

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-522529

(P2020-522529A)

(43) 公表日 令和2年7月30日(2020.7.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 168 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-567258 (P2019-567258)	(71) 出願人	500057995
(86) (22) 出願日	平成30年6月5日 (2018.6.5)		ザ カウンシル オブ ザ クイーンズラ
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月5日 (2020.2.5)		ンド インスティテュート オブ メディ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2018/050557		カル リサーチ
(87) 国際公開番号	W02018/223182		オーストラリア国 4 0 2 9 クイーンズ
(87) 国際公開日	平成30年12月13日 (2018.12.13)		ランド州, ハーストン, ハーストン ロー
(31) 優先権主張番号	2017902125		ド 3 0 0
(32) 優先日	平成29年6月5日 (2017.6.5)	(74) 代理人	100094569
(33) 優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア (AU)		弁理士 田中 伸一郎
		(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100109070
			弁理士 須田 洋之
		(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療または予防のための薬剤およびその使用

(57) 【要約】

癌の治療または予防のための薬剤が開示される。より詳細には、本発明は、癌（転移癌を含む）の発達、進行または再発を治療または阻害する方法および組成物で治療薬組合せを開示し、前記治療薬組合せは、NF- B受容体（RANK）リガンドアンタゴニストおよび免疫チェックポイント分子を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

NF- κ B (RANK) リガンド (RANKL) アンタゴニストおよび少なくとも1つの免疫チェックポイント分子 (ICM) アンタゴニストを含む、それらから成る、または本質的にそれらから成る治療薬組合せ。

【請求項 2】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、適切には以下から成る群から選択されるICMと拮抗する、請求項1に記載の治療薬組合せ：プログラム死1受容体 (PD-1)、プログラム死リガンド1 (PD-L1)、プログラム死リガンド2 (PD-L2)、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4)、A2Aアデノシン受容体 (A2AR)、A2Bアデノシン受容体 (A2BR)、B7-H3 (CD276)、V-セットドメイン含有T細胞活性化阻害因子1 (VTCN1)、BおよびTリンパ球減弱化因子 (BTLA)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3 (TIM-3)、T細胞活性化のV-ドメインIgサブプレッサー (VISTA)、5'-ヌクレオチダーゼ (CD73)、タクチル (CD96)、ポリオウイルス受容体 (CD155)、DNAX付属分子-1 (DNAM-1)、ポリオウイルス受容体関連2 (CD112)、細胞傷害性調節性T細胞分子 (CRTAM)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4 (TNFRSF4; OX40; CD134)、腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー4 (TNFSF4; OX40リガンド (OX40L))、ナチュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244)、CD160、グルコシルチコイド誘発TNFR関連タンパク質 (GITR)、グルコシルチコイド誘発TNFR関連タンパク質リガンド (GITRL)、誘発性共同刺激因子 (ICOS)、ガレクチン9 (GAL-9)、4-1BBリガンド (4-1BBL; CD137L)、4-1BB (4-1BB; CD137)、CD70 (CD27リガンド (CD27L))、CD28、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、シグナル調節タンパク質 (SIRP-1)、インテグリン関連タンパク質 (IAP; CD47); Bリンパ球活性化マーカー (BLAST-1; CD48)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244); CD40、CD40リガンド (CD40L)、ヘルペスウイルス侵入媒介因子 (HVEM)、トランスメンブレンおよび免疫グロブリンドメイン含有2 (TMIGD2)、HERV-H LTR-関連2 (HHLA2)、血管内皮増殖阻害因子 (VEGI)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー25 (TNFRSF25)、誘発性T細胞共同刺激因子リガンド (ICOLG; B7RP1) 並びにIgおよびITIM (免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ) ドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)。

【請求項 3】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニストから選択される、請求項1に記載の治療薬組合せ。

【請求項 4】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、CTLA-4アンタゴニスト以外であるかまたはCTLA-4アンタゴニストを除く、請求項1に記載の治療薬組合せ。

【請求項 5】

少なくとも1つのICMアンタゴニストがPD-1アンタゴニストを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 6】

少なくとも1つのICMアンタゴニストがPD-L1アンタゴニストを含む、請求項1から5のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 7】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、PD-1アンタゴニストおよびPD-L1アンタゴニストを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 8】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、PD-1アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニストを含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 9】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、PD-L1アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニスト

10

20

30

40

50

トを含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 0】

RANKLアンタゴニストが、RANKLと特異的に結合する直接的RANKLアンタゴニストである、請求項1から9のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 1】

RANKLアンタゴニストがRANKと特異的に結合する間接的RANKLアンタゴニストである、請求項1から9のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 2】

RANKLアンタゴニストが抗原結合分子である、請求項1から11のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 3】

個々のICMアンタゴニストが抗原結合分子である、請求項1から12のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 4】

抗RANKL抗原結合分子が、アミノ酸配列TEYLQLMVY（配列番号:1）（すなわち、配列番号:2で示される自然のままのRANKL配列の残基233 - 241）を含むRANKLの領域と特異的に結合する、請求項10に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 5】

抗RANKL抗原結合分子がモノクローナル抗体（MAb）である、請求項10または請求項14に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 6】

抗RANKL抗原結合分子がMAbデノスマブまたはその抗原結合フラグメントである、請求項15に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 7】

抗RANK抗原結合分子が、配列番号:3に示される重鎖アミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項16に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 8】

抗RANK抗原結合分子が配列番号:4に示される軽鎖アミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項16または請求項17に記載の治療薬組合せ。

【請求項 1 9】

抗RANKL抗原結合分子がRANKLとの結合についてデノスマブと競合する、請求項14から18のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項 2 0】

RANKアンタゴニスト（例えば抗RANK抗原結合分子またはアンタゴニストペプチド）が、CDR2（すなわち残基44 - 85）およびCRD3（すなわち残基86 - 123）から選択されるシステイン富裕ドメイン（CRD）の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列と特異的に結合するか、または前記配列を含むか、前記配列から成るかもしくは本質的に前記配列から成る、請求項12に記載の治療薬組合せ。

【請求項 2 1】

RANKアンタゴニスト（例えば抗RANK抗原結合分子またはアンタゴニストペプチド）が、RANK CRD3の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列と特異的に結合するか、または前記配列を含むか、前記配列から成るかもしくは本質的に前記配列から成り、その代表的な例にYCWNSDCECCY（配列番号:5）、YCWSQYLCY（配列番号:6）が含まれる、請求項20に記載の治療薬組合せ。

【請求項 2 2】

RANKアンタゴニストが、アミノ酸配列VSKTEIEEDSFQMPTEDEYMDRPSQPTDQLLFLTEPGSKSTPPFSEPLEVGENDSLSQCFGTGTQSTVGSESCNCTEPLCRDWTTPMS（配列番号:7）（すなわち、配列番号:8に示される自然のままのRANK配列の残基330 - 417）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項12に記載の治療薬組合せ。

【請求項 2 3】

抗RANK抗原結合分子がモノクローナル抗体（MAb）である、請求項12または請求項22に記載の治療薬組合せ。

【請求項24】

抗RANK抗原結合分子が、MAb N-1H8、N-2B10、若しくはMAb 64C1385またはそれらの抗原結合フラグメントから選択される、請求項12に記載の治療薬組合せ。

【請求項25】

抗RANK抗原結合分子が、RANKとの結合についてモノクローナル抗体64C1385、N-1H8またはN-2B10と競合する、請求項12および20から24のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項26】

抗RANK抗原結合分子が、例えばNewaら（Newa et al., Mol Pharm. 11(1):81-9, 2014）によって開示される短鎖Fv（scFv）抗原結合分子またはその抗原結合フラグメントである、請求項12のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

10

【請求項27】

それぞれのICMアンタゴニストが抗ICM抗原結合分子である、請求項1から26のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項28】

抗ICM抗原結合分子が、抗PD-1抗原結合分子、抗PD-L1抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子から選択される、請求項27に記載の治療薬組合せ。

【請求項29】

抗PD-1抗原結合分子がMAbであり、その非限定的な例に、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、およびMEDI-0680（AMP-514）、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、およびBGB-317またはその抗原結合フラグメントが含まれる、請求項28に記載の治療薬組合せ。

20

【請求項30】

抗PD-1抗原結合分子が、PD-1との結合についてニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317またはMEDI-0680と競合する、請求項28に記載の治療薬組合せ。

【請求項31】

抗PD-1抗原結合分子が、アミノ酸配列SFVLNWyRMSPSNQTDKLAAFPEDR（配列番号:9）（すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基62から86）、および/またはアミノ酸配列SGTYLCGAISLAPKAQIKE（配列番号:11）（すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基118から136）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項28から30のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

30

【請求項32】

抗PD-1抗原結合分子が、アミノ酸配列NWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRV（配列番号:12）（すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基66から97に対応する）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項28から30のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項33】

抗PD-L1抗原結合分子がMAbであり、その非限定的な例に、デュルバルマブ（MEDI4736）、アテゾリズマブ（Tecentriq）、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480およびMPDL3280A、またはその抗原結合フラグメントが含まれる、請求項28に記載の治療薬組合せ。

40

【請求項34】

抗PD-L1抗原結合分子が、アミノ酸配列SKKQSDTHLEET（配列番号:13）（すなわち、配列番号:14に示される完全長の自然のままのPD-L1アミノ酸配列の残基279から290）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項28または請求項33に記載の治療薬組合せ。

【請求項35】

抗PD-L1抗原結合分子が、PD-L1との結合についてデュルバルマブ（MEDI4736）、アテゾリズマブ（Tecentriq）、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、

50

CA-170、GNS-1480およびMPDL3280Aのいずれか1つと競合する、請求項28または請求項33に記載の治療薬組合せ。

【請求項36】

抗CTLA4抗原結合分子がMAbであり、その代表的な例にイピリムマブおよびトレメリムマブまたはその抗原結合フラグメントが含まれる、請求28に記載の治療薬組合せ。

【請求項37】

抗CTLA4抗原結合分子が、CTLA4との結合についてイピリムマブまたはトレメリムマブと競合する、請求項28に記載の治療薬組合せ。

【請求項38】

抗CTLA4抗原結合分子が、YASPGKATEVRVTVLRQA（配列番号:15）（すなわち配列番号:16に示される完全長の自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基26から42）、DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD（配列番号:17）（すなわち配列番号:16に示される自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基43から65）、およびVELMYPPPYLGLIG（配列番号:18）（すなわち配列番号:16に示される自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基96から109）から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項28、36および37のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項39】

RANKLアンタゴニストおよびICMアンタゴニストの一方または両方が抗原結合分子であり、当該抗原結合分子が免疫グロブリン定常鎖（例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3またはIgG4定常鎖）に連結した、請求項1から38のいずれかに記載の治療薬組合せ。

【請求項40】

免疫グロブリン定常鎖が、軽鎖または軽鎖から選択される軽鎖、並びに1重鎖、2重鎖、3重鎖および4重鎖から選択される重鎖を含む、請求項39に記載の治療薬組合せ。

【請求項41】

RANKLアンタゴニストおよび2つ以上の異なるICMアンタゴニストを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る、請求項1から40のいずれかに記載の治療薬組合せ。

【請求項42】

治療薬組合せが、RANKLアンタゴニスト並びにCTLA4アンタゴニスト、PD-1アンタゴニストおよびPD-L1アンタゴニストの少なくとも2つを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る、請求項41に記載の治療薬組合せ。

【請求項43】

個々のアンタゴニスト成分が別個の構成要素の形態で存在する、請求項1から42のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項44】

個々のアンタゴニスト成分が互いに融合しているか、そうでなければ（直接的または間接的に）互いに複合体化される、請求項1から42のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

【請求項45】

治療薬組合せがマルチ特異性アンタゴニスト薬剤の形態であり、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストを含む、請求項44に記載の治療薬組合せ。

【請求項46】

マルチ特異性薬剤が2つ以上のポリペプチドの複合体である、請求項45に記載の治療薬組合せ。

【請求項47】

マルチ特異性薬剤が単一鎖ポリペプチドである、請求項45に記載の治療薬組合せ。

【請求項48】

RANKLアンタゴニストが、それぞれのICMアンタゴニストのN-末端で複合体化される、請求項47に記載の治療薬組合せ。

【請求項49】

10

20

30

40

50

RANKLアンタゴニストが、それぞれのICMアンタゴニストのC-末端で複合体化される、請求項47に記載の治療薬組合せ。

【請求項50】

RANKLアンタゴニストおよびICMアンタゴニストが直接的に結合される、請求項48または請求項49に記載の治療薬組合せ。

【請求項51】

RANKLアンタゴニストおよびICMアンタゴニストが、介在リンカー（例えばポリペプチドリンカー）によって結合される、請求項48または請求項49に記載の治療薬組合せ。

【請求項52】

マルチ特異性アンタゴニスト薬剤が少なくとも2つの抗原結合分子を含む、請求項45から51のいずれか1項に記載の治療薬組合せ。

10

【請求項53】

マルチ特異性抗原結合分子が組換え分子の形態で存在し、前記分子が、キメラ、ヒト化およびヒト抗原結合分子を含む、請求項52に記載の治療薬組合せ。

【請求項54】

RANKLおよび少なくとも1つのICMに拮抗するマルチ特異性抗原結合分子であって、RANKLまたはRANKと特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを、さらにそれぞれのICMについては当該ICMと特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むか、それらのフラグメントから成るか、または本質的にそれらのフラグメントから成る、前記マルチ特異性抗原結合分子。

20

【請求項55】

抗体および/または抗原結合フラグメントが直接的に結合される、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項56】

抗体および/または抗原結合フラグメントが、介在リンカー（例えば化学的リンカーまたはポリペプチドリンカー）によって結合される、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項57】

抗体または抗原結合フラグメントが作動できるように結合される単鎖ポリペプチドの形態である、請求項54から56のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

30

【請求項58】

互いに連結されるか、そうでなければ互いに会合して複合体を形成する、複数の別個のポリペプチドの形態にある、請求項54から56のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項59】

二価、三価、または四価である、請求項54から58のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項60】

少なくとも1つのICMが、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、OX40、OX40L、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL、4-1BB、CD27L、CD28、CD80、CD86、SIRP-1、CD47、CD48、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HHLA2、VEG1、TNFRS25、ICOLGおよびTIGITから選択される、請求項54から59のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

40

【請求項61】

二重特異性であり、抗ICM抗体またはその抗原結合フラグメントが、抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラグメント以外である、請求項54から60のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項62】

Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv分子並びに相補性決定領域（CDR）から選択される抗原

50

結合フラグメントを含む、請求項54から61のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 3】

個々の抗体またはその抗原結合フラグメントが、IgG、IgM、IgD、IgA、およびIgEから成る群からそれぞれ独立に選択される定常ドメインを含む、請求項54から62のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 4】

マルチ特異性抗原結合分子が、タンデムscFv (taFvまたはscFv₂)、ジアボディ、dAb₂/VHH₂、ノブインホール誘導体、シードコード-IgG、ヘテロFc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、トリボディ、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/C_L、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhIx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、tandab、DART、BiKE、TriKE、mFc-V_H、架橋Mab、CrossMab、Mab₂、静電的に適合した抗体、対称性IgG様抗体、LUZ-Y、Fab-交換抗体、FIT-Ig、またはそれらの組合せから選択される、請求項54から61のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 5】

免疫グロブリン定常鎖 (例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4) に連結した抗原結合フラグメントを含む、請求項54から64のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 6】

免疫グロブリン定常鎖が、軽鎖および軽鎖から選択される軽鎖、および/または1重鎖、2重鎖、3重鎖、および4重鎖から選択される重鎖を含む、請求項65に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 7】

アミノ酸配列TEYLQLMVY (配列番号:1) (すなわち、配列番号:2に示される自然のままのRANKL配列の残基233 - 241) の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、抗RANKL抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項54から66のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 8】

RANKの細胞外領域 (すなわち、配列番号:8に示されるヒトRANK配列の残基30から212に対応する) と特異的に結合する、抗RANK抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項54から66のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 6 9】

マルチ特異性抗原結合分子がPD-1と拮抗し、さらにSFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDR (配列番号:9) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基62から86)、SGTYLCGAISLAPKAQIKE (配列番号:11) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基118から136)、およびNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRV (配列番号:12) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基66から97) から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項54から68のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 7 0】

抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、およびMEDI-0680 (AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317またはその抗原結合フラグメントから選択されるMabの重鎖および軽鎖を含む、請求項54から69のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 7 1】

マルチ特異性抗原結合分子がPD-L1と拮抗し、さらにSKKQSDTHLEET (配列番号:13) (すなわち、配列番号:14に示される自然のままのヒトPD-L1アミノ酸配列の残基279から290)

と特異的に結合する抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項54から68のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項72】

抗PD-LD1抗体またはその抗原結合フラグメントが、デュルバルマブ (MEDI4736)、アテゾリズマブ (Tecentriq)、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、およびMPDL3280A、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480またはその抗原結合フラグメントから選択されるM Abの重鎖および軽鎖を含む、請求項54から68および71のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項73】

CTLA4と拮抗し、さらに抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラグメントが、YASPGKATEVRV TVLRQA (配列番号:15) (すなわち、配列番号:16に示される完全長の自然のままのPD-CTLA4アミノ酸配列の残基26から42)、DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD (配列番号:17) (すなわち、配列番号:16に示される自然のままのCTLA4配列の残基43から65)、およびVELMYPPPYLG IG (配列番号:18) (すなわち、配列番号:16に示される自然のままのCTLA4配列の残基96から109) から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、請求項54から68のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項74】

抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラグメントが、イピリムマブおよびトレメリムマブ、またはその抗原結合フラグメントから選択されるMAbの重鎖および軽鎖を含む、請求項54から68および73のいずれか1項に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項75】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:240に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:241に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:242に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:244に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項76】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:244に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:245に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:246に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:247に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項77】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:248に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:249に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:250に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:251に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項78】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:252に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:253に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:254に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四

10

20

30

40

50

のポリペプチドが配列番号:254に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 7 9】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:256に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:257に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:258に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:259に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

10

【請求項 8 0】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:260に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:261に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:262に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:263に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 8 1】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:264に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:265に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:266に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:267に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

20

【請求項 8 2】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:268に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:269に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:270に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:271に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

30

【請求項 8 3】

マルチ特異性抗原結合分子がCrossMAb様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、第三のポリペプチド、第四のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:272に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:273に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:274に対応するアミノ酸配列を含み、当該第四のポリペプチドが配列番号:275に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

40

【請求項 8 4】

マルチ特異性抗原結合分子がFIT-Ig様式にあり、かつRANKLおよびPD-1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、および第三のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:276に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:277に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:278に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 8 5】

50

マルチ特異性抗原結合分子がFIT-Ig様式にあり、かつRANKLおよびCTLA4と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、および第三のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:279に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:277に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:280に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 8 6】

マルチ特異性抗原結合分子がFIT-Ig様式にあり、かつRANKLおよびPD-L1と拮抗し、当該マルチ特異性抗原結合分子が第一のポリペプチド、第二のポリペプチド、および第三のポリペプチドを含み、当該第一のポリペプチドが配列番号:281に対応するアミノ酸配列を含み、当該第二のポリペプチドが配列番号:277に対応するアミノ酸配列を含み、当該第三のポリペプチドが配列番号:282に対応するアミノ酸配列を含む、請求項54に記載のマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 8 7】

デリバリービヒクル（例えばリポソーム、ナノ粒子、マイクロ粒子、デンドリマーまたはシクロデキストリン）に収納される、請求項1から86のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 8 8】

RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストの各々を含む単一組成物の形態にある、請求項1から87のいずれかに記載の治療薬組合せ。

【請求項 8 9】

単一組成物が、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストの混合物を含む、請求項87に記載の治療薬組合せ。

【請求項 9 0】

RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストが、別々の組成物中の別個の構成要素として提供される、請求項1から89のいずれかに記載の治療薬組合せ。

【請求項 9 1】

個々のアンタゴニストが抗原結合分子である、請求項1から90のいずれかに記載の治療薬組合せ。

【請求項 9 2】

ICMアンタゴニストが、調節性T（Treg）細胞が発現を欠くかまたは低レベルで発現するICMと拮抗する、請求項1から91のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 9 3】

少なくとも1つのICMアンタゴニストが、PD-1およびPD-L1の一方または両方から選択されるICMと拮抗する、請求項92に記載の治療薬組合せ。

【請求項 9 4】

抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分子を含むか、それらの分子から成るか、または本質的にそれらの分子から成る、請求項1から93のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 9 5】

抗RANKL抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらの分子から成るか、または本質的にそれらの分子から成る、請求項1から94のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 9 6】

抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらの分子から成るか、または本質的にそれらの分子から成る、請求項1から95のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 9 7】

抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子を含むか、それ

10

20

30

40

50

らの分子から成るか、または本質的にそれらの分子から成る、請求項1から96のいずれかに記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子。

【請求項 9 8】

1つ以上の制御配列と作動できるように結合している請求項1から97のいずれかに記載のマルチ特異性抗原結合分子をコードする核酸配列を含む、1つの構築物または複数の構築物。

【請求項 9 9】

請求項98に規定する構築物を含む、宿主細胞。

【請求項 1 0 0】

請求項1から99のいずれかで規定される治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子、および医薬的に許容できる担体または希釈剤を含む医薬組成物。

10

【請求項 1 0 1】

さらにまた、化学療法剤（例えば抗増殖/抗新形成薬、細胞増殖抑制剤、癌細胞侵襲阻害剤、増殖因子機能阻害剤、抗血管形成剤、血管損傷剤などから選択される）または免疫療法剤（例えばサイトカイン、サイトカイン発現細胞、抗体など）から選択される少なくとも1つの補助剤を含む、請求項100に記載の組成物。

【請求項 1 0 2】

対象動物において免疫を刺激するかまたは増大させる方法であって、請求項1から101のいずれかで規定される治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって当該対象動物において免疫を刺激するかまたは増大させる工程を含むか、前記工程から成る、または本質的に前記工程から成る、前記方法。

