

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7347899号

(P7347899)

(45)発行日 令和5年9月20日(2023.9.20)

(24)登録日 令和5年9月11日(2023.9.11)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/525(2006.01)

C 0 7 K 14/525

請求項の数 17 (全118頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-507586(P2020-507586)

(86)(22)出願日 平成30年8月8日(2018.8.8)

(65)公表番号 特表2020-530299(P2020-530299
A)

(43)公表日 令和2年10月22日(2020.10.22)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/045741

(87)国際公開番号 WO2019/032661

(87)国際公開日 平成31年2月14日(2019.2.14)

審査請求日 令和3年8月6日(2021.8.6)

(31)優先権主張番号 62/542,920

(32)優先日 平成29年8月9日(2017.8.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 519287378

オリオンズ バイオサイエンス インコー
ポレイテッドアメリカ合衆国 0 2 4 6 6 マサチュー
セッツ州 ニュートン グローブ ストリ
ート 2 7 5

(73)特許権者 519287389

オリオンズ バイオサイエンス ビービー
ベルギー王国 ビー・9 0 5 2 ズウェイ
ナールデ レイフィセストラート 1 2 0

(74)代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(72)発明者 クレイ、ニコライ

アメリカ合衆国 0 2 4 6 6 マサチュー
セッツ州 ニュートン グローブ ストリ
ート 2 7 5

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 8 結合物質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む単一ドメイン抗体を含む、CD8結合物質であって、(a) CDR1が配列番号28のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号97のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号166のアミノ酸配列からなる；(b) CDR1が配列番号39のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号108のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号177のアミノ酸配列からなる；(c) CDR1が配列番号37のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号112のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号181のアミノ酸配列からなる；(d) CDR1が配列番号45のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号114のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号183のアミノ酸配列からなる；(e) CDR1が配列番号51のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号130のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号199のアミノ酸配列からなる；又は(f) CDR1が配列番号45のアミノ酸配列からなり、CDR2が配列番号1221のアミノ酸配列からなり、CDR3が配列番号183のアミノ酸配列からなり、前記CD8結合物質は、配列番号235、246、250、252、および268から配列番号1215の、AA
Aリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジンタグ配列を除いたアミノ酸配列、ならびに
配列番号1216のアミノ酸配列のうちの1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一

性を有するアミノ酸配列を含む、

前記 C D 8 結合物質。

【請求項 2】

前記単一ドメイン抗体が、組換え重鎖抗体 (V_HH)、単鎖抗体 (s c F v)、またはヒト化 V_HH である、請求項 1 に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 3】

1 種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、請求項 1 または 2 に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 4】

前記 1 種類または複数種類のシグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択され、これらはいずれも改変されていてもよい、請求項 3 に記載の C D 8 結合物質。

10

【請求項 5】

1 つまたは複数の追加の標的化部分を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原を認識し、前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分は腫瘍抗原を機能的に調節してもよい、請求項 5 に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 7】

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が免疫細胞上の抗原を認識し、前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分は免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、請求項 6 に記載の C D 8 結合物質。

20

【請求項 8】

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、および N K 細胞からなる群から選択される、請求項 7 に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 9】

細胞傷害性 T 細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

【請求項 10】

C D 8 を認識して、その活性を機能的に調節することなく C D 8 に結合する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質をコードする組換え核酸。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

【請求項 13】

(a) 請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質；および

(b) 位置 R 1 2 0、M 1 4 8、R 1 4 9、および L 1 5 3 から選択される位置に、野生型 I F N 2 に比べて改善された安全性を付与する 1 つまたは複数の変異を有する、配列番号 2 8 8 又は 2 8 9 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する改変ヒト I F N 2、

40

を含むキメラタンパク質であって、

前記単一ドメイン抗体および前記改変ヒト I F N 2 が、1 つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、キメラタンパク質。

【請求項 14】

前記改変ヒト I F N 2 が、R 1 2 0 E、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 13 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 15】

前記改変ヒト I F N 2 が、R 1 2 0 E 変異と、R 1 4 9 A または L 1 5 3 A 変異のいずれかとを含む、請求項 13 に記載のキメラタンパク質。

50

【請求項 16】

(a) 請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の CD8 結合物質；および

(b) 位置 W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152、および Y155 から選択される位置に、野生型 IFN に比べて改善された安全性を付与する 1 つまたは複数の変異を有する、配列番号 290 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する改変ヒト IFN、

を含むキメラタンパク質であって、

前記単ドメイン抗体および前記改変ヒト IFN が、1 つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、キメラタンパク質。

【請求項 17】

前記改変ヒト IFN が、W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、および R152G からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 16 に記載のキメラタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017 年 8 月 9 日出願の米国特許仮出願第 62 / 542 , 920 号の利益および優先権を主張する。この特許の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、一部は、CD8 を結合する結合物質（例えば、限定されないが、VHH などの抗体）ならびに治療薬および診断薬としてのそれらの使用に関する。

【0003】

電子申請したテキストファイルの説明

本明細書と共に電子申請された次記のテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列リストのコンピュータ可読形式コピー（ファイル名：ORN - 032PC__ST25、作成日付：2018 年 8 月 8 日、ファイルサイズ：828 KB）。

【背景技術】

【0004】

活性化 CD8⁺ T リンパ球（細胞傷害性 T 細胞または CTL としても知られる）は、広範囲の病原性微生物に対する主要な防御線である。さらに、CTL は抗腫瘍免疫において重要な役割も果たす。具体的には、これらのエフェクター細胞は、インターフェロン（IFN）- および細胞毒素の産生、溶解タンパク質（例えば、パーフォリン、グランザイム）のエキソサイトーシス、および FAS 分子の受容体リガンド結合を含む機序により癌発生を抑制できる。

【0005】

それにもかかわらず、病原性微生物および腫瘍細胞は、CTL による免疫破壊を回避する種々の機序を発達させている。例えば、腫瘍は、例えば、癌細胞それ自身によるかまたは腫瘍微小環境中に存在する非癌細胞による免疫抑制サイトカインの産生および免疫チェックポイント阻害の関与を介して、CTL の機能を無能にすることにより免疫監視を回避できる。癌細胞は、アポトーシスにより CTL を除去することも示されている。

【0006】

したがって、例えば、腫瘍回避を効果的に逸脱させかつ、例えば、CTL により媒介される抗腫瘍免疫を強化できる薬剤を含む、改善された免疫療法薬に対する必要性が残されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

種々の態様では、本発明は、C D 8 に特異的に結合する少なくとも 1 つの標的化部分を有する C D 8 結合物質に関する。種々の実施形態では、これらの C D 8 結合物質は、C D 8 に結合するが、C D 8 を機能的に調節しない（限定されないが、部分的にまたは完全に中和しないことを含む）。したがって、種々の実施形態では、本発明の C D 8 結合物質は、例えば、C D 8 発現細胞に C D 8 を介してシグナル伝達させつつその C D 8 発現細胞を目的の部位に動員するのに使用される（すなわち、C D 8 結合物質の結合は、目的の部位での C D 8 シグナル伝達を低減または除去しない）。ある実施形態では、標的化部分は単一ドメイン抗体（V H H）である。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、シグナル伝達物質、例えば、限定されないが、活性を弱めるように改変され得るインターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子をさらに含む。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、目的とする他の抗原に結合する追加の標的化部分を含む。ある実施形態では、目的とする他の抗原は、腫瘍細胞上に存在する。別の実施形態では、目的とする他の抗原は、免疫細胞上に存在する。これらの実施形態では、本発明の C D 8 結合物質は、免疫細胞、例えば、腫瘍を死滅させるおよび / または抑制することができる免疫細胞（例えば、細胞傷害性 T 細胞）を、作用部位（非限定的例であるが、腫瘍微小環境など）に直接的にまたは間接的に動員し得る。

10

【 0 0 0 8 】

種々の実施形態では、本発明の C D 8 結合物質は、癌、感染症、免疫異常、自己免疫疾患、ならびに他の疾患および障害などの種々の疾患または障害の治療で使用され、また、本発明は、種々の治療方法を包含する。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】図 1 は、ヒト C D 8 に特異的な 6 9 種類の異なる V H H のヌクレオチド配列を示す。ギャップは、配列を整列させるために導入された。

【図 2】図 2 は、ヒト C D 8 に特異的な 6 9 種類の異なる V H H のアミノ酸配列を示す。示した相補性決定領域（C D R 1、C D R 2 および C D R 3）は、K a b a t に従って決定された。ギャップは、配列を整列させるために導入された。上記 6 9 種類の異なる V H H は、3 1 個の異なる C D R 3 群に属する（図 3 参照）。同じ群に属する V H H は極めて類似しており、それらのアミノ酸配列は、それらが体細胞超変異から生じるまたは同じ B 細胞から生じるクローンに関連した B 細胞由来であるがライブラリー構築中に R T および / または P C R エラーにより多様化したことを示唆している。同じ群に属する V H H は同じエピトープを認識するが、それらの他の特性（例えば、親和性、効力、安定性、発現量、など）は異なる可能性がある。

30

【図 3】図 3 は、6 9 種類の異なる V H H が 3 1 個の異なる C D R 3 群に属することを示す表である。

【図 4】図 4 は、ヒト C D 8 を遺伝子導入した H e k 2 9 3 T 細胞への種々の V H H の結合を示す。

【図 5 A】図 5 A は、C D 8 陽性細胞での p S T A T 1 シグナル伝達アッセイを示す。調査したキメラは、抗ヒト C D 8 V H H / ヒト I F N R 1 4 9 A（すなわち、C D 8 V H H - A F N）であった。健康なドナー由来の末梢血単核球（P B M C）を C D 8 抗体で染色し、C D 8 V H H - A F N で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 抗体で染色した。データは、p S T A T 1 陽性細胞のパーセンテージとしてプロットされる。

40

【図 5 B】図 5 B は、C D 8 陰性細胞（図 5 B）での p S T A T 1 シグナル伝達アッセイを示す。調査したキメラは、抗ヒト C D 8 V H H / ヒト I F N R 1 4 9 A（すなわち、C D 8 V H H - A F N）であった。健康なドナー由来の末梢血単核球（P B M C）を C D 8 抗体で染色し、C D 8 V H H - A F N で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 抗体で染色した。データは、p S T A T 1 陽性細胞のパーセンテージとしてプロットされる。

50

【図 6 A】図 6 A は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、野生型 I F N 2 で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

【図 6 B】図 6 B は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、C D 8 V H H A F N (すなわち、A F N 2 C D A 5) で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

10

【図 6 C】図 6 C は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、C D 8 V H H A F N (すなわち、A F N 3 C D A 1 9) で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

【図 6 D】図 6 D は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、C D 8 V H H A F N (すなわち、A F N 1 C D A 6 5) で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

20

【図 6 E】図 6 E は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、C D 8 V H H A F N (すなわち、A F N 2 C D A 7 4 (C 5 0 S)) で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

【図 6 F】図 6 F は、健康なドナー由来の P B M C での S T A T リン酸化の C D 8 V H H A c T a f e r o n (A F N) 刺激を示すグラフである。健康なドナー由来の P B M C を C D 8 A b で染色し、C D 8 V H H A F N (すなわち、A F N 2 C D A 6 8) で 1 5 分間刺激した。固定および透過処理後に、細胞を p S T A T 1 A b で染色した。データはベースライン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされる。

30

【図 7 A】図 7 A は、C D 8 V H H (すなわち、2 C D A 5) が、F A C にあるヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに同程度に結合することを示すグラフである。

【図 7 B】図 7 B は、C D 8 V H H (すなわち、3 C D A 1 9) が、F A C にあるヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに同程度に結合することを示すグラフである。

【図 7 C】図 7 C は、C D 8 V H H (すなわち、1 C D A 6 5) が、F A C にあるヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに同程度に結合することを示すグラフである。

【図 7 D】図 7 D は、C D 8 V H H (すなわち、2 C D A 7 4 (C 5 0 S)) が、F A C にあるヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに同程度に結合することを示すグラフである。

【図 7 E】図 7 E は、C D 8 V H H (すなわち、2 C D A 6 8) が、F A C にあるヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに同程度に結合することを示すグラフである。

40

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、一部は、C D 8 を認識し、それに結合する物質（例えば、非限定的例であるが、V H H などの抗体）の発見に基づいている。種々の実施形態では、これらの C D 8 結合物質は、C D 8 に結合するが、C D 8 を機能的に調節しない。種々の実施形態では、これらの C D 8 結合物質は、C D 8 に結合し C D 8 を治療作用の必要な部位（例えば、腫瘍）へ直接的にまたは間接的に動員する。本発明は、C D 8 結合物質を含む医薬組成物および種々の疾患の治療でのそれらの使用をさらに提供する。

【0011】

50

CD8 結合物質

種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、CD8 に特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、CD8 を機能的に調節すること（例えば、部分的なまたは完全な中和）なしに、CD8 に特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。

【0012】

CD8 は、ヘテロダイマーI型膜貫通型糖タンパク質であり、その および 鎖はどちらも伸長O-グリコシル化ストークにより単回通過膜貫通ドメインに連結された免疫グロブリン(Ig)様細胞外ドメインおよび短い細胞質側末端から構成される(Liet al., 2013)。CD8 鎖の細胞質領域は、srcチロシンキナーゼp56lck(Lck)に対するドッキング部位として機能する2つのシステインモチーフを含む。対照的に、このLck結合ドメインは、鎖には存在しないように見え、CD8 鎖は下流シグナル伝達に関与しないことを示唆している(Artyomov et al., 2010)。CD8 は、T細胞受容体に対する共受容体として機能し、その基本的な役割は、MHCに共受容体結合した後にLckをTCR-pMHC複合体へと動員することである(Turner et al., 1990, Veillette et al., 1988)。このキナーゼの局所濃度の増加は、鎖結合プロテインキナーゼ70(ZAP-70)を動員しおよび活性化するシグナル伝達カスケードを活性化し、その後、T細胞活性化信号の増幅をもたらす(Purbhoo et al., 2001, Laugel et al., 2007a)。

【0013】

種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、CD8 および/または 鎖上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、CD8 および/または 鎖上の1つまたは複数の線形エピトープ(linear epitope)を認識する。本明細書で使用される場合、線形エピトープは、CD8 および/または 鎖上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を意味する。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、CD8 および/または 鎖上に存在する1つまたは複数の立体構造エピトープ(conformational epitope)を認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および/または形状および/または三次構造を備えた3次元表面を形成する1つまたは複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0014】

種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、ヒトCD8 および/または 鎖の完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意のその他の天然または合成類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む任意の型のヒトCD8 および/または 鎖に結合し得る。ある実施形態では、CD8 結合物質は、モノマー型のCD8 鎖またはCD8 鎖に結合する。別の実施形態では、CD8 結合物質は、2つのCD8 鎖または2つのCD8 鎖からなるホモダイマー型に結合する。さらなる実施形態では、CD8 結合物質は、1つのCD8 鎖または1つのCD8 鎖からなるヘテロダイマー型に結合する。

【0015】

ある実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、ヒトCD8 鎖上に存在する1つまたは複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム1のアミノ酸配列（配列番号1）を含む。

【0016】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム2のアミノ酸配列（配列番号2）を含む。

【0017】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム3のアミノ酸配列（配列番号3）を含む。

【0018】

ある実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、ヒトCD8 鎖上に存在する1つまたは複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム1のアミノ酸配列（配列番号4）を含む。

【0019】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム2のアミノ酸配列（配列番号5）を含む。

【0020】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム3のアミノ酸配列（配列番号6）を含む。

【0021】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム4のアミノ酸配列（配列番号7）を含む。

【0022】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム5のアミノ酸配列（配列番号8）を含む。

【0023】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム6のアミノ酸配列（配列番号9）を含む。

【0024】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム7のアミノ酸配列（配列番号10）を含む。

【0025】

ある実施形態では、ヒトCD8 鎖は、アイソフォーム8のアミノ酸配列（配列番号11）を含む。

【0026】

種々の実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、特異的に結合できる標的化部分を含む。種々の実施形態では、CD8 結合物質は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、CD8 結合物質は、抗体である標的化部分を含む。種々の実施形態では、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む完全長マルチマータンパク質である。それぞれの重鎖は、1つの可変領域（例えば、 V_H ）および少なくとも3つの定常領域（例えば、 CH_1 、 CH_2 および CH_3 ）を含み、それぞれの軽鎖は、1つの可変領域（ V_L ）および1つの定常領域（ CL ）を含む。可変領域は抗体の特異性を決定する。それぞれの可変領域は、4つの比較的保存されたフレームワーク領域（FR）により挟まれた、相補性決定領域（CDR）としても知られる、3つの高頻度可変領域を含む。3つのCDRは、CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、抗体の結合特異性に寄与する。いくつかの実施形態では、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0027】

いくつかの実施形態では、CD8 結合物質は、特定の抗体誘導体または抗体フォーマットである標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、本発明のCD8 結合物質は、次の標的化部分を含む：単ドメイン抗体、組み換え型の重鎖抗体（重鎖抗体）（ VHH ）、単鎖抗体（ $scFv$ ）、サメの重鎖抗体（ $VNAR$ ）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、 $DARPin$ ；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；アフィマー；ミクロボディ；アプタマー； $alterase$ ；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エピボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（ $armadillo repeat protein$ ）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボデ

10

20

30

40

50

イ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または合成分子。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および/または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz Mabs, 2011 May - Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0028】

いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、VHHなどの単一ドメイン抗体である標的化部分を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導するか、またはVHHは設計によるVHHであってもよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン(VHH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。

【0029】

ある実施形態では、CD8結合物質はVHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

【0030】

いくつかの実施形態では、VHHは、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、HUMABODY (Crescendo Biologics, Cambridge, UK)を含む。いくつかの実施形態では、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、HUMABODYは、一価、二価、または三価である。いくつかの実施形態では、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、HUMABODYは、単一特異性、二重特異性、または三重特異性などの単一特異性または多重特異性である。例示的な完全ヒトV_Hドメイン、例えば、HUMABODIESは、例えば、国際公開第2016/113555号および国際公開第2016/113557号に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0031】

いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHである標的化部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を意味する。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0032】

種々の実施形態では、CD8結合物質は、CDR1、CDR2、および/またはCDR3配列のうちの少なくとも1つを含む可変ドメインを有するVHHを含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、下記から選択される：
GRSFSSYTLA (配列番号12)；GRTFSSSYTMG (配列番号13)；GRTFSSSYIMG (配列番号14)；GRTFSSSYTMG (配列番号15)；GRTSGRTFSSSYTMG (配列番号16)；GRTFSSSYAMG (配列番号17)；GLTFSSNYIMG (配列番号18)；GRTFSSSYTMG (配列番号19)；GRTFSSD TMG (配列番号20)；GLTFSSNYIMG (配列番号21)；GFTLDY

10

20

30

40

50

Y G I G (配列番号 22); G H T F S S Y T M G (配列番号 23); G R T F S S Y V
I G (配列番号 24); G F A F D G Y A I G (配列番号 25); G F A F G F F D M T
(配列番号 26); G R T F S N Y V I G (配列番号 27); G S I F S I N V M G (配
列番号 28); G R T F S N Y N V G (配列番号 29); G H T F S S Y T M G (配列番
号 30); G R T F S T Y P V G (配列番号 31); G R T F S N Y A M G (配列番号 3
2); G R T F S D Y R M G (配列番号 33); G L T F S N Y I M A (配列番号 34)
; G R T F S N S V M G (配列番号 35); G R T F S S Y I I G (配列番号 36); G
R T F S S Y V M G (配列番号 37); G G T F S N Y V M G (配列番号 38); G R T
F S N Y G I G (配列番号 39); G F T F D D Y A I A (配列番号 40); G R T F S
S Y T V A (配列番号 41); G F P F D D Y A I A (配列番号 42); G R T F S S Y
V M G (配列番号 43); G R T L S S N P M A (配列番号 44); G F T F D N Y A I
G (配列番号 45); G R A F S S Y F M G (配列番号 46); T P T F S S Y N M G (配
列番号 47); G F T F D D Y A I A (配列番号 48); G G T F S G Y I M G (配列
番号 49); G R S F S S Y T I A (配列番号 50); G F S S D D Y T I G (配列番号
51); G F T F D D Y T I G (配列番号 52); G F S S D D Y T I G (配列番号 53
); G F T F D Q Y T I A (配列番号 54); G R T F S S Y A M A (配列番号 55);
G F A F D G Y A I G (配列番号 56); G F S S D D Y T I A (配列番号 57); G F
S S D D Y T I G (配列番号 58); G F T F D D Y T I G (配列番号 59); G F S S
D D Y T I G (配列番号 60); G F S S D D Y T I G (配列番号 61); G F S F D D
Y A I A (配列番号 62); G F S S D D Y T I G (配列番号 63); G F T G N D L A
I G (配列番号 64); G F S S D D Y T I A (配列番号 65); E G T L S S Y G I G
(配列番号 66); G F S S D D Y T I A (配列番号 67); G F T F D D Y A I A (配
列番号 68); G L S S D D Y T I G (配列番号 69); G L S S D D Y T I G (配列番
号 70); G F S S D D Y T I G (配列番号 71); G F S F D D Y T I G (配列番号 7
2); G F T F D D Y A I A (配列番号 73); G F T F D D Y A I G (配列番号 74)
; G F T F G D Y T I G (配列番号 75); E G T F S S Y G I G (配列番号 76); G
F S S D D Y T I G (配列番号 77); G V S I G D Y N I G (配列番号 78); G F T
F D D Y T I A (配列番号 79); G F T F D D Y T I A (配列番号 80)。

【0034】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、下記から選択される：

A S I T W G G G N T Y (配列番号 81); A A T V W T G A G T V (配列番号 82);
A A I G W S A D I T V (配列番号 83); A F I D W S G G G T Y (配列番号 84);
A T I T W G G G S T Y (配列番号 85); A A I S W S G G P T V (配列番号 86);
A A I T W G G G S T V (配列番号 87); A A I T W S G V S T V (配列番号 88);
G A I M W S G A F T H (配列番号 89); A A I T W G G G S T V (配列番号 90);
S C I S S S D R N T Y (配列番号 91); A F I D W S G G G T Y (配列番号 92);
A V I T W S G D S T Y (配列番号 93); A C I S S K D G S T Y (配列番号 94);
S G I N S I G G S T T (配列番号 95); A V V T W S G D S T Y (配列番号 96);
A K I T N F G I T S (配列番号 97); S F I S W I S D I T Y (配列番号 98); A
F I D W S G G G T Y (配列番号 99); A V I L W S G V S T Y (配列番号 100);
A A I V W S G G S T Y (配列番号 101); A A I S S S G Y H T Y (配列番号 102
); S C I S S P D G S T Y (配列番号 103); A A V L W S G V S T A (配列番号 1
04); V A I T W D G S A T T (配列番号 105); A A I G W N G G I T Y (配列番
号 106); G F I T W S G A S T Y (配列番号 107); A G I N W S G E S A D (配
列番号 108); S C I E R S D G S T Y (配列番号 109); S C I S N T D S S T Y
(配列番号 110); S C I S N T D S S T Y (配列番号 111); A Q I S W S A G S
I Y (配列番号 112); A G M S W N P G P A V (配列番号 113); S C I S R S D
G S T Y (配列番号 114); A N I G W T G D M T Y (配列番号 115); A A I I W
S G S M T Y (配列番号 116); S C I S N T D S S T Y (配列番号 117); A A N
T W S G G P T Y (配列番号 118); S C I S S D G S T G (配列番号 119); S C

YSSSDGSTG (配列番号120); SCISSDGSTG (配列番号121); G
 CIKSSDGTG (配列番号122); SCISNTDSSTY (配列番号123)
 ;AAIAWSAGSTY (配列番号124); SCISSKEGSTY (配列番号12
 5); SCISSSDGSTG (配列番号126); SCYSSRDGTG (配列番号
 127); SCISSDGSTG (配列番号128); SCYSSSDGSTG (配列番
 号129); SCFSSSDGSTG (配列番号130); SCISNTDSSTF (配
 列番号131); SCYSSSDGSTG (配列番号132); SCISNTDSSTY
 (配列番号133); SCISSSDGSTG (配列番号134); GGINWSGDS
 TD (配列番号135); SCFSSSDGSGAG (配列番号136); SCISNTD
 SSTY (配列番号137); SCFSTRDGNAG (配列番号138); SCFSS
 RDGSTG (配列番号139); SCFSSRDGSTG (配列番号140); SCI
 SSDGSTG (配列番号141); SCISNTDSSTY (配列番号142); SC
 ISSPDGSTY (配列番号143); SCYSSSDGNTG (配列番号144);
 GGINWSGDS TD (配列番号145); SCFSSSDGSTG (配列番号146
); SCISSGDGTTY (配列番号147); SCISSDGSTG (配列番号14
 8); SCISSDGSTG (配列番号149); およびSSISRSDGSTY (配列
 番号1221)。

【0035】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、下記から選択される：

AKGLRNSDWDLRRGYDY (配列番号150); ADQASVPPPYG
 SERYDIASPSEYDY (配列番号151); ANSRAYYSSSYDLGRL
 ASYDY (配列番号152); AAQRLGSVTDYTKYDY (配列番号153)
 ;ASVKVAGSGIDISGSRNYDY (配列番号154); AKRLDYSA
 TDKGVDLSDEYDY (配列番号155); AAGGSGRLRDLKVGQNY
 DY (配列番号156); ADSPPRTYSSGSVNLEDGSEYDY (配列番号
 157); VIPGRGSALPIDVGKSDYEY (配列番号158); AAGA
 SGRLRDLKVGQNYDY (配列番号159); ADGNVWSPPICGSAG
 PPPGGMDY (配列番号160); AAQRLGSVTDYTKYDY (配列番号1
 61); AIPPRAYS GGSYS LK DQSKYEY (配列番号162); ADGN
 VWSPPICSSAGPPPGGMDY (配列番号163); KSRSSYSNN (配
 列番号164); AMPPRAYTGRSVSLKDQSKYEY (配列番号165);
 LDTTGWGPPPYQY (配列番号166); AHPPDPSRGGEWRLQTP
 SEYDY (配列番号167); AAQRLGSVTDYTKYDY (配列番号168)
 ;VPRSHFTTAQDMGQDMGAPSWYEY (配列番号169); AVLIR
 YYSGGYQGLSDANEYDY (配列番号170); VVKYLSGSYSYAG
 QYNF (配列番号171); ADFNVWSPPICGSVGP PPGGMDY (配列
 番号172); AHESTYYS GTYYLTDP RRYVY (配列番号173); AV
 PARGLTMDLENSDIYDH (配列番号174); AATLQVTGSYYLD
 LSTVDIYDN (配列番号175); ATLFRSNGPKDLSSGYEYDY (配
 列番号176); AGESGVWVGGLDY (配列番号177); VGSANSGE
 FRFGWVLKPDLYNY (配列番号178); ADGNVWSPPICGSAGP
 PPGGMDY (配列番号179); ADGNVWSPPICGSAGPPPGGMDY
 (配列番号180); ERGYAYCSD DGCQRTQDYDY (配列番号181);
 GAARAWWSGSYDYTRMNNYDY (配列番号182); AETSADSGE
 FRFGWVLKPSLYDY (配列番号183); AAGSAYS GSYWNITMA
 ANYDY (配列番号184); AQRIFGAQPMDSLGDYEY (配列番号18
 5); ADGNVWSPPICGSAGPPPGGMDY (配列番号186); ARDY
 RGIKDLDLKGDYDY (配列番号187); ADFNVWSPPICGSIWY
 GPPPRGM DY (配列番号188); ADSNVWSPPICGSRWYGPPPG
 GMAY (配列番号189); ADFNVWSPPICGSNWYGPPPGGMDY (

10

20

30

40

50

配列番号190) ; A D F N V W S P P I C G S I W Y G P P P G G M D Y (配列番号191) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号192) ; A R I I T V A T M R L D S D Y D Y (配列番号193) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号194) ; A D S N V W S P P I C G R T W Y G P P P G G M D Y (配列番号195) ; A D F N V W S P P I C G S I W Y G P P P G G M A Y (配列番号196) ; A D F N V W S P P I C G S N W Y G P P P G G M D Y (配列番号197) ; A D F N V W S P P I C G S S W Y G P P P G G M D Y (配列番号198) ; A D F N V W S P P I C G S R W Y G P P P G G M E Y (配列番号199) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号200) ; A D F N V W S P P I C G S R W Y G P P P G G M A Y (配列番号201) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号202) ; A D S N V W S P P I C G K T W Y G P P P G G M D Y (配列番号203) ; A G E S G V W V G G L D Y (配列番号204) ; A D S N V W S P P I C G S T W Y G P P P G G M A Y (配列番号205) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号206) ; A D F N V W S P P I C G S R W Y G P P P G G M D Y (配列番号207) ; A D F N V W S P P I C G S R W Y G P P P G G M D Y (配列番号208) ; A D F N V W S P P I C G S R W Y G P P P G G M D Y (配列番号209) ; A D F N V W S P P I C G S I W Y G P P P G G M D Y (配列番号210) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号211) ; A D F N V W S P P I C G S V G P P P G G M D Y (配列番号212) ; A D F N V W S P P I C G S S W Y G P P P G G M A Y (配列番号213) ; A G E S G V W V G G L D Y (配列番号214) ; A D F N V W S P P I C G S S W Y G P P P G G M E Y (配列番号215) ; A D G N V W S P P I C G S A G P P P G G M D Y (配列番号216) ; A D F N V W S P P I C S S N W Y G P P P R G M D Y (配列番号217) ; A D F N V W S P P I C G S I W Y G P P P R G M D Y (配列番号218) 。

【0036】

種々の実施形態では、CD8結合物質は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

1CDA7 (配列番号219)

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

1CDA12 (配列番号220)

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

1CDA14 (配列番号221)

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

1CDA15 (配列番号222)

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

1CDA17 (配列番号223)

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

10

20

30

40

50

NTVY LQMNS LKPEDTAVYYCAASVKVVAGSGIDISGSRNY
DYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA18 (配列番号224)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRFTFS SYAMGWFRQA
PGKEREFVAAISWSGGPTVYADHVKGRFTISRDN AKNTVY
LQVNS LKPEDTADYYCAAKRLDYSATDKGV DLSDEYDYWG
QGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA19 (配列番号225)

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFSNYIMGWFRQA
PGKEREFVAAITWGGGSTVYADSV EGRFTISR DGTKN TVS
LQMNS L L PEDTAVYYCAAAGGSGRLRDLKVGQ NYDYWGQG
TQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

10

1CDA24 (配列番号226)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFS SYTMGWFRQA
PGREREFVAAITWSGVSTVYTDSVKGRFTVSRDN AKNTVY
LQMNS LKPEDTAVYYCAADSPPR TYSSGSVNLEDGSEYDY
WGQG TQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA26 (配列番号227)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFS SDTMGWFRQA
PGKEREFVGAIMWSGAFTHYADSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNA LKPEDTAVYYCAV I PGRGSALPIDVGKSDEY EYWG
QGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

20

1CDA28 (配列番号228)

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFSNYIMGWFRQA
PGKEREFVAAITWGGGSTVYADSV EGRFTISR DGTKN TVS
LQMNS LQPEDTAVYYCAAAGASGRLRDLKVGQ NYDYWGQG
TQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA37 (配列番号229)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTLDYYGIGWFRQA
PGKEREGVSCISSSDRNTYYADSVKGRFTISGDNA KNTVY
LQMNN LKPEDTAVYYCAADGNVWSPPICGSAGPPPGGMDY
WGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

30

1CDA43 (配列番号230)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGHTFS SYTMGWFRQA
PGKEREFVAFIDWSGGGTYYANSVKGRFTISRDN AENTVY
LQMNN LKPEDTAVYYCAAAQRLGSVTDYTKYDYWGQGTQV
TVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA45 (配列番号231)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFS SYVIGWFRQA
PGKEREFVAVITWSGDSTYSSDSLKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNA LNPEDTAVYYCAAIPPRAYS GGSYSLKDQSKY EYW
GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

40

1CDA47 (配列番号232)

QVQLQESGGGLVQAEGLKLSCISGFAFDGYAIGWFRQAP
GKEREGVACISSKDGSTYYADSVKGRFTMSVDKTKNTVYL
QMS S LKPEDTAVYYCAADGNVWSPPICSSAGPPPGGMDYW
GKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA48 (配列番号233)

QVQLQESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFAFGFFDMTWVRQA
PGKGLEWVSGINSIGGSTTYADSVKGRFTISRDN AKNELY

50

LQMNSLKPD DTA VYYCAKSRSSYSNNWRPPGQGTQVTVSS
AAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA58 (配列番号234)

QVQLQESGGGLVQARGSLTLSCAASGR TFSNYVIGWFRQA
PGEEREFVAVVTWSGDSTYSSDSLKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNNLNPE DTA VYYCAAMP PRA YTG RSVSLKDQSKYEYW
GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA65 (配列番号235)

QVQLQESGGGLVQP GGS LRLSCAASGSIFSINVMGWYRQT
PGKERELVAKITNFGITSYADSAQGRFTISRGN AKNTVYL
QMNSLKPE DTA VYYCNLD TTGWGPPPYQYWGQGTQVTVSS
AAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

10

1CDA68 (配列番号236)

QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCAASGR TFSNYNVWFRQA
PGKEREFVSFISWISDITYYSDSVKGRFIISRDN AKNMVY
LQMNSLKPE DTA VYYCAAHPPDP SRGGEWRLQTPSEYDYW
GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA73 (配列番号237)

QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGH TFS SYTMGWFRQA
PGKEREFVAFIDWSGGGTYYADSVKGRFTISRDN AENTVY
LQMNNLKPE DTA VYYCAAAQRLGSVTDYTKYDYWGQGTQV
TVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

20

1CDA75 (配列番号238)

QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGR TFS TYPVGWFRQA
PGKEREFVAVILWSGVSTYYADSVKGRFTISRDN AQNTVY
LQMDSLKPE DTA VYYCAVPRSHFTTAQDMGQDMGAPSWYE
YWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA86 (配列番号239)

QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGR TFSNYAMGWFRQA
PGKEREFVAAIVWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNSLKPE DTA VYYCAAVLIRYYSGGYQGLSDANEYDYW
GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

30

1CDA87 (配列番号240)

QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCSASGR TFS DYRMGWFRQA
PGKEREWVAAISSSGYHTYYADSVKGRFTISRDN AKNTGY
LQMSSLKPE DTA VYYCAVVKYLSGSYSYAGQYNFWGQGTQ
VTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA88 (配列番号241)

QVQLQESGGGLVQAGDSLKLSCAASGLTF S NYIMAWFRQA
PGKEREGVSCISSPDGSTYYADSVKGRFTISSDN AKNTVY
LQMNSLKPE DTA VYYCAADFNVWSP PICGSVGP PPGMDY
WGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

40

1CDA89 (配列番号242)

QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCAASGR TFS NSVMGWFRQP
PGKEREFVAAVLWSGVSTAYADSVKGRFTISRDN AKNTVY
LQMNNLKPD DTA VYYCAAHESTYYSGTY YLTDP RRYVYWG
QGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

1CDA92 (配列番号243)

QVQLQESGGGLVQAGGS LRLSCVGDGR TFS SYIIGWFRQA
PGNEREFVVAITWDGSATTYADSVKGRFTVSRDS AKNTAY

50

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

1 C D A 9 3 (配列番号 2 4 4)

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

2 C D A 1 (配列番号 2 4 5)

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

10

2 C D A 5 (配列番号 2 4 6)

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

2 C D A 2 2 (配列番号 2 4 7)

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

20

2 C D A 2 8 (配列番号 2 4 8)

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

2 C D A 6 2 (配列番号 2 4 9)

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

30

2 C D A 6 8 (配列番号 2 5 0)

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

2 C D A 7 3 (配列番号 2 5 1)

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

40

2 C D A 7 4 (配列番号 2 5 2)

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

2 C D A 7 4 (C 5 0 S) (配列番号 1 2 1 6)

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

50

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

2 C D A 7 5 (配列番号 2 5 3)

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

2 C D A 7 7 (配列番号 2 5 4)

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

10

2 C D A 8 1 (配列番号 2 5 5)

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

2 C D A 8 7 (配列番号 2 5 6)

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

20

2 C D A 8 8 (配列番号 2 5 7)

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

2 C D A 8 9 (配列番号 2 5 8)

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

30

2 C D A 9 1 (配列番号 2 5 9)

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

2 C D A 9 2 (配列番号 2 6 0)

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

40

2 C D A 9 3 (配列番号 2 6 1)

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

2 C D A 9 4 (配列番号 2 6 2)

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

50

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

2 C D A 9 5 (配列番号 2 6 3)

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

3 C D A 3 (配列番号 2 6 4)

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

10

3 C D A 8 (配列番号 2 6 5)

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

3 C D A 1 1 (配列番号 2 6 6)

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

20

3 C D A 1 8 (配列番号 2 6 7)

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

3 C D A 1 9 (配列番号 2 6 8)

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

30

3 C D A 2 1 (配列番号 2 6 9)

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

3 C D A 2 4 (配列番号 2 7 0)

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

40

3 C D A 2 8 (配列番号 2 7 1)

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

3 C D A 2 9 (配列番号 2 7 2)

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

50

LQMTSLKPEDTAVYYCAADSNVWSPPICGKTWYGP PPGGM
DYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA31 (配列番号273)

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAGSEGLSSYGIGWFRQA
PGKEREFVGGINWSGDS TDYADSVKGRFTISRDSA KNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAAGESGVWVGGLDYWGQGTQVTVS
SAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA32 (配列番号274)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSDDYTIAWFRRA
PGKEREGISCFSSSDGSAGYADSVKGRFTVSSDNA KNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADSNVWSPPICGSTWYGP PPGGM
AYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

