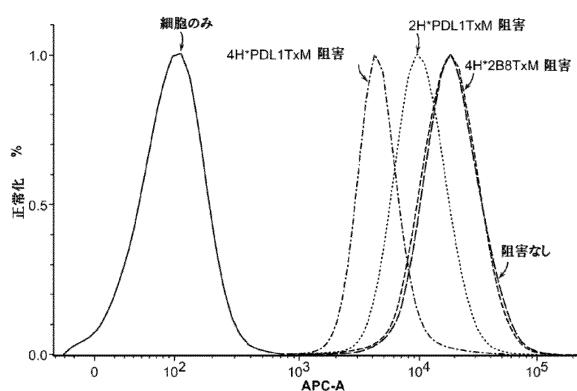
【図 12 - 2】

図 12-2



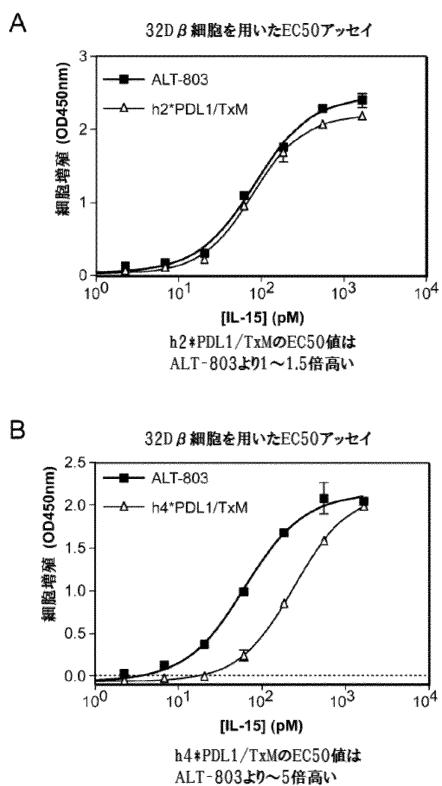
【図 13】

図 13



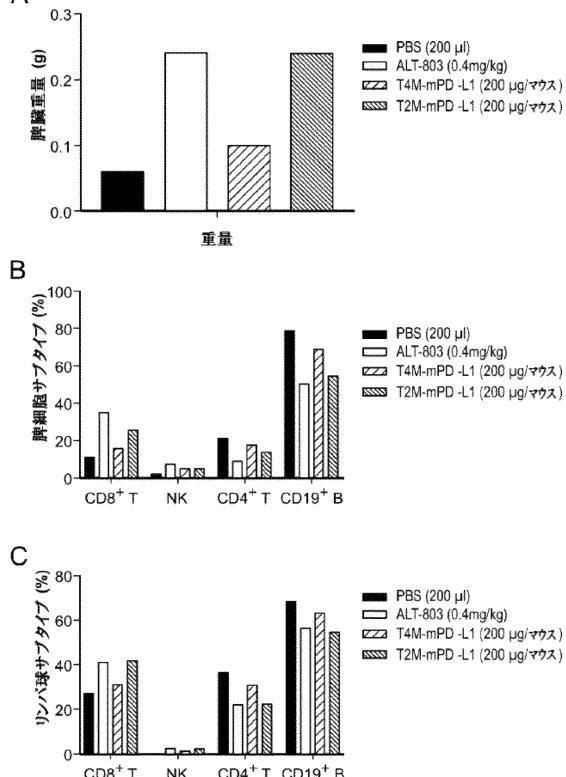
【図 14】

図 14

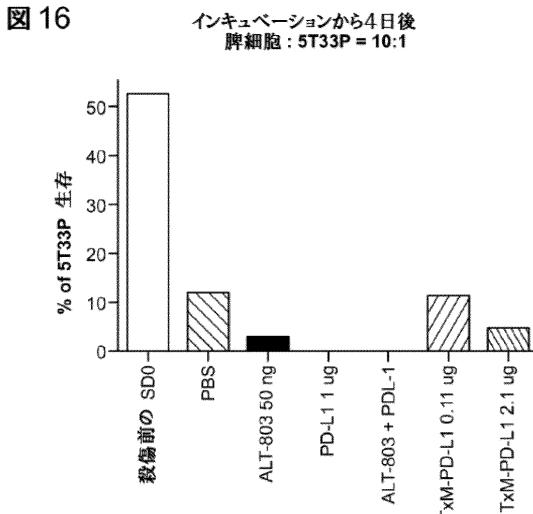


【図 15】

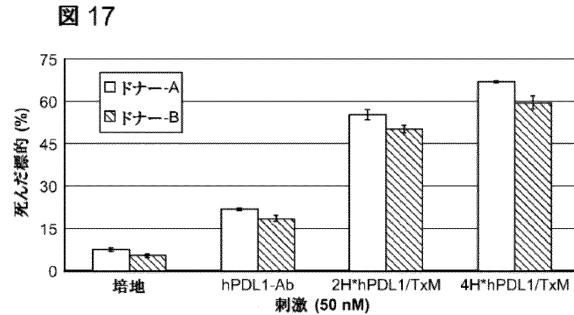
図 15



【図 16】