20

【請求項 1 0 3】

刺激または増大される免疫が有益な宿主免疫応答を含み、その例示的な例に、腫瘍サイズの減少、腫瘍量の減少、疾患の安定化、内因性または外因性抗原に対する抗体の産生、免疫系の誘発、免疫系の1つ以上の構成要素の誘発、細胞媒介免疫およびその発生に必要とされる分子、液性免疫およびその発生に必要とされる分子、抗体依存細胞傷害性（ADCC）免疫およびその発生に必要とされる分子、補体媒介細胞傷害性（CDC）免疫およびその発生に必要とされる分子、ナチュラルキラー細胞、サイトカインおよびケモカイン並びにそれらの産生に必要とされる分子および細胞、抗体依存細胞傷害、補体依存細胞傷害、ナチュラルキラー細胞活性、および抗原増強細胞傷害のいずれか1つ以上が含まれる、請求項102に記載の方法。

30

【請求項 1 0 4】

刺激または増大される免疫が炎症促進免疫応答を含む、請求項102または請求項103に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

対象動物における腫瘍に対する免疫抑制または耐性の発達もしくは進行を阻害する方法であって、腫瘍を請求項1から104のいずれかで規定される治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子と接触させ、それによって対象動物における腫瘍に対する免疫抑制または耐性の発達もしくは進行を阻害する工程を含むか、前記工程から成るか、または本質的に前記工程から成る、前記方法。

40

【請求項 1 0 6】

治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子がまた、免疫系に腫瘍抗原を提示する抗原提示細胞（例えば樹状細胞）と接触する、請求項105に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

癌の発達、進行または再発を対象動物において阻害する方法であって、請求項1から106のいずれかで規定される治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって癌の発達、進行または再発を対象動物において阻害する工程を含むか、前記工程から成るか、または本質的に前記工程から成る、前記方法。

【請求項 1 0 8】

対象動物において癌を治療する方法であって、請求項1から106のいずれかで規定される

50

治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって当該対象動物において癌を治療する工程を含むか、前記工程から成るか、または本質的に前記工程から成る、前記方法。

【請求項 1 0 9】

癌が、メラノーマ、乳癌、結腸癌、卵巣癌、子宮内膜および子宮癌、胃関連または胃の癌、膵臓癌、前立腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝細胞癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、直腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓関連癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、精巣癌、食道癌、胆管の腫瘍、頭頸部癌、および扁平上皮細胞癌腫から選択される、請求項107または請求項108に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

10

癌が転移癌である、請求項107から109のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

対象動物が免疫調節剤に対して低下または障害された応答性を有する、請求項102から110のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

免疫調節剤が抗ICM抗原結合分子（例えば抗PD-1または抗PD-L1抗原結合分子）である、請求項111に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

さらにまた有効量の補助抗癌剤を同時発生的に投与する工程を含む、請求項102から112のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 1 1 4】

補助抗癌剤が、化学療法剤、体外放射線照射、標的に誘導される放射性同位元素、およびシグナル伝達阻害剤から選択される、請求項113に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストを同時発生的に対象動物に投与する工程を含む、請求項102から114のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

治療薬組合せが単一組成物の形態にある、請求項115に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

単一組成物が、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストの混合物を含む、請求項116に記載の方法。

30

【請求項 1 1 8】

個々のアンタゴニストが抗原結合分子である、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

治療薬組合せのRANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストが、別々の組成物中で別個の構成要素として提供される、請求項115に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストが同時に投与される、請求項119に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

40

RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストが逐次的に投与される、請求項119に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

RANKLアンタゴニストが、少なくとも1つのICMアンタゴニストの投与の前に投与される、請求項121に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

RANKLアンタゴニストが、少なくとも1つのICMアンタゴニストの投与の後で投与される、請求項121に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

免疫を刺激もしくは増大させるか、腫瘍に対する免疫抑制もしくは耐性の発達または進

50

行を阻害するか、または対象動物において癌を治療するためのキットであって、請求項1から123のいずれかに記載の治療薬組合せ、医薬組成物、およびマルチ特異性抗原結合分子のいずれか1つ以上を含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、オーストラリア仮特許出願No. 2017902125（発明の名称“Agents for cancer therapy or prophylaxis and uses therefor（癌の治療または予防のための薬剤およびそのための使用）”）（2017年6月5日出願、その内容は参照によってその全体が本明細書に含まれる）に関し優先権を主張する。

10

本発明は概して癌を治療または予防する薬剤に関する。より具体的には、本発明は、癌（転移癌を含む）の発達、進行もしくは再発を治療または予防するための方法および組成物における、NF- κ B受容体（RANK）リガンドのアンタゴニストおよび免疫チェックポイント分子を含む治療薬組合せに関する。

【背景技術】

【0002】

国立癌研究所は、米国だけで3人に1人がその一生で癌と診断されると概算している。さらにまた、癌と診断された人の約50%から60%が最終的に当該疾患に倒れる。この疾患の広範囲の発生は、改善された抗癌治療、特に悪性癌の治療の必要性を強調する。

免疫療法は近年、癌治療で高い有望性を示し始め、転移メラノーマの治療では格段の進歩が達成されて、免疫チェックポイント分子封鎖抗体が承認された。イピリムマブ（抗細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）抗体）は、抗腫瘍免疫をアップレギュレートするように作用し、前記は、転移メラノーマを有する患者を含むフェーズ3試験で全生存の改善に密接に関係する最初の薬剤であった（以下を参照されたい：Wolchok et al., 2013, New Engl J Med, 369:122-133；Smyth et al., 2016, J. Clin. Oncol. 34（12）：e104-106）。まだ完全には解明されていない理由により、イピリムマブは患者の10%および15%のみが応答に関与し（Wolchok et al., 2013（上掲書）；Smyth et al.2016（上掲書））、治療患者の約30%が長期生存を示した（Bostwick et al., 2015, J Immunoth Cancer, 3:19）。したがって、単独療法および併用治療の開発における急速な進行にもかかわらず、癌に起因する当該疾患の負担は顕著には除去されていない。

20

30

免疫チェックポイント分子、プログラム死1（PD-1）に対するモノクローナル抗体（MAB）の抗CTLA4との併用は、PD-1単独と比較して、進行メラノーマで優れた腫瘍応答および生存利益をもたらした。このことは、腫瘍による免疫侵襲の非重複性メカニズムを標的とする併用免疫療法の重要性を明示する（以下を参照されたい：Larkin et al., 2015, N Engl J Med, 373:23-24；Postow et al., 2015, N Engl J Med, 372:2006-2017；およびWolchok et al., 2013（上掲書））。しかしながら、固形および血液学的悪性疾患の免疫療法における1つの難題は、現行の免疫療法併用に対して主要な耐性を示す患者のための新規な標的を見つけることである。

【0003】

NF- κ Bの受容体（RANK）およびそのリガンド（RANKL）は、それぞれ腫瘍壊死因子受容体およびリガンドスーパーファミリーのメンバーであり、CD40およびCD40Lに対して最も近い相同性を有する。RANK（TNFRSF11aとしても知られている）およびRANKL（TNFSF11）は、骨の恒常性におけるそれらの役割について臨床診療ではこれまでのところ最もよく理解されている。なぜならば、単球-マクロファージ系列からの骨芽細胞の分化はRANKとRANK（骨髄性破骨前駆細胞で発現される）との相互作用を必要とするからである（以下を参照されたい：Dougall et al., 1999, Genes Dev., 13:2412-24；およびKong et al., 1999, Nature, 397:315-23）。完全にヒトのIgG2抗RANKL抗体（デノスマブ）は、骨転移から生じる骨格関連イベントの予防のため、並びに骨の巨細胞腫瘍および骨粗しょう症の管理のための強力な忍容性が良好な抗吸収性薬剤として臨床診療で広く用いられている（以下を参照されたい：Branstetter et al., 2012, Clin Cancer Res, 18:4415-4424）；a

40

50

nd Fizazi et al., 2011, Lancet, 377:813-22)。興味深いことに、フェーズ3試験の事後探索分析において、デノスマブは、小細胞性肺癌および骨転移を有する患者でゾレドロン酸と比較して全生存を増加させた（以下を参照されたい：Scagliotti et al., 2012, J. Thorac. Oncol., 7:1823-9）。RANKLはもともと樹状細胞特異的生存因子として識別された。前記因子は活性化T細胞によってアップレギュレートされ、成熟樹状細胞（DC）の表面のRANKと相互反応してアポトーシスを防止した（以下を参照されたい：Wong et al., 1997, J Exp Med, 186:2075-2080；およびHochweller et al., 2005, Eur. J. Immunol., 35:1086-96）。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、NF- κ Bの活性化因子受容体（RANK）リガンド（RANKL）および免疫チェックポイント分子（ICM）（調節性T（Treg）細胞が発現を欠くかまたは低レベルで発現するICMを含む）との拮抗は、癌に対する免疫応答の相乗的増強をもたらすという驚くべき発見に部分的に依拠する。この発見が形を変えて、以下に記載するように、免疫を刺激または増大させる、免疫抑制または腫瘍に対する耐性の発達もしくは進行を阻害する、または癌の発達、進行もしくは再発を阻害する方法および組成物で実践された。

したがって、ある特徴では、本発明は、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストを含む、それらから成る、または本質的にそれらから成る治療薬組合せを提供する。当該治療薬組合せは、それぞれRANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストを含む単一組成物（例えば混合物）の形態であり得る。また別には、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストは、別々の組成物で別個の構成要素として提供され得る。

【0005】

少なくとも1つのICMアンタゴニストは、適切には以下から成る群から選択されるICMと拮抗する：プログラム死1受容体（PD-1）、プログラム死リガンド1（PD-L1）、プログラム死リガンド2（PD-L2）、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）、A2Aアデノシン受容体（A2AR）、A2Bアデノシン受容体（A2BR）、B7-H3（CD276）、V-セットドメイン含有T細胞活性化阻害因子1（VTCN1）、BおよびTリンパ球減弱化因子（BTLA）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG3）、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3（TIM-3）、T細胞活性化のV-ドメインIgサブプレッサー（VISTA）、5'-ヌクレオチダーゼ（CD73）、タクチル（CD96）、ポリオウイルス受容体（CD155）、DNAX付属分子-1（DNAM-1）、ポリオウイルス受容体関連2（CD112）、細胞傷害性調節性T細胞分子（CRTAM）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー-4（TNFRSF4；OX40；CD134）、腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー-4（TNFSF4；OX40リガンド（OX40L））、ナチュラルキラー細胞受容体2B4（CD244）、CD160、グルココルチコイド誘発TNFR関連タンパク質（GITR）、グルココルチコイド誘発TNFR関連タンパク質リガンド（GITRL）、誘発性共同刺激因子（ICOS）、ガレクチン9（GAL-9）、4-1BBリガンド（4-1BBL；CD137L）、4-1BB（4-1BB；CD137）、CD70（CD27リガンド（CD27L））、CD28、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、シグナル調節タンパク質（SIRP-1）、インテグリン関連タンパク質（IAP；CD47）；Bリンパ球活性化マーカー（BLAST-1；CD48）、ナチュラルキラー細胞受容体2B4（CD244）；CD40、CD40リガンド（CD40L）、ヘルペスウイルス侵入媒介因子（HVEM）、トランスメンブレンおよび免疫グロブリンドメイン含有2（TMIGD2）、HERV-H LTR-関連2（HHLA2）、血管内皮増殖因子（VEGF）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー-25（TNFRSF25）、誘発性T細胞共同刺激因子リガンド（ICOLG；B7RP1）並びにIgおよびITIM（免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ）ドメインを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニストから選択される。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、CTLA-4アンタゴニスト以外であるかまたはCTLA-4アンタゴニストを除く。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストはPD-1アンタゴ

10

20

30

40

50

ニストを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストはPD-L1アンタゴニストを含む。ある種の実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-1アンタゴニストおよびPD-L1アンタゴニストを含む。他の実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-1アンタゴニストおよびCTLA-4アンタゴニストを含む。他の実施態様では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-L1アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニストを含む。具体的な実施態様では、ICMアンタゴニストは、Treg細胞が発現を欠くかまたは低レベルで発現するICMと拮抗する。それと同じおよびその他の実施態様のいくつかでは、ICMアンタゴニストは、Treg上でCTLA4よりも低いレベルで発現されるICM（例えばPD-1またはPD-L1）と拮抗する。それと同じまたはその他の実施態様のいくつかでは、ICMアンタゴニストは、Treg上よりも免疫エフェクター細胞（例えばエフェクターT細胞、マクロファージ、樹状細胞、B細胞など）で高いレベルで発現されるICM（例えばPD-1またはPD-L1）と拮抗する。これらの実施態様の代表的な例では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-1およびPD-L1の一方または両方から選択されるICMと拮抗する。

10

【0006】

RANKLアンタゴニストは、RANKLに特異的に結合する直接的RANKLアンタゴニストであってもよく、またはRANKLの同族受容体、RANKに特異的に結合する間接的RANKLアンタゴニストでもよい。

多数のRANKLおよびICMアンタゴニストが当業界では公知であり、そのいずれも本発明の実施に用いことができる。多様な実施態様で、アンタゴニストはアンタゴニスト抗原結合分子である。

20

これらの実施態様のいくつかでは、RANKLアンタゴニストは、RANKLと特異的に結合する抗RANKL抗原結合分子である。このタイプの例示的实施例では、抗RANKL抗原結合分子は、アミノ酸配列TEYLQLMVY（配列番号:1）（すなわち、配列番号:2で示される自然のままのRANKL配列の残基233 - 241）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。

いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子はモノクローナル抗体（MAb）である。抗RANKL抗原結合分子の非限定的な例は、MAbデノスマブまたはその抗原結合フラグメントである。適切には、抗RANKL抗原結合分子は、配列番号:3に示される重鎖アミノ酸配列またはその抗原結合フラグメント、および/または配列番号:4に示される軽鎖アミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントを含む。

30

他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子はRANKLとの結合についてデノスマブと競合する。

いくつかの実施態様では、RANKLアンタゴニストはRANKと拮抗する。例えば、RANKアンタゴニスト（例えば抗RANK抗原結合分子またはアンタゴニストペプチド）は、CDR2（すなわち残基44 - 85）およびCRD3（すなわち残基86 - 123）から選択されるシステイン富裕ドメイン（CRD）の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列と特異的に結合するか、または前記を含むか、それらから成るかもしくは本質的に前記から成り得る。このタイプの非限定的な例では、RANKアンタゴニスト（例えば抗RANK抗原結合分子またはアンタゴニストペプチド）は、RANK CRD3の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列と特異的に結合するか、または前記を含むか、前記から成るかもしくは本質的に前記から成り、その代表的な例には、YCWNSDCECCY（配列番号:5）、YCWSQYLCY（配列番号:6）が含まれる。

40

【0007】

他の実施態様では、RANKアンタゴニストは、アミノ酸配列VSKTEIEEDSFRQMPTEDRYMDRPSQPTDQLLFLTEPGSKSTPPFSEPLEVGENDSLSCQFTGTQSTVGSESCNCTEPLCRTDWTTPMS（配列番号:7）（すなわち、配列番号:8に示される自然のままのRANK配列の残基330 - 417）の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する、抗RANK抗原結合分子である。適切には、抗RANK抗原結合分子はモノクローナル抗体（MAb）である。例示すれば、抗RANK抗原結合分子は、モノクローナル抗体64C1385或いはN-1H8およびN-2B10（Taylor et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017;25（5）:299-307；およびBranstetter et al. J Bone Oncol. 2015;4（3）:59-68）またはその抗原結合フラグメントから選択できる。他の実施態様では、抗RANK抗原

50

結合分子は、RANKとの結合についてモノクローナル抗体64C1385、N-1H8またはN-2B10と競合することができる。いくつかの実施態様では、抗RANK抗原結合分子は、例えばNewaら (Newa et al., Mol Pharm. 11 (1):81-9, 2014) によって開示される短鎖Fv (scFv) 抗原結合分子またはその抗原結合フラグメントである。

適切には、それぞれのICMアンタゴニストは抗ICM抗原結合分子である。具体的な実施態様では、抗ICM抗原結合分子は、抗PD-1抗原結合分子、抗PD-L1抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子から選択される。

抗PD-1抗原結合分子はMAbであり得る。その非限定的な例には、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、およびMEDI-0680 (AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317またはその抗原結合フラグメントが含まれる。また別には、抗PD-1抗原結合分子は、PD-1との結合についてニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、またはMEDI-0680と競合するものであり得る。

いくつかの実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、アミノ酸配列SFVLNMYRMSPSNQTDKLAAFPEDR (配列番号:9) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基62から86)、および/またはアミノ酸配列SGTYLCGAISLAPKAQIKE (配列番号:11) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基118から136) の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。それと同じおよびその他の実施態様のいくつかでは、抗PD-1抗原結合分子は、アミノ酸配列NWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRV (配列番号:12) (すなわち、配列番号:10に示される自然のままのPD-1配列の残基66から97に対応する) の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。

【0008】

いくつかの実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子はMAbであり、その非限定的な例には、デュルバルマブ (MEDI4736)、アテゾリズマブ (Tecentriq)、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480およびMPDL3280A、またはその抗原結合フラグメントが含まれる。このタイプの例示的な例では、抗PD-L1抗原結合分子は、アミノ酸配列SKKQSDTHLEET (配列番号:13) (すなわち、配列番号:14に示される完全長の自然のままのPD-L1アミノ酸配列の残基279から290) の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。また別には、抗PD-L1抗原結合分子は、PD-L1との結合についてデュルバルマブ (MEDI4736)、アテゾリズマブ (Tecentriq)、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480およびMPDL3280Aのいずれか1つと競合するものであり得る。

いくつかの実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子はMAbであり、その代表的な例にはイピリムマブおよびトレメリムマブまたはその抗原結合フラグメントが含まれる。また別には、抗CTLA4抗原結合分子は、CTLA4との結合についてイピリムマブまたはトレメリムマブと競合するものであり得る。このタイプの例示的な例では、抗CTLA4抗原結合分子は、YASPGKATEVRVTVLRQA (配列番号:15) (すなわち配列番号:16に示される完全長の自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基25から42)、DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD (配列番号:17) (すなわち配列番号:16に示される自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基43から65)、およびVELMYPPYYLGIG (配列番号:18) (すなわち配列番号:16に示される自然のままのCTLA4アミノ酸配列の残基96から109) から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。

【0009】

いくつかの実施態様では、治療薬組合せは、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。他の実施態様では、治療薬組合せは、抗RANKL抗原結合分子および抗PDL1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。さらに他の実施態様では、治療薬組合せは、抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。さらに他の実施態様では、治療薬組合せは、抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。他の実施態様では、治療薬組合せは、抗RA

NK抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

RANKLまたはICMアンタゴニストが抗原結合分子であるいくつかの実施態様では、抗原結合分子は、免疫グロブリン定常鎖（例えばIg G1、Ig G2a、Ig G2b、Ig G3またはIg G4定常鎖）と連結する。免疫グロブリン定常鎖は、軽鎖（軽鎖またはラムダ軽鎖から選択される）および重鎖（1重鎖、2重鎖、3重鎖および4重鎖から選択される）を含み得る。

ある種の実施態様では、治療薬組合せは、RANKLアンタゴニストおよび2つ以上の異なるICMアンタゴニストを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。このタイプの代表的な例では、治療薬組合せは、RANKLアンタゴニスト並びにCTLA4アンタゴニスト、PD-1アンタゴニストおよびPD-L1アンタゴニストの少なくとも2つを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

【0010】

治療薬組合せのアンタゴニスト成分は別個の構成要素の形態であり得る。そうでなければ、それらは互いに融合するか、または（直接的または間接的に）複合体化され得る。

具体的な実施態様では、治療薬組合せはマルチ特異性アンタゴニスト薬剤の形態であり、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストを含む。マルチ特異性薬剤は2つ以上のポリペプチドの複合体であり得る。また別には、マルチ特異性薬剤は単一鎖ポリペプチドであり得る。RANKLアンタゴニストは、それぞれのICMアンタゴニストのN-末端でまたはC-末端で複合体化され得る。RANKLアンタゴニストおよびICMアンタゴニストは、直接的にまたは介在リンカー（例えばポリペプチドリリンカー）によって結合され得る。有利な実施態様では、マルチ特異性アンタゴニスト薬剤は少なくとも2つの抗原結合分子を含む。適切には、そのようなマルチ特異性抗原結合分子は組換え分子の形態にある（キメラ、ヒト化およびヒト抗原結合分子を含む）。

関連する特徴では、本発明は、RANKLおよび少なくとも1つのICMに拮抗するマルチ特異性抗原結合分子を提供する。これらマルチ特異性抗原結合分子は、概して、RANKLまたはRANKと特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを、さらにそれぞれのICMについては当該ICMと特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。抗体および/または抗原結合フラグメントは、直接的にまたは介在リンカー（例えば化学的リンカーまたはポリペプチドリリンカー）によって結合され得る。個々のマルチ特異性抗原結合分子は、抗体または抗原結合フラグメントが作動できるように結合されている単鎖ポリペプチドの形態であり得る。また別には、前記は、互いに連結され或いは会合して複合体を形成する複数の別個のポリペプチドを含むことができる。それと同じおよびその他の実施態様のいくつかでは、マルチ特異性抗原結合分子は二価、三価、または四価である。

【0011】

少なくとも1つのICMは適切には以下から選択される：PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、OX40、OX40L、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL、4-1BB、CD27L、CD28、CD80、CD86、SIRP-1、CD47、CD48、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HHLA2、VEGI、TNFRS25、ICOLGおよびTIGIT。具体的な実施態様では、ICMアンタゴニストは、Treg細胞が発現を欠くかまたは低レベルで発現するICMと拮抗する。それと同じおよびその他の実施態様のいくつかでは、ICMアンタゴニストは、TregでCTLA4よりも低いレベルで発現されるICM（例えばPD-1またはPD-L1）と拮抗する。それと同じおよびその他の実施態様のいくつかでは、ICMアンタゴニストは、Tregよりも免疫エフェクター細胞（例えばエフェクターT細胞、マクロファージ、樹状細胞、B細胞など）でより高レベルで発現されるICM（例えばPD-1またはPD-L1）と拮抗する。これらの実施態様の代表的な例では、少なくとも1つのICMアンタゴニストは、PD-1およびPD-L1の一方または両方から選択されるICMと拮抗する。マルチ特異性抗原結合分子が二価である具体的な実施態様では、抗ICM抗体またはその抗原結合フラグメントは、抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラ

グメント以外である。

【 0 0 1 2 】

マルチ特異性抗原結合分子で使用が意図される抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ およびFv分子並びに相補性決定領域(CDR)から選択され得る。いくつかの実施態様では、個々の抗体またはその抗原結合フラグメントは、IgG、IgM、IgD、IgA、およびIgEから成る群からそれぞれ独立に選択される定常ドメインを含む。マルチ特異性抗原結合分子の非限定的な例は適切には以下を含む：タンデムscFv(taFvまたはscFv₂)、ジアボディ、dAb₂/VHH₂、ノブインホール(knobs-in-holes)誘導体、シードコード(Seedcod)-IgG、ヘテロFc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、トリボディ、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/C_L、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dh1x-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、tandab、DART、BiKE、TriKE、mFc-V_H、架橋MAB、CrossMAB、MAB₂、FIT-Ig、静電的に適合した抗体、対称性IgG様抗体、LUZ-Y、Fab-交換抗体、または前記の組合せ。

10

適切な抗原結合フラグメントは、免疫グロブリン定常鎖(例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4)に連結され得る。このタイプの代表的な例では、免疫グロブリン定常鎖は、軽鎖および軽鎖から選択される軽鎖、および/または1重鎖、2重鎖、3重鎖、および4重鎖から選択される重鎖を含むことができる。

【 0 0 1 3 】

RANKLアンタゴニストが直接的なRANKLアンタゴニストであるいくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗体またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、アミノ酸配列TEYLQLMVY(配列番号:1)(すなわち、配列番号:2に示される自然のままのRANKL配列の残基233-241)の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。RANKLアンタゴニストが間接的なRANKLアンタゴニストである他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANK抗体またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記は、RANKの細胞外領域(すなわち、配列番号:8に示されるヒトRANK配列の残基30から212に対応する)と特異的に結合する。

20

マルチ特異性抗原結合分子がPD-1と拮抗するいくつかの実施態様では、抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントは、SFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDR(配列番号:9)(すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基62から86)、SGTYLCGAISLAPKAQIKE(配列番号:11)(すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基118から136)、およびNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRV(配列番号:12)(すなわち、配列番号:10に示される自然のままのヒトPD-1配列の残基66から97)から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。

30

同じ実施態様のいくつかおよび他の実施態様では、抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントは、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ビジリズマブ、およびMEDI-0680(AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendocor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317またはその抗原結合フラグメントから選択されるMABの重鎖および軽鎖を含む。

マルチ特異性抗原結合分子がPD-L1と拮抗するいくつかの実施態様では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントは、SKKQSDTHLEET(配列番号:13)(すなわち、配列番号:14に示される自然のままのヒトPD-L1アミノ酸配列の残基279から290)と特異的に結合する。このタイプの例示的抗体および抗原結合フラグメントは、デュルバルマブ(MEDI4736)、アテゾリズマブ(Tecentriq)、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480およびMPDL3280A、またはその抗原結合フラグメントから選択されるMABの重鎖および軽鎖を含むものを含む。

40

【 0 0 1 4 】

マルチ特異性抗原結合分子がCTLA4と拮抗するいくつかの実施態様では、抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラグメントは、YASPGKATEVRVTVLRQA(配列番号:15)(すなわち、配列番号:16に示される完全長の自然のままのPD-CTLA4アミノ酸配列の残基25から42)、DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD(配列番号:17)(すなわち、配列番号:16に示される自然のままの

50

CTLA4配列の残基43から65)、およびVELMYPPYYLGIG(配列番号:18)(すなわち、配列番号:16に示される自然のままのCTLA4配列の残基96から109)から選択されるアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。このタイプの例示的抗体および抗原結合フラグメントは、イピリムマブおよびトレメリムマブ、またはその抗原結合フラグメントから選択されるMabの重鎖および軽鎖を含むものを含む。

いくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。さらに他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。さらに他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗原結合分子、抗PD-1抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANK抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

10

【0015】

別の特徴では、本発明は、上記および本明細書のいずれかの場所に記載される治療薬組合せを生産する方法を提供する。これらの方法は概して、抗RANKLまたは抗RANK抗原結合分子および少なくとも1つの抗ICM抗原結合分子を組合わせて、それによって治療薬組合せを生産する工程を含む。いくつかの実施態様では、当該方法は治療薬組合せの標的ポリペプチド(例えばRANKL、RANKまたはICM)と特異的に結合する抗原結合分子を生成する工程を含み、前記工程は例えば以下の工程によって実施される: 標的ポリペプチドに対応するアミノ酸配列を含む免疫性ポリペプチドで動物を免疫する工程; および標的ポリペプチドまたはその少なくとも1つの領域と特異的に結合する、当該動物のB細胞を識別および/または単離する工程; および当該B細胞によって発現される抗原結合分子を生産する工程。非限定的な例では、前記方法はさらにまた、そのようにして生産された抗原結合分子をデリバタイズして、抗原結合分子と同じエピトープ結合特異性を有する誘導抗原分子を生産する工程を含む。当該誘導抗原結合分子は抗体フラグメントから選択され得る。前記の例示的な例には以下が含まれる: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、単鎖(scFv)およびドメイン抗体(例えばサメおよびラクダ類抗体を含む)、並びに抗体および抗原結合/認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の改変構造を含む融合タンパク質。

20

30

いくつかの実施態様では、治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子は、デリバリービヒクル(例えばリポソーム、ナノ粒子、マイクロ粒子、デンドリマーまたはシクロデキストリン)に収納される。

さらに別の特徴では、本発明は、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載されるマルチ特異性抗原結合分子をコードする核酸配列を含む構築物(1つ以上の制御配列に作動できるように結合されている)を提供する。適切な構築物は、好ましくは発現構築物の抗体であり、その代表的な例にはプラスミド、コスミド、ファージおよびウイルスが含まれる。

本発明のさらに別の特徴は、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載される構築物を含む宿主細胞を提供する。

40

【0016】

別の特徴では、本発明は、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載される治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子、および医薬的に許容できる担体もしくは希釈剤を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施態様では、組成物はさらにまた、化学療法剤(例えば抗増殖/抗新形成薬、細胞増殖抑制剤、癌細胞侵襲阻害剤、増殖因子機能阻害剤、抗血管形成剤、血管損傷剤などから選択される)または免疫療法剤(例えばサイトカイン、サイトカイン発現細胞、抗体など)から選択される少なくとも1つの補助剤を含む。

本発明のさらに別の特徴は、対象動物において免疫を刺激するかまたは増大させる方法

50

を提供する。これらの方法は概して、上記に広く記載した治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって対象動物において免疫を刺激するかまたは増大させる工程を含む。治療薬組合せでRANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストが別個の構成要素として提供される実施態様では、当該成分は適切には対象動物に同時発生的に投与される。このタイプの例示的な例では、RANKLアンタゴニストは少なくとも1つのICMアンタゴニストと同時に投与される。他の例示的な例では、RANKLアンタゴニストおよび少なくとも1つのICMアンタゴニストは逐次的に投与される。例えば、RANKLアンタゴニストは、少なくとも1つのICMアンタゴニストの投与前に投与することができる。適切には、RANKLアンタゴニストは、少なくとも1つのICMアンタゴニストの投与後に投与される。

10

典型的には、刺激または増大される免疫は有益な宿主免疫応答を含み、その例示的な例には以下のいずれか1つ以上が含まれる：腫瘍サイズの減少、腫瘍量の減少、疾患の安定化、内因性または外因性抗原に対する抗体の産生、免疫系の誘発、免疫系の1つ以上の成分の誘発、細胞媒介免疫およびその発生に必要とされる分子、液性免疫およびその発生に必要とされる分子、抗体依存細胞傷害性（ADCC）免疫およびその発生に必要とされる分子、補体媒介細胞傷害性（CDC）免疫およびその発生に必要とされる分子、ナチュラルキラー細胞、サイトカインおよびケモカイン並びにそれらの産生に必要とされる分子および細胞、抗体依存細胞傷害、補体依存細胞傷害、ナチュラルキラー細胞活性、および抗原増強細胞傷害。このタイプの代表的な例では、刺激または増大される免疫には炎症促進免疫応答が含まれる。

20

【0017】

本発明のさらに別の特徴は、対象動物における腫瘍に対する免疫抑制または耐性の発達もしくは進行を阻害する方法を提供する。これらの方法は概して、腫瘍を上記で広く記載された治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子と接触させ、それによって対象動物における腫瘍に対する免疫抑制または耐性の発達もしくは進行を阻害する工程を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。適切には、治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子はまた、免疫系に腫瘍抗原を提示する抗原提示細胞（例えば樹状細胞）と接触する。

本発明のさらに別の特徴は、癌の発達、進行または再発を対象動物において阻害する方法を提供する。これらの方法は概して、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載された治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって癌の発達、進行または再発を対象動物において阻害する工程を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

30

関連する特徴では、本発明は対象動物において癌を治療する方法を提供する。これらの方法は概して、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載された治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の有効量を対象動物に投与し、それによって当該対象動物において癌を治療する工程を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

【0018】

本発明にしたがって治療し得る癌の非限定的な例には以下が含まれる：メラノーマ、乳癌、結腸癌、卵巣癌、子宮内膜および子宮癌、胃関連または胃の癌（gastric or stomach cancer）、膵臓癌、前立腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝細胞癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、結腸直腸癌、腎臓癌、外陰癌、甲状腺癌、肝関連癌腫（hepatic carcinoma）、肛門癌腫、陰茎癌腫、精巣癌、食道癌、胆管の腫瘍、頭頸部癌、および扁平上皮細胞癌腫。いくつかの具体的な実施態様では、癌は転移癌である。

40

治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子の対象動物への投与を必要とする上記の特徴のいずれにおいても、対象動物は適切には免疫調節剤に対して低下または障害された応答性を有し、例えば、対象動物はICM分子アンタゴニスト（例えば抗PD-1または抗PD-L1免疫療法）に低下または障害された応答性を有する。

本発明の方法のいくつかで、有効量の補助抗癌剤は同時発生的に対象動物に投与される。いくつかの適切な補助抗癌剤には、化学療法剤、体外放射線照射、標的に誘導される放

50

放射性同位元素、およびシグナル伝達阻害剤が含まれる。しかしながら、他の公知の抗癌剤のいずれも、本発明の方法に関する使用で等しく適用可能である。

さらにまた別の特徴では、本発明は、対象動物において腫瘍に対する免疫抑制もしくは耐性の発達もしくは進行を阻害するためにまたは癌を治療するために、免疫を刺激または増大させるキットを提供する。これらのキットは、上記および本明細書のいずれかの場所に広く記載された治療薬組合せ、医薬組成物、およびマルチ特異性抗原結合分子のいずれか1つ以上を含む。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】抗CTLA4および抗RANKL併用による実験肺転移の抑制は、NK細胞およびIFN- 依存性であることを示すグラフである。5 - 10匹のC57BL/6野生型 (WT) および遺伝子標的マウスのグループに (表示のように)、B16F10メラノーマ細胞 (2×10^5) を静脈内に注射した (A - C)。5 - 10匹のC57BL/6野生型 (WT) のグループにRM1前立腺癌細胞 (1×10^4) を静脈内注射した (D)。-1、0および2日目 (腫瘍接種に対応) に、cI g、抗CTLA4 (UC10-4F10、ハムスターI g G) および/または抗RANKL (IK22/5) (いずれも $200 \mu\text{g}$ / マウス i.p.) で表示のようにマウスを処理した。(B) -1、0および7日目にいくつかのマウスグループを抗CD8 または抗asGM1で追加処理した (いずれもそれぞれ $100 \mu\text{g}$ / マウス i.p.)。転移量は、肺表面のコロニーを数えることによって14日後に肺で定量した。各グループの平均 \pm SEMが示される。併用における転移制御の改善は、表示のように統計的に有意であった (一元配置分散分析、チューキー多重比較; * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.0001$)。 10

【図2】抗CTLAのアイソタイプは、抗RANKLと併用されて実験的肺転移を抑制する抗CTLA4の有効性に影響を及ぼすことを示すグラフである。5 - 8匹のC57BL/6野生型 (WT) マウスのグループに、表示のようにB16F10メラノーマ細胞 (2×10^5) を静脈内注射した。-1、0および2日目 (腫瘍接種に対応) にマウスを表示のように以下により処理した: cI g (1D12、マウスI g G2a)、種々のアイソタイプの抗CTLA4 (UC10-4F10 (ハムスターI g G)、9D9 (マウスI g G2a、I g G2b、I g G1またはI g G1 D265A) および/またはcI g (2A3、ラットI g G2a) または抗RANKL (IK22/5) (いずれも $200 \mu\text{g}$ / マウス i.p.)。転移量は、肺表面のコロニーを数えることによって14日後に肺で定量した。各グループの平均 \pm SEMが示される。(A) は2つのそれぞれ別個の実験のプールした結果である。併用対抗CTLA4単独 (I g G2aおよびハムスターアイソタイプ) の転移制御の改善は、表示のように統計的に有意であった (一元配置分散分析、チューキー多重比較; * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。(B) 抗CTLA4-I g G2aアイソタイプ単独による、および種々の併用による転移制御の改善は、表示のように統計的に有意であった (一元配置分散分析、シダック多重比較 (抗CTLA4単独療法がcI g と、および抗RANKLとの併用またはcI g との併用と比較される); * $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。実験は1回実施された。 20

【図3】抗RANKLと併用された抗CTLA4はB16F10皮下腫瘍を抑制することを示すグラフである。5匹のC57BL/6野生型 (WT) マウスのグループにB16F10メラノーマ細胞 (1×10^5) を皮下注射した。3、7、9および11日目 (腫瘍接種に対応) に、マウスをcI g、抗CTLA4 (UC10-4F10、ハムスターI g G) ($200 \mu\text{g}$ 、i.p.) で処理した。各グループの平均 \pm SEMが示される。グラフはそれぞれ別個の7実験の代表的な増殖曲線である。 30

【図4】抗CTLA4のI g G2aアイソタイプは抗RANKLと最も効果的に併用されて、B16F10皮下腫瘍を抑制することを示すグラフである。5匹のC57BL/6野生型 (WT) マウスのグループにB16F10メラノーマ細胞 (1×10^5) を皮下注射した。(A) 6、8、10および12日目 (腫瘍接種に対応) に、または (B) 3、7、9および11日目 (腫瘍接種に対応) に、cI g、抗CTLA4 (9D9、表示のようにマウスI g G2aまたはI g G1-D265A、 $50 \mu\text{g}$ を i.p.)、および/または抗RANKL (IK22/5、 $200 \mu\text{g}$ を i.p.) で表示のようにマウスを処理した。各グループの平均 \pm SEMが示される。提示のように抗CTLA4および抗RANKLの併用による優れた皮下腫瘍増殖抑制は統計的に有意であった (一元配置分散分析、チューキー多重比較; * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$)。抗CTLA4-I g G2aと抗RANKLとの併用と単独療法またはcI g との間の相違は、提示のように有意であった (クルスカール-ワリス検定、ダン多重比較、ここ 40

10

20

30

40

50

で単独療法アームまたはcI g は抗CTLA4-I g G2aと抗RANKLとの併用と比較された； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.0001$ ）。抗RANKLと併用した抗CTLA4-I g G1-D265Aをどちらかの単独療法として比較したとき、有意差は観察されなかった。（C）B16F10皮下腫瘍増殖は、抗CTLA4-I g G2aおよび抗RANKL療法の併用によって最大限に抑制される。7つのそれぞれ別個のプール実験（各グループにつき5 - 6マウス）について処理グループを比較した、予想される混合効果が繰返し再生さる腫瘍データ測定（log スケール）がグラフに示される。単独療法またはコントロールと比較して抗RANKLと抗CTLA4（mI g G2a）との併用による優れた増殖抑制、および、コントロールと比較して優れてはいるが単独療法との比較ではそうではない抗RANKLと抗CTLA4（mI g G1-D265A）との併用は表で提示するように有意であった（ペアワイズ比較； $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.0001$ ）。

10

【図5】B16F10腫瘍ミクロ環境（TME）におけるRANKLおよびRANKの発現を示すグラフである。C57BL/6野生型（WT）のグループにB16F10メラノーマ細胞（ 1×10^5 ）を皮下注射した（A - B）。3、7日目（腫瘍接種に対応）、および実験続行の場合には11および15日目にもまた、表示のようにcI g（1-1、ラットI g G2a、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））または抗RANKL（IK22/5、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））でマウスを処理した。2つのそれぞれ別個の実験（グループにつき各々3 - 5マウス）が（A - B）の各々で組み合わせられる。表示の時点におけるRANKL発現とT細胞サブセットおよび器官部位との間の有意差が、（A）に示される（一元配置分散分析、テューキー多重比較； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.0001$ ）。（B）腫瘍を16日目に分析した。表示のように、cI g と抗RANKL処理グループとの間に有意差は観察されなかった。

20

【図6】抗CTLA4-I g G2aおよび抗RANKL療法の併用の有効性はFcR、IFN、Batf3、およびCD8⁺ T細胞依存性であることを示すグラフである。C57BL/6野生型（WT）または遺伝子標的マウスのグループに、表示のようにB16F10メラノーマ細胞（ 1×10^5 ）を皮下注射した（A - D）。3、7日目（腫瘍接種に対応）、および実験続行の場合には11および15日目にもまた表示のように以下によりマウスを処理した：cI g（1-1、ラットI g G2a、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））+ 1D12、マウスI g G2aまたはI g G1（抗CTLA4アイソタイプと適合するように）、 $50 \mu\text{g}$ （i.p.）、抗CTLA4（9D9、表示のようにマウスI g G2aまたはI g G1-D265A、 $50 \mu\text{g}$ （i.p.））および/または抗RANKL（IK22/5、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））。（B）に表示するように、数匹のマウスは-1、0および7日目に以下を用いて腹腔内処置された：抗CD8 または抗asGM1（いずれも各々 $100 \mu\text{g}$ /マウス（i.p.））。各グループの平均 \pm SEMが示される。腫瘍増殖曲線のグループ間における相違は提示のとおり有意である（一元配置分散分析、テューキー多重比較； $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。cI g およびa-RANKLとa-CTLA4との併用で処理したWTグループは（A）および（C）では同じものであるが、解釈を容易にするために異なるグラフで表示される。抗CTLA4との抗RANKLの併用有効性はFcRおよびBatf3依存性である。

30

【図7】抗RANKLと抗CTLA4療法との併用は、腫瘍へのCD8⁺ T細胞の補充増加をもたらすことを示すグラフである。4 - 8匹のC57BL/6野生型（WT）マウスのグループにB16F10メラノーマ細胞（ 1×10^5 ）を皮下注射した。データはそれぞれ別個の2 - 5実験からプールされる（A - H）。3、7、11および15日目に（A - E、G - H）、または3および11日目に（F）（腫瘍接種に対応）、マウスを表示のように以下により処理した：cI g（1-1、ラットI g G2a、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））+ 1D12、マウスI g G2a、 $50 \mu\text{g}$ （i.p.）、抗CTLA4（9D9、I g G2a、 $50 \mu\text{g}$ （i.p.））および/または抗RANKL（IK22/5、 $200 \mu\text{g}$ （i.p.））。サイズについての倫理的終末点に対応する末期（16日目）にマウスを犠牲にし（A - E、G - H）、FACS分析のために腫瘍を処理した。提示するように、9日目（F）および15 - 16日目（G）における、全生細胞のCD45⁺ TIL比率（A）、CD8⁺Ki-67⁺ T細胞比率（E）、CD8⁺ T細胞対Treg 比（H）（TCR⁺CD4⁺、FoxP3⁺と規定される）の増加、並びにCD8⁺ T細胞対CD11b⁺GR1^{hi} 細胞比の増加は有意である（一元配置分散分析、ダンネット多重比較、ここで各グループは抗CTLA4-I g G2a + 抗RANKL併用療法と比較される； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。（B）提示するように、全CD45⁺ TILの比率のようなCD8⁺ T細胞の増加は有意である（クルスカール-ワリス検定、ダン多重比較、ここで各グループは9D9 I g G2a + IK22/5

40

50

併用と比較される； $^*P < 0.05$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。(C) 腫瘍内のCD8⁺ T細胞数は併用療法により増加する（一元配置分散分析、ダンネット多重比較（ここで各グループは抗CTLA4-Ig G2a + 抗RANKL併用と比較される； $^{**}P < 0.01$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。(D) cIgまたは抗RANKL処理と比較して、抗CTLA4-Ig G2aによるTregの減少は表示のとおり有意である（一元配置分散分析、テューキー多重比較； $^{**}P < 0.01$ ）。

【図8】抗RANKLは、T細胞サイトカインの多機能性の増加によって抗CTLA4の有効性を改善することを示すグラフである。4 - 8匹のC57BL/6野生型(WT)マウスのグループにB16F10メラノーマ細胞(1×10^5)を皮下接種した。(A - E) 3、7、11および15日目に（腫瘍接種に対応）、マウスを表示のように以下により処理した：cIg (1-1、ラットIg G2a、200 μ g (i.p.)) + 1D12、マウスIg G2a、50 μ g (i.p.))、抗CTLA4 (9D9、Ig G2a、50 μ g (i.p.)) および/または抗RANKL (IK22/5、200 μ g (i.p.))。マウスを腫瘍接種から16日目に犠牲にして腫瘍を処理し、ICSの実施前にex-vivoで刺激した。IFN (A)、IFN およびIL-2 (B) またはIFN、IL2およびTNF (C) (“三重陽性”)の共同発現の陽性染色によるCD8⁺ T細胞の比率の増加；並びに(D)併用療法によるIFN 発現CD4⁺ T細胞の比率の増加は、提示のように有意である（クルスカール-ワリス検定、ダン多重比較、ここで各グループは9D9 Ig G2a + IK22/5併用処理と比較される； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。それぞれ別個の2 - 3のプール実験を示す(A - D)。2つのプール実験から、0、1、2または3つのサイトカイン(IFN、IL-2およびTNF)を発現するCD8⁺ T細胞の平均比率が、提示のように4処理グループについて示される(E)。