10

3CDA33 (配列番号275)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCATSGFTFDDYAIWFRQA
PGKEREGVSCISNTDSSTYYADSVKGRFTISSDNA KNTVY
LQMSSSLKPEDTAVYYCAADGNVWSPPICGSAGPPPGMDY
WGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA37 (配列番号276)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGLSDDYTIGWFRQA
PGKEREGFSCFSTRDGNAGYADSVKGRFTISSDNA KNTVY
LQMNNLKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSRWYGP PPGGM
DYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

20

3CDA40 (配列番号277)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGLSDDYTIGWFRQA
PGKKREGFSCFSSRDGSTGYADSVKGRFTISSDNA KNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSRWYGP PPGGM
DYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA41 (配列番号278)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSDDYTIGWFRQA
PGKEREGFSCFSSRDGSTGYADSVKGRFTISSDNA KNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSRWYGP PPGGM
DYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

30

3CDA48 (配列番号279)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSFDDYTIGWFRQV
PGKEREGISCISSDGSTGYADSVKGRFTISSDNA KNTVYL
QINS LKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSIWYGP PPGMD
YWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA57 (配列番号280)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCATFGFTFDDYAIWFRQA
PGKEREGISCISSNTDSSTYYADSVKGRFTISSDNA KNTVH
LQMSSSLKPEDTAVYYCAADGNVWSPPICGSAGPPPGMDY
WGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

40

3CDA65 (配列番号281)

QVQLQESGGGLVQAGGSLXLSCAASGFTFDDYAIWFRQA
PGKEREGVSCISSPDGSTYYADSVKGRFTISSDNA KNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSVGP PPGMDY
WGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH ;

3CDA70 (配列番号282)

QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCKASGFTFGDYTIGWFRQA
PGKEREGISCYSSSDGNTGYADSVKGRFTISSDNA KNTVY

50

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

3 C D A 7 3 (配列番号 2 8 3)

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

3 C D A 8 3 (配列番号 2 8 4)

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

10

3 C D A 8 6 (配列番号 2 8 5)

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

3 C D A 8 8 (配列番号 2 8 6)

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

20

3 C D A 9 0 (配列番号 2 8 7)

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

【 0 0 3 7 】

種々の例示的实施形態では、C D 8 結合物質は、末端ヒスチジントグ配列（すなわち、H H H H H H : 配列番号 1 2 1 3 ）を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、末端 H A タグ（すなわち、Y P Y D V P D Y G S ; 配列番号 1 2 1 4 ）を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、A A A リンカーを含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジントグ配列（すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ; 配列番号 1 2 1 5 ）を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 4 1 】

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明の C D 8 結合物質の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、同族体およびオースログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、C D 8 結合物質のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【 0 0 4 2 】

種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つ

50

に少なくとも60%同一である配列を含む標的化部分を含む。例えば、CD8結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、約99%または約100%の配列同一性）である配列を含む標的化部分を含み得る。

10

20

【0043】

種々の実施形態では、CD8結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに関して1つまたは複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。種々の実施形態では、CD8結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに関して1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、または20個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および短縮化から独立に選択され得る。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、アミノ酸変異は、アミノ酸置換であり、保守的および/または非保守的置換を含み得る。

【0045】

「保守的置換」は、例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒特性における類似性に基づいて行われ得る。20種類の天然アミノ酸は、次の6つの標準的アミノ酸グループに分類できる：(1)疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr；Asn、Gln；(3)酸性：Asp、Glu；(4)塩基性：His、Lys、Arg；(5)鎖配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

【0046】

本明細書で使用される場合、「保守的置換」は、あるアミノ酸の、上記6つの標準的アミノ酸グループの同じグループ内に記載の別のアミノ酸による交換として定義される。例えば、AspのGluによる交換は、そのように改変されたポリペプチド中で1つの負電荷を保持する。さらに、グリシンおよびプロリンは、それらのヘリックスを破壊する能力に基づいて相互に置換され得る。

【0047】

本明細書で使用される場合、「非保守的置換」は、あるアミノ酸の、上記6つの標準的アミノ酸グループ(1)~(6)の異なるグループに記載の別のアミノ酸による交換とし

50

て定義される。

【0048】

種々の実施形態では、置換はまた、非古典的アミノ酸（例えば、セレノシステイン、ピロールリジン、N - ホルミルメチオニン - アラニン、GABAおよび - アミノレブリン酸、4 - アミノ安息香酸（PABA）、共通アミノ酸のD - 異性体、2, 4 - ジアミノ酪酸、 - アミノイソ酪酸、4 - アミノ酪酸、Abu、2 - アミノ酪酸、 - Abu、 - Ahx、6 - アミノヘキササン酸、Aib、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 - アラニン、フルオロアミノ酸、メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、C - メチルアミノ酸、N - メチルアミノ酸、および一般的にアミノ酸類似体）も含む。

10

【0049】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、標的化部分のCDR（例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域）中にあるてもよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、標的化部分のフレームワーク領域（FR）（例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域）中にあるてもよい。

【0050】

アミノ酸配列の改変は、任意の当該技術分野において、周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRベース変異誘発を用いて実現され得る。このような技術は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989に記載されている。

20

【0051】

種々の実施形態では、変異は、CD8に特異的に結合する本発明のCD8結合物質の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、CD8を機能的に調節することなくCD8に特異的に結合する本発明のCD8結合物質の能力を実質的に低下させない。

【0052】

種々の実施形態では、ヒトCD8 および/または 鎖の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび/または会合型を含む）に対する本発明のCD8結合物質の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付けられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、ヒトCD8 および/または 鎖の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび/または会合型を含む）に、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合する標的化部分を含む。

30

40

【0053】

種々の実施形態では、CD8結合物質は、目的の抗原、すなわち、CD8を結合するが機能的に調節しない標的化部分を含む。例えば、種々の実施形態では、CD8結合物質の標的化部分は、単に抗原を標的とするが、抗原を実質的に機能的に調節せず、例えばそれは実質的に、抗原が有する生物学的作用を阻害せず、低下させず、または中和しない。種々の実施形態では、CD8結合物質の標的化部分は、生物活性にとって重要な抗原部位（

50

例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

【 0 0 5 4 】

このような非機能調節（例えば、非中和）結合は、本発明の C D 8 結合物質が直接的にまたは間接的に活性免疫細胞をエフェクター抗原を介して必要な部位に動員するために用いられる方法を含む本発明の種々の実施形態で使用される。例えば、種々の実施形態では、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、本発明の C D 8 結合物質を使って、直接的または間接的に C D 8 を介して細胞傷害性 T 細胞を腫瘍細胞に動員し得る（例えば、C D 8 結合物質は、抗 C D 8 抗原認識ドメインを有する標的化部分および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有する標的化部分を含み得る）。このような実施形態では、直接的または間接的に C D 8 発現細胞傷害性 T 細胞を動員するが、C D 8 活性を中和しないのが望ましい。これらの実施形態では、C D 8 シグナル伝達は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く作用の重要な部分である。

10

【 0 0 5 5 】

本発明の C D 8 結合物質を含む治療薬

シグナル伝達物質とのキメラおよび融合体

種々の実施形態では、本発明の C D 8 結合物質は、1 種類または複数種類のシグナル伝達物質とのキメラまたは融合体の一部である。したがって、本発明は、例えば、C D 8 に対する標的化部分および 1 種類または複数種類のシグナル伝達物質を含むキメラまたは融合タンパク質を提供する。

【 0 0 5 6 】

20

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数のその受容体に対する低減された親和性または活性を有するように改変され、それによりキメラまたは融合タンパク質の活性の減弱化（アゴニズムまたはアンタゴニズムを含む）を可能にし、および / または非特異的シグナル伝達または望ましくない隔離を防止する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は野生型の形態で拮抗性であり、そのアンタゴニスト活性を弱める 1 つまたは複数の変異を有する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数の変異に起因して拮抗性であり、例えば、アゴニストシグナル伝達物質はアンタゴニストシグナル伝達物質に変換され、このような変換されたシグナル伝達物質は、場合により、そのアンタゴニスト活性を弱める 1 つまたは複数の変異も有する（例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号に記載のように、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。

30

【 0 0 5 7 】

したがって、種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数の改変（例えば、変異）を有する改変された（変異した）型のシグナル伝達物質である。種々の実施形態では、変異は改変シグナル伝達物質が、非変異型、すなわち、野生型形態のシグナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変（例えば、変異）形態での同じシグナル伝達物質を比較して）、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性のうちの 1 つまたは複数などの 1 つまたは複数の弱められた活性を有することを可能にする。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異を含む。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異とは異なる。結果として、種々の実施形態では、変異は、シグナル伝達物質が、非変異型、すなわち、野生型シグナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変（例えば、変異）形態での同じシグナル伝達物質を比較して）、向上した安全性、例えば、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にする。

40

【 0 0 5 8 】

本明細書に記載のように、物質は、1 つまたは複数の改変、例えば、変異により、向上した安全性を有し得る。種々の実施形態では、向上した安全性は、本キメラタンパク質がより低い毒性（例えば、全身性毒性および / または組織 / 器官関連毒性）；および / また

50

は低減されたまたは実質的に除去された副作用；および／または高められた耐容性、低減されたまたは実質的に除去された有害事象；および／または低減されたまたは実質的に除去された；および／または拡大された治療濃度域をもたらすことを意味する。

【 0 0 5 9 】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1つまたは複数のその受容体に対する結合親和性または活性を低減する1つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、受容体に対する結合親和性または活性を実質的に低減または除去する1つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、野生型シグナル伝達物質により与えられる活性は、受容体に対するアゴニズム（例えば、治療の部位での細胞効果の活性化）である。例えば、野生型シグナル伝達物質は、その受容体を活性化し得る。このような実施形態では、変異は、受容体に対する活性化作用を低減または除去するように改変されたシグナル伝達物質をもたらす。例えば、変異は、標的細胞に低減された活性化シグナルを送るように改変されたシグナル伝達物質をもたらし得る、または活性化シグナルが除去され得る。いくつかの実施形態では、野生型シグナル伝達物質により与えられる作用は、受容体に対するアンタゴニズム（例えば、治療の部位での細胞効果の遮断または抑制）である。例えば、野生型シグナル伝達物質は、受容体をアンタゴナイズするかあるいは阻害し得る。これらの実施形態では、変異は、受容体に対するアンタゴナイズ活性を低減または除去するように改変されたシグナル伝達物質をもたらす。例えば、変異は、標的細胞に低減された阻害シグナルを送るように改変されたシグナル伝達物質をもたらし得る、または阻害シグナルが除去され得る。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1つまたは複数の変異に起因して拮抗性であり、例えば、アゴニストシグナル伝達物質はアンタゴニストシグナル伝達物質に変換され（例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007520号に記載のように）、また、このような変換されたシグナル伝達物質は、場合により、1つまたは複数のその受容体に対するその結合親和性または活性を低減する、または1つまたは複数のその受容体に対する結合親和性または活性を実質的に低減または除去する1つまたは複数の変異も有する。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1つまたは複数の標的化部分（例えば、CD8に対する標的化部分）の結合により回復可能である。他の実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、1つまたは複数の標的化部分の活性により実質的に回復可能でない。

【 0 0 6 1 】

種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、それらのシグナル伝達物質が受容体に対する結合親和性または活性を弱めるまたは除去する変異を有するという理由で、オフターゲット効果を低減させる。種々の実施形態では、例えば、野生型シグナル伝達物質と比べて、副作用におけるこの低減が観察される。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、標的細胞に対し活性である。理由は、標的化部分（単数または複数）が、実質的な活性化に必要とされる欠損した／不十分な結合（例えば、限定されないが、および／または結合力）を補償するためである。種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、治療作用部位へ向かう途上では実質的に不活性であり、特異的に標的とされる細胞型に対してその効果を実質的に有し、これにより望ましくない副作用を大きく低減する。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、1つの受容体（すなわち、治療受容体）に対する結合または親和性を弱めるまたは低減させる1つまたは複数の変異および第2の受容体に対する結合または活性を実質的に低減または除去する1つまたは複数の変異を含み得る。このような実施形態では、これらの変異は、同じまたは異なる位置にあってよい（すなわち、同じ変異または複数の変異）。いくつかの実施形態では、1つの受容体に対し結合および／または活性を低減する変異（単数または複数）は、別の受容体に対し実質的に低減または除去する変異（単数または複数）とは異なる。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、１つの受容体に対し結合および／または活性を低減する変異（単数または複数）は、別の受容体に対し実質的に低減または除去する変異（単数または複数）と同じである。いくつかの実施形態では、本キメラタンパク質は、治療受容体に対し結合および／または活性を弱めし、したがってより制御されたオンターゲット治療効果（例えば、野生型シグナル伝達物質に比較して）を可能にする変異および、別の受容体に対する結合および／または活性を実質的に低減または除去し、したがって副作用を低減する（例えば、野生型シグナル伝達物質に比べて）変異の両方を有する改変シグナル伝達物質を有する。

【００６３】

いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、標的化部分（ＣＤ８に対する標的化部分または本明細書に記載の任意のその他の標的化部分）を用いて実質的に回復可能ではない。いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、標的化部分を用いて回復可能である。種々の実施形態では、第２の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、他の受容体により媒介される有害作用も防止し得る。あるいは、または加えて、他の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、治療作用部位から離れて治療キメラタンパク質を隔離するのを低減するかあるいは無くするので、治療効果を改善させる。例えば、いくつかの実施形態では、これは、他の受容体での損失を補償するための高用量の本発明のキメラタンパク質の必要性を無くする。このような投与量を低減する能力は、さらに副作用の可能性を低くする。

【００６４】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、１つまたは複数のその受容体に対し、シグナル伝達物質に、親和性、例えば、結合（例えば、 K_D ）および／または活性化（例えば、改変シグナル伝達物質がその受容体のアゴニストである場合、例えば、 K_A および／または EC_{50} として測定可能である）および／または阻害（例えば、改変シグナル伝達物質がその受容体のアンタゴニストである場合、例えば、 K_I および／または IC_{50} として測定可能である）を低減、実質的に低減、または除去する１つまたは複数の変異を含む。種々の実施形態では、免疫調節薬の受容体に対する低減された親和性は、活性の減弱化（アゴニズムまたはアンタゴニズムを含む）を可能にする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、野生型シグナル伝達物質に比較して、受容体に対する約１％、または約３％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、または約１０％～２０％、約２０％～４０％、約５０％、約４０％～６０％、約６０％～８０％、約８０％～１００％の親和性を有する。いくつかの実施形態では、結合親和性は、野生型シグナル伝達物質に比べて、少なくとも約２倍低い、約３倍低い、約４倍低い、約５倍低い、約６倍低い、約７倍低い、約８倍低い、約９倍低い、少なくとも約１０倍低い、少なくとも約１５倍低い、少なくとも約２０倍低い、少なくとも約２５倍低い、少なくとも約３０倍低い、少なくとも約３５倍低い、少なくとも約４０倍低い、少なくとも約４５倍低い、少なくとも約５０倍低い、少なくとも約１００倍低い、少なくとも約１５０倍低い、または約１０～５０倍低い、約５０～１００倍低い、約１００～１５０倍低い、約１５０～２００倍低い、または２００倍超低い。

【００６５】

改変シグナル伝達物質が１つの受容体に対し結合を低減しかつ第２の受容体に対し結合を実質的に低減または除去する変異を有するいくつかの実施形態では、１つの受容体に対する改変シグナル伝達物質の結合親和性の減弱または低減は、他の受容体に対する親和性の実質的な低減または除去より小さい。いくつかの実施形態では、１つの受容体に対する改変シグナル伝達物質の結合親和性の減弱または低減は、他の受容体に対する親和性の実質的な低減または除去よりも、約１％、または約３％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％だけ小さい。種々の実施形態では、実質的な低減または除去は、減弱または低減よりも大きい結合親和性および／または活性の低減を指す。

【 0 0 6 6 】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、例えば、野生型シグナル伝達物質に比べて、シグナル伝達物質の内在性活性を、約 75 %、または約 70 %、または約 60 %、または約 50 %、または約 40 %、または約 30 %、または約 25 %、または約 20 %、または約 10 %、または約 5 %、または約 3 %、または約 1 % に低減する 1 つまたは複数の変異を含む。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達物質が、その受容体に対する標的化部分の結合親和性より低い、その受容体に対する低減された親和性を有するようにさせる 1 つまたは複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、この結合親和性の差異は、同じ細胞上のシグナル伝達物質 / 受容体と標的化部分 / 受容体との間に存在する。いくつかの実施形態では、この結合親和性の差異は、シグナル伝達物質、例えば、変異シグナル伝達物質が、局在化されたオンターゲット効果を有し、かつ野生型シグナル伝達物質で観察される副作用の根底にあるオフターゲット効果を最小化するのを可能にする。いくつかの実施形態では、この結合親和性は、少なくとも約 2 倍、または少なくとも約 5 倍、または少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 15 倍低い、または少なくとも約 25 倍、または少なくとも約 50 倍低い、または少なくとも約 100 倍、または少なくとも約 150 倍低い。

【 0 0 6 8 】

受容体結合活性は、当該技術分野において既知の方法を使用して測定され得る。例えば、親和性および / または結合活性は、スキャッチャードプロット分析および結合データのコンピューターフィッティング（例えば、Scatchard, 1949）または Brechtら（1993）により記載のように、フロースルー条件下で反射型干渉分光法により評価し得る。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 9 】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、免疫調節薬、例えば、インターロイキン、インターフェロン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数である。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、インターロイキンまたは改変インターロイキンであり、例えば、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36 またはそのフラグメント、バリエーション、類似体、またはファミリーメンバーを含む。インターロイキンは、リンパ球、単球、およびマクロファージにより合成される多機能サイトカイン群である。既知の機能は、免疫細胞（例えば、ヘルパー T 細胞、B 細胞、好酸球、およびリンパ球）の増殖の刺激、好中球および T リンパ球の遊走作用、および / またはインターフェロンの阻害を含む。インターロイキン活性は、当該技術分野において既知のアッセイを使用して測定できる（Matthews et al., in Lymphokines and Interferons: A Practical Approach, Clemens et al., eds, IRL Press, Washington, D.C. 1987, pp. 221 - 225; and Orencole & Dinarello (1989) Cytokine 1, 14 - 20）。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、インターフェロンまたはインターフェロン I、II、および III 型などの改変型のインターフェロンである。インターフェロンの例としては、例えば、インターフェロン - 1、2、4、5、6、7、8、10、13、14、16、17、および 21、インターフェロン およびインターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、およびインターフェロン

が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、腫瘍壊死因子 (T N F) または腫瘍壊死因子 (T N F) の改変型または T N F ファミリーのタンパク質であり、限定されないが、 T N F 、 T N F 、 L T 、 C D 4 0 L 、 C D 2 7 L 、 C D 3 0 L 、 F A S L 、 4 - 1 B B L 、 O X 4 0 L 、 および T R A I L を含む。

【 0 0 7 3 】

本明細書に記載の野生型シグナル伝達物質のアミノ酸配列は、当該技術分野において、周知である。したがって、種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質の既知の野生型アミノ酸配列との少なくとも約 6 0 %、または少なくとも約 6 1 %、または少なくとも約 6 2 %、または少なくとも約 6 3 %、または少なくとも約 6 4 %、または少なくとも約 6 5 %、または少なくとも約 6 6 %、または少なくとも約 6 7 %、または少なくとも約 6 8 %、または少なくとも約 6 9 %、または少なくとも約 7 0 %、または少なくとも約 7 1 %、または少なくとも約 7 2 %、または少なくとも約 7 3 %、または少なくとも約 7 4 %、または少なくとも約 7 5 %、または少なくとも約 7 6 %、または少なくとも約 7 7 %、または少なくとも約 7 8 %、または少なくとも約 7 9 %、または少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 1 %、または少なくとも約 8 2 %、または少なくとも約 8 3 %、または少なくとも約 8 4 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 8 6 %、または少なくとも約 8 7 %、または少なくとも約 8 8 %、または少なくとも約 8 9 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 1 %、または少なくとも約 9 2 %、または少なくとも約 9 3 %、または少なくとも約 9 4 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 6 %、または少なくとも約 9 7 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性 (例えば、約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、または約 9 9 % の配列同一性) を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 7 4 】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質のうちのいずれかのアミノ酸配列との少なくとも約 6 0 %、または少なくとも約 6 1 %、または少なくとも約 6 2 %、または少なくとも約 6 3 %、または少なくとも約 6 4 %、または少なくとも約 6 5 %、または少なくとも約 6 6 %、または少なくとも約 6 7 %、または少なくとも約 6 8 %、または少なくとも約 6 9 %、または少なくとも約 7 0 %、または少なくとも約 7 1 %、または少なくとも約 7 2 %、または少なくとも約 7 3 %、または少なくとも約 7 4 %、または少なくとも約 7 5 %、または少なくとも約 7 6 %、または少なくとも約 7 7 %、または少なくとも約 7 8 %、または少なくとも約 7 9 %、または少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 1 %、または少なくとも約 8 2 %、または少なくとも約 8 3 %、または少なくとも約 8 4 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 8 6 %、または少なくとも約 8 7 %、または少なくとも約 8 8 %、または少なくとも約 8 9 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 1 %、または少なくとも約 9 2 %、または少なくとも約 9 3 %、または少なくとも約 9 4 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 6 %、または少なくとも約 9 7 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性 (例えば、約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約

10

20

30

40

50

72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0075】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1つまたは複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および短縮化から独立に選択され得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸変異はアミノ酸置換であり、本明細書の他の場所で記載のように、保存的置換および/または非保存的置換を含み得る。種々の実施形態では、本明細書の他の場所で記載のように、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。

10

【0076】

本明細書に記載のように、改変シグナル伝達物質は、1つまたは複数の受容体に対し親和性および/または活性に影響を与える変異を有する。種々の実施形態では、治療受容体、例えば、それにより目的の治療効果が媒介される（例えば、アゴニズムまたはアンタゴニズム）受容体に対する低減された親和性および/または活性が存在する。種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、受容体、例えば、それにより目的の治療効果が媒介されない（例えば、結合の混乱状態の結果として）受容体に対する親和性および/または活性が実質的に低減または除去される変異を有する。改変シグナル伝達物質の受容体、例えば、本明細書に記載のサイトカイン、成長因子、およびホルモンのうちの1つの受容体は当技術分野において既知である。

20

【0077】

受容体に対し低減された親和性および/または活性（例えば、アゴニスト活性）をもたらす変異の例は、国際公開第2013/107791号および国際出願第PCT/EP2017/061544号（例えば、インターフェロンに関して）、国際公開第2015/007542号（例えば、インターロイキンに関して）、および国際公開第2015/007903号（例えば、TNFに関して）で見出され、これらのそれぞれの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。治療受容体に対する親和性および/または活性（例えば、アンタゴニスト活性）を低減する変異の例は、国際公開第2015/007520号で見出され、この全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0078】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達物質のI型サイトカイン受容体、II型サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーの受容体、TGFベータ受容体、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーの受容体、および/またはチロシンキナーゼスーパーファミリーの受容体に対する親和性および/または活性を低減させる1つまたは複数の変異を含む。

【0079】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、I型サイトカイン受容体である。I型サイトカイン受容体は当技術分野において既知であり、限定されないが、IL2（ベータサブユニット）、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL9、IL11、IL12、GM-CSF、G-CSF、LIF、CNTFに対する受容体、および同様に、トロンボポエチン（TPO）、プロラクチン、および成長ホルモンに対する受容体が挙げられる。例示I型サイトカイン受容体としては、限定されないが、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、LIF受容体、CNTF受容体、TPO受容体、およびI型IL受容体が挙げられる。

40

【0080】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、II型サイトカイン受容体である。II型サイトカイン受容体は、異種のサブユニットからなる多量体受容体であり

50

、主にインターフェロンに対する受容体である。この受容体ファミリーは、限定されないが、インターフェロン、インターフェロン およびインターフェロン、IL10、IL22、および組織因子に対する受容体を含む。例示II型サイトカイン受容体としては、限定されないが、IFN受容体（例えば、IFNAR1およびIFNAR2）、IFN受容体、IFN受容体（例えば、IFNGR1およびIFNGR2）、およびII型IL受容体が挙げられる。

【0081】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、Gタンパク質共役受容体である。ケモカイン受容体は、7回膜貫通型構造を有し、シグナル伝達のためにGタンパク質に結合されるGタンパク質共役受容体である。ケモカイン受容体としては、限定されないが、CCケモカイン受容体、CXCKケモカイン受容体、CX3CKケモカイン受容体、およびXCケモカイン受容体（XCR1）が挙げられる。代表的ケモカイン受容体としては、限定されないが、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR3B、CXCR4、CXCR5、CSCR6、CXCR7、XCR1、およびCX3CR1が挙げられる。

【0082】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、TNFRファミリーメンバーである。腫瘍壊死因子受容体（TNFR）ファミリーメンバーは、細長い分子を作成するCXXCXXCのコアモチーフを取り囲む3つのジスルフィド結合から形成されるシステインリッチドメイン（CRD）を共有する。代表的腫瘍壊死因子受容体ファミリーとしては、下記が挙げられる：CD120a（TNFRSF1A）、CD120b（TNFRSF1B）、リンホトキシンベータ受容体（LTBR、TNFRSF3）、CD134（TNFRSF4）、CD40（CD40、TNFRSF5）、FAS（FAS、TNFRSF6）、TNFRSF6B（TNFRSF6B）、CD27（CD27、TNFRSF7）、CD30（TNFRSF8）、CD137（TNFRSF9）、TNFRSF10A（TNFRSF10A）、TNFRSF10B、（TNFRSF10B）、TNFRSF10C（TNFRSF10C）、TNFRSF10D（TNFRSF10D）、RANK（TNFRSF11A）、破骨細胞分化抑制因子（TNFRSF11B）、TNFRSF12A（TNFRSF12A）、TNFRSF13B（TNFRSF13B）、TNFRSF13C（TNFRSF13C）、TNFRSF14（TNFRSF14）、神経成長因子受容体（NGFR、TNFRSF16）、TNFRSF17（TNFRSF17）、TNFRSF18（TNFRSF18）、TNFRSF19（TNFRSF19）、TNFRSF21（TNFRSF21）、およびTNFRSF25（TNFRSF25）。ある実施形態では、TNFRファミリーメンバーは、CD120a（TNFRSF1A）またはTNF-R1である。別の実施形態では、TNFRファミリーメンバーは、CD120b（TNFRSF1B）またはTNF-R2である。

【0083】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、TGFベータ受容体である。TGFベータ受容体は、1回膜貫通型セリン/トレオニンキナーゼ受容体である。TGFベータ受容体としては、限定されないが、TGFBR1、TGFBR2、およびTGFBR3が挙げられる。

【0084】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、Igスーパーファミリー受容体である。免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーの受容体は、免疫グロブリンとの構造的相同性を共有する。Igスーパーファミリーの受容体としては、限定されないが、インターロイキン-1受容体、CSF-1R、PDGFR（例えば、PDGFRAおよびPDGFRB）、およびSCFRが挙げられる。

【0085】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、チロシンキナーゼスーパー

10

20

30

40

50

ファミリー受容体である。チロシンキナーゼチロシンキナーゼスーパーファミリーの受容体は、当該技術分野において周知である。20のサブファミリーに分類される約58個の受容体チロシンキナーゼ(RTK)が存在する。チロシンキナーゼスーパーファミリーの受容体としては、限定されないが、FGFR受容体およびそれらの種々のアイソフォーム、例えば、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、およびFGFR5が挙げられる。

【0086】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターフェロン である。このような実施形態では、改変IFN 物質は、IFN / 受容体(IFNAR)、すなわち、IFNAR1および/またはIFNAR2鎖に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変IFN 物質は、IFN / 受容体(IFNAR)、すなわち、IFNAR1および/またはIFNAR2鎖に対し、実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

10

【0087】

変異型のインターフェロン は、当業者に既知である。ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、IFN 2a(配列番号288)のアミノ酸配列を有するアレル型IFN 2aである。

【0088】

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、IFN 2b(配列番号289)のアミノ酸配列(これはアミノ酸位置23でIFN 2aと異なる)を有するアレル型のIFN 2bである。

20

【0089】

いくつかの実施形態では、上記IFN 2変異体(IFN 2aまたはIFN 2b)は、位置144~154、例えば、アミノ酸位置148、149および/または153に、1つまたは複数のアミノ酸の変異が導入されている。いくつかの実施形態では、IFN 2変異体は、L153A、R149A、およびM148Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。このような変異体は、例えば、国際公開第2013/107791号およびPiehlerら、(2000)J. Biol. Chem., 275:40425-33に記載されている。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0090】

いくつかの実施形態では、IFN 2変異体は、IFNAR1に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、国際公開第2010/030671号に記載のように、IFN 2変異体は、F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A、およびY89Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0091】

いくつかの実施形態では、国際公開第2008/124086号に記載のように、IFN 2変異体は、K133A、R144A、R149A、およびL153Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0092】

いくつかの実施形態では、国際公開第2015/007520号および国際公開第2010/030671号に記載のように、IFN 2変異体は、R120EおよびR120E/K121Eから選択される1つまたは複数の変異を含む。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、上記IFN 2変異体は、野生型IFN 2活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、上記変異体IFN 2は、IFNAR1に対する低減された親和性および/または活性を有するが、IFNAR2に対する活性は保持される。

【0093】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN 2変異体は、(1)R120EおよびR120

50

E / K 1 2 1 E から選択される 1 つまたは複数の変異（理論に束縛されることを望むものではないが、これらはアンタゴニスト効果を作り出す）、および（2）K 1 3 3 A、R 1 4 4 A、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A から選択される 1 つまたは複数の変異（理論に束縛されることを望むものではないが、これらは、例えば、I F N A R 2 に対する減弱化効果を可能とする）を含む。ある実施形態では、ヒト I F N 2 変異体は、R 1 2 0 E および L 1 5 3 A を含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、ヒト I F N 2 変異体は、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号に開示のように、L 1 5 A、A 1 9 W、R 2 2 A、R 2 3 A、L 2 6 A、F 2 7 A、L 3 0 A、L 3 0 V、K 3 1 A、D 3 2 A、R 3 3 K、R 3 3 A、R 3 3 Q、H 3 4 A、D 3 5 A、Q 4 0 A、D 1 1 4 R、L 1 1 7 A、R 1 2 0 A、R 1 2 5 A、K 1 3 4 A、R 1 4 4 A、A 1 4 5 G、A 1 4 5 M、M 1 4 8 A、R 1 4 9 A、S 1 5 2 A、L 1 5 3 A、および N 1 5 6 A から選択される 1 つまたは複数の変異を含み、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 H 5 7 Y、E 5 8 N、Q 6 1 S、および / または L 3 0 A を含む。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 H 5 7 Y、E 5 8 N、Q 6 1 S、および / または R 3 3 A を含む。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 H 5 7 Y、E 5 8 N、Q 6 1 S、および / または M 1 4 8 A を含む。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 H 5 7 Y、E 5 8 N、Q 6 1 S、および / または L 1 5 3 A を含む。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 N 6 5 A、L 8 0 A、Y 8 5 A、および / または Y 8 9 A を含む。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 N 6 5 A、L 8 0 A、Y 8 5 A、Y 8 9 A および / または D 1 1 4 A を含む。

【0095】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターフェロン である。このような実施形態では、改変インターフェロン 物質は、I F N / 受容体（I F N A R）、すなわち、I F N A R 1 および / または I F N A R 2 鎖に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変 I F N 物質は、I F N / 受容体（I F N A R）、すなわち、I F N A R 1 および / または I F N A R 2 鎖に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【0096】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I F N である。種々の実施形態では、I F N は、官能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスバリエント、または I F N のフラグメントを包含する。種々の実施形態では、I F N は、任意の種由来の I F N を包含する。ある実施形態では、キメラタンパク質は、改変型のマウス I F N を含む。ある実施形態では、キメラタンパク質は、改変型のヒト I F N を含む。ヒト I F N は、1 6 6 個のアミノ酸残基を含む約 2 2 k D a の分子量を有するポリペプチドである。ヒト I F N のアミノ酸配列は、配列番号 2 9 0 である。

【0097】

いくつかの実施形態では、ヒト I F N は、ヒト I F N のグリコシル化型である I F N 1 a である。いくつかの実施形態では、I F N は、M e t - 1 欠失および C y s - 1 7 の S e r への変異を有する非グリコシル化型のヒト I F N である I F N 1 b である。

【0098】

種々の実施形態では、改変 I F N は、I F N A R の I F N A R 1 サブユニットに対するその結合または親和性を低減する 1 つまたは複数の変異を有する。一実施形態では、改変 I F N は、I F N A R 1 に対する低減された親和性および / または活性を有する。種

10

20

30

40

50

々の実施形態では、改変 I F N は、ヒト I F N であり、位置 F 6 7、R 7 1、L 8 8、Y 9 2、I 9 5、N 9 6、K 1 2 3、および R 1 2 4 に 1 つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の変異は、F 6 7 G、F 6 7 S、R 7 1 A、L 8 8 G、L 8 8 S、Y 9 2 G、Y 9 2 S、I 9 5 A、N 9 6 G、K 1 2 3 G、および R 1 2 4 G から選択される置換である。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、K 1 2 3 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G および R 7 1 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 8 8 G および Y 9 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、Y 9 2 G、I 9 5 A、および N 9 6 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、K 1 2 3 G および R 1 2 4 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G、L 8 8 G、および Y 9 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 S、L 8 8 S、および Y 9 2 S 変異を含む。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、改変 I F N は、I F N A R の I F N A R 2 サブユニットに対するその結合または親和性を低減する 1 つまたは複数の変異を有する。一実施形態では、改変 I F N は、I F N A R 2 に対する低減された親和性および / または活性を有する。種々の実施形態では、改変 I F N は、ヒト I F N であり、位置 W 2 2、R 2 7、L 3 2、R 3 5、V 1 4 8、L 1 5 1、R 1 5 2、および Y 1 5 5 に 1 つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の変異は、W 2 2 G、R 2 7 G、L 3 2 A、L 3 2 G、R 3 5 A、R 3 5 G、V 1 4 8 G、L 1 5 1 G、R 1 5 2 A、R 1 5 2 G、および Y 1 5 5 G から選択される置換である。ある実施形態では、改変 I F N は、W 2 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 3 2 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 3 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 3 5 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 3 5 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、V 1 4 8 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 1 5 2 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 1 5 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、Y 1 5 5 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、W 2 2 G および R 2 7 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 3 2 A および R 3 5 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 1 5 1 G および R 1 5 2 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、V 1 4 8 G および R 1 5 2 A 変異を含む。

20

30

【0100】

いくつかの実施形態では、改変 I F N は、1 つまたは複数の次の変異を有する：R 3 5 A、R 3 5 T、E 4 2 K、M 6 2 I、G 7 8 S、A 1 4 1 Y、A 1 4 2 T、E 1 4 9 K、および R 1 5 2 H。いくつかの実施形態では、改変 I F N は、1 つまたは複数の次の変異を有する：C 1 7 S または C 1 7 A と組み合わせた、R 3 5 A、R 3 5 T、E 4 2 K、M 6 2 I、G 7 8 S、A 1 4 1 Y、A 1 4 2 T、E 1 4 9 K、および R 1 5 2 H。

【0101】

いくつかの実施形態では、改変 I F N は、1 つまたは複数の次の変異を有する：本明細書で記載の他の I F N 変異と組み合わせた、R 3 5 A、R 3 5 T、E 4 2 K、M 6 2 I、G 7 8 S、A 1 4 1 Y、A 1 4 2 T、E 1 4 9 K、および R 1 5 2 H。

40

【0102】

ヒト I F N の結晶構造は既知であり、Karpusas et al., (1998) PNAS, 94(22): 11813 - 11818 に記載されている。特に、ヒト I F N の構造は、5 つのヘリックス (すなわち、A、B、C、D、および E) およびこれらのヘリックスを連結する 4 つのループ領域 (すなわち、AB、BC、CD、および DE ループ) を含むことが示された。種々の実施形態では、改変 I F N は、A、B、C、D、E ヘリックスおよび / または AB、BC、CD、および DE ループ中に、I F N A R などの治療受容体に対するその結合親和性または活性を低減させる 1 つまたは複数の変異を有する。代表的変異は、国際公開第 2000/023114 号および米国特許出願公開第 2

50

0150011732号に記載されている。これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置15、16、18、19、22、および/または23にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置28~30、32、および33にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置36、37、39、および42にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置64および67にアラニン置換を含み、位置68にセリン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置71~73にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置92、96、99、および100にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置128、130、131、および134にアラニン置換を含むヒトIFN である。代表的実施形態では、改変IFN は、アミノ酸位置149、153、156、および159にアラニン置換を含むヒトIFN である。いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびW22での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびR27での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびW22での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにR27での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0105】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびL32での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

30

【0106】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびR35での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0107】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびL32での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにR35での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

40

【0108】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびF67での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0109】

いくつかの実施形態では、変異体IFN は、配列番号290およびR71での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

50

50

ソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＫ１２３での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＲ１２４での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

【０１２０】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＫ１２３での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにＲ１２４での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＬ１５１での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

【０１２２】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＲ１５２での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＬ１５１での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにＲ１５２での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

30

【０１２４】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＶ１４８での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、およびメチオニン（Ｍ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＶ１４８での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにＲ１５２での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

40

【０１２６】

いくつかの実施形態では、変異体ＩＦＮ は、配列番号２９０およびＲ１５５での変異を含み、変異は、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、ロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、メチオニン（Ｍ）、およびバリン（Ｖ）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、（ａ）配列番号２９０のアミノ酸配列および位置Ｗ２２に変異を有し、変異は脂肪族疎水性残基である改変ＩＦＮ ；および（ｂ）１つまたは複数の標的化部分を含むキメラタンパク質に関し、上記標的化部分は、目的の抗原ま

50

たは受容体（例えば、CD8）に特異的に結合する認識ドメインを含み、改変IFN および標的化部分は、任意に1つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい。種々の実施形態では、位置W22の変異は、G、A、L、I、M、およびVから選択される脂肪族疎水性残基である。種々の実施形態では、位置W22の変異はGである。