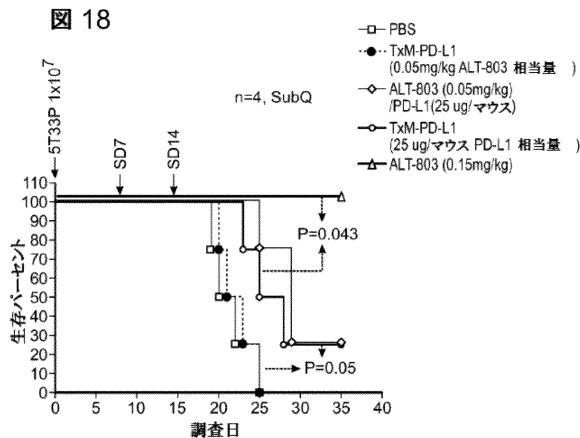


【図 17】

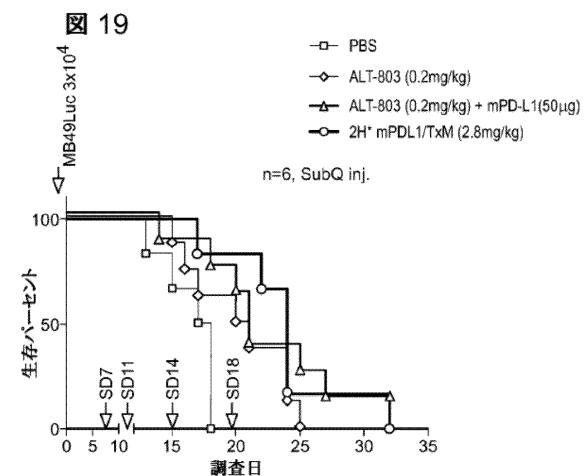


10

【図 18】



【図 19】



20

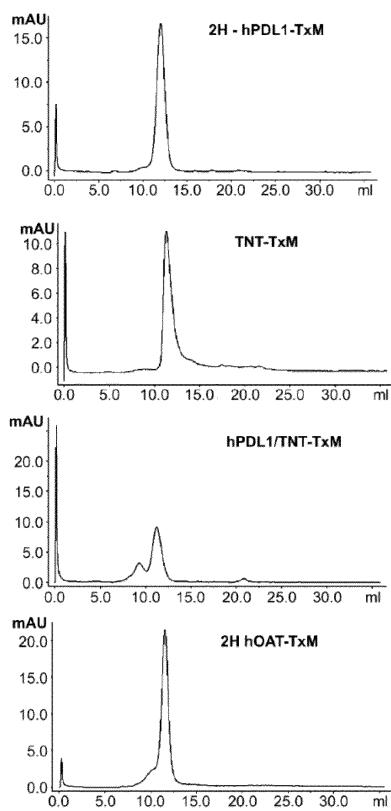
30

40

50

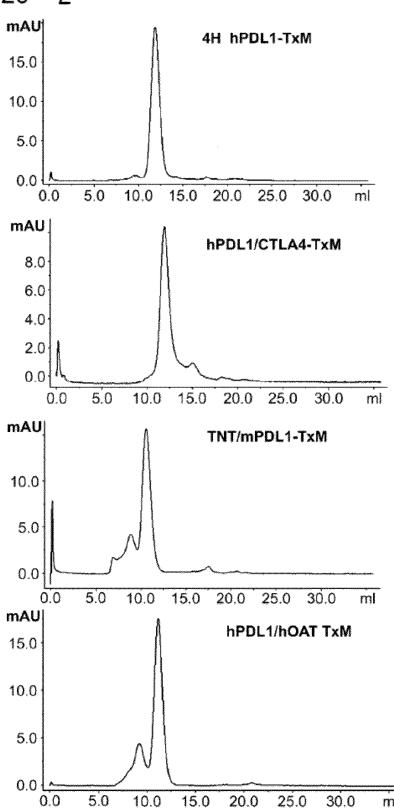
【図 20 - 1】

図 20-1



【図 20 - 2】

図 20-2



10

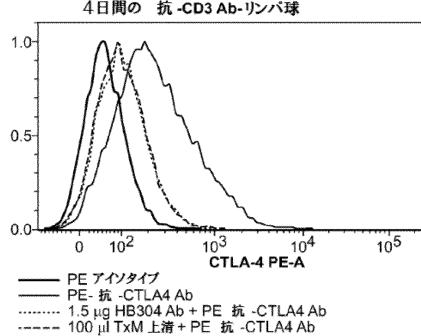