【図9】PD1/PD-L1およびRANKLの共同封鎖は転移の相乗的抑制をもたらすことを示すグラフである。C57BL/6 WTマウスに、(A、C) B16F10メラノーマまたは(B、D) RM1前立腺癌腫を静脈内注射した(2×10^5 細胞)。-1、0および2日目に（腫瘍接種に対応）、表示のように以下によりマウスを処理した：cIg (2A3、200 μ g (i.p.))、(A - B) 抗PD-1 (RMP1-14、200 μ g (i.p.)) または(C - D) 抗PD-L1 (10F.9G2、200 μ g (i.p.))、および/または抗RANKL (IK22/5、200 μ g (i.p.))。14日後に肺表面のコロニーを数えることによって転移量を定量した。グループにつき5匹のマウスの平均 \pm SEMが示される。(A) の2つの実験がプールされる。併用による転移制御の改善は提示のとおり統計的に有意であった（一元配置分散分析、テューキー多重比較； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。

【図10】抗PD-1および抗RANKL MAbは腫瘍の皮下増殖を抑制することを示すグラフである。(A) C57BL/6または(B) BALB/c WT雄マウスのグループに、0日目に(A) MC38または(B) CT26癌腫(1×10^5 細胞)を皮下注射した。続いて、6、9、12および15日目に以下のいずれかでマウスを処理した：cIg (2A3または1-1、250mg i.p.)；抗PD-1単独(RMP1-14、250mg i.p.)；抗RANKL単独IK22/5、200mg i.p.) または表示のように前記の組合せ。腫瘍増殖をデジタルキャリパーを用いて測定し、腫瘍サイズをグループにつき5 - 6匹のマウスの平均 \pm SEMとして提示する。提示のように皮下腫瘍の減少は有意である（一元配置分散分析、テューキー多重比較； $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ ）。

【図11】抗RANKLの皮下腫瘍増殖抑制能力は、Batf3依存性であるがFc受容体発現には依存性ではないことを示すグラフである。表示のように、C57BL/6または遺伝子標的マウスのグループにMCA1956線維肉腫細胞(1×10^6)を皮下注射した。3、7、11および15日目に（腫瘍接種に対応）、マウスを抗RANKL (IK22/5、200 μ g (ip)) またはcIg (1-1、200 μ g (ip)) で処理した。グループにつき5 - 7匹のマウスの平均 \pm SEMが示される。提示するように、腫瘍サイズは、同様な遺伝子型の処理グループと比較して、一元配置分散分析（シダック多重比較）で有意に相違する($^*P < 0.05$)。

【図12】腫瘍から浸潤する骨髓性細胞のRANKおよびPD-L1の共同発現を示すグラフである。C57BL/6にMCA1956線維肉腫細胞(1×10^6)を皮下注射した。腫瘍が約50mm³に達するまで一切処置をせずに22日間増殖させた。腫瘍を収集し、単一細胞懸濁物を作製し、フローサイトメトリーを実施した。パネルAでは、PD-L1およびCD103発現をRANK陽性ゲート分類CD11c+/MHCII+ DCで分析し、ほぼ100%のRANK陽性DCがPD-L1およびCD103の両方を発現

することを示した。パネルBでは、CD11b⁺、F480⁺マクロファージでCD206およびRANK発現を分析し、腫瘍浸潤マクロファージの52%がRANKおよびCD206を共同発現することを示した。

【図13】例示的RANKL-PD-1二重特異性抗体をコードするDNAベクターの模式図である。(A) RANKL-PD-1ジアポディをコードする発現ベクターを示す。(B) RANKL-PD-1トリポディをコードするDNA構築物を示す。第一の構築物はPD-1 Fab Lドメインおよび第一のRANKL scFvドメインをコードし、第二の構築物はPD-1 Fab Fdドメインおよび第二のRANKL scFvドメインをコードする。したがって生じたトリポディは、2つのRANKL結合フラグメントおよび単一PD-1結合フラグメントを有するであろう。(C) PD-1-RANKLトリポディをコードするDNA構築物を示す。第一の構築物は、RANKL Fab Lドメインおよび第一のPD-1 scFvドメインをコードし、第二の構築物は、RANKL Fab Fdドメインおよび第二のscFvドメインをコードする。

【図14】例示的二重特異性抗RANKL抗PD-1トリポディの戯画図である。

【図15】抗RANKL併用療法の有効性はTreg 枯渇に完全には依存しないことを示すグラフである。C57BL/6 FoxP3-DTRマウスに、(A-C) B16F10メラノーマ細胞 (1×10^5) または (D-E) RM-1前立腺癌腫細胞 (5×10^4) を皮下注射した。(A-E) 3、7、11および15日目、または(C-E) 3、7および11日目(腫瘍接種に対応)に、表示のように以下でマウスを処理した: c1g (1-1; ラット Ig G2a、 $200 \mu\text{g}$ (i.p.) + 1D12; マウス Ig G2a、 $50 \mu\text{g}$ (i.p.))、DT ((A) では3日目のみ、(C-E) では3および7日目に 250ng (i.p.))、および/または抗RANKL (IK22-5; ラット Ig G2a、 $200 \mu\text{g}$ (i.p.))。(A、B) B16F10皮下腫瘍増殖(平均 \pm SEMとして表示)、(C) B16F10腫瘍拒絶(処理後に樹立皮下腫瘍の完全な退縮と規定、腫瘍接種後15日目に判定)、(D) グループにつき4-6匹のマウスについて、RM-1腫瘍増殖(平均 \pm SEMとして表示)、および(E) (D) で示した実験の全TILの比率としてTreg が示される。提示するように統計的有意は、一元配置分散分析、テューキー多重比較によって示された (* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。

【図16】RANKLはTMEにおいてPD-1^{hi} 発現T細胞を識別することを示すグラフである。(A-C) BALB/c野生型(WT)マウスのグループ($n = 10/\text{グループ}$)に 2×10^5 のCT26結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後10日目に、等しい腫瘍サイズ中央値を有するグループにマウスを任意抽出し、以下に示す抗体の一用量で処理した: c1g ($200 \mu\text{g}$)、抗CTLA4 (9D9、ml Ig G2aアイソタイプ、 $50 \mu\text{g}$)、抗PD-1 ($200 \mu\text{g}$) または表示の組合せ。処理から3日後に、腫瘍を採集し、CD45.2生細胞について白血球形態のフローサイトメトリーゲーティングのために処理した。(A) PD-1を発現するRANKL⁺ (黒棒線) またはRANKL⁻ (灰色棒線) CD8⁺ T細胞TILの比率、(B) RANKL⁺ (黒棒線) またはRANKL⁻ (灰色棒線) CD8⁺ T細胞TILによるPD-1発現レベル(幾何平均MFI (g MFI) として表現)、および(C) RANKL⁺ (黒棒線) またはRANKL⁻ (灰色棒線) CD8⁺ T細胞TILによるCTLA4発現レベル(幾何平均MFI (g MFI) として表現)。統計的差異は、(C) 以外はテューキー多重比較による一元配置分散分析によって決定され、(C) ではマン-ホイットニー検定を用いて処理内グループが比較された (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。

【図17】PD-1/PD-L1単独またはCTLA4との併用によるRANKLの共同標的化は皮下腫瘍増殖を抑制することを示すグラフである。BALB/cの(A、B) 野生型(WT)またはTRAMPトランスジェニックマウス($n = 5 - 17/\text{グループ}$)に、 1×10^5 のCT26 (A、B) または 1×10^6 のTramp-C1前立腺癌腫Iを0日目に皮下注射し、腫瘍増殖をモニターした。(A-C) 10、14、18および22日目(腫瘍接種に対応)に、またはI 20、24、28および32日目に以下の抗体でマウスを処理した: c1g (合計 $250 - 350 \mu\text{g}$)、抗CTLA4 (9D9 ml Ig G2a、 $50 \mu\text{g}$)、抗PD-1 (クローンRMP1-14; A、D: $250 \mu\text{g}$; C: $100 \mu\text{g}$)、抗PD-L1 (クローン10F.9G2; $100 \mu\text{g}$)、抗RANKL (クローンIK22.5; $200 \mu\text{g}$)、または表示のように前記の組合せ。腫瘍サイズは平均 \pm SEMとして提示される。(A) はそれぞれ別個の2-3回の実験の代表例であり、他の全ての実験は1回実施された。表示のグループ間の統計的相違は、特段の指示がなければ、測定最終日のテューキーポスト-テスト分析による一元配置分散分析によって決定された (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。(C) では、30日目に

おける二重抗体併用および三重抗体併用間の腫瘍サイズの有意差が判定された。22日目の以下の比較はグラフには示されていない：抗PD-1対抗PD-1+抗RANKL（****）；#：35日目に2つの残留グループ間で有意な相違がアンペアードt検定によって決定された（* $P < 0.05$ ）。（B）で、#は、アンペアードt検定によって決定された表示の比較についての有意な相違を示す（* $P < 0.05$ ）。（A、C）の括弧：腫瘍拒絶率（括弧が無い場合は拒絶が無いことを示す）。（A）では、2つの同一の実験の拒絶率をプールし、斜字体の括弧で提示した表示のグループの拒絶率間の有意差はカイ二乗（ χ^2 ）分析によって決定された（フィッシャーの正確確率検定；** $P < 0.01$ ）。

【図18】TME内のRANK発現における好ましい初期変化が、ICBによる最初の処理後に見られることを示すグラフである。（A-C）BALB/c野生型（WT）マウス（ $n = 5 - 10$ /グループ）のグループに 2×10^5 のCT26結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後10日目に、等しい中央値の腫瘍サイズを有するグループにマウスを任意抽出し、表示の抗体の一用量で腹腔内処理した：clg（ $200 \mu g$ ）、抗CTLA4（9D9、mlgG2aアイソタイプ、 $50 \mu g$ ）、抗PD-1（クローンRMP1-14； $200 \mu g$ ）または表示の組合せ。処理から3日後に、腫瘍を採集し、（A-D）白血球形態のCD45.2生細胞、または（E）リンパ球ゲートから排除された単一CD45.2+生細胞について、フローサイトメトリゲート分類のために処理した。（A）RANKLを発現するCD8⁺ T細胞TILの比率、（B）RANKLを発現するgp70特異性CD8⁺ T細胞TILの比率、および（C）RANKLを発現するCD4⁺ T細胞TILの比率を、表示の処理グループについて示す。平均 \pm SEMが示される。統計的有意は、テューキーポストテスト分析による一元配置分散分析で決定され（A）、ここではダンボストテスト分析によるクルスカール-ワリス検定が用いられた（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。

【図19】抗PD-1対抗CTLA4処理後のTMEにおける固有の変化を示すグラフである。（A、B）BALB/c野生型（WT）マウス（ $n = 5 - 10$ /グループ）のグループに 2×10^5 のCT26結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後10日目に、等しい中央値の腫瘍サイズを有するグループにマウスを任意抽出し、表示の抗体の一用量で腹腔内処理した：clg（ $200 \mu g$ ）、抗CTLA4（9D9、mlgG2aアイソタイプ、 $50 \mu g$ ）、抗PD-1（クローンRMP1-14； $200 \mu g$ ）または表示の組合せ。処理から3日後に、腫瘍を採集し、（A-D）白血球形態のCD45.2生細胞で、または（E）リンパ球ゲートから排除された単一CD45.2+生細胞でフローサイトメトリゲート分類のために処理した。（A）表示の処理グループについて示された、gp70特異性CD8⁺ T細胞TILによる幾何平均蛍光強度（gMFI）のPD-1発現。（B）表示の処理グループについて示された、PD-L1を発現する細胞の比率。平均 \pm SEMが示される。統計的有意は、テューキーポストテスト分析による一元配置分散分析で決定されたが、ただし（B）では、統計的有意は、表示の比較についてマン-ホイットニー検定によって決定された（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。加えて、（A）では、抗PD-1単独または抗RANKLとの併用における表示の比較に関するgMFIの統計的相違は、マン-ホイットニー検定によって決定された（# $P < 0.05$ ）。

【図20】CTLA4との併用におけるRANKLの共同標的化は、皮下腫瘍増殖を抑制することを示すグラフである。BALB/c野生型（WT）マウス（ $n = 5 - 17$ /グループ）のグループに 1×10^5 のCT26を0日目に皮下注射し、腫瘍増殖をモニターした。10、14、18および22日目（腫瘍接種に対応）に表示のとおり以下の抗体で腹腔内処理した：clg（合計 $250 - 350 \mu g$ ）、抗CTLA4（9D9 mlgG2a、 $50 \mu g$ ）、抗PD-1（クローンRMP1-14；A、D： $250 \mu g$ ；C： $100 \mu g$ ）、抗PD-L1（クローン10F.9G2； $100 \mu g$ ）、抗RANKL（クローンIKK22.5； $200 \mu g$ ）または前記の組合せ。腫瘍サイズは平均 \pm SEMとして示される。表示グループ間の統計的相違は、特段の指定がなければ、測定最終日にテューキーポストテスト分析による一元配置分散分析で決定された（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ ）。#は、アンペアードt検定によって決定した表示の比較についての有意差を示す（* $P < 0.05$ ）。

【図21】抗PD-1および抗RANKLの最適な抗腫瘍効果は、抗体投与の順序によって影響されることを示すグラフである。C57BL/6野生型（WT）マウス（ $n = 5$ /グループ）のグループに 5×10^5 の3LL肺癌種細胞を皮下注射した。時期を同じくする処理グループ（黒記号）のために、8、12、16および20日目（腫瘍接種に対応）に表示のとおりclg（1-1、 $100 \mu g$

10

20

30

40

50

)、抗PD-1 (RMP1-14、100 μ g)、および/または抗RANKL (IK22/5、100 μ g)でマウスを腹腔処理した。逐次処理グループ(色付き記号)(処理順序は図中の注釈で示される)については、8および12日目(腫瘍接種に対応)(第一の抗体)並びに16および20日目(腫瘍接種に対応)(第二の抗体)に、cIg (1-1、200 μ g)、抗PD-1 (RMP1-14、200 μ g)、および/または抗RANKL (IK22/5、200 μ g)でそれぞれ表示のようにマウスを腹腔処理した。各処理グループについて、平均 \pm SEM腫瘍サイズが示される。22日目のグループ間の統計的相違はテューキーポストテスト分析による一元配置分散分析で決定され、主要な比較が示される(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.0001$)。2つのそれぞれ別個の実験がプールされた。

【図22】RANKLがTMEにおいてPD1^{hi}発現T細胞を識別することを示すグラフである。BALB/c野生型(WT)マウス($n = 10$ /グループ)のグループに 2×10^5 のCT26結腸癌腫細胞を皮下注射した。腫瘍接種後13日目に腫瘍を採集し、CD45.2生細胞について白血球形態のフローサイトメトリーゲーティングのために処理した。PD-1発現を、RANKL+細胞またはRANKL-細胞のCD8⁺ T細胞TILについて分析した。 10

【図23】抗RANKL/PD-1 FIT-Igの例示的作製および特徴付けを示す模式図である。(A)標識された抗原結合ドメインを有する抗RANKL/PD-1 FIT-Igの模式図である。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はニボルマブ抗体配列を示す。(B)RANKL/PD-1 FIT-Igをコードする3つのDNA構築物の設計。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はニボルマブ抗体配列を示す。

【図24】RANKL/CTLA4 FIT-Igの例示的作製および特徴付けを示す模式図である。(A)標識された抗原結合ドメインを有する抗RANKL/CTLA4 FIT-Igの模式図である。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はイピリムマブ抗体配列を示す。(B)RANKL/CTLA4 FIT-Igをコードする3つのDNA構築物の設計。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はイピリムマブ抗体配列を示す。 20

【図25】抗RANKL/PD-L1 FIT-Igの例示的作製および特徴付けを示す模式図である。(A)標識された抗原結合ドメインを有する抗RANKL/PD-L1 FIT-Igの模式図である。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はアテゾリズマブ抗体配列を示す。(B)抗RANKL/PD-L1 FIT-Igをコードする3つのDNA構築物の設計。“A”配列はデノスマブ抗体配列を示し、“B”配列はアテゾリズマブ抗体配列を示す。

【図26】表示の4つの鎖で作製された二重特異性抗RANKL/PD-1 CrossMAbの模式図である。重鎖抗体配列は無影/白色枠で示され、軽鎖抗体配列は灰色枠によって示される。RMP1-14 CH1およびCL配列は交換されヒトIgG1 Fcに融合し(RMP1-14 CH-CL-huIgG1Fcと称される)、IK22-5配列は変更されずにヒトIgG1 Fcに融合する(IK22-5-huIgG1Fc WT)。ヘテロダイマー化は、Fcドメインにおける表示の“ノブインホール”並びに追加のS354CおよびY349C変異によりさらに増強された。各ヒトFcドメインもまたD265A変異を有した。 30

【図27】RMP1-14 CH-CL X IK225 WT二重特異性抗体CrossMAbの分析用SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析を示す写真である。前記抗体は、一過性ExpiCHO-S細胞培養で発現され、タンパク質A親和性クロマトグラフィーによって精製された。レーンM1:タンパク質マーカー(TaKaRa, Cat. No.3452)、レーンM2:タンパク質マーカー(GenScript, Cat. No. M00521)、レーン1:還元状態、レーン2:非還元状態、レーンP:陽性コントロールとしてヒトIgG1、カップ(Sigma, Cat.No.15154)、一次抗体:ヤギ抗ヒトIgG-HRP(GenScript, Cat. No.A00166)、一次抗体:ヤギ抗ヒトカップ-HRP(SouthernBiotech, Cat. No. 2060-05)。 40

【図28】HEK-293細胞によって一過性に発現されたマウスRANKLのフローサイトメトリーによる検出を示すグラフである。HEK-293細胞の単一細胞懸濁物をトランスフェクトしないか、またはマウスRANKL構築物で一過性にトランスフェクトし、トランスフェクションから48時間後に、二工程インキュベーション手順で表面染色した。一次抗体は、2.5 μ gのビオチン化ネズミRANK-Fc、2.5 μ gのビオチン化抗RANKL/PD-1二重特異性抗体またはビオチン化アイソタイプコントロールAb(huIgG1 mAbコントロール)で、前記はHEK-293細胞とともに氷上で30分間インキュベートされた。次いで、二次抗体(BiolegendのAPC 50

）とのインキュベーションを用い、さらに30分間氷上で一次抗体結合を検出した。サンプルおよびデータをFortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターで分析し、ソフトウェア (FlowJo v10 software (Tree Star, Inc.)) で分析した。

【図 2 9】RANKL-RANK結合の抗体競合を示すグラフである。マウスRANKLで一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞を、多様な濃度の抗RANKL/PD-1二重特異性mAb、抗RANKL mAb IK22-5、ラットIgG2aアイソタイプコントロールまたはヒトIgG1アイソタイプコントロールのいずれかとともに氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を2.5 μ g のビオチン化組換えネズミRANK-Fcとともにさらに30分間氷上でインキュベートした。FACS緩衝液 (PBS + 10% FCS) で2回洗浄した後、ストレプトアビジン-APCとの最後のインキュベーションを氷上でさらに30分間実施した。サンプルおよびデータをFortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターで分析し、ソフトウェア (FlowJo v10 software (Tree Star, Inc.)) で分析した。2つのそれぞれ別個の実験によるRANK-Fc結合阻害の代表的なFACS図および要約データが示される。

10

【図 3 0】HEK-293細胞によって一過性に発現されたマウスPD-1のフローサイトメトリーによる抗体検出を示すグラフである。HEK-293親細胞の単一細胞懸濁物をトランスフェクトしないか、またはマウスPD-1プラスミドで一過性にトランスフェクトし、トランスフェクションから48時間後に、二工程インキュベーション手順で表面染色した。一次抗体は、2.5 μ g の抗RANKL/PD-1二重特異性抗体またはアイソタイプコントロールAb (hul IgG1 mAb コントロール) で、前記はHEK-293細胞とともに氷上で30分間インキュベートされた。次いで、ヤギ抗ヒト二次抗体 (Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific)) とのインキュベーションを用い、さらに30分間氷上で抗体結合を検出した。サンプルおよびデータをFortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターで分析し、ソフトウェア (FlowJo v10 software (Tree Star, Inc.)) で分析した。アイソタイプコントロールによる染色は濃い灰色の影付き領域で示され、一方、抗RANKL/PD-1二重特異性抗体による染色は薄い灰色の影付き領域で示される。

20

【図 3 1】PD-1/PDL1結合の抗体競合を示すグラフである。マウスPD-1で一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞を、多様な濃度の抗RANKL/PD-1二重特異性mAb、抗PD-1 mAb RMP1-14、ラットIgG2aアイソタイプコントロールまたはヒトIgG1アイソタイプコントロールのいずれかとともに氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を2.5 μ g のビオチン化組換えネズミPD-L1-Fcとともにさらに30分間氷上でインキュベートした。FACS緩衝液 (PBS + 10% FCS) で2回洗浄した後、ストレプトアビジン-APCとの最後のインキュベーションを氷上でさらに30分間実施した。サンプルおよびデータをFortessa (BD Biosciences) フローサイトメーターで分析し、ソフトウェア (FlowJo v10 software (Tree Star, Inc.)) で分析した。2つのそれぞれ別個の実験によるPD-L1-Fc結合阻害の代表的なFACS図および要約データが示される。

