

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年10月22日(2020.10.22)

【公表番号】特表2019-533449(P2019-533449A)

【公表日】令和1年11月21日(2019.11.21)

【年通号数】公開・登録公報2019-047

【出願番号】特願2019-521081(P2019-521081)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
A 6 1 K	38/20	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
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 K	47/68	(2017.01)
C 0 7 K	14/54	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 1 2 N	5/078	(2010.01)

【F I】

C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	47/68	
C 0 7 K	14/54	Z N A
C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	5/078	

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月10日(2020.9.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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-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-15R<sub>Su</sub>)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IL-15ドメインが第二の可溶性タンパク質のIL-15R<sub>Su</sub>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IL-15ポリペプチドがN72D変異体を含むIL-15多様体(IL-15N72D)である、請求項1又は2に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

#### 【請求項4】

前記結合ドメインが、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たイムノグロブリン軽鎖可変ドメインを含む、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。

#### 【請求項5】

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み、及び/又は、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1~4のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

#### 【請求項6】

請求項1~5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請求項1~5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。

#### 【請求項7】

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、請求項1~6のいずれか1項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

#### 【請求項8】

請求項5に記載の第一の可溶性タンパク質又は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、前記第一の可溶性タンパク質をコードする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であり、

前記第二の可溶性タンパク質をコードする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。

#### 【請求項9】

標的細胞を殺傷する方法であって：

a) 複数の細胞を請求項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請求項1又は2に記載のIL-15ドメインによって認識されたIL-15受容体(IL-15R)鎖を保有する免疫細胞をさらに含むか、あるいは請求項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) 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細胞を殺傷すること；  
を含む方法、に用いるための、請求項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。

**【請求項 10】**

標的細胞を殺傷する方法であって：

a ) 複数の細胞を請求項 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請求項 1 又は 2 に記載の Fc ドメインによって認識された Fc 受容体鎖を保有する免疫細胞、及び請求項 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 Fc 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、に用いるための、請求項 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。

**【請求項 11】**

対象において免疫反応刺激剤として用いるための、請求項 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。

**【請求項 12】**

新生組織形成、感染症又は自己免疫性疾患の治療方法に用いるための、請求項 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。

**【請求項 13】**

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、多発性骨髓腫、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、肺癌、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、請求項 12 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

**【請求項 14】**

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染を予防又は治療する方法に用いるための、配列番号：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可溶性融合タンパク質複合体。

**【請求項 15】**

請求項 1 ~ 7 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を含む医薬組成物。

**【手続補正 2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0059】

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）。

**【手続補正 3】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

**【補正の内容】****【0060】**

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℃、より好ましくは少なくとも約37℃、最も好ましくは少なくとも約42℃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DNA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℃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℃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  $\mu$ g/mlの変性したサケの精子DNA(ssDNA)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℃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  $\mu$ g/mlのssDNA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。

**【手続補正4】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0061****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0061】**

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。

**【手続補正5】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0240****【補正方法】変更**

## 【補正の内容】

## 【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 - 15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 - 15N72D鎖を結合する構築物を製造した。

## 【手続補正6】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0320

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0320】

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って、

第一の可溶性タンパク質がインターロイキン-15(I L - 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F cドメインと融合した可溶性のI L - 15受容体スシ結合ドメイン(I L - 15R 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 - 15ドメインが第二の可溶性タンパク質のI L - 15R 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 - 15ポリペプチドがN72D変異体を含むI L - 15多様体(I L - 15N72D)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(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33(C D 3 3)、分化抗原群47(C D 4 7)、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、[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。

## [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。

[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]

[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。

[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：

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 IL-15 ドメインによって認識された IL-15 受容体 (IL-15R) 鎮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) 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細胞を殺傷すること；  
を含む方法。

[17]

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 Fc ドメインによって認識された Fc 受容体鎮を保有

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Fc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。

[18]

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、[16]又は[17]に記載の方法。

[19]

結合ドメインが抗PD-L1抗体を含む、[16]又は[17]に記載の方法。

[20]

対象の免疫反応を刺激する方法であって、[1]～[9]又は[15]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。

[21]

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]～[15]又は[17]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。

[22]

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、膵癌、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、[21]に記載の方法。

[23]

前記有効量が約1～100μg/kg間の前記融合タンパク質複合体である、[21]又は[22]に記載の方法。

[24]

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、[21]又は[22]に記載の方法。

[25]

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、[21]～[24]のいずれか1項に記載の方法。

[26]

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、[21]～[25]のいずれか1項に記載の方法。

[27]

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、[21]～[26]のいずれか1項に記載の方法。

[28]

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、[21]～[27]のいずれか1項に記載の方法。

[29]

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、49又は50を含む核酸配列。

[30]

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。

[ 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。