【0128】

追加の代表的IFN 変異体は、国際出願第PCT/EP2017/061544号で提供される。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0129】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターフェロン である。このような実施形態では、改変インターフェロン 物質は、インターフェロンガンマ受容体（IFNGR）、すなわち、IFNGR1および/またはIFNGR2鎖に対し、低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変インターフェロン 物質は、インターフェロンガンマ受容体（IFNGR）、すなわち、IFNGR1および/またはIFNGR2鎖に対し、実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0130】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である。VEGFは、生理学的であるが病的でもある血管新生において重要な役割を果たし、血管透過性を調節し、VEGF受容体を発現する細胞に対して成長因子として作用できる、強力な成長因子である。さらなる機能は、特に、マクロファージ系統および内皮細胞の細胞遊走の刺激を含む。少なくとも3個の受容体（VEGFR1、VEGFR2およびVEGFR3）に加えて、VEGF成長因子ファミリーのいくつかのメンバーが存在する。VEGFファミリーのメンバーは、2種以上のVEGFRタイプを結合し活性化できる。例えば、VEGF-Aは、VEGFR1およびVEGFR2を結合し、一方、VEGF-Cは、VEGFR2およびVEGFR3を結合できる。VEGFR1およびVEGFR2活性化は、血管新生を調節し、VEGFR3活性化は、リンパ脈管新生に關与する。大部分の血管新生促進シグナルは、VEGFR2の活性化から生成される。VEGFR1活性化は、血管新生の負の役割と關連する可能性があることが報告された。VEGFR1シグナル伝達は、腫瘍の骨髄由来VEGFR1陽性細胞を介したインビボ進行にも重要である（骨中の転移前微小環境の形成の一因となる）ことも報告された。治療抗体を指向する/治療抗体を中和するVEGF-Aをベースにしたいくつかの治療法が、主に、血管新生に依存する種々のヒト腫瘍の治療での使用のために開発されてきた。しかし、これらは、副作用がないわけではない。これは、これらが一般的な非細胞/組織特異的VEGF/VEGFR相互作用阻害剤として作用することを考慮すると驚くべきことではない。従って、特定の標的細胞（例えば、腫瘍血管系内皮細胞）に対するVEGF（例えば、VEGF-A）/VEGFR2阻害を制限することが望ましいであろう。

【0131】

いくつかの実施形態では、VEGFは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはVEGF-EおよびVEGF₁₂₁、VEGF_{121b}、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₈₉、およびVEGF₂₀₆などの種々のVEGF-Aのアイソフォームを含むこれらのアイソフォームである。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-1（Flt-1）および/またはVEGFR-2（KDR/Flk-1）に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-1（Flt-1）および/またはVEGFR-2（KDR/Flk-1）に対する低減または除去された親和性および/または活性を有する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-2（KDR/Flk-1）に対する低減された親和性および/または活性を有し、および/またはVEGFR-1（Flt-1）に対する低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷治癒方法または虚血關連疾患の治療で使用される（理論に束縛されることを意図するものではないが、内皮細胞

10

20

30

40

50

機能および血管新生に対する V E G F R 2 の効果により媒介されて)。種々の実施形態では、癌および炎症促進性活性と関連する V E G F R - 1 (F l t - 1) への結合が回避される。種々の実施形態では、V E G F R - 1 (F l t - 1) は、デコイ受容体として機能し、そのため、この受容体に対する親和性を実質的に低減または除去し、治療薬の隔離を回避する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 1 (F l t - 1) に対する低減または除去された親和性および/または活性を有し、および/または V E G F R - 2 (K D R / F l k - 1) に対する低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R 3 に対する低減された親和性および/または活性を有する。あるいは、改変シグナル伝達物質は、V E G F R 3 に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

10

【 0 1 3 2 】

血管新生促進治療法はまた、種々の疾患（例えば、虚血性心疾患、出血など）に重要であり、V E G F ベース治療薬を含む。V E G F R 2 の活性化は血管新生促進性である（内皮細胞上で作用する）。V E G F R 1 は、炎症細胞（例えば、マクロファージを含む）の遊走の刺激を生じ、血管過多透過性に関連する炎症をもたらす得る。V E G F R 1 の活性化はまた、腫瘍微小環境形成に関連する骨髄を活性化できる。従って、V E G F R 2 活性化に対し選択性がある V E G F ベース治療薬は、この場合には望ましいであろう。さらに、例えば、内皮細胞を特異的に標的とする細胞が望ましいであろう。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 2 に対する低減された親和性および/または活性（例えば、拮抗的な）を有し、および/または V E G F R - 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。腫瘍内皮細胞マーカー（例えば、P S M A など）に結合する標的化部分を介して腫瘍血管系内皮細胞を標的にする場合、このような構築物は、このようなマーカー陽性細胞上で特異的に V E G F R 2 活性化を阻害するが、標的細胞へ向かう途上および標的細胞上では（活性が除去された場合）V E G F R 1 を活性化せず、従って、例えば、炎症反応の誘導を無くする。これは、V E G F - A 中和療法に比べて、多くの腫瘍型に対するより選択的で安全な抗血管新生薬療法を提供することになる。

20

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 2 に対する低減された親和性および/または活性（例えば、アゴニスト活性）を有し、および/または V E G F R - 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。血管内皮細胞への標的化により、いくつかの実施形態では、このような構築物は、V E G F R 1 が関連する炎症反応誘導を生じることなく、血管新生を促進する。従って、このような構築物は、V E G F R 2 ならびに V E G F R 1 の全身性活性化に起因する副作用の実質的に低減されたりリスクを有する、標的化血管新生促進効果を有するであろう。

30

【 0 1 3 5 】

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号 2 9 1 のアミノ酸を有する V E G F ₁₆₅ である。

【 0 1 3 6 】

別の例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号 2 9 2 のアミノ酸配列を有する V E G F _{165b} である。

40

【 0 1 3 7 】

これらの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸 I 8 3 に変異を有する（例えば、I 8 3 での置換変異、例えば、I 8 3 K、I 8 3 R、または I 8 3 H）。理論に束縛されることを意図するものではないが、このような変異は、低減された受容体結合親和性を生じ得ると考えられている。例えば、米国特許第 9, 0 7 8, 8 6 0 号を参照されたい。この全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 3 8 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は T N F である。T N F は、細胞増殖、分

50

化、アポトーシス、腫瘍形成、ウイルス複製、自己免疫、免疫細胞機能および輸送、炎症、ならびに敗血性ショックの調節を含む、多くの多様な機能を有する多面的サイトカインである。それは、標的細胞：TNFR1 (p55) およびTNFR2 (p75) 上の2つの別々の膜受容体に結合する。TNFR1は非常に広範な発現パターンを示すが、TNFR2はリンパ球、Treg、内皮細胞、特定のニューロン、ミクログリア、心筋細胞および間葉系幹細胞の特定の集団上で選択的に発現される。受容体活性化にตอบสนองして、全く別々の生物学的経路が活性化されるが、若干の重なり合いも存在する。一般原則として、理論に束縛されることを望むものではないが、TNFR1シグナル伝達はアポトーシス(細胞死)の誘導に関連し、TNFR2シグナル伝達は細胞生存シグナルの活性化に関連する(例えば、NF- κ B経路の活性化)。TNFの投与は、全身的毒性であり、これは主にTNFR1の関与のためである。しかし、TNFR2の活性化もまた、TNFR1と同様に、多様な作用に関連し、TNF系治療薬の開発においては、TNF標的化および活性に対する制御が重要であることに留意されたい。

10

【0139】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR1および/またはTNFR2に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR1および/またはTNFR2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。TNFR1はほとんどの組織で発現され、かつ細胞死シグナル伝達に関与するが、対照的に、TNFR2は細胞生存シグナルに関与する。したがって、癌の治療法に関する実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR1に対する低減された親和性および/または活性を有し、および/またはTNFR2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。これらの実施形態では、キメラタンパク質は、アポトーシスが望ましい細胞、例えば、腫瘍細胞または腫瘍血管内皮細胞を標的にし得る。例えば、神経変性障害の治療のためのニューロン新生における、細胞生存を促進する方法に関する実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR2に対する低減された親和性および/または活性および/またはTNFR1に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。言い方を変えれば、本キメラタンパク質は、いくつかの実施形態では、死シグナルまたは生存シグナルのどちらかを優先できる改変TNF物質を含む。

20

【0140】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、TNFR1に対する低減された親和性および/または活性および/またはTNFR2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する改変TNFを有する。このようなキメラは、いくつかの実施形態では、野生型TNFおよび/またはTNFR1に対する低減された親和性および/または活性をもたらず変異のみを有するキメラに比べて、より強力なアポトーシスの誘導因子である。このようなキメラは、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞死または腫瘍血管内皮細胞死の誘導に使用される(例えば、癌の治療において)。また、いくつかの実施形態では、これらのキメラは、例えば、TNFR2を介してTreg細胞の活性化を回避または低減し、したがってインビボでのTNFR1介在性抗腫瘍活性をさらに支持する。

30

【0141】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、TNFR2に対する低減された親和性および/または活性を有し、および/またはTNFR1に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する改変TNFを有する。このようなキメラは、いくつかの実施形態では、いくつかの細胞型での細胞生存のより強力な活性化因子であり、これは種々の疾患における具体的治療目的であり得、限定されないが、ニューロン新生の刺激を含む。さらに、このようなTNFR2選択キメラはまた、自己免疫疾患(例えば、クローン病、糖尿病、MS、大腸炎など、および本明細書に記載の多くの他の疾患)の治療において有用である。いくつかの実施形態では、キメラは自己反応性T細胞を標的にする。いくつかの実施形態では、キメラは、Treg細胞活性化および細胞傷害性T細胞の間接的抑制を促進する。

40

50

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、例えば、TNFR2の活性化および／またはTNFR1の回避により（例えば、TNFR2に対する低減された親和性および／または活性を有し、および／またはTNFR1に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する改変TNFにより）自己反応性T細胞の死をもたらす。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの自己反応性T細胞は、NF- κ B経路活性／シグナル伝達の変化により、変更されたアポトーシス／生存シグナルを有する。いくつかの実施形態では、キメラは、細胞死（アポトーシス）／生存シグナル特性の不均衡の根底にある、NF- κ B経路での損傷または変更および、場合により特定の死誘導シグナルに対する変更された感受性（例えば、TNFR2活性化）を有する自己反応性T細胞の死をもたらす。

10

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、TNFR2ベースキメラは、種々の自己免疫疾患、特に、心臓疾患、脱髄性および神経変性障害、および感染症を含む疾患に対する追加の治療用途を有する。

【 0 1 4 4 】

ある実施形態では、野生型TNF- α は、配列番号293のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 4 5 】

このような実施形態では、改変TNF- α 物質は、1つまたは複数のアミノ酸位置29、31、32、84、85、86、87、88、89、145、146および147に変異を有し、これが、低減された受容体結合親和性を有する改変TNF- α をもたらす。例えば、米国特許第7,993,636号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007903号に記載のように、改変ヒトTNF- α 部分は、アミノ酸位置R32、N34、Q67、H73、L75、T77、S86、Y87、V91、I97、T105、P106、A109、P113、Y115、E127、N137、D143、A145、およびE146のうちの1つまたは複数に変異を有する（ジェンバンク受入番号BAG70306、バージョンBAG70306.1 GI:197692685、ヒトTNF- α 配列に従ってナンバリング）。いくつかの実施形態では、改変ヒトTNF- α 部分は、L29S、R32G、R32W、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、S86T、Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F、Y87H、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145R、A145T、E146D、E146K、およびS147Dから選択される置換変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、Y87Q、Y87L、Y87A、およびY87F、およびY87Hから選択される変異を有する。別の実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、I97A、I97Q、およびI97Sから選択される変異を有する。さらなる実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、Y115AおよびY115Gから選択される変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、E146K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、Y87HおよびE146K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、Y87HおよびA145R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、R32WおよびS86T変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、R32WおよびE146K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、L29SおよびR32W変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、D143NおよびA145R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、D143NおよびA145R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、A145T、E146D、およびS147D変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF- α 部分は、A145T、およびS147D変異を有する。

30

40

50

【0147】

いくつかの実施形態では、国際公開第2008/124086号に記載のように、改変TNF物質は、N39Y、S147Y、およびY87Hから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0148】

いくつかの実施形態では、改変ヒトTNF部分は、国際出願第PCT/IB2016/001668号に記載のような受容体選択性をもたらし変異を有する。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TNFに対する変異は、TNFR1選択的である。いくつかの実施形態では、TNFR1選択的であるTNFに対する変異は、位置R32、S86、およびE146のうちの1つまたは複数に対するものである。いくつかの実施形態では、TNFR1選択的であるTNFに対する変異は、R32W、S86T、およびE146Kのうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、TNFR1選択的であるTNFに対する変異は、R32W、R32W/S86T、R32W/E146KおよびE146Kのうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、TNFに対する変異は、TNFR2選択的である。いくつかの実施形態では、TNFR2選択的であるTNFに対する変異は、位置A145、E146、およびS147のうちの1つまたは複数に対するものである。いくつかの実施形態では、TNFR2選択的であるTNFに対する変異は、A145T、A145R、E146D、およびS147Dのうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、TNFR2選択的であるTNFに対する変異は、A145R、A145T/S147D、およびA145T/E146D/S147Dのうちの1つまたは複数である。

【0149】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はTNFである。TNFは、LT(LT12)と、ホモトリマーまたはヘテロトリマーを形成できる。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR1および/またはTNFR2および/またはヘルペスウイルス侵入メディエーター(HEVM)および/またはLT-Rに対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0150】

ある実施形態では、野生型TNFは、TNFベータ配列番号294のアミノ酸配列を有する。

【0151】

このような実施形態では、改変可溶性物質は、1つまたは複数のアミノ酸位置106~113に変異を含み得、これが、TNFR2に対する低減された受容体結合親和性を有する改変TNFをもたらし。ある実施形態では、改変可溶性物質は、アミノ酸位置106~113に1つまたは複数の置換変異を有する。例示の実施形態では、置換変異は、Q107E、Q107D、S106E、S106D、Q107R、Q107N、Q107E/S106E、Q107E/S106D、Q107D/S106E、およびQ107D/S106Dから選択される。別の実施形態では、改変可溶性物質は、位置106~113に、約1~約3個のアミノ酸の挿入を有する。

【0152】

いくつかの実施形態では、国際公開第2015/007903号に記載のように、改変物質は、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF、TNF)であり、これは、単鎖トリマー型であり得る。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0153】

いくつかの実施形態では、改変物質は、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF、TNF)であり、これは、TNFR1に対し、低減された親和性および/または活性、すなわちアンタゴニスト活性(例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007520号を参照)を有する。これらの実施形態では、改変物質は、TNFファミリーメンバー(例えば、TNF、TNF)であ

10

20

30

40

50

り、これもまた、場合により、TNFR2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変物質は、TNFファミリーメンバー（例えば、TNF α 、TNF β ）であり、これは、TNFR2に対し、低減された親和性および/または活性、すなわちアンタゴニスト活性（例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を有する。これらの実施形態では、改変物質は、TNFファミリーメンバー（例えば、TNF α 、TNF β ）であり、これも同様に、場合により、TNFR1に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態の構築物は、例えば、細胞特異的な様式でTNF応答を抑制する方法において使用される。いくつかの実施形態では、アンタゴニストTNFファミリーメンバー（例えば、TNF α 、TNF β ）は、国際公開第2015/007903号に記載のように、単鎖トリマー型である。

10

【0154】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はTRAILである。いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、DR4（TRAIL-R1）および/またはDR5（TRAIL-R2）および/またはDcR1および/またはDcR2に対して、低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、DR4（TRAIL-R1）および/またはDR5（TRAIL-R2）および/またはDcR1および/またはDcR2に対して、低減された親和性および/または活性を有する。

20

【0155】

ある実施形態では、野生型TRAILは、TRAIL配列番号295のアミノ酸配列を有する。

【0156】

このような実施形態では、改変TRAIL物質は、アミノ酸位置T127～R132、E144～R149、E155～H161、Y189～Y209、T214～T220、K224～A226、W231、E236～L239、E249～K251、T261～H264およびH270～E271に変異を含み得る（ジェンバンク受入番号NP_003801、バージョン10NP_003801.1、GI:4507593、ヒト配列に基づいてナンバリング、上記参照）。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R1に対するその親和性および/または活性を実質的に低減する1つまたは複数の変異を含み得る。このような実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R2に特異的に結合し得る。代表的変異は、アミノ酸位置Y189、R191、Q193、H264、I266、およびD267のうちの1つまたは複数の変異が挙げられる。例えば、変異は、Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266LおよびD267Qのうちの1つまたは複数であり得る。ある実施形態では、改変TRAIL物質は、変異Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266LおよびD267Qを含む。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R2に対するその親和性および/または活性を実質的に低減する1つまたは複数の変異を含み得る。このような実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R1に特異的に結合し得る。代表的変異には、アミノ酸位置G131、R149、S159、N199、K201、およびS215のうちの1つまたは複数の変異が挙げられる。例えば、変異は、G131R、R149I、S159R、N199R、K201H、およびS215Dのうちの1つまたは複数であり得る。ある実施形態では、改変TRAIL物質は、変異G131R、R149I、S159R、N199R、K201H、およびS215Dを含む。さらなるTRAIL変異は、例えば、Trebing et al., (2014) Cell Death an

50

d Disease, 5: e1035に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0159】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はTGFである。このような実施形態では、改変TGF物質は、上皮成長因子受容体(EGFR)に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変TGF物質は、上皮成長因子受容体(EGFR)に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0160】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はTGFである。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TGFBR1および/またはTGFBR2に対する低減された親和性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TGFBR1および/またはTGFBR2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、場合により、TGFBR3に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有し、これは、理論に束縛されることを意図するものではないが、TGFベータ受容体に対するリガンドのリザーバーとして作用し得る。いくつかの実施形態では、TGFは、TGFBR2よりもTGFBR1またはTGFBR1よりもTGFBR2を選択する。同様に、理論に束縛されることを意図するものではないが、LAPは、TGFベータ受容体に対するリガンドのリザーバーとして作用し得る。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TGFBR1および/またはTGFBR2に対する低減された親和性および/または活性および/または潜在関連ペプチド(LAP)に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、このようなキメラは、カムラチ・エンゲルマン病、または不適切なTGFシグナル伝達に関連する他の疾患において使用される。

【0161】

いくつかの実施形態では、改変物質は、TGFファミリーメンバー(例えば、TGF、TGF)であり、これは、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3のうちの1つまたは複数に対し、低減された親和性および/または活性、すなわち、アンタゴニスト活性(例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果であるアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる)を有する。これらの実施形態では、改変物質は、TGFファミリーメンバー(例えば、TGF、TGF)であり、これも同様に、場合により、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3のうちの1つまたは複数に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0162】

いくつかの実施形態では、改変物質は、TGFファミリーメンバー(例えば、TGF、TGF)であり、これは、TGFBR1および/またはTGFBR2に対して、低減された親和性および/または活性、すなわち、アンタゴニスト活性(例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果であるアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる)を有する。これらの実施形態では、改変物質は、TGFファミリーメンバー(例えば、TGF、TGF)であり、これも同様に、場合により、TGFBR3に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0163】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターロイキンである。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL1である。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL1またはIL1である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL1R1および/またはIL1RAPに対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL1R1および/または

IL1RAPに対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL1R2に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。例えば、いくつかの実施形態では、本改変IL1物質は、IL1R2に対する相互作用を回避し、したがって、治療薬に対するデコイおよび/またはシンクとしてのその機能を実質的に低減する。

【0164】

ある実施形態では、野生型IL1は、配列番号296のアミノ酸配列を有する。

【0165】

IL1は、炎症促進性のサイトカインであり、重要な免疫系制御因子である。それは、CD4 T細胞応答の強力な活性化因子であり、Th17細胞の比率を高め、IFN およびIL4産生細胞の増殖を増大させる。IL1はまた、CD8⁺ T細胞の強力な制御因子であり、抗原特異的CD8⁺ T細胞増殖、分化、周辺部への移動および記憶を強化する。IL1受容体は、IL1R1およびIL1R2を含む。IL1R1への結合およびIL1R1を介したシグナル伝達は、それによりIL1が多くのその生物学的（および病理学的）作用を媒介する機序を構成する。IL1R2は、デコイ受容体として機能でき、それにより、IL1R1を介した相互作用およびシグナル伝達のためのIL1の利用可能性を減らす。

【0166】

いくつかの実施形態では、改変IL1は、IL1R1に対する低減された親和性および/または活性（例えば、アゴニスト活性）を有する。いくつかの実施形態では、改変IL1は、IL1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、回復可能なIL1/IL1R1シグナル伝達ならびにIL1R2に対する治療用キメラの損失の防止およびその結果としての必要なIL1投与量の削減（例えば、野生型またはIL1R1に対する減弱化変異のみを有するキメラに比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を刺激して抗癌応答を開始することを含む、例えば、癌を治療する方法で使用される。

【0167】

いくつかの実施形態では、改変IL1は、IL1R1に対し、低減された親和性および/または活性（例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を有する。いくつかの実施形態では、改変IL1は、IL1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、IL1/IL1R1シグナル伝達は回復可能でなく、また、IL1R2に対する治療用キメラの損失の防止およびその結果として必要とされるIL1投与量の削減（例えば、野生型またはIL1R1に対する減弱化変異のみを有するキメラに比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を抑制することを含む、例えば、自己免疫疾患を治療する方法で使用される。

【0168】

このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸52~54の欠失を有し、これは、I型IL1Rに対して、低減された結合親和性および低減された生物活性を有する改変ヒトIL1を産生する。例えば、国際公開第1994/000491号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL1は、A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、

10

20

30

40

50

V 1 7 4 A、K 2 0 8 E、K 2 0 9 X、K 2 0 9 A / K 2 1 0 A、K 2 1 9 X、E 2 2 1 X、E 2 2 1 S / N 2 2 4 A、N 2 2 4 S / K 2 2 5 S、E 2 4 4 K、N 2 4 5 Qから選択される1つまたは複数の置換変異(Xはアミノ酸の任意の変化、例えば、非保守的变化であり得る)を有し、これらは、例えば、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007542号および国際公開第2015/007536号に記載のように、IL1Rに対し低減された結合を示す(ジェンバンク受入番号NP__000567、バージョンNP-000567.1、GI:10835145、ヒトIL1 配列に基づいてナンバリング)。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL1 は、R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221SおよびE221Kから選択される1つまたは複数の変異を有し得る。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異Q131GおよびQ148Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異Q148GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびQ131Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびH146Aを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびH146Nを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびH146Rを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびH146Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1 は、変異R120G、F162A、およびQ164Eを含む。

【0169】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL2である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2R および/またはIL2R および/またはIL2R に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2R および/またはIL2R に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2R に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態は、例えば、改変IL2がIL2R および/またはIL2R に対し拮抗的である場合、癌の治療に適切であり得る。例えば、本発明の構築物は、IL2受容体 および を有するCD8⁺ T細胞(抗腫瘍効果を与えることができる)の減弱化された活性化を優先し、IL2受容体 、 、および を有するT_{reg}(免疫抑制効果、腫瘍促進効果を与えることができる)を優先しない。さらに、いくつかの実施形態では、IL2R よりもIL2R および/またはIL2R に対する選択性は、肺水腫などのIL2副作用を回避させる。また、IL2ベースキメラは、例えば、改変IL2が、IL2R および/またはIL2R に対してアンタゴニスト(例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる)である場合、自己免疫疾患の治療に有用である。例えば、本発明の構築物は、IL2受容体 および を有するCD8⁺ T細胞の抑制の減弱化(したがって、免疫応答を抑制する)を優先し、IL2受容体 、 、および を有するT_{reg}を優先しない。あるいは、いくつかの実施形態では、IL2を有するキメラは、T_{reg}の活性化、したがって免疫抑制を優先し、CD8⁺ T細胞の活性化を優先しない。例えば、これらの構築物は、疾患または免疫抑制により恩恵を受けるとされる疾患、例えば、自己免疫障害の治療に使用される。

【0170】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、CD8⁺ T細胞を指向する本明細書に記載の標的化部分を有し、改変IL2物質は、IL2R および/またはIL2R に対する低減された親和性および/または活性および/またはIL2R に対し実質的に低減されたまたは除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では

、これらの構築物は、 $CD8^+$ T細胞活性を標的とし、通常、 $Treg$ 細胞に対して不活性である（または実質的に低減された活性を有する）。いくつかの実施形態では、このような構築物は、野生型IL2に比べて、高められた免疫刺激効果を有し（理論に束縛されることを望むものではないが、 $Treg$ を刺激しないことにより）、一方で、IL2に関連する全身毒性を除去または低減する。

【0171】

ある実施形態では、野生型IL2は、配列番号297のアミノ酸配列を有する。

【0172】

このような実施形態では、改変IL2物質は1つまたは複数の変異を、アミノ酸L72の位置（L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R、またはL72K）、F42の位置（F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、またはF42K）およびY45の位置（Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45RまたはY45K）に有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL2物質は、野生型IL2と比べて、高親和性IL2受容体に対して低減された親和性を有し、中間的親和性IL2受容体に対しては親和性をそのまま維持すると考えられる。例えば、米国特許出願公開第2012/0244112号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0173】

いくつかの実施形態では、改変IL2物質は、アミノ酸位置R38、F42、Y45、およびE62に1つまたは複数の変異を有する。例えば、改変IL2物質は、R38A、F42A、Y45A、およびE62Aのうちの1つまたは複数を含み得る。いくつかの実施形態では、改変IL2物質は、C125で変異を含み得る。例えば、C125Sであってよい。このような実施形態では、改変IL2物質は、例えば、Carmenate et al. (2013) The Journal of Immunology, 190: 6230 - 6238に記載されているように、IL2Rに対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL2物質は、 $CD8^+$ T細胞およびNK細胞を含むが、 $Treg$ 細胞を含まない、エフェクター細胞の増殖を誘導できる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL2物質は、野生型IL2物質よりも少ない毒性である。IL2Rに対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL2物質を含むキメラタンパク質は、例えば、腫瘍学において用途が見出され得る。

【0174】

他の実施形態では、改変IL2物質は、例えば、国際公開第2016/025385号に記載されているように、IL2Rに対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、改変IL2物質は、 $Treg$ 細胞の増殖を誘導し得るが、 $CD8^+$ T細胞およびNK細胞などのエフェクター細胞の増殖を誘導し得ない。IL2Rに対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL2物質を含むキメラタンパク質は、例えば、自己免疫疾患の治療で用途が見出され得る。いくつかの実施形態では、改変IL2物質は、アミノ酸位置N88、D20、および/またはA126に1つまたは複数の変異を有し得る。例えば、改変IL2物質は、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、およびQ126Fのうちの1つまたは複数を含み得る。

【0175】

種々の実施形態では、改変IL2物質は、D109またはC125に変異を含み得る。例えば、変異は、D109CまたはC125Sであってよい。いくつかの実施形態では、D109またはC125に変異を有する改変IL2は、PEG部分への結合のために利用され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 6 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 3 である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 3 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有し、I L 3 受容体は共通のベータ (ベータ c または C D 1 3 1) サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 3 受容体に対して実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有し、I L 3 受容体は共通のベータ (ベータ c または C D 1 3 1) サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。

【 0 1 7 7 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 4 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1 型および / または 2 型 I L 4 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1 型および / または 2 型 I L 4 受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。1 型 I L 4 受容体は、共通の鎖を有する I L 4 R サブユニットから構成され、I L 4 を特異的に結合する。2 型 I L 4 受容体は、I L 1 3 R 1 として知られる異なるサブユニットに結合した I L 4 R サブユニットを含む。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、2 型 I L 4 受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【 0 1 7 8 】

ある実施形態では、野生型 I L 4 は、配列番号 2 9 8 のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 7 9 】

このような実施形態では、改変 I L 4 物質は、アミノ酸 R 1 2 1 (R 1 2 1 A、R 1 2 1 D、R 1 2 1 E、R 1 2 1 F、R 1 2 1 H、R 1 2 1 I、R 1 2 1 K、R 1 2 1 N、R 1 2 1 P、R 1 2 1 T、R 1 2 1 W)、E 1 2 2 (E 1 2 2 F)、Y 1 2 4 (Y 1 2 4 A、Y 1 2 4 Q、Y 1 2 4 R、Y 1 2 4 S、Y 1 2 4 T) および S 1 2 5 (S 1 2 5 A) に 1 つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変 I L 4 物質は、I 型受容体により媒介される活性を維持するが、その他の受容体により媒介される生物活性を顕著に低減すると考えられる。例えば、米国特許第 6 , 4 3 3 , 1 5 7 号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 8 0 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 6 である。I L 6 は、リガンド結合 I L 6 R 鎖 (C D 1 2 6) およびシグナル伝達成分 g p 1 3 0 を含む細胞表面 I 型サイトカイン受容体複合体を介して信号を伝達する。I L 6 はまた、可溶性型の I L 6 R (s I L 6 R) にも結合し得、これは、I L 6 R の細胞外の部分である。s I L 6 R / I L 6 複合体は、神経突起の成長およびニューロンの生存に関与し、したがって、再ミエリン化による神経再生に重要であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 6 R / g p 1 3 0 および / または s I L 6 R に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 6 R / g p 1 3 0 および / または s I L 6 R に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【 0 1 8 1 】

ある実施形態では、野生型 I L 6 は、I L 6 (成熟型、野生型) (配列番号 2 9 9) のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 8 2 】

このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸 5 8、1 6 0、1 6 3、1 7 1 または 1 7 7 に 1 つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変 I L 6 物質は、I L 6 R に対し低減された結合親和性および低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第 9 7 / 1 0 3 3 8 号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 8 3 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 1 0 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 0 受容体 1 および I L 1 0 受容体 2 に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 0 受容体 1 および I L 1 0 受容体 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【 0 1 8 4 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 1 1 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 1 R および / または I L 1 1 R および / または g p 1 3 0 に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 1 R および / または I L 1 1 R および / または g p 1 3 0 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

10

【 0 1 8 5 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 1 2 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 2 R 1 および / または I L 1 2 R 2 に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 2 R 1 および / または I L 1 2 R 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【 0 1 8 6 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 1 3 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 4 受容体 (I L 4 R) および I L 1 3 R 1 に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 4 受容体 (I L 4 R) または I L 1 3 R 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

20

【 0 1 8 7 】

ある実施形態では、野生型 I L 1 3 は、I L 1 3 (成熟型、野生型) (配列番号 3 0 0) のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 8 8 】

このような実施形態では、改変 I L 1 3 物質は、アミノ酸 1 3、1 6、1 7、6 6、6 9、9 9、1 0 2、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 2、1 1 3 および 1 1 4 に 1 つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変 I L 1 3 物質は、低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第 2 0 0 2 / 0 1 8 4 2 2 号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 1 8 9 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 1 8 である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 8 R および / または I L 1 8 R に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 1 8 R および / または I L 1 8 R に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達に必要な T I R ドメインを欠く I L 1 8 R のアイソフォームである I L 1 8 R 2 型に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

40

【 0 1 9 0 】

ある実施形態では、野生型 I L 1 8 は、I L 1 8 (野生型) (配列番号 3 0 1) のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 9 1 】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 4 2 号に記載のように、改変 I L 1 8 物質は、Y 3 7 ~ K 4 4、R 4 9 ~ Q 5 4、D 5 9 ~ R 6 3、E 6 7 ~ C 7 4、R 8 0、M 8 7 ~ A 9 7、N 1 2 7 ~ K 1 2 9、Q 1 3 9 ~ M 1 4 9、K 1 6 5 ~ K 1 7 1、R 1 8 3 および Q 1 9 0 ~ N 1 9 1 から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に 1 つまたは複数の変異を含み得る (ジェンバ

50

ンク受入番号 A A V 3 8 6 9 7、バージョン A A V 3 8 6 9 7 . 1、G I : 5 4 6 9 6 6 5 0、ヒト I L 1 8 配列に基づいてナンバリング)。

【 0 1 9 2 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 3 3 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、S T 2 受容体 1 および I L 1 R A c P に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、S T 2 受容体および I L 1 R A c P に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【 0 1 9 3 】

ある実施形態では、野生型 I L 3 3 は、配列番号 3 0 2 のアミノ酸配列を有する。

10

【 0 1 9 4 】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 4 2 号に記載のように、改変 I L 3 3 物質は、I 1 1 3 ~ Y 1 2 2、S 1 2 7 ~ E 1 3 9、E 1 4 4 ~ D 1 5 7、Y 1 6 3 ~ M 1 8 3、E 2 0 0、Q 2 1 5、L 2 2 0 ~ C 2 2 7 および T 2 6 0 ~ E 2 6 9 から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に 1 つまたは複数の変異を含み得る (ジェンバンク受入番号 N P _ 2 5 4 2 7 4、バージョン 2 5 4 2 7 4 . 1、G I : 1 5 5 5 9 2 0 9、ヒト配列に基づいてナンバリング)。

【 0 1 9 5 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は上皮増殖因子 (E G F) である。E G F は、強力な成長因子のファミリーである。メンバーは、E G F、H B - E G F、および T G F、アンフィレギュリン、ニューレグリン、エピレギュリン、ベータセルリンなどの他のものを含む。E G F ファミリー受容体は、E G F R (E r b B 1)、E r b B 2、E r b B 3 および E r b B 4 を含む。これらは、ホモダイマーおよび / またはヘテロダイマー受容体サブタイプとして機能し得る。異なる E G F ファミリーメンバーは、種々の受容体サブタイプに対して、他と異なる選択性を示す。例えば、E G F は、E r b B 1 / E r b B 1、E r b B 1 / E r b B 2、E r b B 4 / E r b B 2 およびいくつかの他のヘテロダイマーサブタイプと結合する。H B - E G F は、類似のパターンを有するが、E r b B 4 / 4 と結合する。E G F (E G F 様) 増殖因子シグナル伝達の正または負方向への調節は、大きな治療上の観点から関心がもたれている。例えば、E G F R シグナル伝達の阻害は、E G F R シグナル伝達が主要な成長促進シグナルを構成する種々の癌の治療で関心がもたれている。あるいは、E G F R シグナル伝達の刺激は、例えば、創傷治癒 (急性および慢性)、口腔粘膜炎症 (限定されないが、放射線療法を含む種々の癌療法の主要な副作用) における治療上の観点から関心がもたれている。

20

30

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および / または E r b B 4 に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷の治療方法で使用される。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および E r b B 4 のうちの 1 つまたは複数に結合し、その受容体の活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および / または E r b B 4 に対する低減された親和性および / または活性を有し、これにより、その受容体の活性が、弱められる様式でアンタゴナイズされる。このような実施形態は、例えば、癌の治療で使用される。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1 に対する低減された親和性および / または活性を有する。E r b B 1 は、キナーゼ阻害剤の治療標的であるが - 大抵の場合、副作用があり、その理由は、それらがあまり選択的でないためである (例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ブリガチニブおよびイコチニブ)。いくつかの実施形態では、弱められた拮抗的 E r b B 1 シグナル伝達は、E G F の受容体を標的とする他の物質より、オンターゲットであり、少ない副作用を有する。

40

【 0 1 9 7 】

50

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1 に対し、低減された親和性および／または活性（例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または１つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照、この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）および／または E r b B 4 またはそれが相互作用し得る他のサブタイプに対し実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。標的化部分を介した特異的標的化により、E r b B 1 / E r b B 1 受容体活性化の細胞選択的抑制（アンタゴニズム、例えば、天然のアンタゴニスト活性または１つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照、この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）が達成されるであろう - 阻害関連副作用に関連する可能性のある他の受容体サブタイプを関与させずに。従って、身体中の全ての細胞型の E G F R 活性を阻害する E G F R キナーゼ阻害剤と対照的に、このような構築物は、副作用の低減された細胞選択的（例えば、受容体の増幅、過剰発現などによる活性化 E G F R シグナル伝達を有する腫瘍細胞）抗 E G F R (E r b B 1) 薬物作用を提供するであろう。

10

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 4 および／またはそれが相互作用する他のサブタイプに対する低減された親和性および／または活性（例えば、アゴニスト活性）を有する。標的化部分を介した特定の標的細胞に対する標的化により、E r b B 1 シグナル伝達の選択的活性化が達成される（例えば、上皮細胞）。このような構築物は、いくつかの実施形態では、副作用が低減された創傷の治療（創傷治癒の促進）、特に慢性状態の治療および治療薬局所投与以外の適用（例えば、全身性創傷治癒）のために使用される。

20

【 0 1 9 9 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリンまたはインスリン類似体である。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインスリン類似体は、インスリン受容体および／または I G F 1 または I G F 2 受容体に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインスリン類似体は、インスリン受容体および／または I G F 1 または I G F 2 受容体に対する低減または除去された親和性および／または活性を有する。インスリン受容体に対する弱められた応答は、糖尿病、肥満症、代謝障害などの制御を可能にし、同時に、I G F 1 または I G F 2 受容体から離すことにより、癌促進性作用を回避する。

30

【 0 2 0 0 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン様増殖因子 - I またはインスリン様増殖因子 - I I (I G F 1 または I G F 2) である。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I G F 1 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン受容体および／または I G F 1 受容体に対する低減された親和性および／または活性を有する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に結合し、受容体の活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に対する低減された親和性および／または活性を有し、これにより、受容体の活性が、弱められる形式でアンタゴナイズされることを可能にする。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 2 受容体に対する低減された親和性および／または活性を有し、これにより、受容体の活性が、弱められる形式でアンタゴナイズされることを可能にする。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有し、したがって、インスリンシグナル伝達を妨げない。種々の実施形態では、これは、癌治療に適用される。種々の実施形態では、本物質は、I R アイソフォーム A が癌治療に対し耐性を生じるのを防止し得る。

40

【 0 2 0 1 】

50

一実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載のうちのいずれかの改変（例えば、変異体）型のシグナル伝達物質と共に、（i）CD8結合物質および（ii）腫瘍細胞を指向する標的化部分を有する。ある実施形態では、本キメラタンパク質は、T細胞上のCD8を指向する標的化部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2を指向する第2の標的化部分を有する。