30

【図 3 2】in vitro破骨細胞形成における抗RANKL/PD-1二重特異性抗体の阻害性効果を示すグラフである。抗IK22-5 (陽性コントロール)、hul IgG1アイソタイプコントロールまたは抗RANKL/PD-1二重特異性抗体 (1000 ng/mL から 50 ng/mL の濃度) の存在下もしくは非存在下でネズミの骨髄 (BM) 細胞を培養した。BM細胞培養は、CSF-1およびマウスRANKLを補充したDMEMで実施された。7日後に、TRAP + 多核 (4核以上) 細胞をカウントした。データは三重複製培養の平均 \pm SEMとして表される。

40

【図 3 3】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、肺への実験的メラノーマ転移を抑制することを示すグラフである。C57BL/6野生型 (WT) マウスのグループ (n = 6 - 10/グループ) に 2×10^5 のB16F10メラノーマ細胞を静脈内注射した。-1、0 および2日目 (腫瘍接種に対応) に表示のように以下でマウスを処理した: clg (200 μ g i.p.、組換えMac4-ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL (100 μ g i.p.、組換えIK22.5-ヒトIgG1 D265A)、抗PD-1 (100 μ g i.p.、組換えRMP1-14-ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL + 抗PD-1 (それぞれ100 μ g i.p.)、抗RANKL-PD-1二重特異性抗体 (50から200 μ g i.p.、ヒトIgG1 D265A)。転移量は、肺表面のコロニーを数えることによって14日後に肺で定量した。平均 \pm SEMが示される。表示グループ間の統計的相違は、ダンネット多重比較検定に

50

よる一元配置分散分析によって決定された ($^*P < 0.05$)。

【図34】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、肺への実験的前立腺癌転移を抑制することを示すグラフである。C57BL/6野生型 (WT) マウスのグループ ($n = 6/\text{グループ}$) に 2×10^5 のRM-1前立腺癌腫細胞を静脈内注射した。-1、0および2日目 (腫瘍接種に対応) に表示のように以下でマウスを処理した: cI g ($200 \mu\text{g i.p.}$ 、ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL ($100 \mu\text{g i.p.}$ 、IK22.5ヒトIgG1 D265A)、抗PD-1 ($100 \mu\text{g i.p.}$ 、ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL + 抗PD-1 (それぞれ $100 \mu\text{g i.p.}$)、抗RANKL-PD-1二重特異性抗体 (100 または $200 \mu\text{g i.p.}$ 、ヒトIgG1 D265A)。転移量は、肺表面のコロニーを数えることによって14日後に肺で定量した。平均 \pm SEMが示される。表示グループ間の統計的相違は、テューキーポストテスト分析による一元配置分散分析によって決定された ($^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$ 、 $^{****}P < 0.0001$ 、ns = 有意ではない)。

10

【図35】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、肺癌細胞株3LLの皮下腫瘍増殖を抑制することを示すグラフである。C57BL/6野生型 (WT) マウスのグループに 5×10^5 の3LL肺癌種細胞を皮下注射した。表示のように8、12、16および20日目 (腫瘍接種に対応) に (矢印で表示するように) 腹腔内に以下によりマウスを処理した: cI g ($400 \mu\text{g i.p.}$ 、ラットIgG2a)、抗RANKL ($100 \mu\text{g i.p.}$ 、IK22.5ラットIgG2a)、抗PD-1 ($100 \mu\text{g i.p.}$ 、RMP1-14ラットIgG2a)、抗RANKL + 抗PD-1 ($100 \mu\text{g i.p.}$ 、それぞれIK22.5およびRMP1-14)、および一用量力価の抗RANKL-PD-1二重特異性抗体 (100 、 200 および $400 \mu\text{g i.p.}$ 、ヒトIgG1 D265A)。平均 \pm SEM腫瘍サイズが、各処理グループについて示される。

20

【図36】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、結腸癌腫細胞株CT26の皮下腫瘍増殖を抑制することを示すグラフである。BALB/cマウスのグループ ($n = 5 - 17/\text{グループ}$) に 1×10^5 のCT26を0日目に皮下注射し、腫瘍増殖をモニターした。9、17、18および21日目 (腫瘍接種に対応) に腹腔内に以下の抗体を用いてマウスを処理した: cI g (合計 $300 \mu\text{g}$)、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (huIgG1D265A骨格; 表示のように $100 \mu\text{g}$ または $200 \mu\text{g}$)、抗PD-1 (RMP1-14 $100 \mu\text{g}$)、抗RANKL (IK22.5、 $100 \mu\text{g}$)、または表示のようにそれらの組合せ。腫瘍サイズを平均 \pm SEMとして示した。

【図37】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、CT26腫瘍モデルにおける抗CTLA4処理の抗腫瘍有効性を増強することを示すグラフである。BALB/cマウスのグループ ($n = 5 - 17/\text{グループ}$) に 1×10^5 のCT26を0日目に皮下注射し、腫瘍増殖をモニターした。9、17、18および21日目 (腫瘍接種に対応) に腹腔内に以下の抗体を用いてマウスを処理した: cI g (合計 $300 \mu\text{g}$)、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (huIgG1D265A骨格、 $200 \mu\text{g}$)、抗CTLA4 (UC10-4F10、 $100 \mu\text{g}$)、抗PD-1 (RMP1-14、 $100 \mu\text{g}$)、抗RANKL (IK22.5、 $100 \mu\text{g}$)、または表示のようにそれらの組合せ。腫瘍サイズを平均 \pm SEMとして示した。

30

【図38】二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は、乳癌細胞株AT3-OVAの皮下腫瘍増殖を抑制することを示すグラフである。C57BL/6野生型 (WT) マウスのグループ ($n = 6/\text{グループ}$) に 1×10^6 のAT3-OVAを0日目に皮下注射し、腫瘍増殖をモニターした。19、22、25および28日目 (腫瘍接種に対応) に腹腔内に以下の抗体を用いてマウスを処理した: cI g (組換えMAC4-huIgG1D265A骨格; $200 \mu\text{g}$)、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (huIgG1D265A骨格; 表示のように $100 \mu\text{g}$ または $200 \mu\text{g}$)、抗PD-1 (組換えRMP1-14-huIgG1D265A骨格; $100 \mu\text{g}$)、抗RANKL (組換えIK22.5-huIgG1D265A骨格; $100 \mu\text{g}$)、または表示のようにそれらの組合せ。腫瘍サイズを平均 \pm SEMとして示した。

40

【0020】

表A: 配列の簡単な説明

配列番号	配列	長さ (aa)
配列番号:1	RANKLエピトープ 233-241	9
配列番号:2	自然のままのヒトRANKL (UniProt Acc. No. O14788)	317
配列番号:3	デノスマブ重鎖	452
配列番号:4	デノスマブ軽鎖	215
配列番号:5	RANK CDR3模倣アンタゴニスト	11
配列番号:6	RANK CDR3模倣アンタゴニスト	9
配列番号:7	RANKエピトープ330-417	88
配列番号:8	自然のままのヒトRANK (UniProt Acc. No. Q9Y6Q6)	616
配列番号:9	PD-1エピトープ62-86	25
配列番号:10	自然のままのヒトPD-1 (UniProt Acc. No. Q15116)	155
配列番号:11	PD-1エピトープ118-136	19
配列番号:12	PD-1エピトープ66-97	32
配列番号:13	PD-L1エピトープ279-290	12
配列番号:14	自然のままのヒトPD-L1 (UniProt Acc. No. Q9NZQ7)	290
配列番号:15	CTLA4エピトープ25-42	18
配列番号:16	自然のままのヒトCTLA4 (UniProt Acc. No. P16410)	188
配列番号:17	CTLA4エピトープ43-65	23
配列番号:18	CTLA4エピトープ96-109	14
配列番号:19	デノスマブ重鎖CDR1	5
配列番号:20	デノスマブ重鎖CDR2	17
配列番号:21	デノスマブ重鎖CDR3	13
配列番号:22	デノスマブ軽鎖CDR1	12
配列番号:23	デノスマブ軽鎖CDR2	7
配列番号:24	デノスマブ軽鎖CDR3	9
配列番号:25	デノスマブV _H	122
配列番号:26	デノスマブV _L	108
配列番号:27	デノスマブ重鎖完全長	464
配列番号:28	デノスマブ軽鎖完全長	234
配列番号:29	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	6
配列番号:30	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:31	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17
配列番号:32	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:33	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:34	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5

10

20

30

40

配列番号:35	EP 1257648抗RANKL抗体重鎖	230	
配列番号:36	配列番号:35の抗原結合フラグメント	126	
配列番号:37	EP 1257648抗RANKL抗体軽鎖	215	
配列番号:38	配列番号:37の抗原結合フラグメント	103	
配列番号:39	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	6	
配列番号:40	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17	
配列番号:41	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17	
配列番号:42	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11	
配列番号:43	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	
配列番号:44	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5	10
配列番号:45	EP 1257648抗RANKL抗体重鎖	230	
配列番号:46	配列番号:35の抗原結合フラグメント	126	
配列番号:47	EP 1257648抗RANKL抗体軽鎖	215	
配列番号:48	配列番号:37の抗原結合フラグメント	103	
配列番号:49	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11	
配列番号:50	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11	
配列番号:51	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	12	
配列番号:52	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	9	
配列番号:53	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	20
配列番号:54	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	
配列番号:55	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	
配列番号:56	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	
配列番号:57	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5	
配列番号:58	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5	
配列番号:59	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5	
配列番号:60	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	11	
配列番号:61	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5	
配列番号:62	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5	
配列番号:63	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5	30
配列番号:64	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17	
配列番号:65	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17	
配列番号:66	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17	
配列番号:67	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17	
配列番号:68	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	7	
配列番号:69	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	14	
配列番号:70	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	7	
配列番号:71	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	5	
配列番号:72	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	7	
配列番号:73	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11	40
配列番号:74	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7	
配列番号:75	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	9	
配列番号:76	Newa et al. 抗RANKL抗体V _H	115	
配列番号:77	Newa et al. 抗RANKL抗体V _H	116	
配列番号:78	配列番号:76の抗原結合フラグメント	113	

配列番号:79	配列番号:77の抗原結合フラグメント	114	
配列番号:80	Newa et al. 抗RANKL抗体V _L	111	
配列番号:81	配列番号:80の抗原結合フラグメント	107	
配列番号:82	ニボルマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:83	ニボルマブCDR2 (V _H)	17	
配列番号:84	ニボルマブCDR3 (V _H)	5	
配列番号:85	ニボルマブCDR1 (V _L)	11	
配列番号:86	ニボルマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:87	ニボルマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:88	ニボルマブ重鎖	440	10
配列番号:89	ニボルマブV _H	113	
配列番号:90	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:91	ニボルマブV _L	107	
配列番号:92	ペムブロリズマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:93	ペムブロリズマブCDR2 (V _H)	17	
配列番号:94	ペムブロリズマブCDR3 (V _H)	11	
配列番号:95	ペムブロリズマブCDR1 (V _L)	15	
配列番号:96	ペムブロリズマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:97	ペムブロリズマブCDR3 (V _L)	9	20
配列番号:98	ペムブロリズマブ重鎖	447	
配列番号:99	ペムブロリズマブV _H	120	
配列番号:100	ペムブロリズマブ軽鎖	218	
配列番号:101	ペムブロリズマブV _L	111	
配列番号:102	ピジリズマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:103	ピジリズマブCDR2 (V _H)	17	
配列番号:104	ピジリズマブCDR3 (V _H)	8	
配列番号:105	ピジリズマブCDR1 (V _L)	10	
配列番号:106	ピジリズマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:107	ピジリズマブCDR3 (V _L)	9	30
配列番号:108	ピジリズマブ重鎖	447	
配列番号:109	ピジリズマブV _H	117	
配列番号:110	ピジリズマブ軽鎖	213	
配列番号:111	ピジリズマブV _L	106	
配列番号:112	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _L)	15	
配列番号:113	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _L)	7	
配列番号:114	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _L)	9	
配列番号:115	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _H)	5	
配列番号:116	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _H)	17	
配列番号:117	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _H)	11	40
配列番号:118	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _L)	15	
配列番号:119	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _L)	7	
配列番号:120	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _L)	9	
配列番号:121	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _H)	5	
配列番号:122	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _H)	17	
配列番号:123	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _H)	11	
配列番号:124	WO2015/026634抗PD-1 V _H	120	

配列番号:125	WO2015/026634抗PD-1 V _L	111	
配列番号:126	WO2015/026634抗PD-1 V _L	109	
配列番号:127	WO2015/026634抗PD-1 V _L	111	
配列番号:128	WO2015/026634抗PD-1重鎖	447	
配列番号:129	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	218	
配列番号:130	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	217	
配列番号:131	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	218	
配列番号:132	デュルバルマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:133	デュルバルマブCDR2 (V _H)	16	10
配列番号:134	デュルバルマブCDR3 (V _H)	12	
配列番号:135	デュルバルマブCDR1 (V _L)	12	
配列番号:136	デュルバルマブCDR2 (V _L)	11	
配列番号:137	デュルバルマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:138	デュルバルマブ重鎖	449	
配列番号:139	デュルバルマブV _H	120	
配列番号:140	デュルバルマブ軽鎖	215	
配列番号:141	デュルバルマブV _L	108	
配列番号:142	アテゾリズマブCDR1 (V _H)	10	
配列番号:143	アテゾリズマブCDR2 (V _H)	18	20
配列番号:144	アテゾリズマブCDR3 (V _H)	9	
配列番号:145	アテゾリズマブCDR1 (V _L)	11	
配列番号:146	アテゾリズマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:147	アテゾリズマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:148	アテゾリズマブ重鎖	448	
配列番号:149	アテゾリズマブV _H	118	
配列番号:150	アテゾリズマブ軽鎖	214	
配列番号:151	アテゾリズマブV _L	107	
配列番号:152	アベルマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:153	アベルマブCDR2 (V _H)	17	30
配列番号:154	アベルマブCDR3 (V _H)	11	
配列番号:155	アベルマブCDR1 (V _L)	14	
配列番号:156	アベルマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:157	アベルマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:158	アベルマブ重鎖	450	
配列番号:159	アベルマブV _H	120	
配列番号:160	アベルマブ軽鎖	216	
配列番号:161	アベルマブV _L	110	
配列番号:162	イピリムマブCDR1 (V _H)	5	
配列番号:163	イピリムマブCDR2 (V _H)	17	40
配列番号:164	イピリムマブCDR3 (V _H)	9	
配列番号:165	イピリムマブCDR1 (V _L)	12	
配列番号:166	イピリムマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:167	イピリムマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:168	イピリムマブ重鎖	448	
配列番号:169	イピリムマブV _H	118	

配列番号:170	イピリムマブ軽鎖	215	
配列番号:171	イピリムマブV _L	108	
配列番号:172	トレメリムマブCDR1 (V _H)	10	
配列番号:173	トレメリムマブCDR2 (V _H)	15	
配列番号:174	トレメリムマブCDR3 (V _H)	16	
配列番号:175	トレメリムマブCDR1 (V _L)	11	
配列番号:176	トレメリムマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:177	トレメリムマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:178	トレメリムマブ重鎖	451	
配列番号:179	トレメリムマブV _H	118	10
配列番号:180	トレメリムマブ軽鎖	214	
配列番号:181	トレメリムマブV _L	107	
配列番号:182	自然のままのヒトB7-H3 (UniProt Acc. No. Q5ZPR3)	534	
配列番号:183	エノブリツズマブCDR1 (V _H)	4	
配列番号:184	エノブリツズマブCDR2 (V _H)	16	
配列番号:185	エノブリツズマブCDR3 (V _H)	13	
配列番号:186	エノブリツズマブCDR1 (V _L)	11	
配列番号:187	エノブリツズマブCDR2 (V _L)	7	
配列番号:188	エノブリツズマブCDR3 (V _L)	9	20
配列番号:189	エノブリツズマブ重鎖	451	
配列番号:190	エノブリツズマブV _H	121	
配列番号:191	エノブリツズマブ軽鎖	214	
配列番号:192	エノブリツズマブV _L	107	
配列番号:193	自然のままのヒトIDO (UniProt Acc No. P14902)	403	
配列番号:194	ヒト成熟KIR2-DL1 (UniProt Acc. No. P43626)	327	
配列番号:196	リリルマブCDR2 (V _H)	16	
配列番号:197	リリルマブCDR3 (V _H)	14	
配列番号:198	リリルマブCDR1 (V _L)	11	
配列番号:199	リリルマブCDR2 (V _L)	7	30
配列番号:200	リリルマブCDR3 (V _L)	9	
配列番号:201	リリルマブ重鎖	450	
配列番号:202	リリルマブV _H	123	
配列番号:203	リリルマブ軽鎖	214	
配列番号:204	リリルマブV _L	109	
配列番号:205	ヒト成熟LAG-3 (UniProt Acc. No. P18627)	503	
配列番号:206	BMS-986016 CDR1 (V _H)	5	
配列番号:207	BMS-986016 CDR2 (V _H)	16	
配列番号:208	BMS-986016 CDR3 (V _H)	12	
配列番号:209	BMS-986016 CDR1 (V _L)	11	40
配列番号:210	BMS-986016 CDR2 (V _L)	7	
配列番号:211	BMS-986016 CDR3 (V _L)	9	
配列番号:212	BMS-986016重鎖	447	
配列番号:213	BMS-986016 V _H	120	
配列番号:214	BMS-986016軽鎖	214	

配列番号:215	BMS-986016 V _L	107	
配列番号:216	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	477	
配列番号:217	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	477	
配列番号:218	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	477	
配列番号:219	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	489	
配列番号:220	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	489	
配列番号:221	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	488	
配列番号:222	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	488	
配列番号:223	抗RANKL-抗PD-1ジアボディ	488	
配列番号:224	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	486	10
配列番号:225	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	486	
配列番号:226	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	485	
配列番号:227	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	485	
配列番号:228	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	483	
配列番号:229	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	483	
配列番号:230	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	482	
配列番号:231	抗RANKL-抗PD-L1ジアボディ	482aa	
配列番号:232	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	483	
配列番号:233	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	483	20
配列番号:234	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	482	
配列番号:235	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	482	
配列番号:236	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	482	
配列番号:237	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	482	
配列番号:238	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	481	
配列番号:239	抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ	481	
配列番号:240	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L hulgG2 KNOB変異、重鎖	473	
配列番号:241	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	225	
配列番号:242	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439	
配列番号:243	ニボルマブ軽鎖	214	30
配列番号:244	デノスマブCrossMAb V _H -V _L hulgG2 KNOB変異、重鎖	452	
配列番号:245	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	246	
配列番号:246	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439	
配列番号:247	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:248	デノスマブCrossMAb Fab hulgG2 KNOB変異、重鎖	461	
配列番号:249	デノスマブCrossMAb Fab 軽鎖	237	
配列番号:250	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439	
配列番号:251	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:252	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L hulgG4 KNOB変異、重鎖	474	
配列番号:253	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	225	40
配列番号:254	ニボルマブ IgG ₄ ホール変異、重鎖	440	
配列番号:255	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:256	デノスマブCrossMAb V _H -V _L hulgG4 KNOB変異、重鎖	453	
配列番号:257	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	246	
配列番号:258	ニボルマブIgG ₄ ホール変異、重鎖	440	
配列番号:259	ニボルマブ軽鎖	214	

配列番号:260	デノスマブCrossMAb Fab huIgG4 KNOBノブ変異、重鎖	462	
配列番号:261	デノスマブCrossMAb Fab軽鎖	237	
配列番号:262	ニボルマブIgG ₄ ホール変異、重鎖	440	
配列番号:263	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:264	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L huIgG1 KNOB変異、重鎖	477	
配列番号:265	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	225	
配列番号:266	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443	
配列番号:267	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:268	デノスマブCrossMAb V _H -V _L huIgG1 KNOBノブ変異、重鎖	456	
配列番号:269	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	246	10
配列番号:270	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443	
配列番号:271	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:272	デノスマブCrossMAb Fab huIgG1 KNOB変異、重鎖	465	
配列番号:273	デノスマブCrossMAb Fab軽鎖	237	
配列番号:274	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443	
配列番号:275	ニボルマブ軽鎖	214	
配列番号:276	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#1	655	
配列番号:277	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#2	218	
配列番号:278	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#3	214	20
配列番号:279	RANKL/CTLA4 FIT-Ig構築物#1	663	
配列番号:280	RANKL/CTLA4 FIT-Ig構築物#3	215	
配列番号:281	RANKL/PD-L1 FIT-Ig構築物#1	663	
配列番号:282	RANKL/PD-L1 FIT-Ig構築物#3	214	
配列番号:283	重鎖IK22-5	135	
配列番号:284	軽鎖IK22-5	126	
配列番号:285	重鎖RMP1-14	138	
配列番号:286	軽鎖RMP1-14	131	
配列番号:287	IK22-5-huIgG1Fc WT重鎖	465	
配列番号:288	IK22-5-huIgG1Fc WT軽鎖	232	30
配列番号:289	RMP1-14 C _{H1} -C _L - huIgG1Fc重鎖	473	
配列番号:290	RMP1-14 C _{H1} -C _L - huIgG1Fc軽鎖	233	

【発明を実施するための形態】

【0021】

1. 定義

特段の規定がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語および学術用語は、本発明が属する業界の業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等ないずれの方法および材料も本発明の実施または試験で用いることができるが、好ましい方法および材料を述べる。本発明の目的のために、以下の用語が下記に定義される。

冠詞“a”および“an”は、当該冠詞の文法的目的語の1つまたは2つ以上（すなわち少なくとも1つ）を指すために本明細書では用いられる。例示すれば、“an element（要素）”は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

“約”によって、数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重さまたは長さが示され、前記は、参照数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重さまたは長さに対して15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2また1%ほど変動する。