20

30

【図 21】

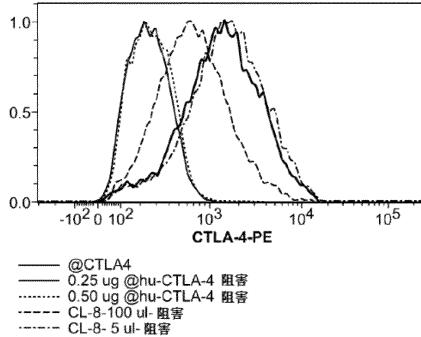
図 21

A



B

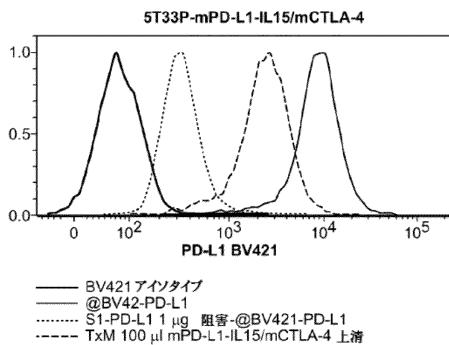
3日間の -OKT3-HuPBMC-CTLA-4



【図 22】

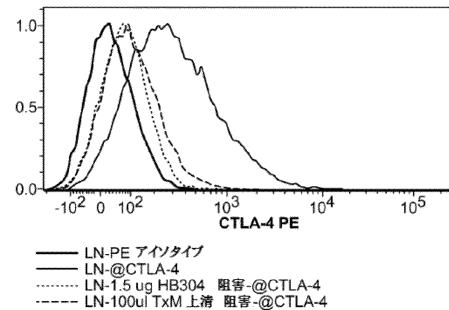
図 22

A



B

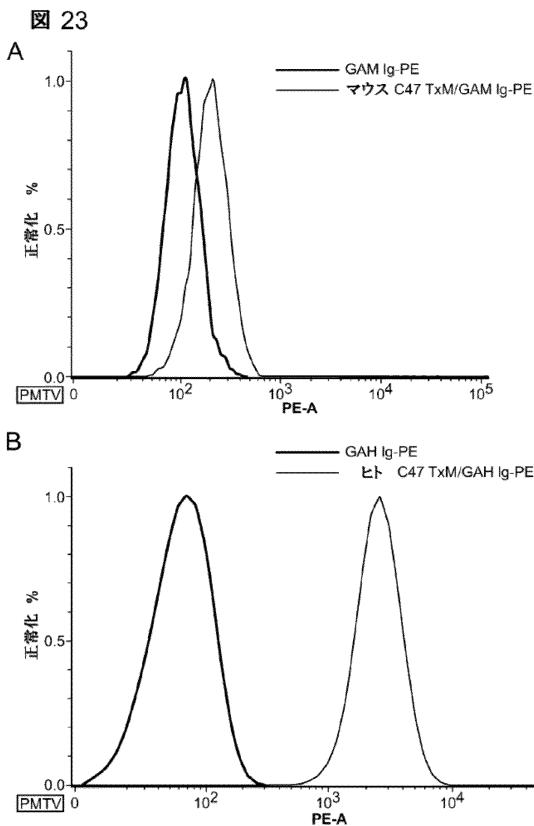
4日間の 2C11-リンパ球