【0202】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は毒素または毒性酵素である。いくつかの実施形態では、毒素または毒性酵素は、植物および細菌から誘導される。毒素または毒性酵素の例としては、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、炭疽病毒素、リシンおよびサポリンなどのリボソーム不活化タンパク質（RIP）、モデシン、アブリン、ゲロニン、およびヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。追加の毒素は、Mathew et al., (2009) Cancer Sci 100(8): 1359-65、に開示のものを含む。この文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、細胞型特異的に細胞死を誘導するのに利用し得る。このような実施形態では、毒素は改変されて、例えば、変異導入されて、本明細書で他のシグナル伝達物質に関し記載のように、効果を弱めるために毒素の親和性および/または活性を低減させ得る。

【0203】

シグナル伝達物質との多重特異的キメラおよび融合体

種々の実施形態では、本発明のCD8結合物質は、本明細書に記載の1種類または複数種類のシグナル伝達物質および/または1つまたは複数の追加の標的化部分のキメラまたは融合体の一部である。したがって、本発明は、例えば、1種類または複数種類のシグナル伝達物質およびCD8に対する標的化部分および/または1つまたは複数の追加の標的化部分を含むキメラまたは融合タンパク質を提供する。

【0204】

種々の実施形態では、本発明のCD8結合物質は、多重特異的であり、すなわち、CD8結合物質は、2つ以上の標的、例えば、抗原、または受容体、またはエピトープを認識して結合する認識ドメインを有する2つ以上の標的化部分を有する。このような実施形態では、本発明のCD8結合物質は、同じ抗原上または異なる抗原上の2個以上のエピトープを認識して結合する認識ドメインを有する2つ以上の標的化部分を含み得る。種々の実施形態では、このような多重特異的CD8結合物質は、向上した結合力および/または改善された選択性などの有利な性質を示す。ある実施形態では、本発明のCD8結合物質は、2つの標的化部分を含み、二重特異性であり、すなわち、同じ抗原上または異なる抗原上の2個のエピトープを結合し認識する。

【0205】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、それぞれの標的化部分が本明細書に記載の抗体または抗体誘導体である2つ以上の標的化部分を含む。ある実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、CD8に対する抗原認識ドメインを含む少なくとも1種類のVHHおよび腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを含む1種類の抗体または抗体誘導体を含む。

【0206】

種々の実施形態では、本多重特異的CD8結合物質は、異なる抗原または受容体を標的とする2つ以上の標的化部分を有し、1つの標的化部分は、その抗原または受容体に対し減弱化され得、例えば、標的化部分はその抗原または受容体を低親和性または結合力で結合する（例えば、その他の標的化部分がその抗原または受容体に対して有する親和性または結合力より低い親和性または結合力で結合することを含み、例えば、結合親和性の間の差異は、約10倍、または25倍、または50倍、または100倍、または300倍、または500倍、または1000倍、または5000倍であってよく；例えば、より低い親和性または結合力の標的化部分はその抗原または受容体の中～高nMまたは低～中μMの範囲K_Dで結合し得るが、より高い親和性または結合力の標的化部分は、中～高pMまた

10

20

30

40

50

は低～中nMの範囲の K_D で結合し得る)。例えば、いくつかの実施形態では、本多重特異的CD8結合物質は、無差別の抗原または受容体を指向する減弱化標的化部分を含み、これは、目的の細胞への標的化を改善し(例えば、その他の標的化部分を介して)、治療用の標的にされないものを含む、複数細胞型間にまたがる効果を防止し得る(例えば、これらの実施形態で与えられるものより高い親和性で無差別の抗原または受容体に結合することによる)。種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、低親和性または低結合力で異なる抗原または受容体を標的とする1つまたは複数の標的化部分を有し、他方の結合を、例えば、協力して高めることができる。

【0207】

本発明の多重特異的CD8結合物質は、当該技術分野において既知の方法を使用して構築し得る。例えば、米国特許第9,067,991号、米国特許出願公開第20110262348号および国際公開第2004/041862号を参照されたい。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、2つ以上の標的化部分を含む本発明の多重特異的CD8結合物質は、例えば、アミノ酸残基と、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Blattler et al., Biochemistry 24, 1517-1524および欧州特許第294703号に記載のような有機誘導体化試薬とを反応させることにより、化学架橋により構築され得る。別の例示的实施形態では、2つ以上の標的化部分を含む多重特異的CD8結合物質は、遺伝子融合、すなわち、個別の標的化部分のポリペプチドを含む単一ポリペプチドを構築することにより、構築される。例えば、CD8に対する抗原認識ドメインを有する第1のVHHおよび腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを有する第2の抗体または抗体誘導体をコードする、単一ポリペプチド構築物を形成し得る。二価または多価性のVHHポリペプチド構築物を産生する方法は、国際公開第96/34103号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。さらなる例示的实施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、リンカーを用いて構築され得る。例えば、CD8に対する抗原認識ドメインを有する第1のVHHのカルボキシ末端を、腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを有する第2の抗体または抗体誘導体のアミノ末端に連結され得る(または逆もまた同様)。使用し得る代表的リンカーは、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質の成分は、リンカーを使用せずに、相互に直接連結される。

【0208】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、CD8および1つまたは複数の免疫細胞上に見つけた1つまたは複数の抗原を認識して、それらに結合する。免疫細胞には、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球(例えば、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞)、Bリンパ球、プラズマ細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含め得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、目的の抗原に特異的に結合し、直接または間接的に1つまたは複数の免疫細胞を効果的に動員する。

【0209】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、CD8および腫瘍細胞上に見つけた1つまたは複数の抗原を認識して、それらに結合する。これらの実施形態では、本CD8結合物質は、免疫細胞を直接的にまたは間接的に腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に動員し得る。いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、免疫細胞、例えば、腫瘍を死滅させるおよび/または抑制することができる免疫細胞(例えば、CTL)を、作用部位(非限定的例であるが、腫瘍微小環境など)に直接的にまたは間接的に動員し得る。

【0210】

いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、腫瘍の免疫攻撃に有利なように免疫細胞のバランスを変化させることができ、または免疫細胞のバランスを変化させることを含む方法において使用される。例えば、本CD8結合物質は、臨床的に重要な部位の免疫細胞の比率を、腫瘍を死滅させるおよび/または抑制することができる細胞(例えば、T細胞

10

20

30

40

50

胞、細胞傷害性Ｔリンパ球、ヘルパーＴ細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーナチュラルキラーＴ（NKＴ）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M１マクロファージ）、好中球、Ｂ細胞、樹状細胞またはこれらのサブセット）に有利なように、および腫瘍を保護する細胞（例えば、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSＣ）、制御性Ｔ細胞（Treg）；腫瘍関連好中球（TAN）、M２マクロファージ、腫瘍関連マクロファージ（TAM）、またはこれらのサブセット）に不利なように変化させることができる。いくつかの実施形態では、本CD８結合物質は、エフェクターＴ細胞の制御性Ｔ細胞に対する比率を高めることができる。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD８結合物質は、腫瘍細胞関連抗原に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、腫瘍細胞を直接または間接的に動員する。例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の動員は、腫瘍細胞を死滅させることができるおよび／または抑制できる１つまたは複数のエフェクター細胞（例えば、本明細書に記載の免疫細胞）に対するものである。いくつかの実施形態では、標的化部分は、腫瘍およびCD８陽性免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）上でそれらのそれぞれの抗原と相互作用する２つの標的化部分によって、Ｔ細胞を腫瘍細胞に直接または間接的に動員する。

【０２１２】

腫瘍細胞、または癌細胞は、身体の器官およびシステムの正常な機能動作を妨害する、細胞または組織の無制御な増殖および／または細胞生存の異常な増大および／またはアポトーシスの抑制の異常な増大を指す。例えば、腫瘍細胞は、良性および悪性の癌、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移を含む。腫瘍細胞の例としては、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎臓癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにＢ細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘤病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびにその他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群と関連する異常血管増殖の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１３】

腫瘍細胞または癌細胞としては、癌腫、例えば、種々のサブタイプ（例えば、腺癌、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、および移行性上皮癌を含む）、肉腫（例えば、骨および軟組織を含む）、白血病（例えば、急性骨髄性、急性リンパ芽球性、慢性骨髄性、慢性リンパ球性、およびヘアリー細胞を含む）、リンパ腫および骨髄腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、軽鎖型、非分泌型MGUS、および形質細胞腫を含む）、および中枢神経系癌（例えば、脳腫瘍（例えば、神経膠腫（例えば、星状細胞腫、乏突起細胞腫および上衣腫）、髄膜腫、下垂体腺腫、および神経腫）、および脊髄腫瘍（例えば、髄膜腫および神経線維腫））も挙げられるが、これらに限定されない。

【０２１４】

腫瘍抗原の例としては、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペ

10

20

30

40

50

プチダーゼⅣ (DPPⅣ)、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質 (ADAbp)、シクロフィリンb、結腸直腸関連性抗原 (CRC) - 0017-1A/GA733、癌胎児抗原 (CEA) およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異抗原 (PSA) およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、MAGEファミリーの腫瘍抗原 (例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGEファミリーの腫瘍抗原 (例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンおよび γ -カテニン、p120ctn、gp100、Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質 (APC)、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、Smadファミリーの腫瘍抗原、lmp-1、NA、EBV-コード化核内抗原 (EBNA) - 1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、c-erbB-2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、PD-L2、PMSA、およびBCMA (TNFRSF17) が挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの腫瘍抗原を結合する標的化部分を含む。

【0215】

いくつかの実施形態では、本多重特異的CD8結合物質は、腫瘍細胞上のCD8ならびに抗原を認識して結合する。いくつかの実施形態では、多重特異的CD8結合物質は、CTLを直接的にまたは間接的に腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に動員する。

【0216】

種々の実施形態では、本多重特異的CD8結合物質は、2個の異なる細胞 (例えば、シナプスを作るために) または同じ細胞 (例えば、より高濃度のシグナル伝達物質効果を得るために) を標的とする標的化部分を有する。

【0217】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、T細胞関連標的 (例えば、抗原、受容体) に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、T細胞を直接または間接的に動員する。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、エフェクターT細胞に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、エフェクターT細胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位 (例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位) に直接または間接的に動員する。エフェクターT細胞の例としては、細胞傷害性T細胞 (例えば、TCR、CD3⁺、CD8⁺、CD45RO⁺) ; CD4⁺エフェクターT細胞 (例えば、TCR、CD3⁺、CD4⁺、CCR7⁺、CD62Lhi、IL7R/CD127⁺) ; CD8⁺エフェクターT細胞 (例えば、TCR、CD3⁺、CD8⁺、CCR7⁺、CD62Lhi、IL7R/CD127⁺) ; エフェクターメモリーT細胞 (例えば、CD62Llow、CD44⁺、TCR、CD3⁺、IL7R/CD127⁺、IL15R⁺、CCR7low) ; セントラルメモリーT細胞 (例えば、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺ ; またはCCR7hi、CD44

$+$ 、 $CD62L^{hi}$ 、 TCR 、 $CD3^{+}$ 、 $IL7R/CD127^{+}$ 、 $IL15R^{+}$) ; $CD62L^{+}$ エフェクターT細胞 ; 早期エフェクターメモリーT細胞 ($CD27^{+} CD62L^{-}$) および後期エフェクターメモリーT細胞 ($CD27^{-} CD62L^{-}$) (それぞれ、 $TemE$ および $TemL$) を含む $CD8^{+}$ エフェクターメモリーT細胞 (TEM) ; $CD127^{+}$ $CD25^{low/-}$ エフェクターT細胞 ; $CD127^{-}$ $CD25^{-}$ エフェクターT細胞 ; $CD8^{+}$ 幹細胞メモリーエフェクター細胞 ($TSCM$) (例えば、 $CD44^{low}$ $CD62L^{high}$ $CD122^{high}$ sca^{+}) ; $TH1$ エフェクターT細胞 (例えば、 $CXCR3^{+}$ 、 $CXCR6^{+}$ および $CCR5^{+}$; または TCR 、 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $IL12R^{+}$ 、 $IFN-\gamma R^{+}$ 、 $CXCR3^{+}$)、 $TH2$ エフェクターT細胞 (例えば、 $CCR3^{+}$ 、 $CCR4^{+}$ および $CCR8^{+}$; または TCR 、 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $IL4R^{+}$ 、 $IL33R^{+}$ 、 $CCR4^{+}$ 、 $IL17RB^{+}$ 、 $CRTTH2^{+}$) ; $TH9$ エフェクターT細胞 (例えば、 TCR 、 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$) ; $TH17$ エフェクターT細胞 (例えば、 TCR 、 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $IL23R^{+}$ 、 $CCR6^{+}$ 、 $IL1R^{+}$) ; $CD4^{+}CD45RO^{+}CCR7^{+}$ エフェクターT細胞、 $ICOS^{+}$ エフェクターT細胞 ; $CD4^{+}CD45RO^{+}CCR7^{-}$ エフェクターT細胞 ; および $IL2$ 、 $IL4$ および / または $IFN-\gamma$ を分泌するエフェクターT細胞が挙げられる。

【0218】

目的とするT細胞抗原の例としては、例えば、下記が挙げられる (該当する場合には、細胞外ドメインも含む) : $CD8$ 、 $CD3$ 、 $SLAMF4$ 、 $IL2R$ 、 $4-1BB/TNFRSF9$ 、 $IL2R$ 、 $ALCAM$ 、 $B7-1$ 、 $IL4R$ 、 $B7-H3$ 、 $BLAME/SLAMFS$ 、 $CEACAM1$ 、 $IL6R$ 、 $CCR3$ 、 $IL7R$ 、 $CCR4$ 、 $CXCR1/ILSRA$ 、 $CCR5$ 、 $CCR6$ 、 $IL10R$ 、 $CCR7$ 、 $IL10R$ 、 $CCRS$ 、 $IL12R-1$ 、 $CCR9$ 、 $IL12R-2$ 、 $CD2$ 、 $IL13R-1$ 、 $IL13$ 、 $CD3$ 、 $CD4$ 、 $ILT2/CDS5j$ 、 $ILT3/CDS5k$ 、 $ILT4/CDS5d$ 、 $ILT5/CDS5a$ 、 $Integrin-4/CD49d$ 、 CDS 、 $Integrin-E/CD103$ 、 $CD6$ 、 $Integrin-M/CD11b$ 、 CDS 、 $Integrin-X/CD11c$ 、 $Integrin-2/CD15$ 、 $KIR/CD15S$ 、 $CD27/TNFRSF7$ 、 $KIR2DL1$ 、 $CD25$ 、 $KIR2DL3$ 、 $CD30/TNFRSFS$ 、 $KIR2DL4/CD15Sd$ 、 $CD31/PECAM-1$ 、 $KIR2DS4$ 、 $CD40$ リガンド、 $TNFSF5$ 、 $LAG-3$ 、 $CD43$ 、 $LAIR1$ 、 $CD45$ 、 $LAIR2$ 、 $CDS3$ 、 $ロイコトリエンB4-R1$ 、 $CDS4/SLAMF5$ 、 $NCAM-L1$ 、 $CD94$ 、 $NKG2A$ 、 $CD97$ 、 $NKG2C$ 、 $CD229/SLAMF3$ 、 $NKG2D$ 、 $CD2F-10/SLAMF9$ 、 $NT-4$ 、 $CD69$ 、 $NTB-A/SLAMF6$ 、 $共通鎖/IL2R$ 、 $オステオポンチン$ 、 $CRACC/SLAMF7$ 、 $PD-1$ 、 $CRTAM$ 、 $PSGL-1$ 、 $CTLA-4$ 、 $RANK/TNFRSF11A$ 、 $CX3CR1$ 、 $CX3CL1$ 、 $L-セレクチン$ 、 $CXCR3$ 、 $SIRP-1$ 、 $CXCR4$ 、 $SLAM$ 、 $CXCR6$ 、 $TCCR/WSX-1$ 、 $DNAM-1$ 、 $サイモポエチン$ 、 $EMMPRIN/CD147$ 、 $TIM-1$ 、 $EphB6$ 、 $TIM-2$ 、 $Fas/TNFRSF6$ 、 $TIM-3$ 、 Fas リガンド、 $TNFSF6$ 、 $TIM-4$ 、 $Fc-RIII/CD16$ 、 $TIM-6$ 、 $TNFR1/TNFRSF1A$ 、 $グラニューライシン$ 、 $TNFRII/TNFRSF1B$ 、 $TRAILR1/TNFRSF10A$ 、 $ICAM-1/CD54$ 、 $TRAILR2/TNFRSF10B$ 、 $ICAM-2/CD102$ 、 $TRAILR3/TNFRSF10C$ 、 $IFN-\gamma R1$ 、 $TRAILR4/TNFRSF10D$ 、 $IFN-\gamma R2$ 、 $TSLP$ 、 $IL1R1$ および $TSLP$ 。種々の実施形態では、 $CD8$ 結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示T細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

【0219】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 $CD8$ 結合物質は、B細胞関連標的 (例えば、抗原、受容体) に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位 (

10

20

30

40

50

例えば、１つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的にＢ細胞を動員する。目的のＢ細胞抗原の例としては、例えば、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ７０、ＣＤ７２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤｗ７５、ＣＤｗ７６、ＣＤ７７、ＣＤ７８、ＣＤ７９ａ／ｂ、ＣＤ８０、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８３、ＣＤ８４、ＣＤ８５、ＣＤ８６、ＣＤ８９、ＣＤ９８、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤｗ１３０、ＣＤ１３８、ＣＤｗ１５０、およびＢ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）が挙げられる。種々の実施形態では、ＣＤ８結合物質は、１つまたは複数のこれらの例示Ｂ細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的ＣＤ８結合物質は、ナチュラルキラー細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー細胞を、治療部位（例えば、１つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）へ直接または間接的に動員する。目的のナチュラルキラー細胞抗原の例としては、例えば、ＴＩＧＩＴ、２Ｂ４／ＳＬＡＭＦ４、ＫＩＲ２ＤＳ４、ＣＤ１５５／ＰＶＲ、ＫＩＲ３ＤＬ１、ＣＤ９４、ＬＭＩＲ１／ＣＤ３００Ａ、ＣＤ６９、ＬＭＩＲ２／ＣＤ３００ｃ、ＣＲＡＣＣ／ＳＬＡＭＦ７、ＬＭＩＲ３／ＣＤ３００ＬＦ、Ｋｉｒ１α、ＤＮＡＭ－１、ＬＭＩＲ５／ＣＤ３００ＬＢ、Ｆｃ－イプシロンＲＩＩ、ＬＭＩＲ６／ＣＤ３００ＬＥ、Ｆｃ－Ｒ１／ＣＤ６４、ＭＩＣＡ、Ｆｃ－ＲＩＩＢ／ＣＤ３２ｂ、ＭＩＣＢ、Ｆｃ－ＲＩＩＣ／ＣＤ３２ｃ、ＭＵＬＴ－１、Ｆｃ－ＲＩＩＡ／ＣＤ３２ａ、Ｎectin－２／ＣＤ１１２、Ｆｃ－ＲＩＩＩ／ＣＤ１６、ＮＫＧ２Ａ、ＦcRH1／IRTA5、ＮＫＧ２Ｃ、ＦcRH2／IRTA4、ＮＫＧ２Ｄ、ＦcRH4／IRTA1、ＮＫp30、ＦcRH5／IRTA2、ＮＫp44、Ｆｃ－受容体様３／ＣＤ１６－２、ＮＫp46／NCR1、ＮＫp80／KLRF1、NTB－A／SLAMF6、Rae－１、Rae－１、Rae－１、Rae－１、H60、Rae－１、ILT2／CD85j、Rae－１、ILT3／CD85k、TREM－１、ILT4／CD85d、TREM－２、ILT5／CD85a、TREM－３、ＫＩＲ／ＣＤ１５８、TREML1／TLT－１、ＫＩＲ２ＤＬ１、ULBP－１、ＫＩＲ２ＤＬ３、ULBP－２、ＫＩＲ２ＤＬ４／ＣＤ１５８dおよびULBP－３が挙げられる。種々の実施形態では、ＣＤ８結合物質は、１つまたは複数のこれらの例示ＮＫ細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的ＣＤ８結合物質は、マクロファージ／単球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、マクロファージ／単球を直接または間接的に、治療部位（例えば、１つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に動員する。目的のマクロファージ／単球抗原の例としては、例えば、ＳＩＲＰ１α、Ｂ７－１／ＣＤ８０、ILT4／CD85d、Ｂ７－H1、ILT5／CD85a、共通鎖、インテグリン４／CD49d、BLAME／SLAMF8、インテグリンX／CD11c、CCL6／C10、インテグリン２／CD18、CD155／PVR、インテグリン３／CD61、CD31／PECAM－１、Latexin、CD36／SR－B3、ロイコトリエンＢ４Ｒ１、CD40／TNFRSF5、LIMPIIISR－B2、CD43、LMIR1／CD300A、CD45、LMIR2／CD300c、CD68、LMIR3／CD300LF、CD84／SLAMF5、LMIR5／CD300LB、CD97、LMIR6／CD300LE、CD163、LRP－１、CD2F－10／SLAMF9、MARCO、CRACC／SLAMF7、MD－１、ECF－L、MD－２、EMMPRIN／CD147、MGL2、エンドグリン／CD105、オステオアクチビン／GPNMB、Ｆｃ－ＲＩ／ＣＤ６４、オステオポンチン、Ｆｃ－ＲＩＩＢ／ＣＤ３２ｂ

、PD-L2、Fc-RIIC/CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-RIIA/CD32a、SIGNR1/CD209、Fc-RIII/CD16、SLAM、GM-CSFR、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN- γ RI、TLR4、IFN- γ RII、TREM-1、IL-1RI、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL10R、ALCAM、IL10R、アミノペプチダーゼN/ANPEP、ILT2/CD85j、共通鎖、ILT3/CD85k、ClqR1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、CD206、インテグリン α 4/CD49d、CCR5、インテグリンM/CD11b、CCR8、インテグリンX/CD11c、CD155/PVR、インテグリン α 2/CD18、CD14、インテグリン α 3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロイコトリエンB4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、LMIR3/CD300LF、凝固因子III/組織因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSFR、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、エンドグリン/CD105、NCAM-L1、Fc-RI/CD64、PSGL-1、Fc-RIIIICD16、RP105、G-CSFR、L-セレクチン、GM-CSFR、シグレック-3/CD33、HVEM/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL6R、TREM-2、CXCR1/IL8RA、TREM-3およびTREML1/TLT-1が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示マクロファージ/単球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0222】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、樹状細胞関連標的(例えば、抗原、受容体)に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位(例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位)に、直接または間接的に樹状細胞を動員する。目的の樹状細胞抗原の例としては、例えば、CLEC9A、XCR1、RANK、CD36/SRB3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MSR、CD5L、SREC-1、CL-PL/COLEC12、SREC-II、LIMPIIISRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBBリガンド/TNFSF9、IL12/IL23p40、4-Amino-1、8-ナフタルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckine、ILT3/CD85k、8-oxo-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、lutegrin α 4/CD49d、Aag、インテグリン α 2/CD18、AMICA、Langerin、B7-2/CD86、ロイコトリエンB4-R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、ClqR1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LBCCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAML1、CD2F-10/SLAMF9、Osteoactivin GPMB、Chern23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、CLEC-8、シグレック-2/CD22、CRACC/SLAMF7、シグレック-3/CD33、DC-SIGN、DEC205、シグレック-5、DC-SIGNR/CD299、シグレック-6、DCAR、シグレック-7、DCIR/CLEC4A、シグレック-9、DEC-205、シグレック-10、Dectin-1/CLEC7A、シグレ

10

20

30

40

50

ック - F、D e c t i n - 2 / C L E C 6 A、S I G N R 1 / C D 2 0 9、D E P - 1 / C D 1 4 8、S I G N R 4、D L E C、S L A M、E M M P R I N / C D 1 4 7、T C C R / W S X - 1、F c - R 1 / C D 6 4、T L R 3、F c - R I I B / C D 3 2 b、T R E M - 1、F c - R I I C / C D 3 2 c、T R E M - 2、F c - R I I A / C D 3 2 a、T R E M - 3、F c - R I I I / C D 1 6、T R E M L 1 / T L T - 1、I C A M - 2 / C D 1 0 2、D E C 2 0 5、およびパニロイド R 1 が挙げられる。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、1 つまたは複数のこれらの例示 D C 抗原を結合する標的化部分を含む。

【 0 2 2 3 】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、4 つの「フレームワーク領域」または F R および 3 つの「相補性決定領域」または C D R を有する単一アミノ酸鎖を含む V H H である C l e c 9 A に対する標的化部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「F R」は、C D R の間に位置する可変ドメイン中の領域を意味する。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「C D R」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含む V H H 中の可変領域を指す。

10

【 0 2 2 4 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、C D R 1、C D R 2、および / または C D R 3 配列のうちの少なくとも 1 つを含む可変ドメインを有する C l e c 9 A に対する V H H を含む。

【 0 2 2 5 】

例示的实施形態では、C D R 1 配列は、配列番号 3 0 3 ~ 配列番号 3 2 2 から選択される。

20

【 0 2 2 6 】

例示的实施形態では、C D R 2 配列は、配列番号 3 2 3 ~ 配列番号 3 4 4 から選択される。

【 0 2 2 7 】

例示的实施形態では、C D R 3 配列は、配列番号 3 4 5 ~ 配列番号 3 5 9 ; または L G R ; または V I K から選択される。

【 0 2 2 8 】

種々の実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：R 2 C H C L 8 (配列番号 3 6 0) ; R 1 C H C L 5 0 (配列番号 3 6 1) ; R 1 C H C L 2 1 (配列番号 3 6 2) ; R 2 C H C L 8 7 (配列番号 3 6 3) ; R 2 C H C L 2 4 (配列番号 3 6 4) ; R 2 C H C L 3 8 (配列番号 3 6 5) ; R 1 C H C L 1 6 (配列番号 3 6 6) ; R 2 C H C L 1 0 (配列番号 3 6 7) ; R 1 C H C L 3 4 (配列番号 3 6 8) ; R 1 C H C L 8 2 (配列番号 3 6 9) ; R 2 C H C L 3 (配列番号 3 7 0) ; R 2 C H C L 6 9 (配列番号 3 7 1) ; R 1 C H C L 5 6 (配列番号 3 7 2) ; R 2 C H C L 3 2 (配列番号 3 7 3) ; R 2 C H C L 4 9 (配列番号 3 7 4) ; R 2 C H C L 5 3 (配列番号 3 7 5) ; R 2 C H C L 2 2 (配列番号 3 7 6) ; R 2 C H C L 2 5 (配列番号 3 7 7) ; R 2 C H C L 1 8 (配列番号 3 7 8) ; R 1 C H C L 2 3 (配列番号 3 7 9) ; R 1 C H C L 2 7 (配列番号 3 8 0) ; R 2 C H C L 1 3 (配列番号 3 8 1) ; R 2 C H C L 1 4 (配列番号 3 8 2) ; R 2 C H C L 4 2 (配列番号 3 8 3) ; R 2 C H C L 4 1 (配列番号 3 8 4) ; R 2 C H C L 9 4 (配列番号 3 8 5) ; または R 2 C H C L 2 7 (配列番号 3 8 6) 。

30

40

【 0 2 2 9 】

種々の実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、後述のように少なくとも 1 つの C D R 1、C D R 2、および / または C D R 3 配列を含む可変ドメインを有する V H H を含む。

【 0 2 3 0 】

いくつかの実施形態では、C D R 1 配列は、配列番号 3 8 7 ~ 配列番号 4 5 2 から選択される。

【 0 2 3 1 】

50

【 0 2 3 2 】

【 0 2 3 3 】

40

【 0 2 3 4 】

【 0 2 3 5 】

【 0 2 3 6 】

50

番号 1 2 1 5) を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 3 7 】

ある実施形態では、標的化部分は、T u l l e t t e t a l . , J C I I n s i g h t . 2 0 1 6 ; 1 (7) : e 8 7 1 0 2 で開示の抗 C l e c 9 A 抗体を含む。この文献の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 2 3 8 】

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明の C l e c 9 A を指向する標的化部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、同族体およびオーバーソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、C l e c 9 A を指向する標的化部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【 0 2 3 9 】

種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つに少なくとも 6 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。例えば、キメラタンパク質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つに、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 1 %、少なくとも約 6 2 %、少なくとも約 6 3 %、少なくとも約 6 4 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 6 %、少なくとも約 6 7 %、少なくとも約 6 8 %、少なくとも約 6 9 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 1 %、少なくとも約 7 2 %、少なくとも約 7 3 %、少なくとも約 7 4 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 6 %、少なくとも約 7 7 %、少なくとも約 7 8 %、少なくとも約 7 9 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 1 %、少なくとも約 8 2 %、少なくとも約 8 3 %、少なくとも約 8 4 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % 同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つに約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、約 9 9 % または約 1 0 0 % の配列同一性）であるアミノ酸配列を含む標的化部分を含み得る。

【 0 2 4 0 】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、限定されないが、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、および好酸球から選択される免疫細胞上の標的（例えば、抗原、受容体）を特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、および好酸球を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1 つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的に動員する。

【 0 2 4 1 】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、巨核球および / または血小板関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。巨核球および / または血小板抗原の例としては、例えば、G P I I b / I I I a、G P I b、v W F、P F 4、および T S P が挙げられる。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、1 つまたは複数のこれらの例示巨核球および / または血小板抗

10

20

30

40

50

原を結合する標的化部分を含む。

【0242】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、赤血球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の赤血球抗原の例としては、例えば、CD34、CD36、CD38、CD41a（血小板糖タンパク質IIb/IIIIa）、CD41b（GPIIb）、CD71（トランスフェリン受容体）、CD105、グリコホリンA、グリコホリンC、c-kit、HLA-DR、H2（MHC-II）、およびRh抗原が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示赤血球抗原を結合する標的化部分を含む。

10

【0243】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、マスト細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的のマスト細胞抗原の例としては、例えば、SCFR/CD117、FcRI、CD2、CD25、CD35、CD88、CD203c、C5R1、CMA1、FCER1A、FCER2、TPSAB1が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示マスト細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

【0244】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、好塩基球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好塩基球抗原の例としては、例えば、FcRI、CD203c、CD123、CD13、CD107a、CD107b、およびCD164が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの好塩基球抗原を結合する標的化部分を含む。

20

【0245】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、好中球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好中球抗原の例としては、例えば、7D5、CD10/CALLA、CD13、CD16（FcRIII）、CD18タンパク質（LFA-1、CR3、およびp150、95）、CD45、CD67、およびCD177が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの好中球抗原を結合する標的化部分を含む。

30

【0246】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、好酸球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好酸球抗原の例としては、例えば、CD35、CD44およびCD69が挙げられる。種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数のこれらの好酸球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0247】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的CD8結合物質は、当業者に既知の任意の適切な抗原または受容体または細胞表面マーカーに特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原または細胞表面マーカーは、組織特異的マーカーである。組織特異的マーカーの例としては、ACE、CD14、CD34、CDH5、ENG、ICAM2、MCAM、NOS3、PECAM1、PROCR、SELE、SELP、TEK、THBD、VCAM1、VWFなどの内皮細胞表面マーカー；ACTA2、MYH10、MYH11、MYH9、MYOCDなどの平滑筋細胞表面マーカー；ALCAM、CD34、COL1A1、COL1A2、COL3A1、FAP、PH-4などの線維芽細胞（間質）細胞表面マーカー；CD1D、K6IRS2、KRTO、KRT13、KRT17、KRT18、KRT19、KRT4、KRT5、KRT8、MUC1、TACSTD1などの上皮細胞表面マーカー；CD13、TFNA、アルファ-vベータ-3（ $\alpha_v\beta_3$ ）、E-セレクトリンなどの新生血管マーカー；およびA

40

50

D I P O Q、F A B P 4、および R E T N などの脂肪細胞表面マーカーが挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、1 つまたは複数のこれらの抗原を結合する標的化部分を含む。

【 0 2 4 8 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、T 細胞上に発現されるチェックポイントマーカー、例えば、P D - 1、C D 2 8、C T L A 4、I C O S、B T L A、K I R、L A G 3、C D 1 3 7、O X 4 0、C D 2 7、C D 4 0 L、T I M 3、および A 2 a R のうちの 1 つまたは複数に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。

【 0 2 4 9 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、チェックポイントマーカー、例えば、P D - 1 / P D - L 1 または P D - L 2、C D 2 8 / C D 8 0 または C D 8 6、C T L A 4 / C D 8 0 または C D 8 6、I C O S / I C O S L または B 7 R P 1、B T L A / H V E M、K I R、L A G 3、C D 1 3 7 / C D 1 3 7 L、O X 4 0 / O X 4 0 L、C D 2 7、C D 4 0 L、T I M 3 / G a l 9、および A 2 a R のうちの 1 つまたは複数に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。

【 0 2 5 0 】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本多重特異的 C D 8 結合物質は、(i) C D 8 ; (i i) T 細胞上に発現されるチェックポイントマーカー、例えば、P D - 1、C D 2 8、C T L A 4、I C O S、B T L A、K I R、L A G 3、C D 1 3 7、O X 4 0、C d 2 7、C D 4 0 L、T I M 3、および A 2 a R のうちの 1 つまたは複数を指向する標的化部分を含み、および / または (i i i) 標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの改変 (例えば、変異体) シグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞を指向する。

【 0 2 5 1 】

種々の実施形態では、本多重特異的 C D 8 結合物質は、P D - 1 を指向する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、P D - 1 ポリペプチドに選択的に結合する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、P D - 1 ポリペプチドに選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの 1 つまたは複数を含む。

【 0 2 5 2 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、C D R 1、C D R 2、および / または C D R 3 配列のうちの少なくとも 1 つを含む可変ドメインを有する P D 1 に対する V H H を含む。

【 0 2 5 3 】

いくつかの実施形態では、C D R 1 配列は、配列番号 6 5 1 ~ 配列番号 6 6 4 から選択される。

【 0 2 5 4 】

いくつかの実施形態では、C D R 2 配列は、配列番号 6 6 5 ~ 配列番号 6 7 8 から選択される。

【 0 2 5 5 】

いくつかの実施形態では、C D R 3 配列は、配列番号 6 7 9 ~ 配列番号 6 9 2 から選択される。

【 0 2 5 6 】

種々の例示的实施形態では、P D 1 標的化部分は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2 P D 2 3 (配列番号 6 9 3) ; または 2 P D 2 6 (配列番号 6 9 4) ; または 2 P D 9 0 (配列番号 6 9 5) ; または 2 P D 1 0 6 (配列番号 6 9 6) ; または 2 P D 1 6 (配列番号 6 9 7) ; または 2 P D 7 1 (配列番号 6 9 8) ; または 2 P D 1 5 2 (配列番号 6 9 9) ; または 2 P D 1 2 (配列番号 7 0 0) ; または 3 P D 5 5 (配列番号 7 0 1) ; または 3 P D 8 2 (配列番号 7 0 2) ; または 2 P D 8 (配列番号 7 0 3

10

20

30

40

50

); または 2 P D 2 7 (配列番号 7 0 4); または 2 P D 8 2 (配列番号 7 0 5); または 3 P D 3 6 (配列番号 7 0 6)。

【 0 2 5 7 】

種々の例示的实施形態では、P D 1 標的化部分は、末端ヒスチジンタグ配列 (すなわち、H H H H H H ; 配列番号 1 2 1 3) を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 5 8 】

いくつかの実施形態では、P D 1 標的化部分は、末端 H A タグ (すなわち、Y P Y D V P D Y G S ; 配列番号 1 2 1 4) を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 5 9 】

いくつかの実施形態では、P D 1 標的化部分は、A A A リンカーを含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 6 0 】

いくつかの実施形態では、P D 1 標的化部分は、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジンタグ配列 (すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ; 配列番号 1 2 1 5) を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 6 1 】

ある実施形態では、標的化部分は、抗 P D - 1 抗体ペムプロリズマブ (別名 M K - 3 4 7 5、キイトルーダ)、またはそのフラグメントを含む。ペムプロリズマブおよびその他のヒト化抗 P D - 1 抗体は、Hamid, et al. (2 0 1 3) New England Journal of Medicine 3 6 9 (2) : 1 3 4 - 4 4, US 8, 3 5 4, 5 0 9、および国際公開第 2 0 0 9 / 1 1 4 3 3 5 号に開示されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのペムプロリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖および / または配列番号 7 0 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【 0 2 6 2 】

ある実施形態では、標的化部分は、抗 P D - 1 抗体、ニボルバム (別名 B M S - 9 3 6 5 5 8、MDX - 1 1 0 6、ONO - 4 5 3 8、オプジーボ)、またはそのフラグメントを含む。P D - 1 に特異的に結合するニボルバム (クローン 5 C 4) およびその他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第 8, 0 0 8, 4 4 9 号および国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 1 1 6 8 号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、ニボルバムまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 0 9 のアミノ酸配列を含む重鎖および / または配列番号 7 1 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【 0 2 6 3 】

ある実施形態では、標的化部分は、抗 P D - 1 抗体ピディリズマブ (別名 C T - 0 1 1、h B A T または h B A T - 1)、またはそのフラグメントを含む。ピディリズマブおよびその他のヒト化抗 P D - 1 モノクローナル抗体は、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号および国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 1 6 1 1 号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗 P D - 1 抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 の配列番号 1 5 ~ 1 8 ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 の配列番号 1 5 (配列番号 7 1 1) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 1 6 (配列番号 7 1 2) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 1 7 (配列番号 7 1 3) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 1 8 (配列番号 7 1 4) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および / または米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 2 0 ~ 2 4 ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 2 0 (配列番