“同時発生的投与”もしくは“同時発生的に投与する”または“共同投与”などという

10

20

30

40

50

用語は、2つ以上の活性物質を含む1つの単一組成物の投与、或いは各活性物質が、単一組成物としてそれら全ての活性物質を投与されたときに得られる有効な結果と同等であるように十分に短い期間内で同時期にもしくは同時にまたは逐次的に、別々の組成物としておよび/または別々のルートで投与および/またはデリバリーされることを指す。“同時に”とは、活性薬剤が実質的に同じ時に、望ましくは同じ処方物と一緒に投与されることを意味する。“同時期に”とは、活性薬剤が時間的に接近して投与されること、例えばある薬剤が別の薬剤の約1分から約1日以内前または後に投与されること意味する。任意の同時期が有用である。しかしながら、同時に投与されないときには、薬剤は、たいてい約1分から約8時間以内に、適切には約1時間から約4時間未満内に投与されるであろう。同時期に投与されるときには、薬剤は適切には対象動物の同じ部位に投与される。“同じ部位”という用語は厳密な位置を含むが、約0.5から約15センチメートル以内、好ましくは約0.5から約5センチメートル以内であり得る。本明細書で用いられる“別々に”という用語は、薬剤が、ある間隔で、例えば約1日から数週間または数ヶ月の間隔で投与されることを意味する。活性物質はどちらの順序で投与されてもよい。本明細書で用いられる“逐次的に”という用語は、薬剤が、連続して、例えば数分、数時間、数日または数週間の1つの間隔もしくは複数の間隔で投与されることを意味する。適切な場合には、活性薬剤は規則的な反復サイクルで投与され得る。

10

【0022】

本明細書で用いられるように、“および/または (and/or)”は、関連する列举項目の1つ以上の任意のかつ全ての可能な組合せ、同様にまた別の解釈が存在するときには組合せの除去 (or) を指しかつ包含する。

20

“アンタゴニスト”という用語はもっとも広い意味で用いられ、RANKLまたはICMの1つ以上の生物学的活性もしくは機能 (例えば結合、シグナリング、複合体形成、遊走、侵入、生存もしくは生存活性を含むがただし前記に限定されない) を、任意の環境で (in vitro、in situ、またはin vivoを含む)、部分的もしくは完全に遮断するか、阻害するか、停止するか、低下させるか、減少させるか、妨害するか、障害するか、または中和する任意の分子を含む。同様に、“拮抗する”、“拮抗”などという用語は、例えば上記および本明細書の別の場所で用いられるように、活性または機能の封鎖、阻害、停止、低下、減少、妨害、障害または中和を指すために互換的に用いられる。例示すれば、“拮抗する”は、活性または機能における約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の低下を指すことができる。

30

【0023】

本明細書で用いられる“抗体”という用語は、少なくとも1つの相補性決定領域 (CDR) (特定の抗原 (例えばRANKLまたはICM) と特異的に結合または相互作用する) を含む、抗原結合分子または分子複合体を意味する。“抗体”という用語は免疫グロブリン分子を含み、前記は、4つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの重 (H) 鎖および2つの軽 (L) 鎖を、そのマルチマー (例えばIgM) とともに含む。各重鎖は、重鎖可変領域 (HCVRまたは V_H と略称されることがある) および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (LCVRまたは V_L と略称されることがある) および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は1つのドメイン (C_{L1}) を含む。 V_H および V_L 領域はさらに、超可変領域 (相補性決定領域と称される) に細分され、前記超可変領域にはより保存された領域 (フレームワーク領域 (FR) と称される) が散在する。各 V_H および V_L は3つのCDRおよび4つのFRで構成され、前記はアミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で並んでいる: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本発明の種々の態様で、本発明の抗体 (またはその抗原結合部分) のFRは、ヒト生殖細胞系列の配列と同一でも、または天然にもしくは人工的に改変されてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2つ以上のCDRの並列分析に基づいて規定され得る。

40

抗体には任意のクラスの抗体、例えばIgG、IgA、またはIgM (またはそのサブクラス) が含まれ、いずれの特定のクラスも要求されない。免疫グロブリンは、その重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列にしたがって種々のクラスに割り振ることができる。以下の5つ

50

の主要なクラスの免疫グロブリンが存在し (IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM)、それらのうちいくつかはさらにサブクラス (アイソタイプ) に分けることができる (例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ および κ と呼ばれる。免疫グロブリンの種々のクラスの三次元構造のサブユニット構造は周知である。

【0024】

“抗原結合フラグメント”、“抗原結合部分”、“抗原結合ドメイン”、および“抗原結合部位”という用語は本明細書では互換的に用いられ、抗原結合に加わる抗原結合分子の部分の指す。これらの用語は、天然に存在するか、酵素的に入手できるか、または遺伝子操作された任意のポリペプチドまたは糖タンパク質を含み、前記は抗原と特異的に結合して複合体を形成する。抗体の抗原結合フラグメントは、例えば完全な抗体分子から標準的な技術を用いて誘導することができる。前記技術は、例えばタンパク質分解消化、または組換え遺伝子操作 (抗体可変ドメインおよび場合によって定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を必要とする) である。そのようなDNAは公知であり、例えば、商業的供給源、DNAライブラリー (例えばファージ抗体ライブラリーを含む) から容易に入手可能であり、または合成することができる。DNAを配列決定し、さらに化学的にまたは分子生物学的技術を用いて操作して、例えば1つ以上の可変ドメインおよび/または定常ドメインを適切な立体配置で並べるか、またはコドンの導入、システイン残基の作製、アミノ酸の改変、付加もしくは欠失などを実施することができる。

【0025】

抗原結合フラグメントの非限定的な例には以下が含まれる: (i) Fabフラグメント; (ii) F(ab')₂フラグメント; (iii) Fdフラグメント; (iv) Fvフラグメント; (v) 単鎖フラグメント (scFv) 分子; (vi) dAbフラグメント; および (vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基から成る最小認識ユニット (例えば、単離された相補性決定領域 (CDR)、例えばCDR3ペプチド)、または拘束FR3-CDR3-FR4ペプチド。例えば以下のその他の操作された分子もまた、本明細書で用いられる“抗原結合フラグメント”の表現内に包含される: ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ジアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ (例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど)、小モジュール免疫医薬品 (SMIP)、およびサメ可変IgNARドメイン。

抗体の抗原結合フラグメントは典型的には少なくとも1つの可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは任意のサイズまたはアミノ酸組成が可能であり、概ね1つ以上のフレームワークと隣接するかまたはインフレームの関係にある少なくとも1つのCDRを含む。 V_H ドメインが V_L ドメインと結合される抗原結合フラグメントでは、 V_H および V_L ドメインは互いに任意の適切な配置で位置する。例えば、可変領域はダイマーであり、 V_H - V_H 、 V_H - V_L または V_L - V_L ダイマーを含むことができる。また別には、抗体の抗原結合フラグメントはモノマー V_H または V_L ドメインを含むことができる。

【0026】

ある種の実施態様では、抗体の抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合で連結した少なくとも1つの可変ドメインを含むことができる。本発明の抗体の抗原結合フラグメント内で見出され得る可変および定常ドメインの非限定的な例示的立体配置には以下が含まれる: (i) V_H - C_{H1} ; (ii) V_H - C_{H2} (iii) V_H - C_{H3} ; (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ; (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_{H1} ; (ix) V_L - C_{H2} ; (x) V_L - C_{H3} ; (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ; (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} ; および (xiv) V_L - C_L 。可変および定常ドメインの任意の立体配置で (上記に列挙した任意の例示的立体配置を含む)、可変および定常ドメインは互いに直接連結され得るか、または完全な若しくは部分的なヒンジまたはリンカー領域によって連結され得る。ヒンジ領域は少なくとも2つの (例えば5、10、15、20、40、60または60を超える) アミノ酸から成ることができ、前記は、単一ポリペプチド分子で隣接する可変および/または定常ドメイン間における可撓性または半可撓性連結を生じる。さらにまた、本発明の抗体の抗

10

20

30

40

50

原結合フラグメントは、上記に列挙した可変および定常ドメインの立体配置のいずれかのホモダイマーまたはヘテロダイマー（または他のマルチマー）を含むことができ、前記は、互いにおよび/または1つ以上のモノマーの V_H もしくは V_L ドメインと非共有結合（例えばジスルフィド結合）されてある。

完全な抗体分子に関して、抗原結合フラグメントは一特異性またはマルチ特異性（例えば二重特異性）であり得る。抗体のマルチ特異性抗原結合フラグメントは典型的には少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、ここで、各可変ドメインは、別々の抗原とまたは同じ抗原の異なるエピトープと特異的に結合することができる。任意のマルチ特異性抗原結合分子様式（本明細書に開示する例示的な二重特異性抗原結合分子様式を含む）が、当業界で利用可能な日常的技術を用い本発明の抗体の抗原結合フラグメントの関係で使用するために応用され得る。

10

【0027】

本明細書で用いられる“抗原 (antigen)” およびその文法的同等表現（例えば“抗原性の (antigenic)”）は、液性または細胞性免疫の生成物（例えば抗体分子またはT細胞受容体）と特異的に結合できる化合物、組成物または物質を指す。抗原は任意のタイプの分子であることができ、前記には例えば、ハプテン、単純な中間代謝物質、糖類（例えばオリゴ糖）、脂質、およびホルモンとともに巨大分子、例えば複雑な炭水化物（例えば多糖類）、リン脂質、およびタンパク質が含まれる。抗原の一般的なカテゴリーには、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原生動物および他の寄生生物抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギーおよび移植片拒絶に關与する抗原、毒素、並びに他の雑多な抗原が含まれる。

20

“抗原結合分子”とは、標的抗原に対して結合親和性を有する分子を意味する。この用語は、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメント、および抗原結合活性を示す非免疫グロブリン由来タンパク質フレームワークに及ぶことは理解されるであろう。本発明の実施に有用な代表的抗原結合分子には、抗体およびそれらの抗原結合フラグメントが含まれる。“抗原結合分子”という用語は、抗体および抗体の抗原結合フラグメントを含む。

“二重特異性抗原結合分子”という用語は、同じ抗原上の2つの別個のエピトープまたは2つの異なる抗原と結合する能力を有するマルチ特異性抗原結合分子を指す。二重特異性抗原結合分子は、二価、三価、または四価であり得る。本明細書で用いられるように、“価の (valent) ”、“一価 (valence) ”、“複数価 (valencies) ”または前記語の他の文法的変形は、抗原結合分子の抗原結合部位の数を意味する。これらの抗原認識部位は、同じエピトープまたは異なるエピトープを認識することができる。二価および二重特異性分子は、例えば以下に記載される：Kostelny et al. J Immunol 148 (1992):1547; Pack and Pluckthun Biochemistry 31 (1992) 1579; Gruber et al. J Immunol (1994) 5368; Zhu et al. Protein Sci 6 (1997):781; Hu et al. Cancer Res. 56 (1996):3055; Adams et al. Cancer Res. 53 (1993):4026; およびMcCartney, et al. Protein Eng. 8 (1995):301。三価二重特異性抗原結合分子および四価二重特異性抗原結合分子もまた当業界で公知である。例えば以下を参照されたい：Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 199- 216, 2011。二重特異性抗原結合分子はまた4より高い価数を有することができ、それらもまた本発明の範囲内である。そのような抗原結合分子は、例えばドックアンドロック複合体化方法 (Chang, C.-H. et al. In: Bispecific Antibodies. Kontermann RE, 2011 (上掲書)) によって作製することができる。

30

40

【0028】

“特異的に結合する”または“特異的結合”という語句は、生理学的条件下でバックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンド分子結合の10倍から100倍を超える2つの分子間の結合反応を指す。タンパク質である1つ以上の検出可能な結合薬剤を用いるとき、特異的結合は、タンパク質および他の生物学的物質の不均質集団で当該タンパク質の存在を決定することができる。したがって、指定の免疫アッセイ条件下で、特異的抗原結合分子は特定の抗原性決定基と結合し、それによってその存在を識別する。その

50

ような条件下での抗原性決定基との特異的結合は、当該決定基に対するその特異性について選別される抗原結合分子を必要とする。この選別は、他の分子と交差反応する抗原結合分子を差し引くことによって達成され得る。多様な免疫アッセイ様式を用いて、抗原結合分子（例えば免疫グロブリン）をそれらが特定の抗原と特異的に免疫反応性であるように選別することができる。例えば、固相ELISA免疫アッセイを日常的に用いて、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選別することができる（特異的な免疫反応性を決定するために用いることができる免疫アッセイ様式および条件の説明については、例えば以下を参照されたい：Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988）。結合親和性および特異性を決定する方法もまた当業界では周知である（例えば以下を参照されたい：Harlow and Lane（上掲書）；Friefelder, “*Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology*”（W.H. Freeman and Co. 1976））。 10

分子に関して用いられるとき、“キメラ”という用語は、当該分子が、2つ以上の異なる起原または供給源に由来するか、それらの起原または供給源から入手または単離されたか、またはそれらの起原または供給源を土台とする部分を含むことを意味する。したがって、ポリペプチドが異なる起原の2つ以上のアミノ酸配列を含み、かつ以下の（1）または（2）を含むとき、当該ポリペプチドはキメラである：（1）天然では一緒に見出されないポリペプチド配列（すなわち、アミノ酸配列の少なくとも1つは他方のアミノ酸配列の少なくとも1つに対して異種である）、または（2）天然では隣り合わないアミノ酸配列。

【0029】

“コード配列”とは、遺伝子のポリペプチド生成物または遺伝子の最終mRNA生成物（例えばスプライシング後の遺伝子のmRNA生成物）をコードするために必要な任意の核酸配列を意味する。対照的に、“非コード配列”という用語は、遺伝子のポリペプチド生成物または遺伝子の最終mRNA生成物をコードするために必要ではない任意の核酸配列を指す。 20

本明細書で用いられるように、“相補性決定領域”（CDR、すなわちCDR1、CDR2およびCDR3）という用語は、抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指し、その存在は抗原結合に必要である。各可変ドメインは典型的には3つの領域を有し、それらの領域はCDR1、CDR2およびCDR3として識別される。各相補性決定領域は以下のアミノ酸残基を含むことができる：例えばKabatによって規定される“相補性決定領域”のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインのおよその残基24 - 34（L1）、50 - 56（L2）および89 - 97（L3）並びに重鎖可変ドメインのおよその残基31 - 35（H1）、50 - 65（H2）および95 - 102（H3）；Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、および/または“超可変ループ”のそれら残基（すなわち、軽鎖可変ドメインのおよその残基26 - 32（L1）、50 - 52（L2）および91 - 96（L3）並びに重鎖可変ドメインのおよその残基26 - 32（H1）、53 - 55（H2）および96 - 101（H3）；Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917, 1987）。いくつかの事例では、相補性決定領域は、Kabatが規定したCDR領域および超可変ループの両方のアミノ酸を含むことができる。 30

本明細書で用いられるように、“複合体”という用語は、互いに直接的におよび/または間接的に接触する分子（例えばペプチド、ポリペプチドなど）の集合物または凝集物を指す。具体的な実施態様では、“接触”またはより詳細には“直接的接触”は、強い非共有結合性相互作用（例えばファンデルワールス力、水素結合、イオン性および疎水性相互作用）が分子の相互作用の主流であり得るように2つ以上の分子が十分に接近していることを意味する。そのような実施態様では、分子（例えばペプチドおよびポリペプチド）複合体は、（例えばその構成要素分子の非凝集（または非複合体）状態と比較して）熱力学的に好ましい状態下で形成される。本明細書で用いられる、“ポリペプチド複合体”または“タンパク質複合体”という用語は、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ヘプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマー、ウンデカマー、ドデカマー、またはより高順位のオリゴマーを指す。 40

【0030】

本明細書を通して、文脈がそうではないことを要求しないならば、“含む（comprises, 50

comprising) ” という語は、記載の工程もしくは要素または工程もしくは要素のグループを包含するが、任意の他の工程もしくは要素または工程もしくは要素のグループも排除しないことを暗示すると理解されるであろう。したがって、“含む”などの用語の使用は、列挙要素は必要または必須であるが、他の要素は任意選択であり、存在してもしなくてもよいことを示す。“から成る”とは、“から成る”の語句の後に続くものは何であれ含まれ、かつそれに限定されることを意味する。したがって、“から成る”という語句は、列挙要素が必要であるかまたは必須であり、他の要素は存在し得ないことを示す。“本質的に～から成る”とは、当該語句の後に列挙される要素を含むことを意味し、列挙要素について本開示で指定される活性または作用に干渉もしくは影響しない他の要素に限定される。したがって、“本質的に～から成る”という語句は、列挙要素が必要かつ必須であるが、他の要素は任意選択であり、列挙要素の活性または作用に影響するか否かにかかわらず存在することもしないこともあることを示す。いくつかの実施態様では、サブユニット配列（例えばアミノ酸配列）の記述の中で“から成る”という語句は、当該配列が少なくとも1つの追加される上流のサブユニット（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50または50を超える）および/または少なくとも1つの追加される下流のサブユニット（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50または50を超える）を含むことができることを示し、ここで、上流サブユニットの数および下流サブユニットの数はそれぞれ独立に選択できる。

10

20

【0031】

本明細書で用いられるように、2つ以上の要素または成分またはドメインが、化学的複合体化または組換え手段（例えば遺伝子融合）を含むいずれの手段であれ一緒に結合させるという文脈で、“複合体化する”、“連結する”、“融合する”または“融合”という用語およびそれらの文法的に同等な用語は互換的に用いられる。化学的複合体化（例えば異種二官能性架橋剤を用いる）は当業界で公知である。

本出願で用いられる“定常ドメイン”または“定常領域”という用語は、可変領域以外の抗体のドメインの全体を指す。定常領域は、抗原の結合に直接的に関与しないが、多様な免疫エフェクター機能を示す。

30

【0032】

“構築物”という用語は、異なる供給源に由来する1つ以上の単離された核酸配列を含む組換え遺伝分子を指す。したがって、構築物は、異なる起原の2つ以上の核酸配列が単一核酸分子に組み立てられたキメラ分子であり、以下を含む任意の構築物が含まれる：（1）核酸配列、天然では一緒に見いだされない調節配列およびコード配列を含む（すなわち、ヌクレオチド配列の少なくとも1つは他方のヌクレオチド配列の少なくとも1つに対して異種である）、または（2）天然では隣り合わない機能性RNA分子の部分またはタンパク質をコードする配列、または（3）天然では隣り合わないプロモーターの部分。代表的な構築物には、任意の組換え核酸分子、例えばプラスミド、コスミド、ウイルス、自律的に複製するポリヌクレオチド分子、ファージ、または直鎖状もしくは環状一本鎖もしくは二本鎖DNAまたはRNA核酸分子（1つ以上の核酸分子が作動できるように連結されてある核酸分子を含む）が含まれる。本発明の構築物は概して、問題の核酸配列の発現を指令するために必要なエレメントを含むであろう。前記問題の核酸配列もまた構築物中に収納され、例えば標的核酸配列または調節因子核酸配列である。そのようなエレメントには、問題の核酸配列に作動できるように連結される（したがって当該核酸配列の転写を指令する）制御エレメントも含まれ、さらにしばしばポリアデニル化配列も同様に含まれ得る。本発明のある種の実施態様では、構築物はベクター内に収納され得る。構築物の構成要素に加えて、ベクターは、例えば1つ以上の選別可能マーカー、1つ以上の複製起点（例えば原核細胞および真核細胞起原）、少なくとも1つのマルチクローニング部位、および/または宿主細胞ゲノムへの構築物の安定的な組込みを促進するためのエレメントを含むことができる

40

50

。2つ以上の構築物が、単一核酸分子（例えば単一ベクター）に収納されてもよく、または2つ以上の別々の核酸分子（例えば2つ以上の別々のベクター）に収納されてもよい。“発現構築物”は概して少なくとも1つの制御配列を含み、前記配列は問題のヌクレオチド配列に作動できるように連結される。この態様では、例えば、発現されるべきヌクレオチド配列に作動できるように接続されたプロモーターは、生物またはその部分（宿主細胞を含む）での発現のための発現構築物中で提供される。本発明の実施について、構築物および宿主細胞を調製および使用するための通常的な組成物および方法は、当業者には周知である。例えば以下を参照されたい：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition Volumes 1, 2, and 3. J. F. Sambrook, D. W. Russell, and N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000。

10

【0033】

“制御エレメント”または“制御配列”とは、作動できるように連結されたコード配列の特定の宿主細胞での発現に必要な核酸配列（例えばDNA）を意味する。例えば原核細胞に適切な制御配列には、プロモーターおよび場合によってcis-作動性配列、例えばオペレーター配列およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞に適切な制御配列には、転写制御配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、転写エンハンサー、翻訳制御配列、例えば翻訳エンハンサーおよび内部リボソーム結合部位（IRES）、mRNAの安定性を調節する核酸配列の他に、標的誘導配列（転写されたポリヌクレオチドによってコードされる生成物を細胞の細胞内区画または細胞外環境に誘導する）が含まれる。

“対応する”または“対応”とは、参照核酸配列に対して実質的な配列同一性を示す核酸配列を意味するか（例えば、参照核酸配列の全部または部分に対して、少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%または100%もの配列同一性）、または参照アミノ酸配列に対して実質的な配列類似性または同一性を示すアミノ酸配列を意味する（例えば、参照アミノ酸配列の全部または部分に対して、少なくとも約50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%または100%もの配列類似性または同一性）。

20

【0034】

“細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）”（ALPS5、CD、CD152、CELIAC3、CTLA-4、GRD4、GSE、IDDM12としてもまた知られている）は、免疫チェックポイントとして機能し、免疫応答をダウンレギュレートするタンパク質受容体を指す。CTLA4は、T調節性細胞（Treg）では構成的に発現されるが、通常のT細胞では活性化後にアップレギュレートされるだけである。前記は、抗原提示細胞の表面でCD80およびCD86と結合するとき“オフ”スイッチとして機能する。本明細書で用いられる“CTLA4”という用語には、ヒトCTLA4（hCTLA4）、CTLA4の変種、アイソフォーム、および種ホモログ配列、およびhCTLA4と少なくとも1つの共通エピトープを有するアナログが含まれる。完全なhCTLA4はUniProt Acc. No. P16410で見出すことができる。