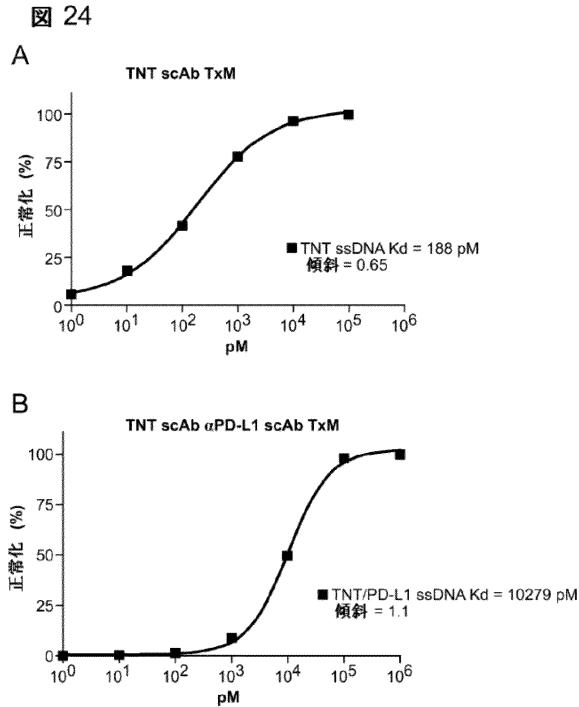
40

50

【図23】



【図24】



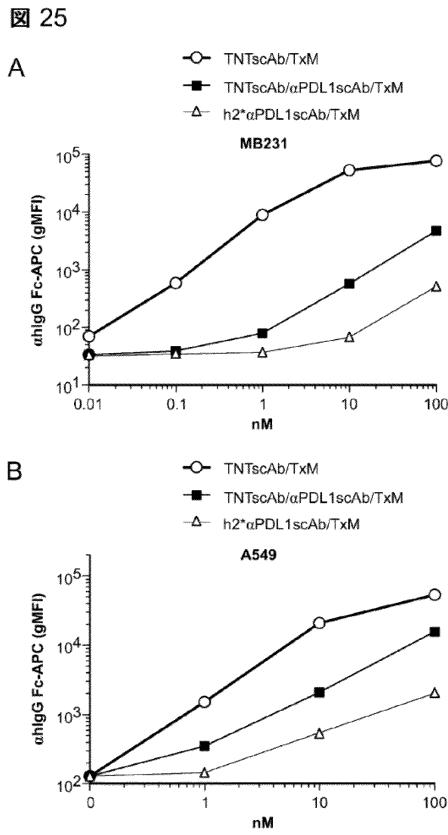
10

20

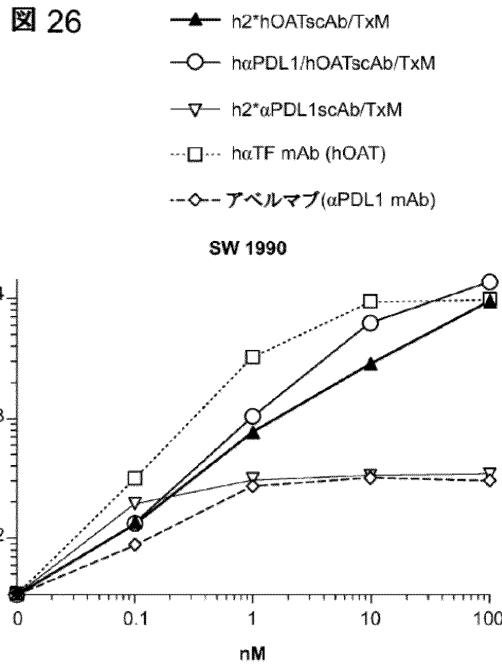
30

40

【図25】



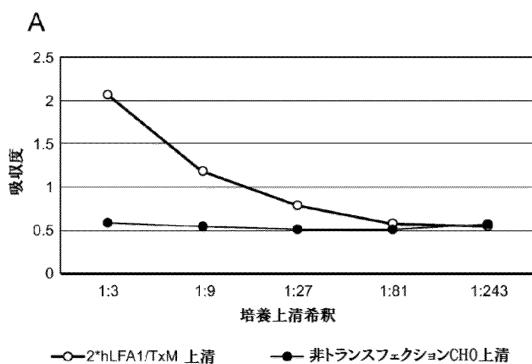
【図26】



50

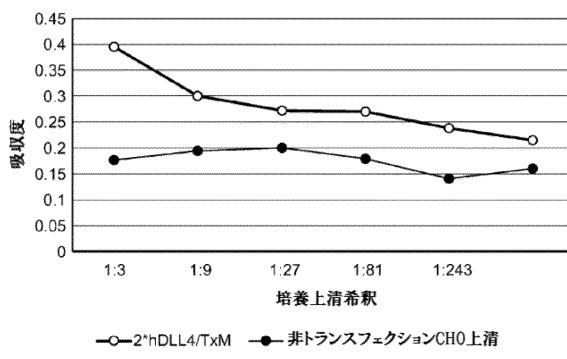
【図 27】

図 27