10

20

30

40

50

号 7 1 5) ; 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号 の 配 列 番 号 2 1 (配 列 番 号 7 1 6) ; 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 0 8 号 / 0 0 2 5 9 8 0 の 配 列 番 号 2 2 (配 列 番 号 7 1 7) ; 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号 の 配 列 番 号 2 3 (配 列 番 号 7 1 8) ; または米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号 の 配 列 番 号 2 4 (配 列 番 号 7 1 9) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【 0 2 6 4 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号 の 配 列 番 号 1 8 を 含 む 軽 鎖 お よ び 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号 の 配 列 番 号 2 2 を 含 む 重 鎖 を 含 む。

【 0 2 6 5 】

ある実施形態では、標的化部分は、AMP - 5 1 4 (別 名 MED I - 0 6 8 0) を 含 む。

【 0 2 6 6 】

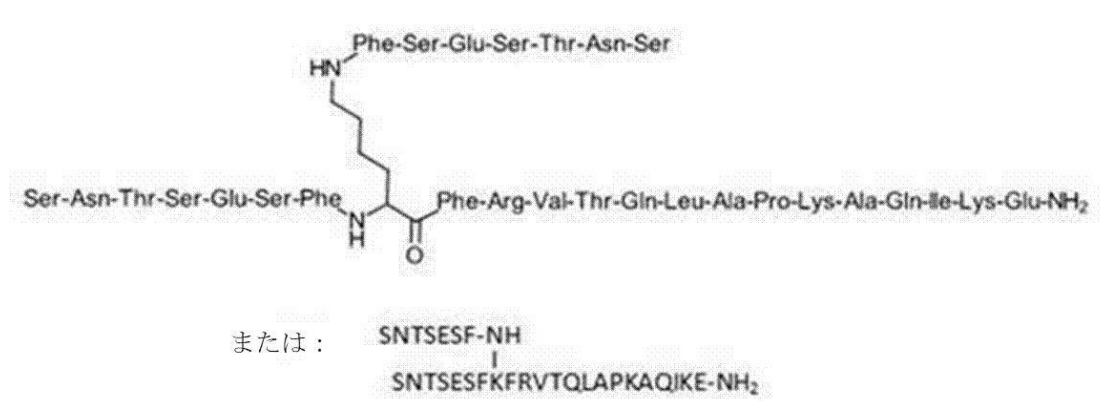
ある実施形態では、標的化部分は、pd - 1 2 - F c 融合タンパク質 AMP - 2 2 4 を 含 み、これは国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号 お よ び 同 第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 4 2 号 に 開 示 され、これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、標的化部分は、国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号 の 配 列 番 号 4 (配 列 番 号 7 2 0) を 含 む 標 的 化 ド メ イ ン お よ び / または国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号 の 配 列 番 号 8 3 (配 列 番 号 7 2 1) を 含 む B 7 - D C 融 合 タ ン パ ク 質 を 含 み 得 る。

【 0 2 6 7 】

ある実施形態では、標的化部分は、ペプチド A U N P 1 2 または米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 8 3 7 3 号 または米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 5 3 号 に 開 示 の う ち の い ず れ かの他のペプチドを含む。例えば、標的化部分は、A U N P 1 2 (す な わ ち、米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 1 1 / 0 3 1 8 3 7 3 号 の 化 合 物 8 または配列番号 4 9) を 含 み 得、これは、配列番号 7 2 2 の下記配列を有する：

S N T S E S F K (S N T S E S F) F R V T Q L A P K A Q I K E - N H ₂

【 化 1 】



【 0 2 6 8 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号 に 開 示 の よ う に、標的化部分は、抗 PD - 1 抗体 1 E 3 またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 E 3 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 2 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 7 2 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 6 9 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号 に 開 示 の よ う に、標的化部分は、抗 PD - 1 抗体 1 E 8 またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 E 8 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 7 2 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可

変領域を含む。

【 0 2 7 0 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - 1 抗体 1 H 3 またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 H 3 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 7 2 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 7 1 】

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号および国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 1 4 4 7 号に開示のように、P D - 1 を指向する V H H を含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、P D - 1 に対する V H H は、米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 4 7 ~ 3 5 1 : 米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 4 7 (配列番号 7 2 9) ; 米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 4 8 (配列番号 7 3 0) ; 米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 4 9 (配列番号 7 3 1) ; 米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 5 0 (配列番号 7 3 2) ; または米国特許第 8 , 9 0 7 , 0 6 5 号の配列番号 3 5 1 (配列番号 7 3 3) を含む。

【 0 2 7 2 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号および国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 6 9 5 9 号に開示のように、抗 P D - 1 抗体またはそのフラグメントのうちのいずれか 1 種類を含み、これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 5 ~ 2 9 : 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 5 (配列番号 7 3 4) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 6 (配列番号 7 3 5) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 7 (配列番号 7 3 6) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 8 (配列番号 7 3 7) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 2 9 (配列番号 7 3 8) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 0 ~ 3 3 : 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 0 (配列番号 7 3 9) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 1 (配列番号 7 4 0) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 2 (配列番号 7 4 1) ; 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 3 (配列番号 7 4 2) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【 0 2 7 3 】

種々の実施形態では、本多重特異的 C D 8 結合物質は、T S R - 0 4 2 (T e s a r o , I n c .)、R E G N 2 8 1 0 (R e g e n e r o n P h a r m a c e u t i c a l s , I n c .)、P D R 0 0 1 (N o v a r t i s P h a r m a c e u t i c a l s)、および B G B - A 3 1 7 (B e i G e n e L t d .) から選択される P D - 1 を指向する 1 種類または複数種類の抗体、またはその抗体フラグメントを含む。

【 0 2 7 4 】

種々の実施形態では、本多重特異的 C D 8 結合物質は、P D - L 1 を指向する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、P D - L 1 ポリペプチドに選択的に結合する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、P D - L 1 ポリペプチドに選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの 1 つまたは複数を含む。

【 0 2 7 5 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 C D 8 結合物質は、C D R 1、C D R 2、お

10

20

30

40

50

よび／またはCDR3配列のうちの少なくとも1つを含む可変ドメインを有するPD-L1に対するVHHを含む。

【0276】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号743～配列番号773から選択される。

【0277】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号774～配列番号804から選択される。

【0278】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号805～配列番号835から選択される。

10

【0279】

種々の例示的实施形態では、PD-L1標的化部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2LIG2（配列番号836）；または2LIG3（配列番号837）；または2LIG16（配列番号838）または2LIG22（配列番号839）または2LIG27（配列番号840）または2LIG29（配列番号841）または2LIG30（配列番号842）または2LIG34（配列番号843）または2LIG35（配列番号844）または2LIG48（配列番号845）または2LIG65（配列番号846）または2LIG85（配列番号847）または2LIG86（配列番号848）または2LIG89（配列番号849）または2LIG97（配列番号850）または2LIG99（配列番号851）または2LIG109（配列番号852）または2LIG127（配列番号853）または2LIG139（配列番号854）または2LIG176（配列番号855）または2LIG189（配列番号856）または3LIG3（配列番号857）または3LIG7（配列番号858）または3LIG8（配列番号859）または3LIG9（配列番号860）または3LIG18（配列番号861）または3LIG20（配列番号862）または3LIG28（配列番号863）または3LIG29（配列番号864）または3LIG30（配列番号865）または3LIG33（配列番号866）。

20

【0280】

種々の例示的实施形態では、PD-L1標的化部分は、末端ヒスチンタグ配列（すなわち、HHHHHH；配列番号1213）を含まない上記配列のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0281】

いくつかの実施形態では、PD-L1標的化部分は、末端HAタグ（すなわち、YPYDVPDYGS；配列番号1214）を含まない上記配列のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【0282】

いくつかの実施形態では、PD-L1標的化部分は、AAAリンカーを含まない上記配列のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【0283】

40

いくつかの実施形態では、PD-L1標的化部分は、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチンタグ配列（すなわち、AAAYPYDVPDYGSHHHHHH；配列番号1215）を含まない上記配列のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【0284】

ある実施形態では、標的化部分は、抗PD-L1抗体MEI4736（別名デュルバルマブ）、またはそのフラグメントを含む。MEI4736は、PD-L1に対し選択的であり、PD-L1のPD-1およびCD80受容体に対する結合を阻止する。本明細書で提供される方法で使用するためのMEI4736およびその抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖または重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。MEI4736の

50

配列は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 2 7 2 号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための M E D I 4 7 3 6 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 6 7 のアミノ酸配列を含む重鎖および / または配列番号 8 6 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【 0 2 8 5 】

例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための M E D I 4 7 3 6 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 2 7 2 号の配列番号 4 (配列番号 8 6 9) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / または国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 2 7 2 号の配列番号 3 (配列番号 8 7 0) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【 0 2 8 6 】

ある実施形態では、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体アテゾリズマブ (別名 M P D L 3 2 8 0 A、R G 7 4 4 6)、またはそのフラグメントを含む。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 7 1 のアミノ酸配列を含む重鎖 ; および / または配列番号 8 7 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【 0 2 8 7 】

ある実施形態では、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体アベルマブ (別名 M S B 0 0 1 0 7 1 8 C)、またはそのフラグメントを含む。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 7 3 のアミノ酸配列を含む重鎖 ; および / または配列番号 8 7 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【 0 2 8 8 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 B M S - 9 3 6 5 5 9 (別名 1 2 A 4、M D X - 1 1 0 5)、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための B M S - 9 3 6 5 5 9 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 7 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / または配列番号 8 7 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【 0 2 8 9 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 3 G 1 0、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための 3 G 1 0 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 7 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / または配列番号 8 7 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 0 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 1 0 A 5、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 0 A 5 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 7 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / または配列番号 8 8 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【 0 2 9 1 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 5 F 8、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 5 F 8 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 8 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / ま

50

たは配列番号 8 8 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 2 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 1 0 H 1 0、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 0 H 1 0 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 8 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 8 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 3 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 1 B 1 2、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 B 1 2 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 8 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 8 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 4 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 7 H 1、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための 7 H 1 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 8 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 8 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 5 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 1 1 E 6、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 1 E 6 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 8 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 9 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 6 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 1 2 B 7、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 2 B 7 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 9 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 9 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 7 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 0 9 2 5 0 号および国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 1 3 G 4、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 3 G 4 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 9 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 9 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 9 8 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 1 E 1 2 またはそのフラグメントを含む。この特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1 E 1 2 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 9 5 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 8 9 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

50

【 0 2 9 9 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 1 F 4 またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための 1 F 4 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 9 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 8 9 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 3 0 0 】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 2 G 1 1 またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための 2 G 1 1 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 9 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 9 0 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【 0 3 0 1 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 3 B 6、またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための 3 B 6 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 9 0 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 9 0 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【 0 3 0 2 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号および国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 5 4 9 3 号に開示のように、抗 P D - L 1 抗体 3 D 1 0、またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための 3 D 1 0 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 9 0 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 9 0 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 3 0 3 】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号および国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 6 9 5 9 号に開示のうちのいずれか 1 種類の抗 P D - L 1 抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 4 ~ 3 8；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 4（配列番号 9 0 5）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 5（配列番号 9 0 6）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 6（配列番号 9 0 7）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 7（配列番号 9 0 8）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 8（配列番号 9 0 9）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 9 ~ 4 2；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 3 9（配列番号 9 1 0）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 4 0（配列番号 9 1 1）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 4 1（配列番号 9 1 2）；米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 2 7 1 3 5 8 号の配列番号 4 2（配列番号 9 1 3）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

40

【 0 3 0 4 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8, 7 7 9, 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 2 . 7 A 4 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供され

50

る方法で使用するための 2 . 7 A 4 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 2 (配列番号 9 1 4) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 7 (配列番号 9 1 5) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 3 0 5 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 2 . 9 D 1 0 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 2 . 9 D 1 0 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 1 2 (配列番号 9 1 6) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 1 7 (配列番号 9 1 7) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【 0 3 0 6 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 2 . 1 4 H 9 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 2 . 1 4 H 9 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 2 2 (配列番号 9 1 8) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 2 7 (配列番号 9 1 9) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【 0 3 0 7 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 2 . 2 0 A 8 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 2 . 2 0 A 8 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 3 2 (配列番号 9 2 0) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 3 7 (配列番号 9 2 1) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【 0 3 0 8 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 3 . 1 5 G 8 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 3 . 1 5 G 8 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 4 2 (配列番号 9 2 2) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号 9 2 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 3 0 9 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号、および米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 5 6 3 5 3 号に開示のように、標的化部分は、抗 P D - L 1 抗体 3 . 1 8 G 1 またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 3 . 1 8 G 1 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 5 2 (配列番号 9 2 4) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号の配列番号 5 7 (配列番号 9 2 5) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【 0 3 1 0 】

ある実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1

50

08号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2.7A4OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.7A4OPTまたはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号62（配列番号926）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第2011/066389号の配列番号67（配列番号927）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0311】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2.14H9OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.14H9OPTまたはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号72（配列番号928）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または国際公開第2011/066389号の配列番号77（配列番号929）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0312】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2016/061142号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2016/061142号の配列番号18、30、38、46、50、54、62、70、および78；国際公開第2016/061142号の配列番号18（配列番号930）；国際公開第2016/061142号の配列番号30（配列番号931）；国際公開第2016/061142号の配列番号38（配列番号932）；国際公開第2016/061142号の配列番号46（配列番号933）；国際公開第2016/061142号の配列番号50（配列番号934）；国際公開第2016/061142号の配列番号54（配列番号935）；国際公開第2016/061142号の配列番号62（配列番号936）；国際公開第2016/061142号の配列番号70（配列番号937）；国際公開第2016/061142号の配列番号78（配列番号938）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および/または、国際公開第2016/061142号の配列番号22、26、34、42、58、66、74、82、および86；国際公開第2016/061142号の配列番号22（配列番号939）；国際公開第2016/061142号の配列番号26（配列番号940）；国際公開第2016/061142号の配列番号34（配列番号941）；国際公開第2016/061142号の配列番号42（配列番号942）；国際公開第2016/061142号の配列番号58（配列番号943）；国際公開第2016/061142号の配列番号66（配列番号944）；国際公開第2016/061142号の配列番号74（配列番号945）；国際公開第2016/061142号の配列番号82（配列番号946）；国際公開第2016/061142号の配列番号86（配列番号947）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0313】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2016/022630号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2016/022630号の配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、および46；国際公開第2016/022630号の配列番号2（配列番号948）；国際公開第2016/022630号の配列番号6（配列番号949）；国際公開第2016/022630号の配列番号10（配列番号950）；国際公開第2016/022630号の配列番号14（配列番号951）；国際公開第2016/022630号の配列番号18（配列番号952）

10

20

30

40

50

); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 22 (配列番号 953); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 26 (配列番号 954); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 30 (配列番号 955); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 34 (配列番号 956); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 38 (配列番号 957); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 42 (配列番号 958); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 46 (配列番号 959) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖; および/または、国際公開第 2016/022630 号の配列番号 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、および 48: 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 4 (配列番号 960); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 8 (配列番号 961); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 12 (配列番号 962); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 16 (配列番号 963); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 20 (配列番号 964); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 24 (配列番号 965); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 28 (配列番号 966); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 32 (配列番号 967); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 36 (配列番号 968); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 40 (配列番号 969); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 44 (配列番号 970); 国際公開第 2016/022630 号の配列番号 48 (配列番号 971) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

【0314】

20

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第 2015/112900 号に開示されるいずれか 1 種類の抗 PD-L1 抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2015/112900 号の配列番号 38、50、82、および 86: 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 38 (配列番号 972); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 50 (配列番号 973); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 82 (配列番号 974); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 86 (配列番号 975) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖; および/または国際公開第 2015/112900 号の配列番号 42、46、54、58、62、66、70、74、および 78: 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 42 (配列番号 976); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 46 (配列番号 977); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 54 (配列番号 978); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 58 (配列番号 979); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 62 (配列番号 980); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 66 (配列番号 981); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 70 (配列番号 982); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 74 (配列番号 983); 国際公開第 2015/112900 号の配列番号 78 (配列番号 984) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0315】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第 2010/077634 号および米国特許第 8,217,149 号に開示されるいずれか 1 種類の抗 PD-L1 抗体を含む。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗 PD-L1 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2010/077634 号の配列番号 20 (配列番号 985) のアミノ酸配列を含む重鎖領域; および/または国際公開第 2010/077634 号の配列番号 21 (配列番号 986) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0316】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第 20120039906 号に開示されているように、CNCM 受託番号 CNCM I-4122、CNCM I-4080 および CNCM I-4081 により入手可能なハイブリドーマから得ることができる

50

いずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0317】

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第8,907,065号および国際公開第2008/071447号に開示のように、PD-L1抗体を指向するVHHを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-L1に対するVHHは、米国特許第8,907,065号の配列番号394~399:米国特許第8,907,065号の配列番号394(配列番号987);米国特許第8,907,065号の配列番号395(配列番号988);米国特許第8,907,065号の配列番号396(配列番号989);米国特許第8,907,065号の配列番号397(配列番号990);米国特許第8,907,065号の配列番号398(配列番号991);米国特許第8,907,065号の配列番号399(配列番号992)を含む。

10

【0318】

種々の実施形態では、本多重特異的CD8結合物質は、PD-L2を指向する1つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、PD-L2ポリペプチドに選択的に結合する1つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、PD-L2ポリペプチドを選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの1つまたは複数を含む。

20

【0319】

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第8,907,065号および国際公開第2008/071447号に開示のように、PD-L2を指向するVHHを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-L1に対するVHHは、米国特許第8,907,065号の配列番号449~455:米国特許第8,907,065号の配列番号449(配列番号993);米国特許第8,907,065号の配列番号450(配列番号994);米国特許第8,907,065号の配列番号451(配列番号995);米国特許第8,907,065号の配列番号452(配列番号996);米国特許第8,907,065号の配列番号453(配列番号997);米国特許第8,907,065号の配列番号454(配列番号998);米国特許第8,907,065号の配列番号455(配列番号999)を含む。

30

【0320】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2011/0271358号および国際公開第2010/036959号に開示のうちのいずれか1種類の抗PD-L2抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号43~47:米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号43(配列番号1000);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号44(配列番号1001);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号45(配列番号1002);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号46(配列番号1003);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号47(配列番号1004)から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖;および/または米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号48~51:米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号48(配列番号1005);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号49(配列番号1006);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号50(配列番号1007);米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号51(配列番号1008)から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

40

【0321】

種々の実施形態では、本発明の標的化部分は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか

50

に少なくとも約 60%、少なくとも約 61%、少なくとも約 62%、少なくとも約 63%、
 少なくとも約 64%、少なくとも約 65%、少なくとも約 66%、少なくとも約 67%、
 少なくとも約 68%、少なくとも約 69%、少なくとも約 70%、少なくとも約 71%、
 少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、
 少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、
 少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、
 少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、
 少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、
 少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、
 少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、
 または 100% 同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれかと約 60%、ま
 たは約 61%、または約 62%、または約 63%、または約 64%、または約 65%、ま
 たは約 66%、または約 67%、または約 68%、または約 69%、または約 70%、ま
 たは約 71%、または約 72%、または約 73%、または約 74%、または約 75%、ま
 たは約 76%、または約 77%、または約 78%、または約 79%、または約 80%、ま
 たは約 81%、または約 82%、または約 83%、または約 84%、または約 85%、ま
 たは約 86%、または約 87%、または約 88%、または約 89%、または約 90%、ま
 たは約 91%、または約 92%、または約 93%、または約 94%、または約 95%、ま
 たは約 96%、または約 97%、または約 98%、約 99% または約 100% の配列同一
 性）である、PD-1、PD-L1、および/または PD-L2 を標的とする配列を含み
 得る。

10

20

【0322】

種々の実施形態では、本発明の標的化部分は、本明細書で開示の PD-1、PD-L1、
 および/または PD-L2 を標的とする重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相
 補性決定領域 (CDR)、およびフレームワーク領域配列のいずれの組み合わせを含み得
 る。

【0323】

PD-1、PD-L1 および/または PD-L2 を選択的に結合するかあるいは標的に
 する追加の抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチドまた
 は融合タンパク質は、国際公開第 2011/066389 号、米国特許出願公開第 2008/0025980 号、
 米国特許出願公開第 2013/0034559 号、米国特許第 8,779,108 号、米国特許出願公開第 2014/0356353 号、
 米国特許第 8,609,089 号、米国特許出願公開第 2010/028330 号、米国特許出願公開第 2012/0114649 号、
 国際公開第 2010/027827 号、国際公開第 2011/066342 号、米国特許第 8,907,065 号、
 国際公開第 2016/062722 号、国際公開第 2009/101611 号、国際公開第 2010/027827 号、
 国際公開第 2011/066342 号、国際公開第 2007/005874 号、国際公開第 2001/014556 号、
 米国特許出願公開第 2011/0271358 号、国際公開第 2010/036959 号、国際公開第 2010/077634 号、
 米国特許第 8,217,149 号、米国特許出願公開第 2012/0039906 号、国際公開第 2012/145493 号、
 米国特許出願公開第 2011/0318373 号、米国特許第 8,779,108 号、米国特許出願公開第 2014/0044738 号、
 国際公開第 2009/089149 号、国際公開第 2007/005877 号、国際公開第 2016/061142 号、
 国際公開第 2016/02263 号、国際公開第 2010/077634 号、および国際公開第 2015/112900 号で
 開示されている。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0324】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 CD8 結合物質は、例えば DC 上で、XCR1
 に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。種々の実施形態では、
 本発明の多重特異的 CD8 結合物質は、XCL1 の全体または一部を含む抗原認識ドメ

50

インを有する標的化部分を含む。

【0325】

種々の実施形態では、多重特異的CD8結合物質は、非細胞構造の一部である標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する認識ドメインを有する標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、無傷の細胞または細胞構造の不可欠な構成要素ではない。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、細胞外の抗原または受容体である。いくつかの実施形態では、標的は、非タンパク質性の非細胞マーカーであり、これらは、限定されないが、例えば、壊死腫瘍細胞から放出されたDNA、などのDNAまたはRNAを含む、核酸またはコレステロールなどの細胞外沈着物を含む。

【0326】

いくつかの実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、ストローマもしくは細胞外マトリックス（ECM）の非細胞成分またはそれと関連するマーカーの一部である。本明細書で使用される場合、ストローマは、組織または器官の連結および支持フレームワークを指す。ストローマは、細胞外マトリックス（ECM）および細胞外分子と共に線維芽細胞/筋線維芽細胞/膠細胞、上皮、脂肪、免疫、血管、平滑筋、および免疫細胞などの細胞の寄せ集めを含み得る。種々の実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、細胞外マトリックスおよび細胞外分子などのストローマの非細胞成分の一部である。本明細書で使用される場合、ECMは、全ての組織および器官内に存在する非細胞成分を指す。ECMは、限定されないが、タンパク質、糖タンパク質、プロテオグリカン、および多糖類を含む生化学的に別々の成分の多数の集まりからなる。これらのECM成分は通常、隣接する細胞により産生され、エキソサイトーシスによりECM中に分泌される。分泌されると、ECM成分は多くの場合、集合して、巨大分子の複合体ネットワークを形成する。種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、ECMの任意の成分上に位置する標的（例えば、抗原または受容体または非タンパク質分子）を認識する標的化部分を含む。ECMの成分の例としては、限定されないが、プロテオグリカン、非プロテオグリカン多糖類、繊維および他のECMタンパク質またはECM非タンパク質、例えば、多糖類および/または脂質、またはECM関連分子（例えば、タンパク質または非タンパク質、例えば、多糖類、核酸および/または脂質）が挙げられる。

【0327】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、ECMプロテオグリカン上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。プロテオグリカンはグリコシル化タンパク質である。塩基性プロテオグリカン単位は、1つまたは複数の共有結合グリコサミノグリカン（GAG）鎖を有するコアタンパク質を含む。プロテオグリカンは、正電荷のナトリウムイオン（Na⁺）を引き付ける正味負電荷を有し、これは、浸透を介して水を引き付け、ECMおよび常在性細胞を水和した状態に保持する。プロテオグリカンはまた、成長因子を捕捉し、ECM内に貯蔵し得る。本発明のキメラタンパク質により標的とされ得るプロテオグリカンの例としては、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、およびケラタン硫酸が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、標的化部分は、ヒアルロン酸などの非プロテオグリカン多糖類上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。

【0328】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、ECM繊維上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。ECM繊維は、コラーゲン繊維およびエラスチン繊維を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、コラーゲンまたはコラーゲン繊維上の1つまたは複数のエピトープを認識する。コラーゲンは、ECM中で最も豊富なタンパク質である。コラーゲンはECM中に線維性タンパク質として存在し、常在性細胞に対し構造支持を与える。1つまたは複数の実施形態では、標的化部分は、限定されないが、線維性コラーゲン（I、II、III、V、XI型）、FACITコラーゲン（IX、XII、XIV型）、短鎖コラーゲン（VIIII、X型）、基底膜コラーゲン（IV型）、および/またはVI、VII、またはXIIII型コラーゲンを有するECM内に存在する様々な種類のコラーゲンを認識し、これに結合する。エラスチン繊維は、組織に弾性を与え、組織が必要に応じ伸

10

20

30

40

50

縮し、その後、元の状態に戻ることを可能にする。いくつかの実施形態では、標的化部分は、エラスチンまたはエラスチン繊維上の1つまたは複数のエピトープを認識する。

【0329】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、限定されないが、テネイシン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、またはナイドジェン/エンタクチンを含む、1種類または複数種類のECMタンパク質を認識する。

【0330】

ある実施形態では、標的化部分は、テネイシンを認識し、これに結合する。テネイシン(TN)ファミリーの糖タンパク質は、少なくとも4種類のメンバー：テネイシン-C、テネイシン-R、テネイシン-X、およびテネイシン-Wを含む。テネイシンタンパク質の一次構造は、同じ連続配列中に順序づけられたいくつかの共通のモチーフ：アミノ末端7個の反復、上皮増殖因子(EGF)様反復、フィブロネクチンIII型ドメイン反復、およびカルボキシル末端フィブリノーゲン様球状ドメインを含む。それぞれのタンパク質メンバーは、EGF様およびフィブロネクチンIII型反復の数および性質における典型的な変動に関連付けられる。アイソフォームバリエーションはまた、特にテネイシン-Cに対して存在する。27種を超えるテネイシン-Cのスプライスバリエーションおよび/またはアイソフォームが知られている。特定の実施形態では、標的化部分は、テネイシン-CA1を認識し、これに結合する。同様に、テネイシン-Rはまた、種々のスプライスバリエーションおよびアイソフォームを有する。テネイシン-Rは通常、ダイマーまたはトリマーとして存在する。テネイシン-Xは、テネイシンファミリーの最大メンバーであり、トリマーとして存在することが知られている。テネイシン-Wは、トリマーとして存在する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、テネイシンタンパク質上の1つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーおよび/またはダイマーおよび/またはトリマーおよび/またはヘキサマー型のテネイシンタンパク質を認識する。

【0331】

ある実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチンを認識し、これに結合する。フィブロネクチンは、細胞をECM中のコラーゲン繊維と連結し、細胞がECM中を移動することを可能にする糖タンパク質である。インテグリンに結合時には、フィブロネクチンは折り畳みをほどいて機能的ダイマーを形成する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーおよび/またはダイマー型のフィブロネクチンを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチン上の1つまたは複数のエピトープを認識する。例示的実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチン細胞外ドメインA(EDA)またはフィブロネクチン細胞外ドメインB(EDB)を認識する。EDAレベルの上昇は、乾癬、関節リウマチ、糖尿病、および癌を含む種々の疾患および障害に関連する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、EDAアイソフォームを含むフィブロネクチンを認識し、癌細胞を含む疾患細胞にキメラタンパク質を標的化するために使用し得る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、EDBアイソフォームを含むフィブロネクチンを認識する。種々の実施形態では、このような標的化部分は、腫瘍新生血管を含む腫瘍細胞にキメラタンパク質を標的化するために使用し得る。

【0332】

ある実施形態では、標的化部分は、フィブリンを認識し、これに結合する。フィブリンは、ECMのマトリックスネットワーク中に見つかることが多い、もう1つのタンパク質物質である。フィブリンは、フィブリノーゲンに対するプロテアーゼトロンビンの作用により形成され、これにより、フィブリンを重合させる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブリン上の1つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーならびに重合型のフィブリンを認識する。

【0333】

ある実施形態では、標的化部分は、ラミニンを認識し、これに結合する。ラミニンは、基底膜の主要成分であり、細胞および器官のためのタンパク質ネットワーク基盤である。

ラミニンは、鎖、鎖、および鎖を含むヘテロトリマータンパク質である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ラミニン上の1つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマー、ダイマーならびにトリマー型のラミニンを認識する。

【0334】

ある実施形態では、標的化部分は、ナイドジェンまたはエンタクチンを認識し、これらに結合する。ナイドジェン/エンタクチンは、高度に保存された硫酸化糖タンパク質ファミリーである。それらは基底膜の主要構造的成分をなし、ラミニンと、基底膜中のコラーゲンIVネットワークを連結するように機能する。このファミリーのメンバーは、ナイドジェン-1およびナイドジェン-2を含む。種々の実施形態では、標的化部分は、ナイドジェン-1および/またはナイドジェン-2上のエピトープを認識する。

10

【0335】

種々の実施形態では、標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの標的（例えば、ECMタンパク質）上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、タンパク質上に存在する1つまたは複数の線形エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、線形エピトープは、タンパク質上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、タンパク質上に存在する1つまたは複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および/または形状および/または三次構造を備えた3次元表面を形成する1つまたは複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

20

【0336】

種々の実施形態では、標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの標的（例えば、ECMタンパク質）の完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエーションおよび/またはフラグメントおよび/または任意の他の天然または合成の類似体、バリエーション、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、標的化部分は、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む、本明細書に記載の任意の型のタンパク質に結合し得る。種々の実施形態では、標的化部分は、グリコシル化および/またはリン酸化型などの、本明細書に記載の任意の翻訳後修飾型のタンパク質に結合し得る。

30

【0337】

種々の実施形態では、標的化部分は、DNAなどの細胞外分子を認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、DNAを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、DNAは、壊死細胞またはアポトーシス腫瘍細胞または他の疾患細胞から細胞外間隙中に脱落する。

【0338】

種々の実施形態では、標的化部分は、アテローム斑と関連する1種類または複数種類の非細胞構造を認識する抗原認識ドメインを含む。2つのタイプのアテローム斑が知られている。線維-脂質（線維-脂肪）斑（*fibro-lipid (fibro-fatty) plaque*）は、動脈の内膜の下に脂質を取り込んだ（*lipid-laden*）細胞の蓄積を特徴とする。内皮の下には、アテローム性のプラークコアを覆う繊維状キャップが存在する。コアは、増大した組織コレステロールおよびコレステロールエステル含量を有する脂質を取り込んだ細胞（マクロファージおよび平滑筋細胞）、フィブリン、プロテオグリカン、コラーゲン、エラスチン、ならびに壊死細胞片を含む。進行型プラークでは、プラークの中心コアは通常、細胞外のコレステロール沈着物（死細胞から放出）を含み、これは、空の針状間隙を有するコレステロール結晶の領域を形成する。プラークの周辺部には、より若い泡沫状細胞および毛細血管がある。繊維状プラークはまた、動脈壁内の内膜下にも局在し、壁の肥厚化および増殖、および時には、筋層の若干の萎縮を伴う内腔の飛び飛びに局在化した狭小化をもたらす。繊維状プラークは、コラーゲン繊維（エオシン好性）、カルシウムの沈殿物（ヘマトキシリン好性）および脂質を取り込んだ細胞を

40

50

含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブリン、プロテオグリカン、コラーゲン、エラスチン、壊死細胞片、およびカルシウムまたは他の鉱物沈着物または沈殿物などのこれらのブランクの1種類または複数種類の非細胞成分を認識し、これに結合する。いくつかの実施形態では、壊死細胞片は、核酸、例えば、死細胞から放出されるDNAまたはRNAである。

【0339】

種々の実施形態では、標的化部分は、神経変性疾患と関連する脳ブランク中で見つかる1種類または複数種類の非細胞構造を認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、アルツハイマー病の患者の脳中で見つかるアミロイド斑中に局在化する1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。例えば、標的化部分は、ペプチドアミロイドペータを認識し、これに結合する。ペプチドアミロイドペータは、アミロイド斑の主要な成分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ハンチントン病の患者で見つかる脳ブランク中にある1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。種々の実施形態では、標的化部分は、レヴィー小体認知症および封入体筋炎などの他の神経変性疾患または筋骨格疾病と関連するブランクで見つかる1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。

【0340】

リンカーおよび官能基

種々の実施形態では、CD8結合物質は、1つまたは複数の官能基、残基、または部分を含み得る。種々の実施形態では、1つまたは複数の官能基、残基、または部分は、本明細書に記載のうちのいずれかのシグナル伝達物質または標的化部分に結合されるか、または遺伝的に融合される。いくつかの実施形態では、このような官能基、残基または部分は、1つまたは複数の望ましい特性または官能基を本発明のCD8結合物質に付与する。このような官能基およびそれらをCD8結合物質に導入する技術の例は、当技術分野において既知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980)を参照されたい。

【0341】

種々の実施形態では、CD8結合物質は、別の物質と複合化および/または融合して、半減期を延長するか、または別の方法で薬学的および薬物動態学的特性を改善し得る。いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、PEG、XTEN（例えば、rPEGとして）、ポリシアル酸（POLYXEN）、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミンまたはHAS）、エラスチン様タンパク質（ELP）、PAS、HAP、GLK、CTP、トランスフェリンなどのうちの1つまたは複数と融合または複合化され得る。いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、抗体またはFcフラグメントなどの抗体フラグメントと融合または複合化され得る。例えば、キメラタンパク質は、ヒト免疫グロブリン（Ig）GのFcドメインのN-末端またはC末端に融合され得る。種々の実施形態では、それぞれ個々のキメラタンパク質は、BioDrugs (2015) 29: 215-239に記載の1種類または複数種類の物質に融合され、この文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0342】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、好適な薬学的に許容可能なポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）（PEG）またはその誘導体（例えば、メトキシポリ（エチレングリコール）またはmPEG）を含む。いくつかの実施形態では、PEG部分の結合は、半減期を伸ばし、および/またはCD8結合タンパク質の免疫原性を低減する。例えば、抗体および抗体フラグメント（限定されないが、VHHなどの単ドメイン抗体を含む）に対し当該技術分野で用いられるペグ化などの任意の好適な形態のペグ化が通常用いられる；例えば、Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); VeroneseおよびHarrisによる、Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), Harrisお

10

20

30

40

50

よび *Chess* による、*Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2, (2003) ならびに国際公開第 04/060965 号を参照されたい。これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質のペグ化のための種々の試薬も、例えば、*Nektar Therapeutics, USA* から市販されている。いくつかの実施形態では、特に、システイン残基を介した部位特異的なペグ化が使用される（例えば、*Yang et al., Protein Engineering*, 16, 10, 761-770 (2003) を参照されたい、この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、このために、本発明の CD8 結合物質中の天然のシステイン残基に結合され得る。いくつかの実施形態では、本発明の CD8 結合物質は、PEG の結合のための 1 つまたは複数のシステイン残基を適切に導入するように修飾されるか、または PEG の結合のための 1 つまたは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列が、当該技術分野において既知の技術を使用して CD8 結合物質のアミノ末端および/またはカルボキシ末端に融合され得る。いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分には、N 結合型または O 結合型グリコシル化を含む。いくつかの実施形態では、N 結合型または O 結合型グリコシル化は、翻訳時修飾および/または翻訳後修飾の一部として導入される。

【0343】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、1 つまたは複数の検出可能なラベルまたはその他のシグナル生成基または部分を含む。好適なラベルおよびそれらの結合、使用および検出のための技術は、当技術分野において、既知であり、限定されないが、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、ならびにフルオレサミンおよび蛍光金属、例えば、Eu またはランタニド系列の他の金属）、リン光標識、化学発光ラベルまたは生物発光ラベル（例えば、ルミノール、イソルミノール、セロマテックアクリジニウム・エステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、オキサレートエステル、ジオキセタンまたは GFP およびその類似体）、放射性同位体、金属、金属キレートもしくは金属カチオンまたはインビボ、インビトロまたはインサイツ診断および画像処理での使用に特に適している他の金属もしくは金属カチオン、ならびに発色団および酵素（例えば、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチンアビジンペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ）を含む。他の好適なラベルとしては、NMR または ESR 分光法を用いて検出できる部分が挙げられる。このように標識した本発明の VHH およびポリペプチドは、特定の標識の選択により、例えば、インビトロ、インビボまたはインサイツアッセイ（これ自体 ELISA、RIA および EIA およびその他の「サンドイッチ法」などとして知られるイムノアッセイ）ならびにインビボ診断および画像処理の目的に使用し得る。

【0344】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分には、CD8 結合物質に結合または遺伝的に融合されたタグが含まれる。いくつかの実施形態では、CD8 結合物質は、単一タグまたは複数タグを含み得る。例えば、タグは、CD8 結合物質の CD8 またはいずれか他の腫瘍抗原などの目的抗原に対する結合を阻害または妨害しない、ペプチド、糖、または DNA 分子である。種々の実施形態では、タグは、少なくとも約：3~5 アミノ酸長さ、5~8 アミノ酸長さ、8~12 アミノ酸長さ、12~15 アミノ酸長さ、または 15~20 アミノ酸長さである。代表的タグは、例えば、米国特許出願公開第 2013/0058962 号に記載されている。いくつかの実施形態では、タグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) およびヒスチジン (His) タグなどの親和性タグである。ある実施形態では、CD8 結合物質は His タグを含む。

【0345】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、例えば、金属または金属カチオンのうちの1つをキレートするためのキレート化基を含む。好適なキレート化基は、例えば、限定されないが、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含む。