30

“DART”（二親和性再標的誘導試薬（dual affinity retargeting reagent））は、少なくとも2つのポリペプチド鎖を含む免疫グロブリン分子を指し、前記2つのポリペプチド鎖は結合して（特に共有結合的相互作用を介して）、少なくとも2つのエピトープ結合部位を形成する（前記部位は同じまたは異なるエピトープを認識できる）。DARTのポリペプチド鎖の各々は、免疫グロブリン軽鎖可変領域および免疫グロブリン重鎖可変領域を含むが、これらの領域は相互作用してエピトープ結合部位を形成することはない。むしろ、DARTポリペプチド鎖の一方の（例えば第一の）免疫グロブリン重鎖可変領域は、異なる（例えば第二の）DARTポリペプチド鎖の免疫グロブリン軽鎖可変領域と相互作用してエピトープ結合部位を形成する。同様に、DARTポリペプチド鎖の一方の（例えば第一の）免疫グロブリン軽鎖可変領域は、異なる（例えば第二の）DARTポリペプチド鎖の免疫グロブリン重鎖可変領域と相互作用してエピトープ結合部位を形成する。DARTは、一特異性、二重特

40

50

異性、三重特異性などであることができ、したがって同時に1つ、2つ、3つまたは4つを超える異なるエピトープ（前記は同じまたは異なる抗原であり得る）と結合することができる。加えて、DARTは、一価、二価、三価、四価、五価、六価などであることができ、したがって同時に1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは7つを超える分子と結合できる。これら2つはDARTの属性を決定し、すなわち特異性の程度および価数は一緒になって、例えば四価（すなわち4セットのエピトープと結合できる）の二重特異性抗体（すなわち2つのエピトープと結合できる）を生成することができる。DART分子は以下でより詳細に開示される：国際PCT公開No. WO 2006/113665、WO 2008/157379、およびWO 2010/080538。

【0035】

疾患または症状（例えば癌）の治療または予防の関係で、“有効量”とは、一用量でのまたは逐次もしくは徐放系の部分としてのある量の活性薬剤の対象動物への投与を意味し、前記量は当該疾患または症状の治療または予防に有効である。有効量は、対象動物の健康および身体の状態並びに治療されるべき個体の分類学上のグループ、組成物の処方、医学的状況の評価、並びに他の関連要件にしたがって変動するであろう。

本明細書で用いられるように、“コードする”、“コードの”などの用語は、核酸が別の核酸またはポリペプチドを提供する能力を指す。例えば、核酸が転写されおよび/または翻訳されてポリペプチドを生成することができるならば、または転写および/または翻訳されてポリペプチドを生じ得る形態に核酸が処理されることが可能ならば、当該核酸配列は、ポリペプチドを“コードする”と称される。そのような核酸配列は、コード配列またはコード配列および非コード配列の両方を含むことができる。したがって、“コードする”、“コードの”などの用語は、DNA分子の転写から生じるRNA生成物、RNA分子の翻訳から生じるタンパク質、DNA分子が転写されてRNA生成物を形成し続いてRNA生成物の翻訳から生じるタンパク質、またはDNA分子が転写されてRNA生成物を提供しRNA生成物が処理されて処理RNA生成物（例えばmRNA）を提供し続いて処理RNA生成物の翻訳から生じるタンパク質を含む。

【0036】

“エピトープ”および“抗原決定基”という用語は本明細書では互換的に用いられ、抗原結合分子またはその抗原結合フラグメントが結合する抗原の領域を指す。エピトープは、連続するアミノ酸（線状エピトープ）またはタンパク質の三次元折畳みによって並置される不連続アミノ酸（立体エピトープ）の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは典型的には変性性溶媒への暴露に存続するが、一方、三次元折畳みによって形成されるエピトープは典型的には変性性溶媒による処理で失われる。典型的には、エピトープは、固有の空間配座の少なくとも3、より通常では少なくとも5または8-10アミノ酸を含む。エピトープの空間配座を決定する方法は、例えばx線結晶学および二次元核磁気共鳴を含む（例えば以下を参照されたい：Morris G.E., Epitope Mapping Protocols, Meth Mol Biol, 66, 1996）。エピトープマッピングの好ましい方法は表面プラズモン共鳴である。二重特異性抗体は二価、三価または四価であり得る。二重特異性抗体の関係で本明細書で用いられるとき、“価の”、“一価”、“複数価”または前記語の他の文法的変形は、抗体分子の抗原結合部位の数を意味する。これらの抗原認識部位は、同じエピトープまたは異なるエピトープを認識することができる。二価および二重特異性分子は、例えば以下に記載される：Kostelny et al. (1992) J Immunol 148:1547; Pack and Pluckthun (1992) Biochemistry 31 1579; Hollinger et al., 1993 (上掲書); Gruber et al. J Immunol 5368; Zhu et al. (1997) Protein Sci 6:781; Hu et al. (1996) Cancer Res. 56:3055; Adams et al. (1993) Cancer Res. 53:4026; およびMcCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8:301。三価二重特異性抗体および四価二重特異性抗体もまた当業界で公知である。例えば以下を参照されたい：Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 199-216, 2011。二重特異性抗体はまた4より高い価数を有することができ、それらもまた本発明の範囲内である。そのような抗体は、例えばドックアンドロック複合体化方法（以下を参照されたい：Chang, C.-H. et al. In: Bispecific Antibodies. Kontermann R E (ed.), Springer Heid

elberg Dordrecht London New York, pp. 199-216, 2011) によって作製することができる。

【0037】

本明細書で用いられるように、“機能”、“機能性”などという用語は、生物学機能、酵素機能、または治療機能を指す。

“フレームワーク領域”(FR)はCDR残基以外の可変ドメインである。典型的には、各可変ドメインは、FR1、FR2、FR3およびFR4として識別される4つのFRを有する。CDRがKabatにしたがって規定される場合、軽鎖FR残基は、残基およそ1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)、および98-107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は、重鎖残基内の残基およそ1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)、および103-113(HCFR4)に位置する。CDRが超可変ループのアミノ酸残基を含む場合、軽鎖FR残基は、軽鎖内の残基およそ1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)、および97-107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は、重鎖残基内の残基およそ1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)、および102-113(HCFR4)に位置する。いくつかの事例では、CDRが、Kabatに規定されるCDRおよび超可変ループのCDRの両方のアミノ酸を含むとき、FR残基はそれにしたがって調整されるであろう。例えば、CDRH1がアミノ酸H26-H35を含むとき、重鎖FR1残基は1-25位に存在し、FR2残基は36-49位に存在する。

【0038】

本明細書で用いられるように、細胞マーカーまたはバイオマーカーの測定に関して“より高い”という用語は、参照レベルと比較して、バイオマーカー測定レベルにおける統計的に有意かつ測定可能な相違を指し、この場合バイオマーカー測定値は参照レベルより高い。相違は、適切には少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%である。

本明細書で用いられるように、細胞マーカーまたはバイオマーカーの測定に関して“より低い”という用語は、参照レベルと比較して、バイオマーカー測定レベルにおける統計的に有意かつ測定可能な相違を指し、この場合バイオマーカー測定値は参照レベル未満である。相違は、適切には、少なくとも約10%、または少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%である。

“免疫チェックポイント分子”という用語は、免疫チェックポイントとして機能する受容体およびリガンドの両方を含む。免疫チェックポイントは、免疫系がそれ自身の身体を攻撃することを防ぐ免疫脱出メカニズムである。免疫チェックポイント受容体はT細胞上に存在し、抗原提示細胞上で発現される免疫チェックポイントリガンドと相互作用する。T細胞はMHC分子上に提示される抗原を認識して活性化され免疫反応を生じ、一方、上記と並行して発生する免疫チェックポイント受容体およびリガンド間の相互作用はT細胞の活性化を制御する。例示的な免疫チェックポイント分子には以下が含まれる：PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、B7-H3、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、TNFRS4(OX40、CD134)、TNFSF4(OX40L)、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL(CD137L)、4-1BB(CD137)、CD70、CD27L、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、SIRP-1、IAP(CD47)、BLAST-1(CD48)、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HHLA2、VEG1、TNFRS25、ICOLG(B7RP1)およびTIGIT(ただし前記に限定されない)。具体的な実施態様では、免疫チェックポイント分子はPD-1、PD-L1またはCTLA4である。

【0039】

本発明の係で“免疫エフェクター細胞”という用語は、免疫反応時にエフェクター機能を示す細胞と関係がある。例えば、そのような細胞は、サイトカインおよび/またはケモカインを分泌し、微生物を殺滅し、抗体を分泌し、感染細胞または癌細胞を認識し、場合によってそのような細胞を排除する。例えば、免疫エフェクター細胞は、T細胞(細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、腫瘍浸潤T細胞)、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、

リンホカイン活性化キラー（LAK）細胞、好中球、マクロファージおよび樹状細胞である。

本発明の関係では、“免疫エフェクター機能”という用語は、免疫系の構成要素によって媒介される任意の機能を含み、前記機能は、例えば、ウイルス感染細胞または腫瘍細胞の殺滅、または腫瘍増殖阻害および/または腫瘍発達阻害（腫瘍播種および転移の阻害を含む）をもたらす。好ましくは、本発明の関係の免疫エフェクター機能はT細胞媒介エフェクター機能である。そのような機能は以下を含む：ヘルパーT細胞（CD4⁺ T細胞）に事例では、MHCクラスII分子に関係する抗原に由来する抗原または抗原ペプチドのT細胞受容体による認識、サイトカインの放出および/またはCD8⁺リンパ球（CTL）および/またはB細胞の活性化、並びにCTLの事例では、MHCクラスI分子に関係する抗原に由来する抗原または抗原ペプチドのT細胞受容体による認識、MHCクラスI分子の関係で提示される細胞の排除（すなわち、例えばアポトーシスまたはパーフォリン媒介細胞溶解を介するクラスI MHCによる抗原提示を特徴とする細胞の排除）、サイトカイン（例えばIFN- γ およびTNF- α ）の産生、および抗原発現標的細胞の特異的な細胞溶解性殺滅。

10

20

30

40

50

【0040】

“免疫系”という用語は、細胞、分子性成分およびメカニズム（それぞれ適応免疫および先天免疫の抗原特異的および非特異的カテゴリーを含む）を指し、前記は、損傷および傷害並びに物質に対する防御を提供し、後者は、抗原性分子（腫瘍、病原体および自己反応性細胞を含むが、ただしこれらに限定されない）を含む。“適応免疫系”とは、数日にわたって出現し特異的抗原と反応してこれを除去する抗原特異性細胞、分子性成分およびメカニズムを指す。適応免疫系は宿主の生涯を通して発達する。適応免疫系は白血球をベースにし、以下の2つの主要なセクションに分けられる：液性免疫系（主としてB細胞によって産生される免疫グロブリンを介して作用する）および細胞媒介免疫系（主としてT細胞を介して機能する）。

“リンカー”とは、2つの分子を接続し、しばしば所望の立体配置に2つの分子を配置するために役立つ分子または分子のグループ（例えばモノマーまたはポリマー）を意味する。具体的な実施態様では、“ペプチドリリンカー”は、2つのタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、領域またはモチーフを接続するアミノ酸配列を指し、前記は、抗原結合フラグメントがそれらの同族エピトープと特異的に結合できるようにそれらの間隔に適合するスペーサー機能を提供することができる。ある種の実施態様では、リンカーは、約2から約35アミノ酸、例えば約4から約20アミノ酸、または約8から約15アミノ酸、または約15から約25アミノ酸で構成される。

【0041】

本明細書で用いられるように、“ミクロ環境”という用語は、生物学的細胞、組織または器官の結合性支持性枠組みを指す。本明細書で用いられるように、“腫瘍ミクロ環境”または“TME”という用語は腫瘍環境の任意のかつ全ての要素を指し、前記要素は、生存および/または拡張および/または拡散の悪性プロセスのために構造的および機能的環境を創出する。一般的に、“腫瘍ミクロ環境”または“TME”という用語は腫瘍が存在する細胞環境を指し、線維芽細胞、白血球および内皮細胞並びに細胞外マトリックス（ECM）を取り巻く直近の領域を含む。したがって、腫瘍ミクロ環境の細胞は、非悪性細胞（悪性細胞の増殖および生存を支える）と密接に関係する悪性細胞を含む。非悪性細胞（間質細胞とも呼ばれる）は、悪性細胞と同じ細胞間隙または悪性細胞の基部に隣接する細胞間隙を占めまたは蓄積し、腫瘍細胞増殖または生存を調節する。“間質細胞”という用語は線維芽細胞、白血球および血管細胞を含む。腫瘍ミクロ環境の非悪性細胞には、線維芽細胞、上皮細胞、血管細胞（血管およびリンパ管の内皮細胞および周皮細胞を含む）、在留性および/または補充される炎症細胞並びに免疫細胞（例えばマクロファージ、樹状細胞、顆粒球、リンパ球など）が含まれる。これらの細胞および特に活性化された線維芽細胞は転移の発達に活発に加わる。

【0042】

本明細書で用いられる“モノクローナル抗体”という用語は、実質的に均質な抗体集団

から入手される抗体を指す（すなわち、集団を構成する個々の抗体は同一であるが、わずかな量で存在し得る可能な天然に出現する変異は除かれる）。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原エピトープに向けられる。修飾語の“モノクローナル”は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の生産を必要とすると解されるべきではない。例えば、本発明にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、Kohlerら（Kohler et al., Nature 256: 495, 1975）によって最初に記載されたハイブリドーマによって作製され、上記に示す体細胞ハイブリダイゼーションによって改変することができる。或いは、モノクローナル抗体は他の組換えDNA方法（例えばU.S. Patent No. 4,816,567に記載）によって作製され得る。

“マルチ特異性抗原結合分子”という用語はそのもっとも広い意味で用いられ、特に少なくとも2つ（例えば2、3、4など）の異なるエピトープに対して特異性を有する抗原結合分子をカバーする（すなわち、1つの抗原の2つ以上の異なるエピトープと特異的に結合できるか、または2つ以上の異なる抗原のエピトープと特異的に結合できる）。

【0043】

マーカーに適用される、“陰性”、“陽性”及び“低”発現レベルは、以下のように定義される。陰性発現（すなわち“-”）を有するかまたは“発現を欠く”細胞は、完全な抗体染色カクテル（追加の蛍光発光チャンネルで問題の他のタンパク質を標識する）の存在下の蛍光チャンネルでアイソタイプコントロールにより観察される発現の95パーセントイル未満またはそれと同等の発現を示す細胞と本明細書では定義される。陰性事象を規定するこの手順は、“蛍光マイナスワン（fluorescence minus one）”（または“FMO”）染色と称されることは当業者には理解されるであろう。上記に記載したFMO染色手順を用いてアイソタイプコントロール抗体で観察される発現の95パーセントイルより高い発現を有する細胞は、本明細書では“陽性”（すなわち“+”）と定義される。“陽性”と広く規定される多様な集団が存在する。例えば、低い発現（すなわち“低”または“lo”）を有する細胞は概ね、FMO染色を用いアイソタイプコントロール抗体で決定される95パーセントイルを超える観察発現を有し、かつ上記に記載のFMO染色手順を用いてアイソタイプコントロール抗体で観察される発現の95パーセントイルの一標準偏差内の細胞と定義される。ICMに関して“低”または“lo”という用語は、1つ以上の他の別個の細胞または細胞集団（例えば免疫エフェクター細胞、例えばT細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T（NKT）細胞、単球、マクロファージ、および樹状細胞（DC）とともに腫瘍細胞）よりも低レベルでICMを発現する細胞または細胞集団（例えばTreg細胞（腫瘍ミクロ環境中のT細胞を含む））を指す。例えば、腫瘍ミクロ環境で、CTLA4はPD-1よりも有意に高いレベルでTreg上で発現され、PD-1は、免疫エフェクター細胞（エフェクターT細胞を含む）でTreg細胞上よりも有意に高いレベルで発現されることは公知である（Jacobs et al., 2009. Neuro-Oncology 11(4): 394-402）。

【0044】

本明細書で用いられる“作動できるように接続”または“作動できるように連結”という用語は、該当する複数の構成要素が、それらの意図された態様で機能することが許容される関係にある並列配置を指す。例えば、問題のヌクレオチド配列（例えばコードおよび/または非コード配列）に“作動できるように連結”された調節配列（例えばプロモーター）は、問題のヌクレオチド配列に対して当該制御配列の配置および/または向きが当該制御配列と適合する条件下で当該ヌクレオチド配列の発現を許容することをいう。制御配列は、それらが機能してヌクレオチド配列の発現を指令する限り問題のヌクレオチド配列と連続している必要はない。したがって、例えば、介在非コード配列（例えば翻訳されないが転写される配列）がプロモーターとコード配列との間に存在することが可能であり、プロモーター配列はなおコード配列に“作動できるように連結”されている。同様に、第一の抗原結合フラグメントを第二の抗原結合フラグメントに“作動できるように接続”することは、各抗原結合フラグメントのその同族エピトープとの結合を許容する態様にある抗原結合フラグメントの配置および/または向きを包含する。

“医薬的に許容できる担体”とは、生物学的に或いは別の態様で望ましい物質、すなわ

ち何らかのまたは実質的な有害反応を引き起こすことなく選択した活性薬剤とともに対象動物に投与できる物質で構成される医薬ビヒクルを意味する。担体は、賦形剤および他の添加物（例えば希釈剤、洗剤、着色剤、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、保存料など）を含む。

【 0 0 4 5 】

“ プログラム死1 (PD-1) ” (CD279、PD1、SLEB2、hPD-1、hPD-1およびhSLE1としても知られている) は、CD28ファミリーに属する免疫阻害受容体を指す。PD-1は、in vivoで以前に活性化されたT細胞上で主として発現され、2つのリガンド (PD-L1およびPD-L2) に結合する。“ PD-1 ” という用語は、PD-1のフラグメントとともに関連ペプチドを含み、前記には、対立遺伝子変種、スプライス変種、誘導変種、置換変種、欠失変種および/または挿入変種、融合ポリペプチド、および種間ホモログが含まれる (ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、PD-1ポリペプチドは、末端残基、例えばリーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基および/または融合タンパク質残基を含む (ただしこれらに限定されない)。好ましい実施態様では、“ PD-1 ” には、ヒトPD-1 (hPD-1)、変種、アイソフォーム、およびhPD-1の種ホモログ、並びにhPD-1と共通の少なくとも1つのエピトープを有するアナログが含まれる。完全なhPD-1配列はGenBank Accession No. U64863で見出され得る。

10

“ プログラム死リガンド-1 (PD-L1) ” (CD274、B7-H、B7H1、PDCD1L1、PDCD1LG1、PDL1およびCD274分子としても知られている) は、PD-1に対する2つの細胞表面糖タンパク質の1つで (他はPD-L2である)、PD-L1は、PD-1との結合に際してT細胞活性化およびサイトカイン分泌をダウンレギュレートする。“ PD-L1 ” という用語は、PD-L1のフラグメントとともに関連ペプチドを含み、前記には、対立遺伝子変種、スプライス変種、誘導変種、置換変種、欠失変種および/または挿入変種、融合ポリペプチド、および種間ホモログが含まれる (ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、PD-1ポリペプチドは、末端残基、例えばリーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基および/または融合タンパク質残基を含む (ただしこれらに限定されない)。好ましい実施態様では、本明細書で用いられる“ PD-L1 ” には、ヒトPD-L1 (hPD-L1)、変種、アイソフォーム、およびhPD-L1の種ホモログ、並びにhPD-L1と共通の少なくとも1つのエピトープを有するアナログが含まれる。完全なhPD-L1配列はGenBank Accession No. Q9NZQ7で見出され得る。

20

30

【 0 0 4 6 】

“ ポリペプチド ”、“ タンパク質分子 ”、“ ペプチド ” および “ タンパク質 ” という用語は本明細書では互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマー並びに前記の変種および合成アナログを指す。したがって、これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が合成で天然には存在しないアミノ酸 (例えば対応する天然に存在するアミノ酸の化学的アナログ) であるアミノ酸ポリマーとともに、天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。これらの用語は、改変 (例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など) を排除しない。対象タンパク質分子の可溶性は特に有用である。本定義に含まれるものは、例えば1つ以上のアミノ酸アナログ (例えば非天然アミノ酸) を含むポリペプチドまたは置換結合を有するポリペプチドである。

40

“ NF- κ Bの活性化因子受容体リガンド (RANKL) ” (腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー11 (TNFSF11)、TNF関連活性化誘発サイトカイン (TRANCE)、オステオプロテグリンリガンド (OPGL) および破骨細胞分化因子 (ODF) としても知られている) は、とりわけNF- κ Bの活性化因子受容体 (RANK) との結合を介して破骨細胞形成を促進するポリペプチドを指す。“ RANKL ” という用語は、RANKLのフラグメントとともに関連ペプチドを含み、前記には、対立遺伝子変種、スプライス変種、誘導変種、置換変種、欠失変種および/または挿入変種、融合ポリペプチド、および種間ホモログが含まれる (ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、RANKLポリペプチドは、末端残基、例えばリーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基および/または融合タンパク質残基を含む (ただしこれらに限定されない)。RANKLという

50

用語には、ヒトRANKL (hRANKL)、変種、アイソフォーム、およびhRANKLの種ホモログ、並びにhRANKLと共通の少なくとも1つのエピトープを有するアナログが含まれる。完全なhRANKL配列はUniProt Accession No. 014788で見出され得る。