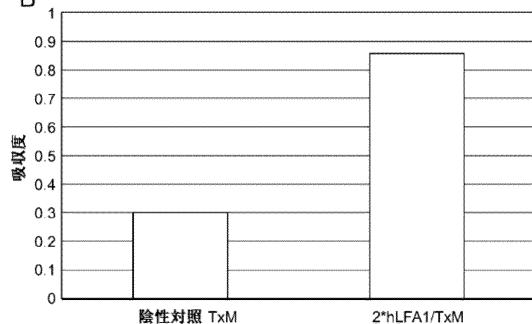


【図 28】

図 28

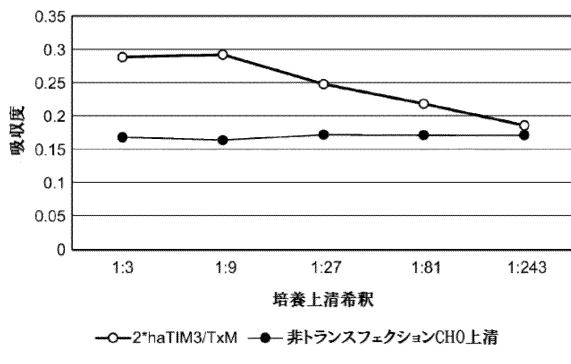


B



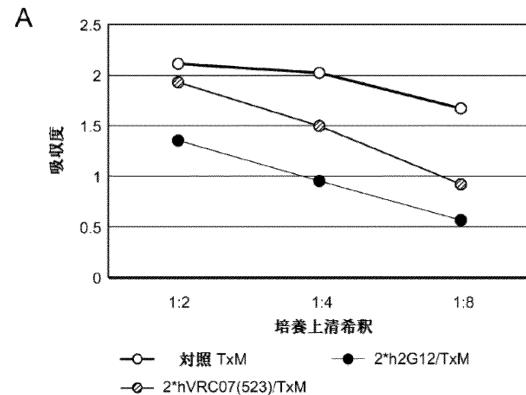
【図 29】

図 29



【図 30-1】

図 30-1

B

B

培養上清希釈	2*N6/TxM (○)	2*101074/TxM (○)	陰性対照 TxM (●)
1:2	~0.55	~0.20	~1.40
1:4	~0.25	~0.15	~1.45
1:8	~0.15	~0.10	~1.10