【0346】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、ビオチン - （ストレプト）アビジン結合対などの、特異的結合対の片方の一部である官能基を含む。このような官能基を使って、本発明のCD8結合物質を、結合対のもう一方の半分に結合した別のタンパク質、ポリペプチドまたは化学化合物に、すなわち、結合対の結合を介して、連結し得る。例えば、本発明のCD8結合物質をビオチンに複合化させ、アビジンまたはストレプトアビジンに複合化させた別のタンパク質、ポリペプチド、化合物または担体に連結し得る。例えば、検出可能なシグナル生成物質がアビジンまたはストレプトアビジンに複合化されている診断システムにおいて、このような結合CD8結合物質を、例えば、レポーターとして用い得る。例えば、このような結合対を使用して、CD8結合物質を医薬品目的に好適する担体などの担体に結合し得る。1つの非限定的例は、Cao and Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000) に記載されたりボソーム製剤である。また、このような結合対を使用して、治療活性薬剤を、本発明のCD8結合物質に連結し得る。

10

【0347】

いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、必要に応じ、1つまたは複数のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、標的化部分とシグナル伝達物質とを連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、シグナル伝達物質内にリンカーを含む（例えば、単鎖TNFの場合には、トリマーを生じる2つのリンカーを含み得る）。

20

【0348】

いくつかの実施形態では、CD8結合物質は、結合領域および/または標的化部分をそれぞれ連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書に記載の種々の官能基、残基、または部分をCD8結合物質に連結するのに利用し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、結合領域および結合タンパク質の安定性、配向、結合、中和、および/または排出特性に影響を与えない、またはそれらを低下させない単一アミノ酸または複数のアミノ酸である。種々の実施形態では、リンカーは、ペプチド、タンパク質、糖、または核酸から選択される。

30

【0349】

本発明は、種々のリンカー配列の使用を意図する。種々の実施形態では、リンカーは、天然のマルチドメインタンパク質から誘導され得るか、または、例えば、Chichili et al., (2013), *Protein Sci.* 22(2):153-167; Chen et al., (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369 に記載されている経験的リンカーである。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、リンカー設計データベースおよびChen et al., (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369 and Crasto et al., (2000), *Protein Eng.* 13(5):309-312 に記載のものなどのコンピュータープログラムを用いて設計し得る。種々の実施形態では、リンカーは機能性であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、折り畳みおよび/または安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態学を改善するように、および/または本CD8結合物質の生物活性を改善するように機能し得る。

40

【0350】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカーは約100アミノ酸長未満である。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約

50

40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、または約2アミノ酸長未満であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーはフレキシブルである。別の実施形態では、リンカーは剛性である。

【0351】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカーは約100アミノ酸長を超える。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、または約2アミノ酸長を超え得る。いくつかの実施形態では、リンカーはフレキシブルである。別の実施形態では、リンカーは剛性である。

10

【0352】

種々の実施形態では、リンカーは、グリシンおよびセリン残基から実質的に構成される（例えば、約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約95%、または約97%のグリシンとセリン）。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは $(Gly_4Ser)_n$ であり、式中、 n は、約1~約8、例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8（配列番号1009~1016）である。ある実施形態では、リンカー配列は、GGSGGSGGGGSGGGGS（配列番号1017）である。追加のリンカーの例としては、限定されないが、次記配列を有するリンカーが挙げられる：LE、GGGGS（配列番号1009）、 $(GGGGS)_n$ （ $n=1\sim4$ ）（配列番号1009~1012）、 $(Gly)_8$ （配列番号1018）、 $(Gly)_6$ （配列番号1019）、 $(EAAAK)_n$ （ $n=1\sim3$ ）（配列番号1020~1022）、 $A(EAAAK)_nA$ （ $n=2\sim5$ ）（配列番号1023~1026）、 $AEAAAKEAAAKA$ （配列番号1027）、 $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ （配列番号1028）、PAPAP（配列番号1029）、KESGVSSEQLAQFRSLD（配列番号1030）、EGKSSGSGSESKST（配列番号1031）、GSAGSAAAGSGEF（配列番号1032）、および $(XP)_n$ 、 X は、任意のアミノ酸、例えば、Ala、Lys、またはGluを示す。種々の実施形態では、リンカーは $(GGS)_n$ （ $n=1\sim20$ ）（配列番号1176~配列番号1195）である。いくつかの実施形態では、リンカーはGである。いくつかの実施形態では、リンカーはAAAである。いくつかの実施形態では、リンカーは $(GGGS)_n$ （ $n=9\sim20$ ）（配列番号1196~配列番号1207）である。

20

30

【0353】

いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGSE（配列番号1208）、GSESG（配列番号1209）、GSEGS（配列番号1210）、GEGGSGEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGS（配列番号1211）、および4アミノ酸間隔毎にランダムに配置されたG、S、およびEのリンカーのうちの1つまたは複数である。

【0354】

いくつかの実施形態では、リンカーは抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）のヒンジ部である。種々の実施形態では、リンカーは抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）のヒンジ部である。IgG、IgA、IgD、およびIgEクラス抗体で見つかるヒンジ部は、フレキシブルスパーサーとして機能し、Fab部が空間中で自由に動くことを可能にする。定常領域と対照的に、ヒンジドメインは、構造上多様であり、免疫グロブリンクラスおよびサブクラス中の配列および長さの両方で変動する。例えば、ヒンジ部の長さおよび可撓性は、IgGサブクラス内で変動する。IgG1のヒンジ部は、アミノ酸216~2

40

50

3 1 を包含し、それが自由にフレキシブルであるために、F a b フラグメントは、それらの対称軸の周りで回転でき、2 つの重鎖間ジスルフィド架橋の最初的位置を中心とする球内で移動できる。I g G 2 は、I g G 1 より短いヒンジを有し、1 2 個のアミノ酸残基と 4 個のジスルフィド架橋を有する。I g G 2 のヒンジ部は、グリシン残基を欠き、比較的短く、また、追加の重鎖間ジスルフィド架橋により安定化された剛性ポリプロリン二重らせん体を含む。これらの特性は、I g G 2 分子の可撓性を制限する。I g G 3 は、6 2 個のアミノ酸を含む (2 1 個のプロリンと 1 1 個のシステインを含む) その特有の延長されたヒンジ部 (I g G 1 ヒンジの約 4 倍の長さ) により、他のサブクラスとは異なり、柔軟性を欠くポリプロリン二重らせん体を形成する。I g G 3 では、F a b フラグメントは、F c フラグメントから比較的遠くに離れており、より大きな可撓性を分子に与える。I g G 3 の伸びたヒンジは、他のサブクラスに比べて、そのより高分子量の原因でもある。I g G 4 のヒンジ部は、I g G 1 より短く、その可撓性は、I g G 1 と I g G 2 との間である。ヒンジ部の可撓性は、次の順に低下すると報告されている : I g G 3 > I g G 1 > I g G 4 > I g G 2 。

【 0 3 5 5 】

結晶学的調査によれば、免疫グロブリンヒンジ部は、機能的に次の 3 つの領域にさらに細分できる : 上部ヒンジ部、コア部、および下部ヒンジ部。Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130 : 87 を参照されたい。上部ヒンジ部は、C_H1 のカルボキシル末端 ~ 運動を制限するヒンジ中の最初の残基、通常は 2 つの重鎖間の鎖間ジスルフィド結合を形成する最初のシステイン残基のアミノ酸を含む。上部ヒンジ部の長さは、抗体のセグメントの可撓性と相関する。コアヒンジ部は重鎖間ジスルフィド架橋を含み、下部ヒンジ部は C_H2 ドメインのアミノ末端に繋がり、C_H2 中の残基を含む (同上文献) 。野性型ヒト I g G 1 のコアヒンジ部は、配列 Cys - Pro - Pro - Cys (配列番号 1 2 1 2) を含み、これは、ジスルフィド結合形成により二量体化されると、環状オクタペプチドを生成し、これが旋回軸として機能することにより、可撓性を付与すると考えられている。種々の実施形態では、本発明のリンカーは、任意の抗体 (例えば、I g G、I g A、I g D、および I g E、サブクラス (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4、および I g A 1 および I g A 2) を含む) の 1、または 2、または 3 個の上部ヒンジ部、コア部および下部ヒンジ部を含む。ヒンジ部はまた、1 つまたは複数のグリコシル化部位も含み得、これは、多くの構造上異なるタイプの炭水化物付着部位を含む。例えば、I g A 1 は、ヒンジ部の 1 7 アミノ酸セグメント内に 5 つのグリコシル化部位を含み、腸内プロテアーゼに対するヒンジ部ポリペプチドの耐性を付与し、これは、分泌性免疫グロブリンにとって、有利な性質であると考えられる。種々の実施形態では、本発明のリンカーは、1 つまたは複数のグリコシル化部位を含む。種々の実施形態では、リンカーは、ヒト I g G 4 抗体のヒンジ - C_H2 - C_H3 ドメインである。

【 0 3 5 6 】

必要に応じ、本 C D 8 結合物質は抗体 F c 領域に連結されてよく、C_H2 および C_H3 ドメインの片方または両方、および場合によりヒンジ部を含む例えば、単一ヌクレオチド配列として F c 領域に連結された本 C D 8 結合物質をコードするベクターを用いて、このようなポリペプチドを調製できる。

【 0 3 5 7 】

いくつかの実施形態では、リンカーは P E G などの合成リンカーである。

【 0 3 5 8 】

種々の実施形態では、リンカーは機能性であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、折り畳みおよび / または安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態学を改善するように、および / または本 C D 8 結合物質の生物活性を改善するように機能し得る。別の例では、リンカーは、特定の細胞型または部位に C D 8 結合物質を標的化するように機能し得る。

【 0 3 5 9 】

10

20

30

40

50

C D 8 結合物質の改変と産生

種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、V H H である標的化部分を含む。種々の実施形態では、V H H は、特定の生物源または特定の調製法に限定されない。例えば、V H H は通常、次記により得ることができる：(1) 天然の重鎖抗体の V H H ドメインを単離することにより；(2) 天然の V H H ドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により；(3) 天然の V H H ドメインの「ヒト化」により、またはこのようなヒト化 V H H ドメインをコードする核酸の発現により；(4) ヒト由来などの哺乳動物種由来などの任意の動物種由来の天然の V H ドメインの「ラクダ化」、またはこのようなラクダ化 V H ドメインをコードする核酸の発現により；(5) 当該技術分野で記載の「ドメイン抗体」または「D a b」の「ラクダ化」により、またはこのようなラクダ化 V H ドメインをコードする核酸の発現により；(6) 当該技術分野において既知のタンパク質、ポリペプチドまたはその他のアミノ酸配列のための合成または半合成技術を用いることにより；(7) 当該技術分野において既知の核酸合成技術を用いて V H H をコードする核酸を調製し、続けて、こうして得られた拡散を発現させることにより；および/または(8) 前述のうちの 1 つまたは複数の任意の組み合わせにより。

【 0 3 6 0 】

ある実施形態では、C D 8 結合物質は、ヒト C D 8 を指向する天然の重鎖抗体の V H H ドメインに対応する V H H を含む。いくつかの実施形態では、このような V H H 配列は通常、ラクダ科の動物種を C D 8 分子で適切に免疫化する（すなわち、C D 8 に対する免疫応答を生じさせる、および/または C D 8 に対する重鎖抗体を産生させるように免疫化することにより、ラクダ科の動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、または B 細胞の任意の試料）を得ることにより、および任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、C D 8 に対する V H H 配列を生成することにより、生成または得ることができる。いくつかの実施形態では、C D 8 に対する天然の V H H ドメインは、ラクダ科の動物 V H H 配列の未処理ライブラリーから、例えば、当該技術分野で既知の 1 種類または複数種類のスクリーニング技術を使って、C D 8、またはその少なくとも 1 つの部分、フラグメント、抗原決定基またはエピトープを用いてこのようなライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることができる。このようなライブラリーおよび技術は、例えば、国際公開第 9 9 / 3 7 6 8 1 号、国際公開第 0 1 / 9 0 1 9 0 号、国際公開第 0 3 / 0 2 5 0 2 0 号、および国際公開第 0 3 / 0 3 5 6 9 4 号に記載されている。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、例えば、国際公開第 0 0 / 4 3 5 0 7 号に記載のランダム変異誘発および/または C D R シャッフリングなどの技術により未処理 V H H ライブラリーから得られた V H H ライブラリーなどの未処理 V H H ライブラリー由来の改善された合成または半合成ライブラリーを使用し得る。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、C D 8 に対する V H H 配列を得る別の技術は、重鎖抗体を発現できる遺伝子導入哺乳動物を適切に免疫化し（すなわち、C D 8 に対する免疫応答を生じさせる、および/または C D 8 に対する重鎖抗体を産生させるように免疫化し）、遺伝子導入哺乳動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、または B 細胞の任意の試料）を得て、その後、任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、C D 8 に対する V H H 配列を生成することを含む。例えば、このために、国際公開第 0 2 / 0 8 5 9 4 5 号および国際公開第 0 4 / 0 4 9 7 9 4 号（これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の重鎖抗体発現マウスおよびさらなる方法および技術を使用できる。

【 0 3 6 1 】

ある実施形態では、C D 8 結合物質は、「ヒト化」、すなわち、天然の V H H 配列（および特に、フレームワーク配列中の）のアミノ酸配列中の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を、ヒトの従来の 4 鎖抗体由来の V H ドメイン中の対応する位置（単一または複数）にある 1 つまたは複数のアミノ酸残基で置換している V H H を含む。これは、当該技術分野において既知のヒト化技術を使用して実施できる。いくつかの実施形態では、可能なヒト化置換またはヒト化置換の組み合わせは、当該技術分野において既知の方法、例えば、V H

10

20

30

40

50

Hの配列と天然のヒトV_Hドメインの配列との間の比較により決定し得る。いくつかの実施形態では、ヒト化置換は、得られたヒト化V_HHが有利な機能特性をなお保持するように選択される。通常、ヒト化の結果として、本発明のV_HHは、より「ヒト様」になり得るが、対応する天然のV_HHドメインと比較して、低減された免疫原性などの好ましい特性を依然として保持している。種々の実施形態では、本発明のヒト化V_HHは、当該技術分野において既知の任意の好適な方法で得ることができ、したがって、出発材料として天然のV_HHドメインを含むポリペプチドを用いて得たポリペプチドに厳密に限定されない。

【0362】

ある実施形態では、CD8結合物質は、「ラクダ化」、すなわち、従来の4鎖抗体由来の天然のV_Hドメインのアミノ酸配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基を、ラクダ科の動物の重鎖抗体のV_HHドメイン中の対応する位置（単一または複数）にある1つまたは複数のアミノ酸残基で置換しているV_HHを含む。いくつかの実施形態では、このような「ラクダ化」置換は、V_H-V_Lインターフェースを形成するおよび/または、そこに存在するアミノ酸位置に、および/またはいわゆるラクダ科の顕著な特徴残基（例えば、国際公開第94/04678号を参照されたい、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）の位置に挿入されるいくつかの実施形態では、ラクダ化V_HHを生成するかあるいは設計するための出発材料または出発点として用いられるV_H配列は、哺乳動物由来のV_H配列、例えば、V_H3配列などの、ヒトのV_H配列である。種々の実施形態では、ラクダ化V_HHは、当該技術分野において既知の任意の好適な方法で得ることができ（すなわち、上記（1）～（8）で示したような）、したがって、出発材料として天然のV_Hドメインを含むポリペプチドを用いて得たポリペプチドに厳密に限定されない。

【0363】

種々の実施形態では、「ヒト化」および「ラクダ化」の両方は、天然のV_HHドメインまたはV_Hドメインをコードするヌクレオチド配列をそれぞれ用意し、次に、当該技術分野において既知の方法で、ヌクレオチド配列中の1つまたは複数のコドン新規ヌクレオチド配列がそれぞれ「ヒト化」または「ラクダ化」V_HHをコードするような方法で変更することにより実施することができる。この核酸は、その後、本発明の目的のV_HHを得るように、当該技術分野において既知の方法で発現させることができる。あるいは、天然のV_HHドメインまたはV_Hドメインそれぞれのアミノ酸配列に基づいて、目的の本発明のヒト化またはラクダ化V_HHのそれぞれのアミノ酸配列を設計し、その後、当該技術分野において既知のペプチド合成技術を用いて新規に合成できる。また、天然のV_HHドメインまたはV_Hドメインそれぞれのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に基づいて、目的のヒト化またはラクダ化V_HHのそれぞれをコードするヌクレオチド配列を設計し、次に当該技術分野において既知の核酸合成技術を用いて新規に合成でき、その後、こうして得られた核酸を、本発明の目的のV_HHが得られるように、当該技術分野において既知の方法で発現させることができる。天然のV_H配列またはV_HH配列から出発して、本発明のV_HHおよび/またはそれをコードする核酸を得るその他の好適な方法および技術は、当該技術分野において既知であり、例えば、1つまたは複数の天然のV_H配列（1つまたは複数のFR配列および/またはCDR配列など）中の1つまたは複数の部分、1つまたは複数の天然のV_HH配列（1つまたは複数のFR配列またはCDR配列など）中の1つまたは複数の部分、および/または1つまたは複数の合成または半合成配列を、本発明のV_HHまたはそれをコードするヌクレオチド配列もしくは核酸を得るように、好適な方法で組み合わせることを含み得る。

【0364】

本発明のCD8結合物質を産生する方法は、本明細書に記載されている。例えば、本発明のCD8結合物質をコードするDNA配列は、当該技術分野において既知の方法を使用して化学的に合成できる。合成DNA配列は、例えば、発現制御配列を含む他の適切なヌクレオチド配列に連結し、目的のCD8結合物質をコードする遺伝子発現構築物を産生できる。したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のCD8結合物質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。

【0365】

本発明のCD8結合物質をコードする核酸は、発現ベクター中に組み込まれ（連結され）てよく、このベクターは、遺伝子導入、形質転換、または形質導入技術により宿主細胞中に導入できる。例えば、本発明のCD8結合物質をコードする核酸を、レトロウイルス形質導入により宿主細胞中に導入できる。宿主細胞の例は、大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児腎臓293（HEK293）細胞、ヒーラ細胞、仔ハムスター腎（BHK）細胞、サル腎培養細胞（COS）、またはヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、および骨髄腫細胞である。形質転換宿主細胞は、宿主細胞に、本発明のCD8結合物質をコードする遺伝子を発現させるのを可能とする条件下で増殖させることができる。したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のCD8結合物質をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。種々の実施形態では、本発明は、このような発現ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

10

【0366】

特定の発現および精製条件は、用いられる発現系に応じて変化する。例えば、遺伝子が、大腸菌中で発現される場合、遺伝子は最初に、操作された遺伝子を細菌プロモーター、例えば、TrpまたはTac、および原核生物シグナル配列の下流に配置することにより発現ベクター中に挿入される。別の例では、操作された遺伝子が真核生物宿主細胞、例えば、CHO細胞中で発現される場合、遺伝子は最初に、例えば、好適な真核生物プロモーター、分泌シグナル、転写促進因子、および種々のイントロンを含む発現ベクター中に挿入される。遺伝子構築物は、遺伝子導入、形質転換、または形質導入技術を用いて宿主細胞中に導入できる。

20

【0367】

本発明のCD8結合物質は、タンパク質の発現を許容する条件下で、CD8結合物質をコードする発現ベクターを形質導入した宿主細胞を増殖させることにより産生できる。発現後、タンパク質を収集し、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびヒスチジン（His）などの親和性タグまたはクロマトグラフィーにより、当該技術分野において周知の技術を用いて精製できる。ある実施形態では、CD8結合物質はHisタグ（これは、必要に応じ、操作されたタンパク質切断部位により切断可能である）を含む。

【0368】

したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のCD8結合物質をコードする核酸を提供する。種々の実施形態では、本発明は、本発明のCD8結合物質をコードする核酸を含む宿主細胞を提供する。

30

【0369】

種々の実施形態では、本発明のCD8結合物質またはCD8結合物質を含むキメラタンパク質は、例えば、患者中でインビボ発現され得る。例えば、種々の実施形態では、本発明のCD8結合物質またはCD8結合物質を含むキメラタンパク質は、本発明のCD8結合物質またはCD8結合物質を含むキメラタンパク質をコードする核酸の形態で投与され得る。種々の実施形態では、核酸はDNAまたはRNAである。いくつかの実施形態では、本発明のCD8結合物質またはCD8結合物質を含むキメラタンパク質は、修飾mRNA、すなわち、1種類または複数種類の修飾ヌクレオチドを含むmRNAによりコードされる。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、米国特許第8,278,036号で見出される1つまたは複数の修飾を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、m5C、m5U、m6A、s2U、および2'-O-メチル-Uのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の1種類または複数種類のキメラタンパク質をコードする修飾mRNAの投与に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾mRNAを含む遺伝子治療ベクターに関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾mRNAを含む遺伝子治療ベクターに関する。種々の実施形態では、核酸は、腫瘍溶解性ウイルス、例えば、アデノウイルス、レオウイルス、はしか、単純ヘルペス、ニューカッスル病ウイルスまたはワ

40

50

クシニアの形態である。

【0370】

薬学的に許容可能な塩および賦形剤

本明細書で記載のCD8結合物質は、無機もしくは有機酸と反応できる十分に塩基性の官能基を有して、または無機もしくは有機塩基と反応できるカルボキシル基を有して、薬学的に許容可能な塩を形成できる。薬学的に許容可能な酸付加塩は、当該技術分野でよく知られているように、薬学的に許容可能な酸から形成される。このような塩は、例えば、*Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977および*The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002、に挙げられた薬学的に許容可能な塩を含む。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0371】

薬学的に許容可能な塩としては、非限定的例であるが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、ホスフェート、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、樟脳スルホン酸塩、パモ酸塩、フェニル酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アクリル酸塩、クロロ安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、o-アセトキシ安息香酸塩、ナフタレン-2-安息香酸塩、イソ酪酸塩、フェニル酪酸塩、p-ヒドロキシ酪酸塩、ブチン-1,4-ジカルボキシレート、ヘキシン-1,4-ジカルボキシレート、カプリン酸塩、カプリル酸塩、ケイ皮酸塩、グリコール酸塩、ヘプタン酸塩、ヒプル酸塩、リンゴ酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、ニコチン酸塩、フタル酸塩、テラフタル酸塩、プロピオール酸塩、プロピオン酸塩、フェニルプロピオン酸塩、セバシン酸塩、スベリン酸塩、p-プロモベンゼンスルホン酸塩、クロロベンゼンスルホン酸塩、エチルスルホン酸塩、2-ヒドロキシエチルスルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、ナフタレン-1,5-スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、および酒石酸塩が挙げられる。

20

30

【0372】

「薬学的に許容可能な塩」という用語はまた、カルボン酸官能基などの酸性官能基、および塩基を有する本発明の組成物の塩を指す。適切な塩基としては、限定されないが、ナトリウム、カリウム、およびリチウムなどのアルカリ金属の水酸化物；カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属の水酸化物；アルミニウムおよび亜鉛などのその他の金属の水酸化物；アンモニア、および非置換またはヒドロキシ置換のモノ-、ジ-、またはトリ-アルキルアミン、ジシクロヘキシルアミンなどの有機アミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-、ビス-、またはトリス-(2-ヒドロキシエチル)アミン、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス-(ヒドロキシメチル)メチルアミンなどのモノ-、ビス-、またはトリス-(2-OH-低級アルキルアミン)、N,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アミンまたはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミンなどのN,N-ジ-低級アルキル-N-(ヒドロキシル-低級アルキル)-アミン；N-メチル-D-グルカミン；およびアルギニン、リシンなどのアミノ酸などが挙げられる。

40

【0373】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載の組成物は、薬学的に許容可能な塩の形態である。

50

【0374】

医薬組成物および製剤

種々の実施形態では、本発明は、本明細書で記載のCD8結合物質および薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。本明細書で記載のいずれの医薬組成物も、薬学的に許容可能な担体またはピークルを含む組成物の成分として、対象に投与することができる。このような組成物は必要に応じ、適切な投与用の形態を与えるように、適切な量の薬学的に許容可能な賦形剤を含み得る。

【0375】

種々の実施形態では、医薬賦形剤は、ピーナッツオイル、大豆油、ミネラルオイル、ゴマ油などの石油、動物、植物、または人工起源のものを含む、水および油などの液体であり得る。医薬賦形剤は、例えば、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、滑石、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであってよい。さらに、助剤、安定化剤、増粘化剤、潤滑剤、および着色料を使用することができる。一実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、対象に投与される場合、無菌である。本明細書で記載のうちのいずれかの薬剤が静脈内に投与される場合、水は有用な賦形剤である。生理食塩水および水性デキストロースならびにグリセリン溶液はまた、液体賦形剤として、特に注射可能溶液に用いることができる。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセリンモノステアレート、滑石、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセリン、プロピレン、グリコール、水、エタノールなども挙げられる。本明細書で記載のいずれの薬剤も、必要に応じ、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでよい。適切な医薬賦形剤のその他の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed., 1995)に記載されている。この文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0376】

本発明は、種々の製剤中に記載医薬組成物（および/または追加の治療薬）を含む。本明細書で記載のいずれの本発明の医薬組成物（および/または追加の治療薬）も、液剤、懸濁剤、乳濁液、点滴剤、錠剤、丸薬、ペレット、カプセル剤、液体含有カプセル剤、ゼラチンカプセル剤、散剤、徐放製剤、坐剤、乳剤、エアロゾル、噴霧剤、懸濁剤、凍結乾燥散剤、凍結懸濁剤、乾燥散剤、または使用に適するその他の任意の形態をとることができる。一実施形態では、組成物はカプセルの形態である。別の実施形態では、組成物は錠剤の形態である。さらに別の実施形態では、医薬組成物は、軟質ゲルカプセルの形態に処方される。さらなる実施形態では、医薬組成物は、ゼラチンカプセルの形態に処方される。さらに別の実施形態では、医薬組成物は、液剤として処方される。

【0377】

必要に応じて、本発明の医薬組成物（および/または追加の薬剤）は、可溶化剤も含み得る。また、薬剤は当技術分野において既知の適切なピークルまたは送達装置を使って送達することができる。本明細書で概要を述べた併用療法剤は、単一の送達ピークルまたは送達担体で同時送達できる。

【0378】

本発明の医薬組成物（および/または追加の薬剤）を含む製剤は単位剤形として好都合に提供でき、薬学の分野でよく知られたいずれかの方法により調製され得る。このような方法は通常、治療薬を担体と混合するステップを含み、担体は1種類または複数種類の補助成分を構成する。通常、製剤は、治療薬と、液体担体、微粉化固相担体、または両方とを均一に、完全に混合すること、その後、必要に応じ、生成物を所望の製剤の剤形に成形すること（例えば、湿式または乾式造粒、散剤ブレンド、など、それに続く当該技術分野で既知の従来する方法を使って錠剤化すること）により調製される。

【0379】

種々の実施形態では、本明細書で記載のいずれの医薬組成物（および/または追加の薬剤）も、本明細書で記載の投与方法に適合された組成物として、ルーチン手順に従って処

10

20

30

40

50

方される。

【0380】

投与経路は、例えば、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、腔内、経皮、直腸内、吸入、または局所を含む。投与は局所的または全身性であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、経口により行われる。別の実施形態では、投与は非経口の注射による。投与方法は、開業医の自由裁量に任すことができ、一部には、病状の部位に依存する。大抵の場合、投与は本明細書で記載のうちのいずれかの薬剤の血流中への放出をもたらす。

【0381】

一実施形態では、本明細書で記載のCD8結合物質は、経口投与に適合された組成物として、常法に従って処方される。経口送達用の組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、水性または油性懸濁剤、粒剤、散剤、乳剤、カプセル剤、シロップ剤、またはエリキシル剤の形態であってよい。経口投与される組成物は、薬学的に口当たりの良い製剤を提供するために、1種類または複数種類の薬剤、例えば、ラクトース、アスパルテムまたはサッカリンなどの甘味料、ペパーミント、冬緑油またはチェリー油などの調味料、着色料および保存剤を含み得る。さらに、タブレットまたは丸薬形態では、組成物をコートして、消化管での崩壊および吸収を遅らせることにより長期間にわたり持続作用を可能とすることができる。本明細書に記載のうちのいずれかのCD8結合物質を運ぶ浸透圧的に活性な物質を取り囲む選択的透過性膜も、経口投与組成物として好適である。これらの後者のプラットフォームでは、カプセルの周りの環境からの液体が運搬化合物により吸収され、この化合物は膨潤し、開口部を介して薬剤または薬剤組成物を追い出す。これらの送達プラットフォームは、即時放出製剤の急上昇プロファイルとは対照的に、基本的に0次の送達プロファイルを提供することができる。グリセロールモノステアレートまたはグリセロールステアレートなどの時間遅延物質も使用することができる。経口組成物は、標準的な賦形剤、例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、および炭酸マグネシウムを含んでよい。一実施形態では、賦形剤は医薬品グレードである。活性化化合物に加えて、懸濁剤には、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天、トラガント、など、およびこれらの混合物などの沈殿防止剤を含んでよい。

【0382】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下および関節内注射および注入）に好適な剤形は、例えば、液剤、懸濁剤、分散剤、乳剤、などを含む。それらは、無菌の固相組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造されてよく、これは、使用直前に、無菌の注入可能媒体中に溶解または懸濁され得る。それらは、例えば、当該技術分野において、既知の懸濁剤または分散剤を含み得る。非経口的投与に好適な製剤成分としては、注射用の水、食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、またはその他の合成溶媒などの無菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸もしくは亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤、EDTAなどのキレート化剤、アセテート、シトレート、またはホスフェートなどの緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調節剤が挙げられる。

【0383】

静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌性水、クレモフォアELTM (BASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。担体は、製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、微生物に対し保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール）、およびこれらの好適な混合物を含む、溶媒または分散媒であってよい。

【0384】

本明細書にて提供される組成物は、単独でまたは他の好適な成分と組み合わせて、吸入

10

20

30

40

50

により投与されるエーロゾル製剤（すなわち、「噴霧化」製剤）を作製することができる。エーロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの許容され得る加圧化噴射剤中に入れることができる。

【0385】

本明細書で記載のいずれの本発明の医薬組成物（および／または追加の薬剤）も、当業者に既知の制御放出によりまたは徐放手段または送達装置により投与可能である。例としては、米国特許第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,536,809号；同第3,598,123号；同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639,476号、同第5,354,556号、および同第5,733,556号に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。これらの特許のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。このような剤形は、例えば、ヒドロプロピルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、その他のポリマーマトリクス、ゲル、浸透膜、浸透系、多層被膜、微粒子、リポソーム、マイクロスフェア、またはこれらの組み合わせを用いて、1つまたは複数の有効成分の制御放出または徐放を可能にするために有用であり、様々な割合での所望の放出プロファイルを提供することができる。本明細書に記載されたものを含む当業者に既知の適切な制御放出または徐放製剤は、本明細書で記載の薬剤の有効成分と共に使用する上で容易に選択することができる。本発明はこのように、限定されないが、制御放出または徐放に適合された錠剤、カプセル、ジェルカプセルおよびカプレットなどの経口投与に好適な単位剤形を提供する。

【0386】

有効成分の制御放出または徐放は、限定されないが、pH変化、温度変化、適切な波長の光による刺激、酵素の濃度もしくは利用可能性、水の濃度または利用可能性、または他の生理学的条件または化合物を含む、種々の条件により刺激できる。

【0387】

別の実施形態では、徐放系を、治療される標的領域の近傍に配置でき、したがって全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)を参照）。Langer, 1990, Science 249: 1527 - 1533、中の概説で考察されている他の放出制御系を使用し得る。

【0388】

医薬製剤は好ましくは無菌である。無菌化は、例えば、無菌濾過膜で濾過することにより達成される。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥および再構成の前またはその後でフィルター滅菌を行うことができる。

【0389】

投与および投与量

本発明により投与されるCD8結合物質の実際の用量は、特定の剤形および投与方法に応じて変わるであろうということは理解されよう。当業者なら、CD8結合物質の作用を変え得る多くの要因（例えば、体重、性別、食事、投与時期、投与経路、排出速度、対象の状態、薬剤の組み合わせ、遺伝的素因および反応感度）を考慮に入れることができる。投与は、最大耐量の範囲内で連続的にまたは1種類または複数種類の別々の投与量で実施できる。与えられた一連の条件に対する最適投与速度は、従来の用量投与試験を使って、当業者により確認できる。

【0390】

いくつかの実施形態では、CD8結合物質の好適な投与量は、約0.01mg / (対象のkg体重) ~ 約10g / (対象のkg体重)、約0.01mg / (対象のkg体重) ~ 約1g / (対象のkg体重)、約0.01mg / (対象のkg体重) ~ 約100mg / (対象のkg体重)、約0.01mg / (対象のkg体重) ~ 約10mg / (対象のkg体

10

20

30

40

50

重)の範囲であり、例えば、約0.01mg/kg、約0.02mg/kg、約0.03mg/kg、約0.04mg/kg、約0.05mg/kg、約0.06mg/kg、約0.07mg/kg、約0.08mg/kg、約0.09mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、約1.5mg/kg、約1.6mg/kg、約1.7mg/kg、約1.8mg/kg、約1.9mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg体重、約100mg/kg体重、約1g/kg体重、約10g/kg体重(これらの間の全ての値および範囲を含む)である。

10

【0391】

CD8結合物質の個々の用量は、例えば、単位剤形当たり、約0.01mg~約100g、約0.01mg~約75g、約0.01mg~約50g、約0.01mg~約25g、約0.01mg~約10g、約0.01mg~約7.5g、約0.01mg~約5g、約0.01mg~約2.5g、約0.01mg~約1g、約0.01mg~約100mg、約0.1mg~約100mg、約0.1mg~約90mg、約0.1mg~約80mg、約0.1mg~約70mg、約0.1mg~約60mg、約0.1mg~約50mg、約0.1mg~約40mgの有効成分、約0.1mg~約30mg、約0.1mg~約20mg、約0.1mg~約10mg、約0.1mg~約5mg、約0.1mg~約3mg、約0.1mg~約1mg、または単位剤形当たり約5mg~約80mgを含む単位剤形で投与できる。例えば、単位剤形は、約0.01mg、約0.02mg、約0.03mg、約0.04mg、約0.05mg、約0.06mg、約0.07mg、約0.08mg、約0.09mg、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約0.6mg、約0.7mg、約0.8mg、約0.9mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約70mg、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mg、約100mg、約200mg、約500mg、約1g、約2.5g、約5g、約10g、約25g、約50g、約75g、約100g(これらの間の全ての値および範囲を含む)であってよい。

20

30

【0392】

一実施形態では、CD8結合物質は、毎日約0.01mg~約100g、毎日約0.01mg~約75g、毎日約0.01mg~約50g、毎日約0.01mg~約25g、毎日約0.01mg~約10g、毎日約0.01mg~約7.5g、毎日約0.01mg~約5g、毎日約0.01mg~約2.5g、毎日約0.01mg~約1g、毎日約0.01mg~約100mg、毎日約0.1mg~約100mg、毎日約0.1mg~約95mg、毎日約0.1mg~約90mg、毎日約0.1mg~約85mg、毎日約0.1mg~約80mg、毎日約0.1mg~約75mg、毎日約0.1mg~約70mg、毎日約0.1mg~約65mg、毎日約0.1mg~約60mg、毎日約0.1mg~約55mg、毎日約0.1mg~約50mg、毎日約0.1mg~約45mg、毎日約0.1mg~約40mg、毎日約0.1mg~約35mg、毎日約0.1mg~約30mg、毎日約0.1mg~約25mg、毎日約0.1mg~約20mg、毎日約0.1mg~約15mg、毎日約0.1mg~約10mg、毎日約0.1mg~約5mg、毎日約0.1mg~約3mg、毎日約0.1mg~約1mg、または毎日約5mg~約80mgの量で投与される。種々の実施形態では、CD8結合物質は、約0.01mg、約0.02mg、約0.03mg、約0.04mg、約0.05mg、約0.06mg、約0.07mg、約0.08mg、約0.09mg、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約0.6mg、約0.7mg、約0.8mg、約0.9mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg

40

50

g 約 10 mg、約 15 mg、約 20 mg、約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、約 100 mg、約 200 mg、約 500 mg、約 1 g、約 2.5 g、約 5 g、約 7.5 g、約 10 g、約 25 g、約 50 g、約 75 g、約 100 g (これらの間の全ての値および範囲を含む) の 1 日量で投与される。

【0393】

本発明の特定の実施形態では、CD8 結合物質を含む医薬組成物は、例えば、1 日 2 回以上 (例えば、毎日約 2 回、約 3 回、約 4 回、約 5 回、約 6 回、約 7 回、約 8 回、約 9 回、または約 10 回)、1 日約 1 回、約 1 日おき、約 3 日おき、週約 1 回、2 週毎に約 1 回、毎月約 1 回、2 ヶ月毎に約 1 回、3 ヶ月毎に約 1 回、6 ヶ月毎に約 1 回、または毎年約 1 回投与されてよい。

10

【0394】

併用療法および追加の治療薬

種々の実施形態では、本発明の医薬組成物は、追加の治療薬と共に同時投与される。同時投与は、同時または順次であってよい。

【0395】

一実施形態では、追加の治療薬および本発明の CD8 結合物質は、対象に同時に投与される。本明細書で使用される場合、用語の「同時に」は、追加の治療薬および CD8 結合物質が約 60 分程度、例えば、約 30 分程度、約 20 分程度、約 10 分程度、約 5 分程度、または約 1 分程度の時間間隔で投与されることを意味する。追加の治療薬および CD8 結合物質の投与は、単一製剤 (例えば、追加の治療薬および CD8 結合物質を含む製剤) または別々の製剤 (例えば、追加の治療薬を含む第 1 の製剤および CD8 結合物質を含む第 2 の製剤) の同時投与により行うことが可能である。