10

20

30

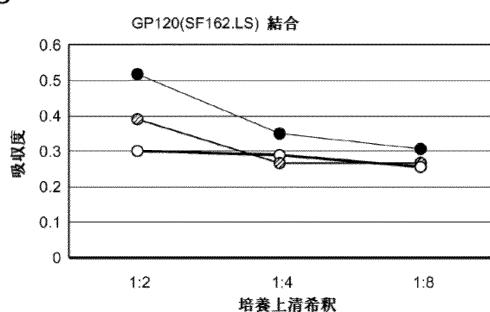
40

50

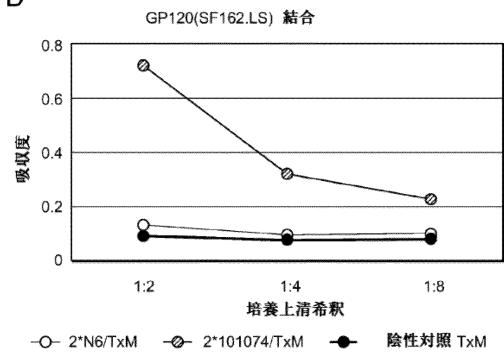
【図 30 - 2】

図 30-2

C



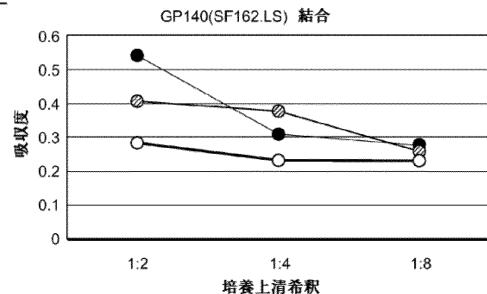
D



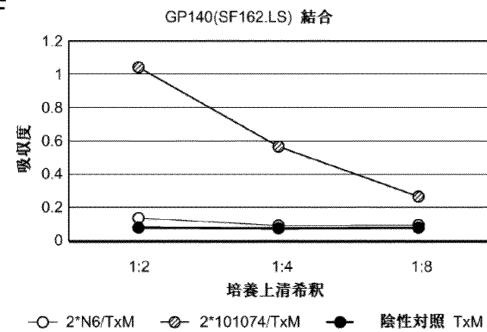
【図 30 - 3】

図 30-3

E

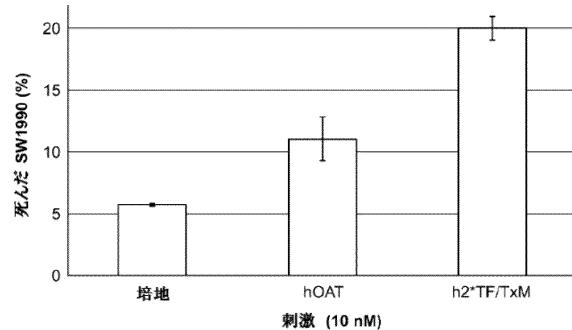


F



【図 31】

図 31



【配列表】

0007492336000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K	47/68 (2017.01)
A 6 1 P	31/18 (2006.01)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)
A 6 1 P	35/02 (2006.01)
A 6 1 P	37/06 (2006.01)
	A 6 1 K 47/68
	A 6 1 P 31/18
	A 6 1 P 35/00
	A 6 1 P 35/02
	A 6 1 P 37/06

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/513,964

(32)優先日 平成29年6月1日(2017.6.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100147289

弁理士 佐伯 裕子

(72)発明者 ウォン, ヒン シー.

アメリカ合衆国 フロリダ州 33332 ウェストン, ウェントワース ストリート 2966

(72)発明者 マーカス, ウォーレン

アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ミラマー, サウスウェスト 29ス ストリート 8382

(72)発明者 リウ, バイ

アメリカ合衆国 フロリダ州 33024 クーパー シティ, ノースウェスト 39ス ストリート 9631

(72)発明者 シュ, ウエンシン

アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ペンブロークパインズ, サウスウェスト 12ス ストリート 11917

(72)発明者 ニューマン, ロビー

アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ミラマー, ノース コマース パークウェイ 2810

(72)発明者 ケイジ, カレン

アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ミラマー, ノース コマース パークウェイ 2810

(72)発明者 ヨウ, リジン

アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ミラマー, ノース コマース パークウェイ 2810

(72)発明者 ロード, ピーター

アメリカ合衆国 フロリダ州 33185 マイアミ, サウスウェスト 42ンド レーン 14857

(72)発明者 スン - シオン, パトリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90232 カルバー シティ, ジェファーソン ブールバード 9920

合議体

審判長 福井 悟

審判官 田中 耕一郎

審判官 中根 知大

(56)参考文献

特表2013-541335 (JP, A)

国際公開第2016/154003 (WO, A1)

特表2015-521592 (JP, A)

国際公開第2013/163427 (WO, A1)

特表2015-534982 (JP, A)

特表2010-527919 (JP, A)

特表2010-531878 (JP, A)

特表2008-545397 (JP, A)

J. Biol. Chem., Published 2016.09.20, Vol. 2

91, No. 46, pp. 23869-23881

Nature, 2014, Vol. 515, pp. 558-562

J. Clin. Oncol., 2016, Vol. 4, No. 15 suppl., p
.5533

J. Immunol., 2008, Vol. 180, pp. 2099-2106

J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281, No. 3, pp. 161
2-1619

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)