20

【0396】

同時投与は、それらの投与のタイミングが、追加の治療薬および CD8 結合物質の薬理的活性が時間経過と共に重なりあい、それにより組み合わせられた治療効果が発揮されるような場合には、治療薬が同時に投与される必要はない。例えば、追加の治療薬および CD8 結合物質は、順次に投与できる。本明細書で使用される場合、用語の「順次に」は、追加の治療薬および CD8 結合物質が約 60 分を超える時間間隔で投与されることを意味する。例えば、追加の治療薬と CD8 結合物質との逐次投与の間の時間間隔を、約 60 分を超えて、約 2 時間を超えて、約 5 時間を超えて、約 10 時間を超えて、約 1 日を超えて、約 2 日を超えて、約 3 日を超えて、約 1 週間を超えて間隔を開ける、約 2 週間を超えて間隔を開ける、または約 1 ヶ月を越えて間隔を開けることができる。最適投与時間は、投与される追加の治療薬および CD8 結合物質の代謝、排泄速度、および / または薬力学的活性に依存するであろう。追加の治療薬または CD8 結合物質のうちのいずれかを、最初に投与してよい。

30

【0397】

同時投与はまた、治療薬が同じ投与経路により対象に投与される必要はない。むしろ、それぞれの治療薬は、任意の適切な経路、例えば、非経口または経口 (non-parenterally) で投与できる。

40

【0398】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の CD8 結合物質は、別の治療薬と同時投与されると、相乗的に作用する。このような実施形態では、CD8 結合物質および追加の治療薬は、その治療薬が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。

【0399】

いくつかの実施形態では、本発明は、追加の治療薬としての化学療法剤に関する。例えば、限定されないが、本 CD8 結合物質と化学療法剤とのこのような組み合わせは、本明細書の別の場所で記載のように、癌の治療に使用される。化学療法剤の例としては、アル

50

キル化剤、例えば、チオテパ、CYTOXAN（シクロホスファミド）、スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン、アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ、エチレンイミン、メチラメラミン例えば、アルトレタミン、トリエチルエネメラミン、トリエチレンネフオスフォラミド、トリエチレンチオフォスフォラミドおよび、トリメチロールメラミン、アセトゲニン（例えば、プラタシン、プラタチノン）、カントテシン（合成類似剤トポテカンを含む）、プリオスタチン、カリストアチン（callystatin）、CC-1065（アドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）、クリプトフィシン（例えば、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8など）、ドラスタチン、デュオカルマイシン（合成類似薬KW-2189およびCB1-TM1を含む）、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコディクチン、スポンギスタチン、ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化メクロルエタミン塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン（ranimustine）、抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（カリチアマイシン、特にカリチアマイシガンマIIとカリチアマイシオメガII（Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照）、ダイネマイシン、ダイネマイシンAを含む、ビスフォスフォネート、例えば、クロドロネート、エスペラマイシン、ならびに、ネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン（ドキソルピシン）（モルフォリノドキソルピシン、シアノモルフォリノドキソルピシン、2-ピロリノドキソルピシンおよびデオキシドキソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（例えば、マイトマイシンC）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン、代謝拮抗薬、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）、葉酸の類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキサート、プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド（minoglutethimide）、ミトタン、トリロスタン、葉酸補充液、例えば、フロリン酸（frolinic acid）、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトラキセート（edatraxate）、デメコルチン、ジアジクオン、エルフォルミチン（elformithine）、エリプチニウムアセテート、エボチロン、エトグルシド、ガリウムニトレート、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン（lonidainine）、メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、PSK多糖複合体（JHS Natural Products, Eugene, Oreg.）、ラゾキサン、リゾキシシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセ

10

20

30

40

50

ン（例えば、T2毒、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイディン）、ウレタン、ピンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピポプロマン、ガシトシン、アラビノシド（アラ-C）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えば、タキソールパクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、アブラキサクレモフォアフリー、アルブミン処理ナノ粒子形成パクリタキセル（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.）、タキソテルドキセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、クロランブシル、ジェムザール（ゲムシタピン）、6-チオグアニン、メルカプトブリン、メトトレキセート、白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン、ピンブラスチン、白金、エトポシド（VP-16）、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ナベルピン（ピノレルピン）、ノバントロン、テニポシド、エダトレキセート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン（キャンプトサー、CPT-11）（イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンの治療法を含む）、トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000、チルルオロメチルオルニチン（DMFO）、レチノイド、例えば、レチノイン酸、カペシタピン、コンプレタスタチン、ロイコボリン（LV）、オキサリプラチン、オキサリプラチン治療法（FOLFOX）を含む、ラパチニブ（Tykerb）、PKC-、Raf、H-Ras、EGFRの阻害剤（例えば、エルロチニブ（Tarceva）および細胞増殖を抑制するVEGF-Aならびに上述のうちのいずれかの薬剤の薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体、が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療の方法は、放射線の使用をさらに含み得る。さらに、治療の方法は、光線力学的治療の使用をさらに含み得る。

【0400】

限定されないが、感染症適用を含む、いくつかの実施形態では、本発明は、追加の治療薬としての抗感染薬に関する。いくつかの実施形態では、抗感染薬は、抗ウイルス薬であり、これは、限定されないが、アバカビル、アシクロビル、アデホビル、アンブレナビル、アタザナビル、シドフォヴィル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エトラビリン、ファムシクロビル、およびホスカルネットを含む。いくつかの実施形態では、抗感染薬は抗菌剤であり、これは、限定されないが、セファロスポリン系抗生物質（セファレキシン、セフロキシム、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファクロール、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル、およびセフトピブロール）；フルオロキノロン系抗生物質（シプロ、レヴァキン、フロキシム、テクイン、アベロックスおよびノルフロックス）；テトラサイクリン系抗生物質（テトラサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびドキシサイクリン）；ペニシリン系抗生物質（アモキシシリン、アンピシリン、ペニシリンV、ジクロキサシリン、カルベニシリン、バンコマイシン、およびメチシリン）；モノバクタム系抗生物質（アズトレオナム）；およびカルバペネム系抗生物質（エルタペネム、ドリペネム、イミペネム/シラスタチン、およびメロペネム）を含む。いくつかの実施形態では、抗感染薬は、抗マラリア薬（例えば、クロロキン、キニーネ、メフロキン、プリマキン、ドキシサイクリン、アーテメータノルメファントリン、アトバクオン/プログアニルおよびスルファドキシム/ピリメタミン）、メトロニダゾール、チニダゾール、イベルメクチン、パモ酸ピランテル、およびアルベンダゾールを含む。

【0401】

限定されないが、自己免疫疾患適用を含むいくつかの実施形態では、追加の治療薬は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、ステロイド性抗炎症剤または非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）などの抗炎症剤である。ステロイド、特に副腎皮質ホルモン剤およびそれらの合成類似体は当該技術分野においてよく知られている。本発明で有用な副腎皮質ステロイドの例としては、ヒドロキシトリアムシノロン、-メチルデキサメタゾン、-メチル-メタゾン、ベクロメタゾンジプロピオネート、-

10

20

30

40

50

メタゾンベンゾエート、 - メタゾンジプロピオネート、 - メタゾンバレレート、クロ
ベタゾールバレレート、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラソンジ
アセテート、ジフルコルトロンバレレート、フルアドレノロン、フルクロロロンアセトニ
ド、フルメタゾンピバレート、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルコルチ
ンブチルエステル、フルオコルトロン、フルブレドニデン（フルブレドニリデン）アセテ
ート、フルランドレノロン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチ
ゾンブチレート、メチルブレドニゾロン、トリウムシノロンアセトニド、コルチゾン、コ
ルトドキソン、フルセトニド、フルドロコルチゾン、ジフルオロゾンジアセテート、フル
ラドレノロンアセトニド、メドリゾン、アムシナフェル、アムシナフィド、ベタメタゾン
およびその残りのエステル、クロロブレドニソン、クロコルテロン、クレシノロン、ジク
ロリゾン、ジフルブレドネート、フルクロロニド、フルニソリド、フルオロメタロン、フ
ルペロロン、フルブレドニソロン、ヒドロコルチゾン、メブレドニゾン、パラメタゾン、
ブレドニゾロン、ブレドニゾン、ベクロメタゾンジプロピオネートが挙げられるが、これ
らに限定されない。本発明で使用するよい（NSAIDS）としては、限定されないが、
サリチル酸、アセチルサリチル酸、サリチル酸メチル、グリコールサリチレート、サリチ
ルアミド、ベンジル - 2 , 5 - ジアセトキシ安息香酸、イブプロフェン、スリンダク（f
u l i n d a c）、ナプロキセン、ケトプロフェン、エトフェナメート、フェニルブタゾ
ン、およびインドメタシンが挙げられる。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、アル
キル化剤、代謝拮抗物質（例えば、アザチオプリン、メトトレキセート）、細胞傷害性抗
生物質、抗体（バシリキシマブ、ダクリズマブ、およびムロモナブ）、抗イムノフィリン
剤（例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス）、インターフェロン、オピオ
イド、TNF結合タンパク質、ミコフェノレート、および小分子生物学的製剤（例えば、
フィンゴリモド、ミリオシン）などの細胞分裂阻害薬であってよい。追加の抗炎症剤は、
例えば、米国特許第4,537,776号に記載され、この特許の全内容は参照により本
明細書に組み込まれる。

【0402】

いくつかの実施形態では、本発明は、1種類または複数種類の免疫調節薬、例えば、限
定されないが、免疫チェックポイントを調節する物質を用いる併用療法に関する。種々の
実施形態では、免疫調節薬は、PD - 1、PD - L1、およびPD - L2のうちの1つまた
は複数を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD - 1阻害剤である。種
々の実施形態では、免疫調節薬は、PD - 1、PD - L1、およびPD - L2のうちの1
つまたは複수에特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、
限定されないが、例えば、ニボルバム（ONO - 4538 / BMS - 936558、MD
X1106、オプジーボ、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペムブロリズマ
ブ（キイトルーダ、MERCCK）、ピディリズマブ（CT - 011, CURE TECH
）、MK - 3475（MERCCK）、BMS936559（BRISTOL MYERS
SQUIBB）、MPDL3280A（ROCHE）などの抗体である。いくつかの実施
形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lのうちの1つまたは複数を標的
とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lのうちの1
つまたは複수에特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、
限定されないが、例えば、ウレルマブ（BMS - 663513および抗4 - 1BB抗体と
しても知られる）などの抗体である。いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、固
形腫瘍および/またはB細胞非ホジキンリンパ腫および/または頭頸部癌および/または
多発性骨髄腫の治療のために、ウレルマブと組み合わせられる（必要に応じ、ニボルバム、
リリルマブ、およびウレルマブのうちの1つまたは複数と組み合わせられる）。いくつか
の実施形態では、免疫調節薬は、CTLA - 4、AP2M1、CD80、CD86、SHP
- 2、およびPPP2R5Aのうちの1つまたは複数を標的とする物質である。種々の実
施形態では、免疫調節薬は、CTLA - 4、AP2M1、CD80、CD86、SHP -
2、およびPPP2R5Aのうちの1つまたは複수에特異的な抗体である。例えば、いく
つかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、イピリムマブ（MDX -

10

20

30

40

50

010、MDX-101、ヤーボイ、BMS)および/またはトレメリムマブ(Pfizer)などの抗体である。いくつかの実施形態では、本CD8結合物質は、黒色腫、前立腺癌、および肺癌のうちの1つまたは複数の治療のために、イビリムマブと組み合わせられる(必要に応じ、バビツキシマブと組み合わせられる)。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、オファツムマブ(GENMAB)、オビヌツズマブ(GAZYVA)、AME-133v(APPLIED MOLECULAR EVOLUTION)、オクレリズマブ(GENENTECH)、TRU-015(TRUBION/EMERGENT)、ベルツズマブ(IMMU-106)などの抗体である。

10

【0403】

いくつかの実施形態では、本発明は、国際公開第2013/10779号、国際公開第2015/007536号、国際公開第2015/007520号、国際公開第2015/007542号、および国際公開第2015/007903号に記載の1種類または複数種類のキメラ物質との併用療法に関する。これらの特許の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0404】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD8結合物質は、修飾されている誘導体、すなわち、共有結合が組成物の活性を妨げないようにして、任意のタイプの分子の、組成物への共有結合により修飾されている誘導体を含む。例えば、限定するものではないが、誘導体は、特に、グリコシル化、脂質化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたはその他のタンパク質への結合、などにより修飾されている組成物を含む。多くの化学修飾のうちのいずれかを既知の技術、例えば、限定されないが、特異的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成、などを使って行うことができる。

20

【0405】

さらにその他の実施形態では、本明細書に記載のCD8結合物質は、例示的实施形態では、毒素、化学療法剤、放射性同位元素、およびアポトーシスまたは細胞死を引き起こす物質を含む細胞傷害薬をさらに含む。このような物質は、本明細書に記載の組成物に複合化され得る。

30

【0406】

本明細書に記載のCD8結合物質をこのように翻訳後修飾して、化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば、蛍光染料、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、および化学発光部分などの検出可能な部分、または、例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒、細胞傷害性薬、および放射性物質などの機能的部分を付加し得る。

【0407】

細胞傷害薬の例としては、メトトレキサート、アミノプテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン;アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ(thioepa)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、マイトマイシンC、ロムスチン(CCNU)、1-メチルニトロソウレア、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、メクロレタミン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、シス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチンおよびカルボプラチン(パラプラチン));アントラサイクリン(ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)およびドキシソルビシン(アドリアマイシン)、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロンおよびビサントレンを含む);抗生物質(ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ブレオマイシン、カリチアマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC)を含む);有糸分裂阻害薬(antimytotic agent)(例えば、ピンカアルカロイドピンカアルカロイド、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が挙げられるが、これらに限定されない。その他の細胞傷害薬とし

40

50

では、パクリタキセル（タキソール）、リシン、緑膿菌外毒素、ゲムシタピン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、副腎皮質ステロイド、ミトタン（mytotane）（O, P' - (DDD)）、インターフェロン、およびこれらの細胞傷害薬の混合物が挙げられる。

【0408】

さらなる細胞傷害薬としては、化学療法剤、例えば、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタピン、カリチアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシン、VEGFアンタゴニスト、EGFRアンタゴニスト、プラチン、タキソール、イリノテカン、5-フルオロウラシル、ゲムシタピン（gemcytabine）、ロイコボリン、ステロイド類、シクロホスファミド、メルファラン、ピンカアルカロイド（例えば、ピンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビン）、ムスチン、チロシンキナーゼ阻害剤、放射線療法、性ホルモン拮抗薬、選択的アンドロゲン受容体調節薬、選択的エストロゲン受容体調節薬、PDGFアンタゴニスト、TNFアンタゴニスト、IL1アンタゴニスト、インターロイキン（例えば、IL12またはIL2）、IL12Rアンタゴニスト、毒素複合化モノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体、アービタックス、アバスチン、ペルツズマブ、抗CD20抗体、リツキサン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、DXL625、ハーセプチン（登録商標）、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。リシン、ジフテリア毒素およびシュードモナス毒素などの植物および細菌由来の毒性酵素は、治療薬（例えば、抗体）と複合体形成して、細胞型特異的殺作用剤を生成し得る（Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539 (1980); Krollick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980)）。

【0409】

他の細胞傷害薬としては、Goldenbergによる米国特許第6,653,104号に記載される細胞傷害性リボヌクレアーゼが挙げられる。本発明の実施形態はまた、放射性免疫複合体に関し、複合体形成剤を使用してまたは使用せずに、アルファまたはベータ粒子を放出する放射性核種がCD8結合物質に安定に結合される。このような放射性核種としては、例えば、リン-32、スカンジウム-47、銅-67、ガリウム-67、イットリウム-88、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、サマリウム-153、ルテチウム-177、レニウム-186またはレニウム-188などの放射体、およびアスタチン-211、鉛-212、ビスマス-212、ビスマス-213またはアクチニウム-225などの放射体が挙げられる。

【0410】

検出可能な部分の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光材料のさらなる例としては、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリンおよびダンシルクロリドが挙げられるが、これらに限定されない。化学発光部分のさらなる例としては、ルミノールが挙げられるが、これに限定されない。生物発光材料のさらなる例としては、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられるが、これらに限定されない。放射性材料のさらなる例としては、ヨウ素-125、炭素-14、硫黄-35、トリチウムおよびリン-32が挙げられるが、これらに限定されない。

【0411】

治療方法

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法および組成物は、限定されないが、癌、感染症、免疫異常、炎症性疾患または状態、および自己免疫疾患を含む種々の疾患および障害を治療する用途がある。

【0412】

さらに、本発明の物質は、限定されないが、癌、感染症、免疫異常、炎症性疾患または状態、および自己免疫疾患を含む、種々の疾患および障害の治療、または治療用の薬物の製造において使用し得る。

【0413】

いくつかの実施形態では、本発明は、癌の治療、または癌の患者に関する。本明細書で使用される場合、癌は、身体の器官およびシステムの正常な機能動作を妨害し得る任意の制御されない細胞増殖を指し、原発性および転移性の腫瘍の両方を含む。元の位置から移動し重要な器官に播種される原発性腫瘍または癌は、罹患した器官の機能劣化により対象の死を最終的にもたらず場合がある。転移は、原発腫瘍部位のものとは異なる癌細胞または一群の癌細胞であり、原発腫瘍から身体の他の部位への癌細胞の播種から生ずる。転移は、最終的に対象の死をもたらず場合がある。例えば、癌は、良性および悪性の癌、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移を含み得る。

【0414】

治療され得る癌の例としては、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎臓癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘍病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群に関連する異常血管増殖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0415】

治療し得る癌の例としては、癌腫、例えば、種々のサブタイプ（例えば、腺癌、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、および移行性上皮癌を含む）、肉腫（例えば、骨および軟組織を含む）、白血病（例えば、急性骨髄性、急性リンパ芽球性、慢性骨髄性、慢性リンパ球性、およびヘアリー細胞を含む）、リンパ腫および骨髄腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、軽鎖型、非分泌型MGUS、および形質細胞腫を含む）、および中枢神経系癌（例えば、脳腫瘍（例えば、神経膠腫（例えば、星状細胞腫、乏突起細胞腫および上衣腫）、髄膜腫、下垂体腺腫、および神経腫）、および脊髄腫瘍（例えば、髄膜腫および神経線維腫））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0416】

いくつかの実施形態では、本発明は、微生物感染症および/または慢性感染症の治療、またはそれらの感染症を罹患している患者に関する。感染症の例としては、HIV/AIDS、結核、骨髄炎、B型肝炎、C型肝炎、エプスタイン・パールウイルスまたはパルボウイルス感染症、T細胞白血病ウイルス感染症、細菌過剰症候群、真菌または寄生虫感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 7 】

種々の実施形態では、本発明の組成物は、炎症、急性炎症、慢性炎症、呼吸器疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、敗血性ショック、関節リウマチ、炎症性腸疾患、炎症性骨盤疾患、痛み、眼の炎症性疾患、セリアック病、リー症候群、グリセロールキナーゼ欠損症、家族性好酸球増加症（F E）、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、炎症性喉頭疾患、結核、慢性胆嚢炎、気管支拡張症、珪肺症および他の塵肺症などの１種類または複数種類の炎症性疾患または状態を治療または予防するために使用される。

【 0 4 1 8 】

種々の実施形態では、本組成物は、多発性硬化症、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェグナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性硬化性胆管炎、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群（Menier's syndrome）、移植拒絶反応（例えば、移植片拒絶の防止）、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、およびその他の自己免疫疾患などの１種類または複数種類の自己免疫疾患または状態の治療または予防に使用される。

【 0 4 1 9 】

キット

本発明はまた、本明細書に記載のうちのいずれかのＣＤ８結合物質の投与（例えば、追加の治療薬を含み、または含まずに）のためのキットを提供する。キットは、本明細書に記載の少なくとも１種類の本発明の医薬組成物を含む、材料または成分の集合体である。したがって、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の少なくとも１種類の医薬組成物を含む。

【 0 4 2 0 】

キットを構成する成分の明確な性質は、その意図される目的に依存する。一実施形態では、キットは、ヒト対象用を治療する目的のために構成される。

【 0 4 2 1 】

使用説明書をキット中に含めてもよい。使用説明書は、通常、癌の治療などの望まれる治療結果を達成するために、キットの成分を使用する際に採用すべき技術を説明する明確な表現を含む。必要に応じ、キットは、他の有用な成分、例えば、希釈剤、緩衝剤、薬学的に許容可能な担体、シリンジ、カテーテル、塗布具、ピペット操作または測定用ツール、包帯材料または当業者なら容易に気付くような他の有用な備品一式も含む。

【 0 4 2 2 】

キットに組込まれる材料および成分は、それらの操作性および有用性を維持する任意の便利で適切な方法で保管され開業医に提供され得る。例えば、成分は、室温、冷蔵温度、または凍結温度で提供できる。成分は通常、適切な梱包材料に収容される。種々の実施形態では、梱包材料は、よく知られた方法、好ましくは、無菌の、混入物のない環境を与える方法で構築される。梱包材料は、内容物および／またはキットの目的および／またはその成分を表示する外部ラベルを有してよい。

【 0 4 2 3 】

定義

本明細書で使用される場合、「a」、「an」、または「the」は、１つ（１種類）または２つ以上（２種類以上）を意味し得る。

【 0 4 2 4 】

さらに、参照数値表示に関連して使われる用語の「約」は、参照数値表示±参照数値表示の最大で１０％を意味する。例えば、用語の「約５０」は、４５～５５の範囲を含む。

【 0 4 2 5 】

「有効量」という用語は、医学的使用に関連して使用される場合、測定できるほどの目

10

20

30

40

50

的の疾患の治療、予防、または発病速度の低下をもたらすのに効果的である量である。

【0426】

本明細書で使用される場合、物質または刺激の存在下で、このような調節の非存在下に比べて、活性および/または効果の出力値がかなりの量、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、またはそれを超えて、少なくとも最大約100%（約100%を含む）低減されるとき、何かが「減少され」ている。当業者により理解されるように、いくつかの実施形態では、活性は減少され、かついくつかの下流の出力値は減少されるが、他のものは増加し得る。

10

【0427】

逆に、物質または刺激の存在下で、このような物質または刺激の非存在下に比べて、活性および/または効果の出力値がかなりの量、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、またはそれを超えて、最大少なくとも約100%（約100%を含む）またはそれを超えて、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍増加する場合、活性は「増加され」る。

20

【0428】

本明細書において、参照される場合、全ての組成物に関するパーセンテージは、特に指定がない限り、総組成物の重量による。本明細書で使用する場合、「含む(include)」という単語とその変形物は、非限定であることを意図し、それにより、リスト中の項目の記載は、この技術の組成物および方法に有用である可能性を同様に有する他の類似項目の除外を意図するものではない。同様に、用語の「can」および「may」およびその変形物は、非限定であることを意図し、それにより、ある実施形態が特定の要素または特徴を含むことが「できる(can)」または含んでも「よい(may)」という記載は、これらの要素または特徴を含まない本発明の技術のその他の実施形態を排除するものではない。

30

【0429】

including、containing、またはhavingなどの用語の同義語としてのオープンエンド用語の「含む(comprising)」を本明細書でを使用して本発明を記載および請求するが、本発明、またはその実施形態は、「からなる(consisting of)」または「から本質的になる(consisting essentially of)」などの代替用語を使って、代わりに記載することができる。

【0430】

本明細書で使用される場合、用語の「好ましい」および「好ましくは」は、特定の状況下で、特定の利点をもたらす本技術の実施形態を指す。しかしながら、同じまたは他の環境下で、他の実施形態も好ましい場合がある。さらに、1つまたは複数の好ましい実施形態の記載は、他の実施形態が有用でないことを示すものではなく、また、本技術の範囲から他の実施形態を排除することを意図するものではない。

40

【0431】

治療効果の達成に必要な本明細書で記載の組成物の量は、特定目的のための従来の手順に従って経験的に決定されてよい。一般に、治療目的のために治療薬を投与する場合、治療薬は薬理学的有効量で投与される。「薬理学的有効量」、「薬理学的有効用量」、「治療有効量」、または「有効量」は、特に障害または疾患を治療するために、目的の生理的な効果を生み出すのに十分な量または目的の結果を達成することができる量を意味する。本明細書で使用される場合、有効量は、例えば、障害または疾患の症状の進展を遅らせる、障害または疾患の症状の経過を変える（例えば、疾患の症状の進展を遅らせる）、障害

50

または疾患のうちの1つまたは複数の症状または発症を減らすまたはなくす、および障害または疾患の症状を回復させるのに十分な量を含んでよい。治療効果はまた、改善が実現されるかどうかにかかわらず、根底にある疾患または障害の進行を止めるまたは遅らせることも含む。

【0432】

有効量、毒性、および治療効果は、例えば、細胞培養または実験動物によりLD₅₀（集団の約50％に対する致死用量）およびED₅₀（集団の約50％での治療的有效量）を測定するための標準的薬学的手順により決定できる。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて変化し得る。毒性と治療効果との間の用量比率は、治療指数であり、比率LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。いくつかの実施形態では、大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療有効量は、最初は、例えば、細胞培養アッセイを含むインビトロアッセイから推測することができる。また、用量は、細胞培養または適切な動物モデルで決定したIC₅₀などの循環血漿中濃度を達成するように動物モデルで処方することができる。記載の組成物の血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。いずれかの特定の投与量の効果は、適切なバイオアッセイによりモニターすることができる。投与量は医師により決定されてよく、必要に応じて、観察された治療の効果に適合するように調節できる。

【0433】

特定の実施形態では、効果は、少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約50％、少なくとも約70％、または少なくとも約90％の定量可能な変化をもたらすであろう。いくつかの実施形態では、効果は、約10％、約20％、約30％、約50％、約70％、またはさらに約90％以上の定量化可能な変化をもたらすであろう。治療効果はまた、改善が実現されるかどうかにかかわらず、根底にある疾患または障害の進行を止めるまたは遅らせることも含む。

【0434】

本明細書で使用される場合、「治療方法」は、本明細書に記載の疾患または障害の治療のための組成物および/または本明細書に記載の疾患または障害の治療のための薬剤の製造での使用および/または複数使用のための組成物に等しく適用可能である。

【実施例】

【0435】

実施例1．ヒトCD8特異的VHHの構築と評価
抗原特異的VHHの単離

免役したラマからVHHライブラリーを構築した。ヒトCD8を発現している安定に遺伝子導入されたCHO-K1細胞を用いて、溶液中でVHHライブラリーの3回の連続パニングラウンドを実施した。各パニングラウンド後に、遺伝子導入細胞から溶出されたファージミド粒子の数（出力）を、パニングに使用したファージミド粒子の数（入力）と比較することにより、抗原特異的ファージの濃縮を評価した。ファージ出力は、第1ラウンドの出力と比較して、第2ラウンドで約10²倍、第3ラウンドで10³倍に増大した。入力ファージは、常に約10¹¹であり、第1ラウンドからの出力は約10⁷ファージ粒子であった。第1および第2および第3パニングラウンドから285個の無作為に選択したコロニー（各ラウンドから95個）を配列決定し、その後、CDR3配列に基づいて分類した。VHHを含む粗製ペリプラズム抽出物を使用し、安定にヒトCD8を遺伝子導入したCHO-K1細胞を用いて、フローサイトメトリーにより、89種類の特有の配列のCD8に対する特異性を分析した。親の非遺伝子導入CHO-K1細胞は、陰性対照細胞としての役割を果たした。無関係のVHHをナノボディ陰性対照として使用した。フローサイトメトリー実験は、31種類の異なる群に属する69種類の異なるVHHがヒトCD8に特異的であることを明らかにした（図3参照）。下表は、69種類の異なる抗ヒトCD8 VHH遺伝子を表す69個のクローンの説明である。抗ヒトCD8A VHH配列を含む組換えファージミドpMECSを含む大腸菌TG1を生成し、-80℃で保存した。ベクターpMECSは、アンピシリン耐性をコードする。

10

20

30

40

50

【表 1】

大腸菌株 + ベクター	VHH (Nb)	NSF グリセロールストック番号
TG1, pMECS	1CDA 7	4757
TG1, pMECS	1CDA 12	4758
TG1, pMECS	1CDA 14	4759
TG1, pMECS	1CDA 15	4760
TG1, pMECS	1CDA 17	4761
TG1, pMECS	1CDA 18	4762
TG1, pMECS	1CDA 19	4763
TG1, pMECS	1CDA 24	4764
TG1, pMECS	1CDA 26	4765
TG1, pMECS	1CDA 28	4766
TG1, pMECS	1CDA 37	4767
TG1, pMECS	1CDA 43	4768
TG1, pMECS	1CDA 45	4769
TG1, pMECS	1CDA 47	4770
TG1, pMECS	1CDA 48	4771
TG1, pMECS	1CDA 58	4772
TG1, pMECS	1CDA 65	4773
TG1, pMECS	1CDA 68	4774
TG1, pMECS	1CDA 73	4775
TG1, pMECS	1CDA 75	4776
TG1, pMECS	1CDA 86	4777
TG1, pMECS	1CDA 87	4778
TG1, pMECS	1CDA 88	4779
TG1, pMECS	1CDA 89	4780
TG1, pMECS	1CDA 92	4781
TG1, pMECS	1CDA 93	4782
TG1, pMECS	2CDA 1	4783
TG1, pMECS	2CDA 5	4784
TG1, pMECS	2CDA 22	4785
TG1, pMECS	2CDA 28	4786
TG1, pMECS	2CDA 62	4787
TG1, pMECS	2CDA 68	4788
TG1, pMECS	2CDA 73	4789
TG1, pMECS	2CDA 74	4790
TG1, pMECS	2CDA 75	4791
TG1, pMECS	2CDA 77	4792

10

20

30

40

50

【表 2】

大腸菌株 + ベクター	VHH (Nb)	NSF グリセロールストック番号
TG1, pMECS	2CDA 81	4793
TG1, pMECS	2CDA 87	4794
TG1, pMECS	2CDA 88	4795
TG1, pMECS	2CDA 89	4796
TG1, pMECS	2CDA 91	4797
TG1, pMECS	2CDA 92	4798
TG1, pMECS	2CDA 93	4799
TG1, pMECS	2CDA 94	4800
TG1, pMECS	2CDA 95	4801
TG1, pMECS	3CDA 3	4802
TG1, pMECS	3CDA 8	4803
TG1, pMECS	3CDA 11	4804
TG1, pMECS	3CDA 18	4805
TG1, pMECS	3CDA 19	4806
TG1, pMECS	3CDA 21	4807
TG1, pMECS	3CDA 24	4808
TG1, pMECS	3CDA 28	4809
TG1, pMECS	3CDA 29	4810
TG1, pMECS	3CDA 31	4811
TG1, pMECS	3CDA 32	4812
TG1, pMECS	3CDA 33	4813
TG1, pMECS	3CDA 37	4814
TG1, pMECS	3CDA 40	4815
TG1, pMECS	3CDA 41	4816
TG1, pMECS	3CDA 48	4817
TG1, pMECS	3CDA 57	4818
TG1, pMECS	3CDA 65	4819
TG1, pMECS	3CDA 70	4820
TG1, pMECS	3CDA 73	4821
TG1, pMECS	3CDA 83	4822
TG1, pMECS	3CDA 86	4823
TG1, pMECS	3CDA 88	4824
TG1, pMECS	3CDA 90	4825

【0436】

組換え pMECS を用いた非サプレッサー株（例えば、WK6）の形質転換

N - 末端に PelB シグナル配列、ならびに C - 末端に HA タグおよび His₆ タグを含む pMECS ベクターに VHH 遺伝子をクローニングした（PelB リーダー - VHH - HA - His₆）。PelB リーダー配列は、VHH を大腸菌の細胞膜周辺腔に標的化し、HA および His₆ タグは VHH の精製と検出（例えば、ELISA、ウェスタンブロット、などで）に使用された。

【0437】

pMECS ベクター中では、His₆ タグに続けて、アンバー停止コドン（TAG）およびこのアンバー停止コドンの後に、M13 ファージの gene III が続いた。サプレッサー大腸菌株（例えば、TG1）では、アンバー停止コドンがグルタミンとして読み取られ、したがって、VHH はファージのタンパク質 III との融合タンパク質として発現され、これは、パニングのために、ファージコート上の VHH の提示を可能にする。TG1 サプレッサー株では、抑制の効率は 100% ではなく、したがって、抑制因子株中の VHH の発現は、2 種類の異なるタイプの VHH 分子、タンパク質 III に融合されたものとタンパク質 III のないもの、をもたらす。非サプレッサー大腸菌株（例えば、WK6

）では、アンバー停止コドンが停止コドンとして読み取られ、したがって、得られたV H Hはタンパク質I I Iに融合されなかった。

【0438】

p M E C SベクターにクローニングされたV H Hを発現させ精製するために、目的のV H Hの遺伝子を含むp M E C Sを作製し、プラスミドを非サプレッサー株（例えば、W K 6）中に形質転換した。得られたクローンのV H HをM P 0 5 7プライマー（5' - T T A T G C T T C C G G C T C G T A T G - 3'）（配列番号1033）を用いて配列決定し、クローンの同一性を確認した。抗原結合能を、E L I S Aまたは任意の他の適切なアッセイにより再試験した。V H H遺伝子を有する組換えp M E C Sベクターを含む非サプレッサー株（例えば、W K 6）をV H Hの発現と精製に使用した。

10

【0439】

p M E C Sベクターでは、V H Hの保存時に、H i s₆タグを切断した。したがって、H i s₆タグが検出などのために使われる場合には、V H H遺伝子を、p M E C Sからp H E N 6 cベクター中に再クローニングした。具体的には、テンプレートとしてV H H遺伝子を含む組換えp M E C Sを用い、プライマーとしてA 6 EおよびP M C Fを用いて、V H H遺伝子をP C Rにより増幅した。プライマーA 6 EおよびP M C Fは、それぞれ、フレームワーク1およびフレームワーク4プライマーであった。プライマー配列は以下の通り：

【化2】

・プライマーA6E（5' GAT GTG CAG CTG CAG GAG TC T GGR* GGA GG 3'）（配列番号1034）。

20

・プライマーPMCF（5' CTA GTG CGG CCG CTG AGG A GA CGG TGA CCT GGG T 3'）（配列番号1035）。

・ユニバーサル逆方向プライマー（5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'）（配列番号1036）。

・ユニバーサル順方向プライマー（5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3'）（配列番号1037）。

*Rは、AまたはGを表す。P s t I、N o t IおよびB s t E I I（E c o 9 1 I）認識配列は、それぞれ、太字、イタリックおよび下線で示されている。

【0440】

30

増幅プロトコルは、約30サイクルのP C Rを含み、それぞれのサイクルは、94 で30秒、55 で30秒および72 で45秒、その後、P C Rの最後に72 で10分間の伸長反応を含んだ。約400 b pのフラグメントが増幅された。

【0441】

P C R産物を精製し（例えば、Q i a g e nのQ i a q u i c k P C R精製キットを用いて）、P s t Iで一晩消化した。精製P C R産物をB s t E I Iで（またはF e r m e n t a sのE c o 9 1 Iで）一晩消化した。消化に用いた温度は様々であった。例えば、B s t E I Iによる消化は、酵素の供給業者に依拠して、50 または60 で実施した。

【0442】

ライゲーションのために、P C R産物を精製した。p H E N 6 cベクターをP s t Iで3時間消化し、上述のように精製した後、B s t E I Iで2～3時間消化した。あるいは、消化をF e r m e n t a sのE c o 9 1 Iを用いて実施した。消化ベクターを1%アガロースゲルで泳動し、ベクターバンドをゲルから切り出し、精製した（例えば、Q i a g e nのQ i a q u i c kゲル抽出キットにより）。P C Rフラグメントをその後ベクターに連結した。

40

【0443】

エレクトロコンピテントW K 6細胞を連結反応で形質転換し、L B / 寒天 / アンピシリン（100 μ g / m l）/ グルコース（1～2%）プレートを用いて形質転換体を選択した。陽性クローンを、ユニバーサル逆方向およびユニバーサル順方向プライマーを用いてP C Rによりスクリーニングした。インサートが存在する場合には、約550 b pのフラ

50

グメントを増幅した。クローンの同一性を確認するために、ユニバーサル逆方向プライマーを用いて、それぞれのVHH当たり、少なくとも2種類のクローンを配列決定した。抗原結合能を、ELISAまたは任意の他の適切なアッセイにより再試験した。

【0444】

上記プロトコルに続き、pHEN6cベクター中でクローニングしたVHH遺伝子を生成した。これは、N-末端にPelBシグナル配列およびC-末端にHis₆テイルを含んだ。PelBリーダー配列は、VHHを大腸菌の細胞膜周辺腔に標的化し、HisタグはVHHの精製と検出（例えば、ELISA、ウェスタンブロット、などで）に使用された。

【0445】

VHHの発現および精製

VHHの発現および精製を実施した。具体的には、1日目に、10~20mlのLB+アンピシリン(100μg/ml)+グルコース(1%)に、新たに形質転換したWK6コロニーを接種した。この前培養液を37℃で一晩、200~250rpmで振盪を加えながらインキュベートした。2日目に、VHH発現用にTB培地を用いた。TB培地は、1リットル当たり、次記を含んだ：2.3gのKH₂PO₄、16.4gのK₂HPO₄・3H₂O、12gのトリプトン(Duchefa Biochemie)、24gの酵母(Duchefa Biochemie)、および4mlの100%グリセロール(Duchefa Biochemie)。

【0446】

1リットルのバッフル付振とうフラスコを、330mlのTBで満たし、オートクレーブ処理した。KH₂PO₄およびK₂HPO₄・3H₂Oは、オートクレーブ処理しなかった。その代わりに、KH₂PO₄およびK₂HPO₄・3H₂Oを調製し、フィルター滅菌した後、既にオートクレーブ処理されている残りの培地に加えた。約1mlの前培養液を、100μgのアンピシリン、330mlの、2mMのMgCl₂および0.1%のグルコースを補充したTBに加えた後、37℃で振盪(200~250rpm)を加えながら、0.6~0.9のOD₆₀₀に達するまで増殖させた。IPTG(1mMの最終濃度)を加え、VHH発現を誘導した。この培養液を28℃で振盪を加えながら一晩(約16~18時間)インキュベートした。一晩誘導後、OD₆₀₀は通常、25~30であった。クローン当たり少なくとも1リットルの培養液(3つのボトル)を、平均収量1~15mg/lで調製した。

【0447】

大腸菌の周辺質からのVHHの抽出を3日目に実施した。使用した溶液は、次を含んだ：TES：0.2M トリスpH8.0、0.5mM EDTA、0.5Mショ糖、およびTES/4：水中4倍希釈TES。

【0448】

一晩の誘導培養液を8000rpmで8分間遠心分離した。1リットルの培養液からの細胞ペレットを、上下のピペッティングにより12mlのTES中に再懸濁し、氷上で1時間震盪した。使用した各12mlのTES当たり、約18mlのTES/4を加え、氷上で追加の1時間振盪を加えながらインキュベートし、続けて、4℃、8000rpmで30分間遠心分離した。細胞膜周辺腔から抽出したタンパク質を含む上清を新しいファルコンチューブに移した。

【0449】

VHHをその後、次の溶液を使用するIMACにより精製した：HIS-select(Sigma)、PBS、および50mMの酢酸ナトリウムpH4.6。

【0450】

HIS-selectをPBSで平衡化した。具体的には、1リットルの培養液からのペリプラズム抽出物当たり、1mlのレジン(約2mlのHIS-select溶液)を50mlのファルコンチューブに加えた。PBSも加えて、最終体積の50mlにし、混合した。2000rpmで2分間遠心分離し、上清を廃棄した。上述のように、レジンを

10

20

30

40

50

PBSで2回洗浄した。周辺質抽出物をレジンに加え、緩やかな振盪を加えながら室温で30分～1時間インキュベートした。試料を底部にフィルターを備えたPD-10カラム(GE Healthcare、カタログ番号17-0435-01)に加え、50～100mlのPBS(使用した1mlのレジン当たり、50～100mlのPBS)で洗浄した。溶出を3回実施し、各回に1mlの使用したレジン当たり、1mlのPBS/0.5Mのイミダゾールを用いた(溶出を効率化するために、ビーズを再懸濁し、カラムの低部を閉止して、4℃で一晩放置した)。PBSに対し4℃で一晩透析を実施(カットオフ3500ダルトン)して、イミダゾールを除去した。透析を効率化するために、透析緩衝液(PBS)を2、3回交換した。あるいは、イミダゾールを用いる溶出の代わりに、結合VHHを10mlの50mMの酢酸ナトリウムpH4.6で溶出することも可能である。50mMの酢酸ナトリウムpH4.6をVHHの溶出に使用する場合、溶出したVHHをすぐに1MのトリスpH8.0で中和し、透析は必要なかった。

10

【0451】

タンパク質の量は、溶出試料のOD₂₈₀測定により推定した。各クローンの消光率を、ExPASyプロテオミクスサーバーでの一次構造分析に基づいて、protParamツールにより測定した。VHHのさらなる精製は、異なる方法で達成できるであろう。例えば、Superdex 75 16/60へのロード用の適切な体積が得られるまで(最大4ml)、4℃、2000rpmでの遠心分離(Vivaspin 5000MWカットオフ、Vivascience)により試料を濃縮し得る。濃縮試料を、PBSで平衡化したSuperdex 75 16/60カラムにロードした。ピーク画分をブールし、定量化するために、OD₂₈₀測定を実施した。一般に、1ml/分で実施した場合、85～95分後にVHHが溶出した。濃縮VHH試料の分割量を、-20℃下、約1mg/mlの濃度で貯蔵した。

20

【0452】

実施例2．ヒトCD8結合VHHの機能特性評価

種々のVHH(実施例1で記載のような)の結合特性をフローサイトメトリーで試験した。HEK293-T細胞にヒトCD8 発現プラスミドを遺伝子導入し、2μg/mlのHisタグ付きVHHで染色し、続けて、抗His FITC 標識抗体で染色した。フローサイトメトリーを介して細胞蛍光を検出することにより結合を測定した。図4に示す結果は、VHHがCD8に結合することを示す。

30

【0453】

実施例3．抗ヒトCD8 VHHキメラにより誘導されるpSTATシグナル伝達

用語の「Actaferon」(AFN)は、インターフェロンベスキメラに言及するために本明細書で使われる。下記の実施例では、特に断りのない限り、IFNに対する変異は、ヒトIFN 2(配列番号12)に対するものである。

【0454】

CD8陽性細胞およびCD8陰性細胞でpSTATシグナル伝達アッセイを行った。調査したキメラは、抗ヒトCD8 VHH/ヒトIFN R149A融合体であった。

【0455】

CD8に対する結合のFACS分析および配列類似度に基づいて、6種類のCD8 VHH: 3CDA19、3CDA65、3CDA33、3CDA28、3CDA31、および2CDA5をさらなる分析のために選択した。これらのVHHを、真核生物発現のためのpMTW中で、次記のようにActaferon(AFN)背景にクローン化した: pMTW-SIgK-hCD8__VHH-(GGS)₂₀-hIFNa2__R149A-GGS-(His)₉。目的のタンパク質を、標準的プロトコルに従って25K PEI(ポリエチレンイミン)を用いてヒトHEK293F細胞で産生した。培地を採取し、細胞を遠心分離により除去し、濾過滅菌した。組換えタンパク質を、製造業者の説明書に従いNi Excelレジン(GE Healthcare)を用いて精製し、イミダゾールをPD10カラム(GE Healthcare)により試料から除去した。

40

【0456】

50

健康なドナーのバフィーコート由来のPBMCを、Ficoll-Paque (GE Healthcare) を用いる密度勾配遠心分離により単離した。細胞をFACS緩衝液 (2% FBS、PBS中1mMのEDTA) で2回洗浄し、抗ヒトCD8 APC (クローンREA734; Miltenyi Biotec) を用いて4 で20分間染色した。2回の洗浄後、細胞を系列希釈したCD8 - Actaferonを用いて37 で15分間刺激した。固定 (10分間、37、Fix Buffer I; BD Biosciences) および透過処理 (30分、氷上、Perm III Buffer I; BD Biosciences) および洗浄後に、細胞を抗STAT1 pY701 Ab (BD Biosciences) で染色した。試料を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して、FACSCalibur (BD Biosciences) で取得した。

10

【0457】

図5A~Bに示すように、CD8 VHH標的化変異体IFN (すなわち、R149A) は、CD8陽性細胞 (図5A) 中でSTAT1をリン酸化できたが、CD8陰性細胞中 (図5B) ではリン酸化できず、効率的なCD8標的化を示す。

【0458】

実施例4. 抗ヒトCD8 VHH Actaferonにより誘導されるpSTAT1シグナル伝達

実施例3では、図3に示すように、CD8 VHHがより大きな配列群1、2、および15から選択された。FACSにおけるCD8への結合に基づいて (実施例2および図4を参照)、群3、4、22、および30を含む追加の配列群が、CD8に対する強い結合を示した。これらのCD8 VHHを、CD8陽性およびCD8陰性末梢血単核球 (PBMC) でのSTAT1リン酸化のFACSを用いた定量化による、ActaferonのヒトCD8標的化のそれらの効率のさらなる評価のために選択した。配列群3および4は類似であると思われ、より強い結合のVHH 2CDA74が代表的メンバーとして選択された。2CDA74の配列は、位置50にCDR2中に遊離システインを含む。この残基を、ジスルフィドベースの二量体形成を回避するためにセリンへ変異させた。変異は、SSISRSDGSTY (配列番号1221) のCDR2配列を有する2CDA74をもたらした。

20

【0459】

CD8 VHH: 1CDA65、2CDA5、2CDA68、2CDA74 (C50S)、および3CDA19 (下記に示す配列) の親和性を測定した (表1参照)。CD8 VHHの親和性を、バイオレイヤー干渉法であるOctet RED96 system (ForteBio) を用いて測定した: ピオチン化CD8 (Sino Biologic al) をストレプトアビジンバイオセンサー (ForteBio) 上に固定し、段階希釈CD8 AFN中に浸漬した。親和性を、Octetソフトウェア (ForteBio) を用いて計算した。

30

1CDA65 (配列番号1217)

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

40

2CDA5 (配列番号1218)

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

2CDA68 (配列番号1219)

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

50

GTQVTVSS。

2CDA74 (C50S) (配列番号1216)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGFTFDNYAIGWFRQA
PGKEREGVSSISRSDGSTYYADSVRGRFTISSSDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCAAETSAADSGEFRFGWVLKPSLYDY
WGQGTQVTVSS。

3CDA19 (配列番号1220)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSDDYTIGWFRQA
PGKEREGISCFSSSDGSTGFADSVKGRFTISSSDNATNTVY
LEMNSLKPEDTAVYYCAADFNVWSPPICGSRWYGPPPGGM
EYWGKGTQVTVSS。

10

【表3】

表1						
	KD (M)	KD 誤差	kon(1/Ms)	kon 誤差	kdis (1/s)	kdis 誤差
2CDA5	2.01E-08	3.41E-10	1.02E+05	1.43E+03	2.04E-03	1.95E-05
3CDA19	2.60E-09	3.29E-11	2.07E+05	1.10E+03	5.37E-04	6.17E-06
1CDA65	3.09E-09	1.87E-11	3.13E+05	1.18E+03	9.65E-04	4.59E-06
2CDA74 (C50S)	1.94E-08	9.55E-10	4.97E+03	5.44E+01	9.67E-05	4.63E-06
2CDA68	9.30E-09	1.32E-10	3.24E+05	4.10E+03	3.01E-03	1.93E-05

20

【0460】

CD8 VHH: 1CDA65、2CDA5、2CDA68、2CDA74 (C50S)、および3CDA19を次記のように、真核生物発現のためのpMTWベクター中の、AFNにクローン化した: pmTW-SIgK-hCD8__VHH-(GGs)₂₀-hIFNa2__R149A-GGS-(His)₉。目的のCD8 VHH AFNタンパク質(すなわち、AFN 1CDA65、AFN、2CDA5、AFN 2CDA68、AFN 2CDA74 (C50S)、およびAFN 3CDA19)を製造者のガイドラインに従って、Exp CHO細胞(Thermo Fisher)中で産生した。培地を採取し、細胞を遠心分離により除去し、濾過滅菌した。組換えタンパク質を、His Pur Cobaltビーズ(Thermo Fisher)を用いて精製し、イミダゾールをPD10カラム(GE Healthcare)を用いて試料から除去した。

30

【0461】

得られたCD8 VHH AFNの生物活性を試験するために、PBMCを、Ficoll-Paque(GE Healthcare)を用いる密度勾配遠心分離により、健康なドナーのパフィーコートから単離した。細胞をFACS緩衝液(2% FBS、PBS中1mMのEDTA)で2回洗浄し、抗ヒトCD8-FITC(クローンREA734; Miltenyi Biotec)を用いて4℃で20分間染色した。2回の洗浄後、細胞をCD8 VHH AFN(すなわち、AFN 1CDA65、AFN 2CDA5、AFN 2CDA68、AFN 2CDA74 (C50S)、またはAFN 3CDA19)の系列希釈または野生型IFNa2(陽性対照)を用いて37℃で15分間刺激した。固定(10分間、37℃、Fix Buffer I; BD Biosciences)および透過処理(30分、氷上、Perm III Buffer I; BD Biosciences)および洗浄後に、細胞を抗STAT1 pY701 Ab(BD Biosciences)で染色した。試料を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア(BD Biosciences)を用いて、FACS Calibur(BD Biosciences)で取得し、FlowJoソフトウェア(FlowJo)を用いて分析した。

40

【0462】

図6A~Fは、CD8 VHH AFNによる処理が、CD8陰性細胞に比べて、CD8陽性細胞でSTAT1のより多くのリン酸化をもたらすことを示す(データは、ベースラ

50

イン S T A T 1 リン酸化に対する増加としてプロットされた)。

【0463】

実施例5．カニクイザル C D 8 との交差反応性

実施例4からの C D 8 V H H の、ヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファへ結合する能力を F A C S で試験した。

【0464】

H e k 2 9 3 T 細胞を、標準的リン酸カルシウム法を使ってヒトまたはカニクイザル C D 8 アルファをコードする発現プラスミドで一時的にトランスフェクトした。2日後に、細胞を再懸濁し、段階希釈 C D 8 A F N および F I T C 結合 T H E H I S A b (G e n s c r i p t) と順次インキュベートした。試料を、C e l l Q u e s t P r o V e r s i o n 4 . 0 . 2 ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s) を用いて、F A C S C a l i b u r (B D B i o s c i e n c e s) で取得し、F l o w J o ソフトウェア (F l o w J o) を用いて分析した。

【0465】

図7A～Eは、5つ全ての C D 8 V H H が同様に等しく、ヒトおよびカニクイザル C D 8 アルファに結合することを示す。

【0466】

等価物

本発明をその特定の実施形態と関連付けて説明してきたが、その実施形態はさらに修正が可能であり、本出願は、一般的に、本発明の原理に従った本発明の任意の変形、使用、または改変を包含することが意図され、本発明が属する技術内の既知のまたは日常的な実施の範囲に入る、および上に示されるおよび以下の添付の請求項の範囲に入る本質的な特徴に該当し得る本開示からの乖離を含むものと理解されよう。

【0467】

当業者は、本明細書で具体的に記載された特定の実施形態に対する多数の等価物を、ルーチン実験のみを用いて認識し、確認できるであろう。このような等価物は、次の請求項の範囲内に包含されることが意図されている。

【0468】

参照による組み込み

本明細書で引用されている全ての特許および刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0469】

本明細書で考察された出版物は、単に本出願の出願日に先行してそれらが開示されているという理由で提供されている。本明細書のいずれも、本発明が、先行発明の理由でこのような出版物に先行する権利がないことを容認すると解釈されるべきではない。

【0470】

本明細書で使用されている全ての見出しは、単に構成上の理由によるものであり、どんな形にせよ、本開示を限定することを意図するものではない。任意の個別のセクションの内容は、等しく全てのセクションに適用できる。

【0471】

参考文献

以下は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

A r t y o m o v M N , L i s M , D e v a d a s S , D a v i s M M , C h a k r a b o r t y A K , 2 0 1 0 . C D 4 a n d C D 8 b i n d i n g t o M H C m o l e c u l e s p r i m a r i l y a c t s t o e n h a n c e L c k d e l i v e r y . P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f t h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a 1 0 7 , 1 6 9 1 6 - 2 1 .

C o l e D K , D u n n S M , S a m i M , B o u l t e r J M , J a k o b s e n B K , S e w e l l A K , 2 0 0 8 . T c e l l r e c e p t o r e n g a

10

20

30

40

50

gement of peptide-major histocompatibility complex class I does not modify CD8 binding. *Molecular Immunology* 45, 2700-9.

Cole DK, Pumphrey NJ, Boulter JM, et al., 2007. Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. *Journal of Immunology* 178, 5727-34.

Janeway CA, Jr., 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual Review of Immunology* 10, 645-74.

10

Jiang N, Huang J, Edwards LJ, et al., 2011. Two-stage cooperative T cell receptor-peptide major histocompatibility complex-CD8 trimolecular interactions amplify antigen discrimination. *Immunity* 34, 13-23.

Laugel B, Price DA, Milicic A, Sewell AK, 2007a. CD8 exerts differential effects on the deployment of cytotoxic T lymphocyte effector functions. *European Journal of Immunology* 37, 905-13.

20

Laugel B, Van Den Berg HA, Gostick E, et al., 2007b. Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 23799-810.

Li Y, Yin Y, Mariuzza RA, 2013. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Frontiers in Immunology* 4, 206.

30

Moebius U, Kober G, Griscelli AL, Hercend T, Meuer SC, 1991. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *European Journal of Immunology* 21, 1793-800.

Purbhoo MA, Boulter JM, Price DA, et al., 2001. The human CD8 coreceptor effects cytotoxic T cell activation and antigen sensitivity primarily by mediating complete phosphorylation of the T cell receptor zeta chain. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 32786-92.

40

Singer A, Bosselut R, 2004. CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Advances in Immunology* 83, 91-131.

Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD,

50

Perlmutter RM, Littman DR, 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. Cell 60, 755 - 65.

Van Der Merwe PA, Davis SJ, 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. Annual Review of Immunology 21, 659 - 84.

Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB, 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. Cell 55, 301 - 8.

Wyer JR, Willcox BE, Gao GF, et al., 1999. T cell receptor and coreceptor CD8 alpha alpha bind peptide-MHC independently and with distinct kinetics. Immunity 10, 219 - 25.

Zamoyska R, 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? Current Opinion in Immunology 10, 82 - 7.

本発明の態様は以下を含む。

[付記 1]

配列番号 235、246、250、252、268、および 1216 のうちの 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む CD8 結合物質。

[付記 2]

3 つの相補性決定領域 (CDR1、CDR2、および CDR3) を含む少なくとも 1 つの標的化部分を含む CD8 結合物質であって、

(a) CDR1 が、配列番号 29、37、39、45、および 51 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；

(b) CDR2 が、配列番号 97、108、112、114、130、および 1221 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；ならびに

(c) CDR3 が、配列番号 166、177、181、183、および 199 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む、

CD8 結合物質。

[付記 3]

前記標的化部分が、完全長抗体、単ドメイン抗体、組換え重鎖抗体 (VHH)、単鎖抗体 (scFv)、サメ重鎖抗体 (VNAR)、マイクロタンパク質、darpin、アンチカリン、アドネクチン、アプタマー、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、受容体に対する天然リガンド、または合成分子である、付記 1 または 2 に記載の CD8 結合物質。

[付記 4]

前記標的化部分が、単ドメイン抗体である、付記 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の CD8 結合物質。

[付記 5]

前記標的化部分が、V_HH、ヒト化 V_HH、またはラクダ化 V_HH を含む、付記 3 に記載の CD8 結合物質。

[付記 6]

1 種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、付記 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の C

D 8 結合物質。

[付記 7]

前記シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの1つまたは複数から選択され、これらはいずれも任意に改変されていてもよい、付記 6 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 8]

1つまたは複数の追加の標的化部分を含む、付記 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 9]

前記 1つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原を認識し、腫瘍抗原を機能的に調節してもよい、付記 8 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 10]

前記 1つまたは複数の追加の標的化部分が免疫細胞上の抗原を認識し、任意に免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、付記 9 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 11]

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、およびNK細胞から選択される、付記 10 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 12]

細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、付記 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 13]

C D 8 を認識して、その活性を実質的に機能的に調節することなく C D 8 に結合する、付記 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 14]

付記 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質をコードする組換え核酸組成物。

[付記 15]

付記 14 に記載の核酸を含む宿主細胞。

[付記 16]

3つの相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含む少なくとも1つの標的化部分を含む C D 8 結合物質であって、

(a) C D R 1 が、配列番号 12 ~ 80 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；

(b) C D R 2 が、配列番号 81 ~ 149 または 1221 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

(c) C D R 3 が、配列番号 150 ~ 218 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む、

C D 8 結合物質。

[付記 17]

前記標的化部分が、完全長抗体、単ドメイン抗体、組換え重鎖抗体 (V H H)、単鎖抗体 (s c F v)、サメ重鎖抗体 (V N A R)、マイクロタンパク質、d a r p i n、アンチカリン、アドネクチン、アプタマー、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、ペプチド模倣分子、受容体に対する天然リガンド、または合成分子である、付記 16 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 18]

前記標的化部分が、単ドメイン抗体である、付記 16 または付記 17 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 19]

前記標的化部分が、V_HH、ヒト化 V_HH、またはラクダ化 V_HH を含む、付記 18 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 20]

10

20

30

40

50

配列番号 2 1 9 ~ 2 8 7 または配列番号 1 2 1 6 のうちの 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、付記 1 9 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 1]

1 種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、付記 1 6 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 2]

前記シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択され、これらはいずれも任意に改変されていてもよい、付記 2 1 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 3]

1 つまたは複数の追加の標的化部分を含む、付記 1 6 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 4]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原を認識し、腫瘍抗原を機能的に調節してもよい、付記 2 3 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 5]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が免疫細胞上の抗原を認識し、任意に免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、付記 2 4 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 6]

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、および N K 細胞から選択される、付記 2 5 に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 7]

細胞傷害性 T 細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、付記 1 6 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 8]

C D 8 を認識して、その活性を実質的に機能的に調節することなく C D 8 に結合する、付記 1 6 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 2 9]

付記 1 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質をコードする組換え核酸組成物。

[付記 3 0]

付記 2 9 に記載の核酸を含む宿主細胞。

[付記 3 1]

癌、感染症、免疫異常、および / または自己免疫疾患のうちの 1 つまたは複数を有する患者における使用に適している、付記 1 ~ 1 3 または付記 1 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質。

[付記 3 2]

C D 8 を標的とする抗原または受容体認識ドメインを含む標的化部分ならびにインターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択されるシグナル伝達物質を含むキメラの有効量を、投与を必要とする患者に投与することを含む、癌を治療または予防するための方法。

[付記 3 3]

前記シグナル伝達物質が、改変されている、付記 3 2 に記載の方法。

[付記 3 4]

前記 C D 8 結合物質が、付記 1 ~ 1 3 または付記 1 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の C D 8 結合物質である、付記 3 2 または 3 3 に記載の方法。

[付記 3 5]

前記 C D 8 結合物質が、3 つの相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含む少なくとも 1 つの標的化部分を含み、

(a) C D R 1 が、配列番号 1 2 ~ 8 0 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

(b) CDR2が、配列番号81～149または1216のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

(c) CDR3が、配列番号150～218のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む、

付記32～34のいずれか1項に記載の方法。

[付記36]

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘍病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群に関連する異常血管増殖のうちの1つまたは複数から選択される、付記32～35のいずれか1項に記載の方法。

[付記37]

癌、感染症、免疫異常、および／または自己免疫疾患のうちの1つまたは複数の治療における使用のための付記1～36のいずれか1項に記載のCD8結合物質。

[付記38]

本明細書に記載の、癌、感染症、免疫異常、および／または自己免疫疾患のうちの1つまたは複数を経治療するための薬物の製造のための付記1～37のいずれか1項に記載のCD8結合物質の使用。

[付記39]

(a) 付記1～13または付記16～28に記載のCD8結合物質のうちのいずれか1つ；および

(b) 野生型IFN γ 2に比べて改善された安全性を付与する1つまたは複数の変異を有する改変ヒトIFN γ 2、

を含むキメラタンパク質であって、

前記標的化部分および前記改変シグナル伝達物質が、任意に1つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、キメラタンパク質。

[付記40]

前記改変ヒトIFN γ 2が、位置R120、M148、R149、およびL153に1つまたは複数の変異を含む、付記39に記載のキメラタンパク質。

[付記41]

前記改変ヒトIFN γ 2が、R120E、R149A、およびL153Aから選択される1つまたは複数の変異を含む、付記40に記載のキメラタンパク質。

[付記42]

前記改変ヒトIFN γ 2が、R120E変異と、R149AまたはL153A変異のいずれかとを含む、付記40に記載のキメラタンパク質。

[付記43]

(a) 付記1～13または付記16～28に記載のCD8結合物質のうちのいずれか1つ

10

20

30

40

50

；および

(b) 野生型 I F N に比べて改善された安全性を付与する 1 つまたは複数の変異を有する改変ヒト I F N 、

を含むキメラタンパク質であって、

前記標的化部分および前記改変シグナル伝達物質が、任意に 1 つまたは複数のリンカーにより連結されていてよい、キメラタンパク質。

〔付記 4 4〕

前記改変ヒト I F N が、位置 W 2 2、R 2 7、L 3 2、R 3 5、V 1 4 8、L 1 5 1、R 1 5 2、および Y 1 5 5 に 1 つまたは複数の変異を含む、付記 4 3 に記載のキメラタンパク質。

〔付記 4 5〕

前記改変ヒト I F N が、W 2 2 G、R 2 7 G、L 3 2 A、L 3 2 G、R 3 5 A、R 3 5 G、V 1 4 8 G、L 1 5 1 G、R 1 5 2 A、R 1 5 2 G から選択される 1 つまたは複数の変異を含む、付記 4 4 に記載のキメラタンパク質。

【図面】

【図 1 - 1】

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186

【図 1 - 3】

1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590	1591	1592	1593	1594	1595	1596	1597	1598	1599	1600	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	1610	1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658	1659	1660	1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667	1668	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688	1689	1690	1691	1692	1693	1694	1695	1696	1697	1698	1699	1700	1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710	1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720	1721	1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730	1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740	1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750	1751	1752	1753	1754	1755	1756	1757	1758	1759	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778	1779	1780	1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800	1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810	1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820	1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830	1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840	1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850	1851	1852	1853	1854	1855	1856	1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864	1865	1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883	1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937	1938	1939	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	23
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----

【 図 2 - 2 】

[illegible]

【圖 2 - 4】

配列番号: 1166	1CD3445	AYGSGSYLQDQKZYEW	-GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	150
配列番号: 1167	1CD3446	ATYGRSLQDQSKIZW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	150
配列番号: 1168	1CD3463	PERGEMALQTFSEYDW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	145
配列番号: 1169	1CD3464	---SGSYVAGQGVQVW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	145
配列番号: 1170	1CD3419	-GSGRLQVAGQGVQVW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	147
配列番号: 1171	1CD3428	-ASGRLLDVGQGVQVW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	147
配列番号: 1172	1CD3478	---SGSYDTMRNRYDW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	149
配列番号: 1173	1CD3492	PARGLTMDLMSYLDHW	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	144
配列番号: 1174	1CD3465	---FYQV	---GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	140
配列番号: 1175	1CD3448	---NNRFFQ	GGTGTTVSSAAAPYDVDFY	CSHHHHHHX	140

【 図 2 - 3 】

[illegible]

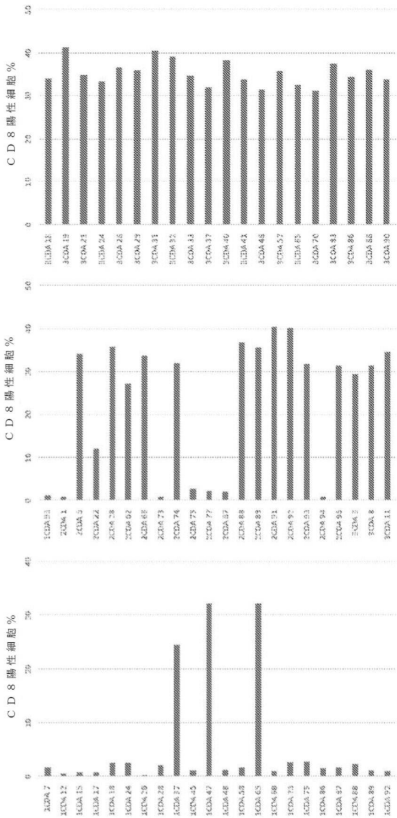
【 図 3 - 1 】

群	メンバー
1	3CDA11, 3CDA18, 3CDA48, 2CDA91, 3CDA90, 3CDA88, 2CDA92, 3CDA19, 3CDA83, 3CDA40, 3CDA41, 3CDA37, 3CDA3, 3CDA29, 3CDA8, 3CDA24, 2CDA89, 2CDA88, 3CDA70, 3CDA32
2	3CDA65, 2CDA95, 1CDA88, 2CDA81, 3CDA57, 3CDA21, 3CDA33, 2CDA62, 2CDA93, 3CDA28, 2CDA28, 1CDA47, 3CDA86, 1CDA37
3	2CDA22
4	2CDA74
5	1CDA86
6	2CDA94
7	1CDA17
8	1CDA89
9	2CDA1
10	2CDA75
11	1CDA43, 1CDA73, 1CDA15
12	1CDA24
13	1CDA75
14	1CDA26
15	3CDA31, 3CDA73, 2CDA5
16	2CDA87
17	1CDA12
18	1CDA93
19	2CDA77
20	1CDA7
21	1CDA14

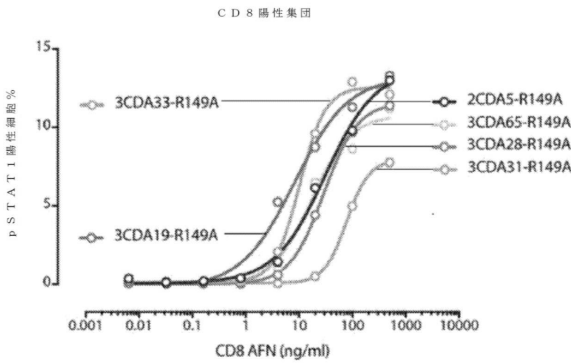
【 図 3 - 2 】

22	2CDA68
23	1CDA18
24	1CDA45, 1CDA58
25	1CDA68
26	1CDA87
27	1CDA19, 1CDA28
28	2CDA73
29	1CDA92
30	1CDA65
31	1CDA48

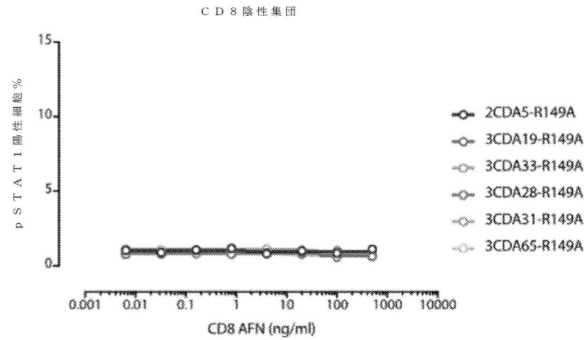
【 図 4 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



10

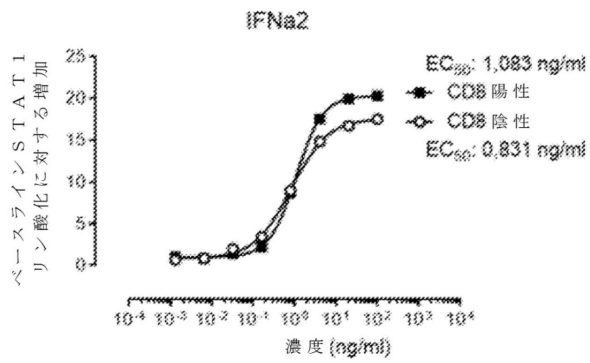
20

30

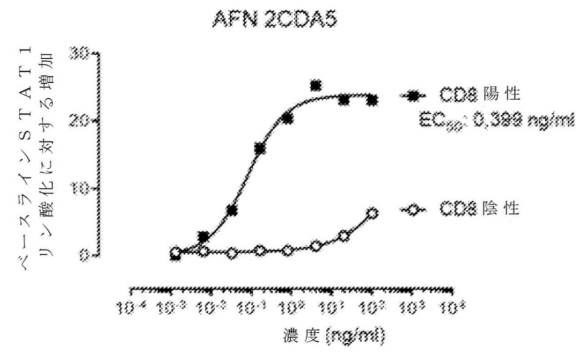
40

50

【図 6 A】

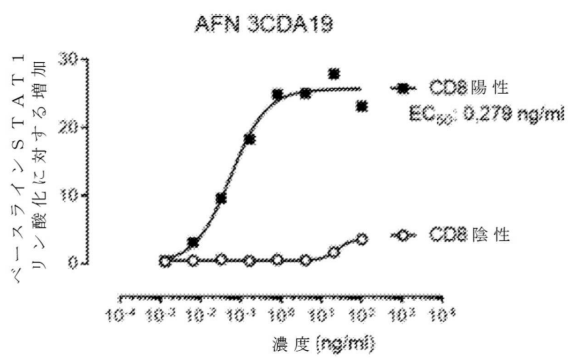


【図 6 B】

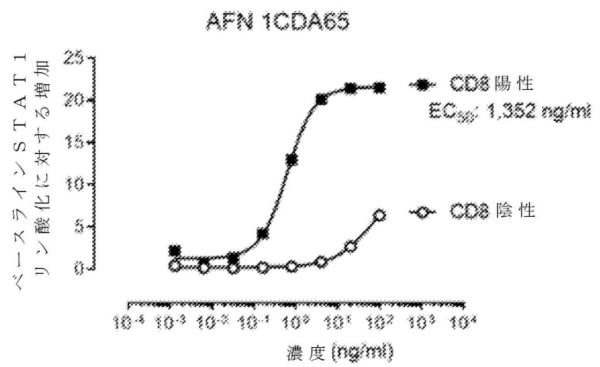


10

【図 6 C】

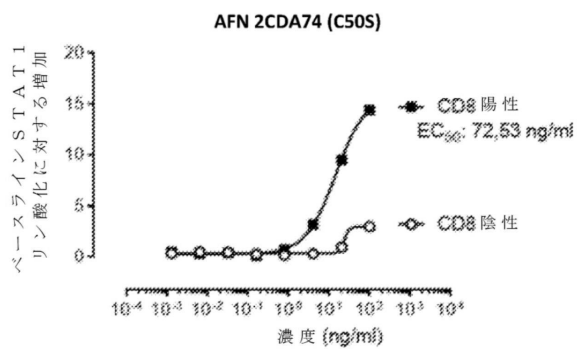


【図 6 D】

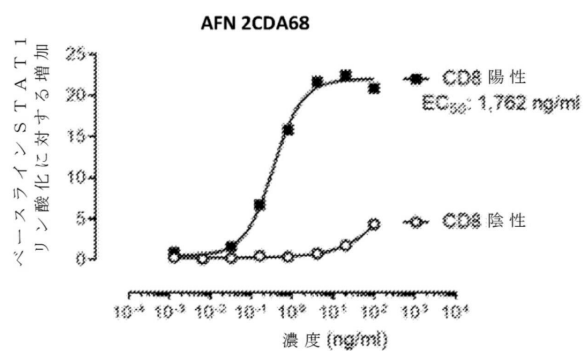


20

【図 6 E】



【図 6 F】

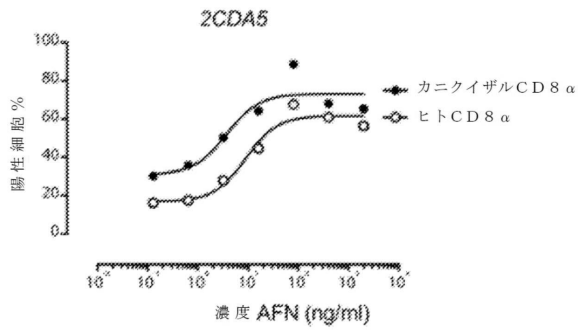


30

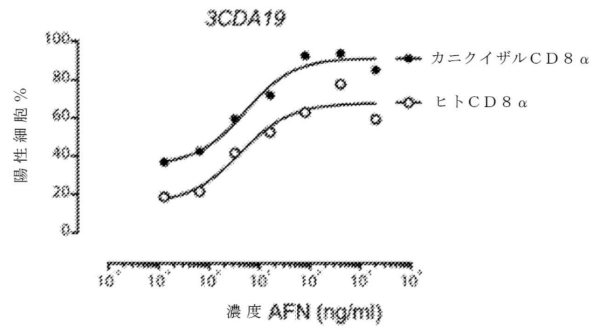
40

50

【図 7 A】

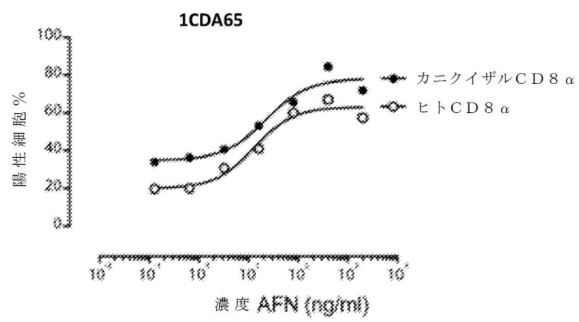


【図 7 B】

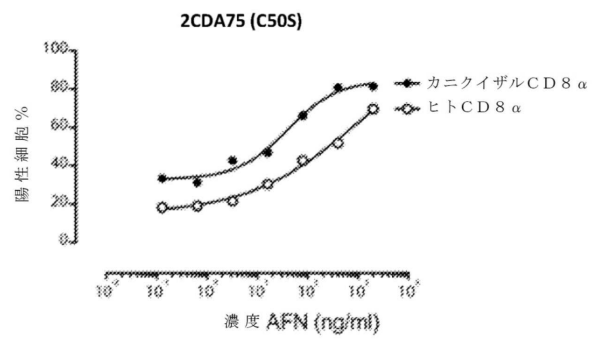


10

【図 7 C】

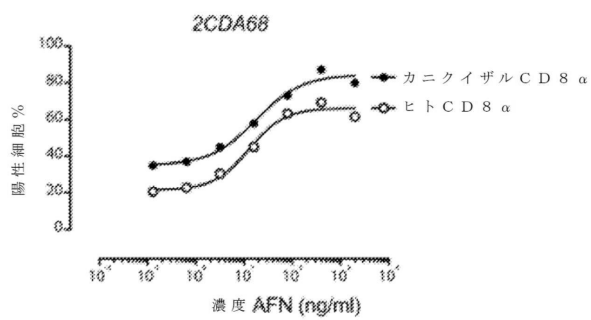


【図 7 D】



20

【図 7 E】



30

【配列表】

[0007347899000001.app](#)

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K	14/56 (2006.01)	C 0 7 K	14/56	
C 0 7 K	14/565 (2006.01)	C 0 7 K	14/565	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z

ート 2 7 5 オリオンズ バイオサイエンス インコーポレーテッド 内

(72)発明者

タベルニエ、ジャン

ベルギー王国 ピー - 9 8 6 0 バエーゲーム ボッテルウェーク 2

(72)発明者

ザベアウ、レナルト

ベルギー王国 ピー - 9 0 5 2 ズウェイナールデ レイフィセストラート 1 2 0 オリオンズ バ
イオサイエンス エヌバイ 内

(72)発明者

デプラ、エリク

ベルギー王国 ピー - 9 0 5 2 ズウェイナールデ レイフィセストラート 1 2 0 オリオンズ バ
イオサイエンス エヌバイ 内

審査官 福間 信子

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 0 5 1 4 (J P , A)

特表 2 0 0 3 - 5 2 6 3 3 2 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 0 0 7 9 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 0 2 3 1 (W O , A 2)

特表 2 0 1 5 - 5 1 1 2 1 9 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 7 3 8 2 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q