【0047】

“NF- κ Bの活性化因子受容体(RANK)”(腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー11a、NF- κ Bの活性化因子、CD265、FEO、LOH18CR1、ODFR、OFE、OPTB7、OSTS、PDB2、およびTRANCERとしても知られている)は、RANKリガンド(RANKL)に対する受容体およびRANK/RANKL/オステオプロテグリン(OPG)シグナリング経路の部分であるポリペプチドを指し、前記は破骨細胞の分化および活性化を調節する。前記は、骨再形成および修復、免疫細胞機能、リンパ節発達、温度調節、および乳腺発達に関与する。“RANK”という用語は、RANKのフラグメントとともに関連ペプチドを含み、前記には、対立遺伝子変種、スプライス変種、誘導変種、置換変種、欠失変種および/または挿入変種、融合ポリペプチド、および種間ホモログが含まれる(ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、RANKポリペプチドは、末端残基、例えばリーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基および/または融合タンパク質残基を含む(ただしこれらに限定されない)。RANKという用語には、ヒトRANK(hRANK)、変種、アイソフォーム、およびhRANKの種ホモログ、並びにhRANKと共通の少なくとも1つのエピトープを有するアナログが含まれる。完全なhRANKL配列はUniProt Accession No. Q9Y6Q6で見出され得る。

【0048】

本明細書で用いられるように、“組換え”抗原結合分子は、その生成が所望の抗体構造をコードする非天然DNA配列の生物での発現を必要とする任意の抗原結合分子を意味し、その非限定的な例には、タンデムscFv(taFvまたはscFv₂)、ジアボディ、dAb₂/VHH₂、ノブイントゥホール(knob into holes)誘導体、SEED-IgG、ヘテロFc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、トリボディ、DNL-F(ab)₃、scFv₃-CH1/CL、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDB-CH₃、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhIx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、CrossMAb、MAb₂、FIT-Ig、および前記の組合せが含まれる。

本明細書で用いられるように、“調節性T細胞”または“Treg”は、他のT細胞(エフェクターT細胞を含む)とともに先天的免疫系細胞の活性化を負の方向に調節するT細胞を指す。Treg細胞は、エフェクターT細胞応答の持続的抑制を特徴とする。いくつかの特徴では、TregはCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞である。

本明細書で互換的に用いられる“対象動物”、“患者”、“宿主”または“個体”という用語は、治療または予防が所望される、任意の対象動物、特に脊椎を有する対象動物、より具体的には哺乳動物の対象動物を指す。本発明の範囲に含まれる適切な脊椎動物には霊長類を含む脊索動物亜門の以下の任意のメンバーが含まれる(ただし前記に限定されない)。例えば人間、猿、類人猿では、猿の種、例えばマカク(Macaca)属(例えばカニクイザル、例えばマカカ・ファシクラリス(Macaca fascicularis))、および/またはアカゲザル(マカカ・ムラッタ(Macaca mulatta))およびヒヒ(パピオ・ウルシヌス(Papio ursinus))、その他にマーモセット(カリスリクス(Callithrix)属由来の種)、リスザル(サイミリ(Saimiri)属由来の種)、およびタマリン(サギヌス(Saguinus)属由来の種)、とともに類人猿の種、例えばチンパンジー(パン・トログロディテス(Pan troglodytes))；げっ歯類では、例えばマウス、ラット、モルモット；ウサギ類では、例えばウサギ、ノウサギ；ウシ類では例えば畜牛；ヒツジ類では例えばヒツジ；ヤギ類では例えばヤギ；ブタ類では例えばブタ；ウマ類では例えばウマ；イヌ類では例えばイヌ；ネコ類では例えばネコ；鳥類では例えばニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、カモ、ペットの鳥類(例えばカナリア、セキセイインコなど)；海洋哺乳動物では例えばイルカ、クジラ；爬虫類ではヘビ、カエル、トカゲなど；および魚類。好ましい対象動物は、癌に対する免疫応答を引き出す必要がある人間である。しかしながら、前述の用語は症状が存在すること暗示しないことは理解されるであろう。

【0049】

“治療”、“治療する”、“治療される”などは、予防的および治療的処置の両方を含むことを意味し、前記処置は、(1)標的抗原の存在または異常発現に随伴する疾患もしくはは症状、または(2)当該疾患もしくはは症状の徴候、または(3)当該疾患もしくはは症状の素因の発達または進行を防止し、軽減し、改変し、逆転させ、影響を付与し、阻害すること、前記を緩和または治療することを含み(ただし前記に限定されない)、対象動物への防御免疫の付与を含む。

本明細書で用いられるように、“治療薬組合せ(併用)”という用語は、1つ以上の活性な医薬物質の組合せ、すなわち同時発生的に投与されるときに(すなわち併用療法)治療有用性を示す化合物を指す。したがって、化合物は単一組成物の形態にあるか(適切には化合物の混合物を含み)、または別々の組成物の形態にあることが可能である。典型的には、本発明の治療薬組合せ中のそのような化合物の各々は、当該化合物および医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物として存在するであろう。本発明の治療薬組合せ中の化合物は、各治療薬化合物の有益な作用が対象動物によって所望の時期に認識される投薬形で提供される。

本明細書で用いられるように、“三重特異性抗体”という用語は、第一のエピトープに対する特異性を有する少なくとも1つの第一の抗原結合ドメイン、第二のエピトープに対する特異性を有する第二の抗原結合ドメイン、および第三のエピトープに対する特異性を有する第三の抗原結合ドメインを含む抗体を指す(例えばRANKL並びにCTLA4、PD-1およびPD-L1の任意の2つ)。第一、第二および第三のエピトープは同じではないが(すなわち前記は異なる標的(例えばタンパク質)である)、前記はいずれも単一細胞にまたは少なくとも2つの細胞に存在することができる。

【0050】

本明細書で用いられる“腫瘍”という用語は、任意の新形成細胞の成長および増殖生長(悪性または良性を問わない)、並びに全ての前癌性および癌性細胞および組織を指す。“癌”および“癌性”は、典型的には無制御な細胞の増殖によって部分的に特徴づけられる哺乳動物における生理学的状態を指すかまたは前記をいう。本明細書で用いられるように、“癌”という用語は、非転移および転移癌を指し、初期および後期癌を含む。“前癌性”という用語は、典型的には癌に先行するかまたは癌に発達する状態または増殖を指す。“非転移”とは、良性であるかまたは原発部位にとどまりリンパ管もしくはは血管系または原発部位以外の他の組織に侵入していない癌を意味する。一般的には、非転移癌は、0、IまたはII期癌、場合によってIII期癌のいずれかである。“初期癌”とは、侵襲または転移していないか、または0、IまたはII期癌と分類される癌を意味する。“後期癌”という用語は、一般的にはIII期またはIV期癌を指すが、II期癌またはII期癌の亜期もまた指すことができる。II期癌を初期癌または後期癌として分類するか否かは、具体的な癌のタイプに左右されることは当業者には理解されるであろう。例示的な癌の例には以下が含まれる(ただしそれらに限定されない):乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌、肝細胞癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、尿路癌、甲状腺癌、腎癌、癌腫、メラノーマ、脳の癌、非小細胞肺癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、結腸癌、および食道癌。例示的な実施態様では、癌は、前立腺癌、肺癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、および骨の癌から選択される。

【0051】

“ベクター”とは、例えばプラスミド、バクテリオファージまたは植物ウイルスに由来し、その中に核酸配列を挿入するかまたはクローン化することができる核酸分子(好ましくはDNA分子)を意味する。ベクターは、好ましくは1つ以上の固有の制限部位を含み、所定の宿主細胞(標的細胞もしくはは組織または前記の前駆細胞もしくはは組織を含む)で自律的に複製する能力を有し得るか、またはクローン化配列が再生できるように当該所定の宿主のゲノムに組み込まれ得る。したがって、ベクターは、自律的に複製するベクター(すなわち余剰染色体性実体として存在するベクター)であり、その複製は染色体の複製に依存しない、例えば直鎖状または閉鎖環状プラスミド、余剰染色体性エレメント、ミニ染色

10

20

30

40

50

体、または人工染色体であり得る。ベクターは、自己複製を担保する任意の手段を含むことができる。また別には、ベクターは、宿主細胞に導入されるときゲノムに組み込まれ、それを組み込んだ染色体とともに複製されるものであり得る。ベクター系は、単一のベクターもしくはプラスミド、2つ以上のベクターもしくはプラスミドを含むことができ、それらは、宿主細胞のゲノムまたはトランスポゾンに導入されるべき全DNAをまとめて含む。ベクターの選択は、典型的には、ベクターが導入される宿主細胞とのベクターの適合性に左右されるであろう。ベクターはまた、選別マーカー、例えば、適切な形質転換体の選別に用いることができる抗生物質耐性遺伝子を含むことができる。そのような耐性遺伝子の例は当業者には周知である。

本明細書に記載の各実施態様は、特段の規定がなければ実施態様の各々およびいずれの実施態様にも準用され得る。

【0052】

2. 略語

以下の略語が本出願を通して用いられる：

aa = アミノ酸

CDR = 相補性決定領域

CTLA4 = 細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4

Fc = 定常領域

FR = フレームワーク

h = 時間

ICM = 免疫チェックポイント分子

Ig = 免疫グロブリン

MAb = モノクローナル抗体

PD-1 = プログラム死1

PD-L1 = プログラム死リガンド1

RANKL = NF- κ Bの活性化因子受容体リガンド

s = 秒

V_H = 重鎖可変ドメイン

V_L = 軽鎖可変ドメイン

【0053】

3. 治療薬組合せ

本発明は治療薬組合せを提供し、前記組み合わせは、とりわけ癌に対する免疫応答を対象動物において刺激または増大させるために有用である。これらの組成物は、概ね(1)NF- κ Bの活性化因子受容体リガンド(RANKL)アンタゴニスト、および(2)少なくとも1つの免疫チェックポイント分子(ICM)アンタゴニストを利用する。当該組成物は、これら2つの経路間における新規に識別された相乗作用を利用し、前記相乗作用は、腫瘍または癌部位におけるCD8⁺T細胞の局在化の増加をもたらす。有利には、前記相乗性組成物は適切にはエフェクター細胞機能の増強を刺激し、例えば、増強されるエフェクターT細胞機能にはTh1型サイトカイン(例えばIFN- γ および/またはIL-2)の生成および多機能性T細胞の割合の増加が含まれる。

いくつかの好ましい実施態様では、本発明のアンタゴニスト(すなわち、RANKLアンタゴニストおよびICMアンタゴニスト)は抗原結合分子である。適切な抗原結合分子は、組換え抗体、モノクローナル抗体(MAb)、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、およびそのような抗体の抗原結合フラグメントを含む抗体およびそれらの抗原結合フラグメントから選択できる。

人間での適用のために、もともと他の種(例えばマウス)に由来する抗体の免疫原性を低下させることが所望される。これらは、キメラ抗体の構築によって、または“ヒト化”と呼ばれるプロセスによって実施できる。ここでは、“キメラ抗体”は、異なる種(例えばヒト)に由来するドメイン(例えば定常ドメイン)に融合した1つの種(例えばマウス)に由来するドメイン(例えば可変ドメイン)を含む抗体であると理解される。

【 0 0 5 4 】

“ ヒト化抗体 ” は、非ヒト（例えばネズミ）抗体の配列とともにヒト抗体の配列を含む抗体の形態を指す。そのような抗体はキメラ抗体であり、前記は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ（典型的には2つ）の可変ドメインの実質的に全てを含み、前記では、超可変ループの全てもしくは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、フレームワーク（FR）領域の全てもしくは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれである。ヒト化抗体はまた、場合によって免疫グロブリン定常領域（Fc）（典型的にはヒト免疫グロブリンのそれ）の少なくとも部分を含むであろう（以下を参照されたい：Jones et al., Nature 321:522-525, 1986 ; Riechmann et al., Nature 332:323-329, 1988 ; およびPresta, Curr Op Struct Biol 2:593-596, 1992）。ヒト化は、Winterらの方法（Jones et al.（上掲書）；Riechmann et al.（上掲書）；Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988）に従い、げっ歯類の複数のCDRまたは1つのCDR配列を対応するヒト抗体の配列の代用とすることによって本質的に実施され得る。さらにまた、ヒトゲノムに由来する配列をベースにした抗体を作製するために複数の技術が開発され、前記は、例えばファージディスプレイによるかまたはトランスジェニック動物を用いる（以下を参照されたい：国際特許公開No. WO 90/05144 ; Marks et al., (1991) By-passing immunisation. Human antibodies from V- gene libraries displayed on phage, J Mol Biol, 222, 581-597 ; Knappik et al., J Mol Biol 296: 57-86, 2000 ; Carmen and Jermutus, Concepts in antibody phage display, Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1 (2) :189-203 ; Lonberg and Huszar, Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol 1995; 13 (1) :65-93 ; Bruggemann and Taussig, Production of human antibody repertoires in transgenic mice, Curr Opin Biotechnol 1997 8 (4) : 455-8）。そのような抗体は本発明の関係では“ ヒト抗体 ” である。

【 0 0 5 5 】

本発明はまた合成または組換え抗原結合分子を意図し、その生成は、所望の抗体構造をコードする自然のままではないDNA配列の生物での発現を必要とする。いくつかの実施態様では、合成または組換え抗原結合分子はマルチ特異性抗原結合分子であり、その代表的な例には以下が含まれる：タンデムscFv（taFvまたはscFv₂）、ジアボディ、dAb₂/V_HH₂、ノブイントゥホール誘導体、SEED-IgG、ヘテロFc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、トリボディ、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/CL、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dh1x-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAbおよび前記の組合せ。具体的な実施態様では、合成または組換え抗原結合分子は以下から選択される：IgG様抗体（例えば、トリオマブ/クアドローマ（Trion Pharma/Fresenius Biotech）；ノブイントゥホール（Genentech）；CrossMAb（Roche）；静電的に適合した抗体（AMGEN）；LUZ-Y（Genentech）；鎖交換操作ドメイン（SEED）体（EMD Serono）；ピオロニク（Merus）；およびFab交換抗体（Genmab）、合成IgG様抗体（例えば、二重標的化（DT）-Ig（GSK/Domantis）；トゥインワン抗体（Genentech）；架橋MAb（karmanos cancer center）；MAb₂（F-star）；およびCoy X-ボディ（Coy X/Pfizer）、IgG融合物（例えば二重可変ドメイン（DVD）-Ig（Abbott）；IgG様に特異性抗体（Eli Lilly）；Ts2Ab（Medimmune/AZ）；BsAb（ZymoGenetics）；HERCULES（Biogen Idec）；TvAb（Roche）；Fc融合物（例えば、ScFv/Fc融合物（Academic Institution）；SCORPION（Emergent Biosolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS）；二重親和性再標的化技術（Fc-DART）（MacroGenics）；二重（ScFv）₂-Fab（National Research Center for Antibody Medicine）、Fab融合物（例えばF(ab)₂（Medarex/AMGEN）；二重作用またはBis-Fab（Genentech）；ドックアンドロック（DNL）（ImmunoMedics）；二価二重特異性（Biotechno）；およびFab-Fv（UCB-Celltech）、ScFv-およびジアボディ系抗体（例えば二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）（Micromet）；タンデムジアボディ（Tandab）（Affimed）；DART（MacroGenics）；単鎖ジアボディ（Academic）；TCR様抗体、AIT（Receptor Logistics）；ヒト血

清アルブミンScFv融合物 (Merrimack) ; およびCOMBODIES (Epi gen Biotech))、IgG/非IgG融合物 (例えばイムノサイトカイン (EMDSerono, Philo gen, ImmunGene, Immunomedics) ; スーパー抗原融合タンパク質 (Active Biotech) ; およびイミュンモビライジングmTCRアゲインストゥキャンサー (ImmTAC))、並びにオリゴクローン抗体 (例えばSympho genおよびMerus)。

【0056】

マルチ特異性抗原結合分子のその他の非限定的な例には、タンデムFab免疫グロブリン (Fabs-in-tandem immunoglobulin) (FIT-Ig) (Gong et al., 2017. MAbs. 9(7): 1118-1128. doi: 10.1080/19420862.2017.1345401. Epub 2017 Jul 10. PubMedPMID: 28692328; PubMed Central PMCID: PMC5627593) が含まれ、前記は2つ以上の抗原と結合できる。FIT-Ig分子の設計では、親mAb由来の2つのFabドメインが十文字方向でタンデムに直接融合される。哺乳動物細胞で共同発現されるとき、3つのフラグメントは集合して四価のマルチ特異性FIT-Ig分子を形成する。例えば、二重特異性結合タンパク質は、2つの親モノクローナル抗体、mAb A (抗原Aと結合する) およびmAb B (抗原Bと結合する) を用いてFIT-Igとして構築できよう。FIT-Ig分子の設計では、親mAb由来の2つのFabドメインが十文字方向でタンデムに直接融合される。哺乳動物細胞で共同発現されるとき、3つのフラグメントは集合して四価のマルチ特異性FIT-Ig分子を形成する。代表的な実施態様では、FIT-Igは、RANKLおよび少なくとも1つのICMと拮抗するためにマルチ特異性抗原結合分子を提供する。これらのマルチ特異性抗原結合分子は、一般的に、そのFIT-Ig分子として構築される抗体または抗原結合フラグメント (RANKLまたはRANK特異的に結合する) およびそれぞれのICMのために当該ICMと特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。RANKLアンタゴニストが直接的なRANKLアンタゴニストであるいくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANKL抗体またはその抗原結合フラグメントを含む (前記はFIT-Ig分子に取り込まれるであろう)。RANKLアンタゴニストが間接的RANKLアンタゴニストである他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗RANK抗体またはその抗原結合フラグメントを含む (前記はFIT-Ig分子に取り込まれるであろう)。少なくとも1つのICMは、適切にはPD-1、PD-L1またはCTLA-4から選択され、FIT-Ig分子に取り込まれる。マルチ特異性抗原結合分子がPD-1と拮抗するいくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。マルチ特異性抗原結合分子がPD-L1と拮抗するいくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗PD-L1抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。マルチ特異性抗原結合分子がCTLA4と拮抗するいくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。

【0057】

抗体の可変領域は、典型的には単鎖Fv (scFv) またはFabフラグメントとして単離される。いくつかの実施態様では、抗原結合分子は2つ以上のscFvフラグメントを含む。scFvフラグメントは、短い10 - 25アミノ酸リンカーによって連結されるV_HおよびV_Lドメインで構成される。いったん単離されると、scFvフラグメントは当業界で公知の任意の可撓性ペプチドリンカー (例えばAla-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Serなどの1回以上の繰り返し) で連結され得る。得られたポリペプチド、タンデムscFv (taFvまたはscFv₂) は多様な態様で、taFvの各scFvについてV_H-V_LまたはV_L-V_Hの順序で並べることができる (Kontermann (上掲書))。

本発明では、抗体は、抗原に対して少なくとも約10⁵ mol⁻¹、10⁶ mol⁻¹以上、好ましくは10⁷ mol⁻¹以上、より好ましくは10⁸ mol⁻¹以上、もっとも好ましくは10⁹ mol⁻¹以上の結合比活性 (K_a) を有することを特徴とし得る。当業者は抗体の結合親和性を容易に、例えばスキャチャード分析によって決定できる (以下を参照されたい: Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949)。

3.1NF- Bの活性化因子受容体 (RANK) リガンド (RANKL) のアンタゴニスト

本発明の治療薬剤における使用に適切なRANKLアンタゴニストには、RANKL (例えばヒト

RANKL)と拮抗することができる任意の分子が含まれる。例示すれば、RANKLアンタゴニストはポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗原結合分子、炭水化物、または小分子であり得る。いくつかの好ましい実施態様では、RANKLアンタゴニストは、抗RANKL抗原結合分子(例えばMabまたはその抗原結合フラグメント)である。そのような抗RANKL抗原結合分子は、自然のままのRANKL、例えば、以下のアミノ酸配列を有する自然のままのヒトRANKLの領域またはエピトープと特異的に結合する:

MRRASRDYTKYLRGSEEMGGPGAPHEGPLHAPPPAPHQPPAASRSMFVALLGLGLGQVVCVALFFFYFRAQMDPNR
ISEDGTHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLI PDSCRR I KQAFQGAVQKELQHI VGSQHI RAEKAMVDGSLDLAKRS
KLEAQPFALHTINATDIPSGSHKVSLSWYHDRGWAKISNMFTSNGKLI VNQDGFYLYANICFRHHETSGDLATEYLQL
MVVYTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSINVGGFFKLRSGEESI EVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID

10

(配列番号:2)

【0058】

適切には、本発明の抗RANKL抗原結合分子は、一般的に、RANKLの細胞外ドメインの領域またはエピトープ(すなわち配列番号:2に示すヒトRANKL配列の残基69から317に対応する)と結合する。いくつかのより具体的な実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、適切にはRANKLの受容体結合ドメインの領域(配列番号:2に示すヒトRANKL配列の残基162から317に対応する)と結合する。例示すれば、抗RANKL抗原結合分子は、アミノ酸配列TEYLQLMVY(配列番号:1)(すなわち配列番号:2に示す自然のままのヒトRANKL配列の残基233から241)の1つ以上のアミノ酸と特異的に結合する。

ヒトRANKLと特異的に結合する公知のMabの例は、U.S. Patent Appl Pub No. 2016/0333101および2012/0087923に記載され、それらの内容は、参照によってその全体が本明細書に含まれる。

20

本発明に関する使用に適切なそのような抗RANKL Mabの1つはデノスマブである。したがって、いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、完全なヒトのIgG2 Mabデノスマブまたはその抗原結合フラグメントを含む。同じ実施態様のいくつかまたは他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、表1に示すCDR配列を含む。

表1:

重鎖		軽鎖	
CDR1	SYAMS (配列番号:19)	CDR1	RASQSVRGRYLA (配列番号:22)
CDR2	GITGSGGSTYYADSVKKG(配列番号:20)	CDR2	GASSRAT (配列番号:23)
CDR3	DPGTTVIMSWFDP (配列番号:21)	CDR3	QQYGSSPRT (配列番号:24)

30

このタイプの限定的な例では、抗RANKL抗原結合分子は、下記に例示のために示すデノスマブの重鎖アミノ酸配列:

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:3)、

40

またはその抗原結合フラグメントを含み、その例示的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る:

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号:25)。

【0059】

これらの実施例および他の実施例のいくつかでは、抗RANKL抗原結合分子は、下記に示すデノスマブの軽鎖アミノ酸配列:

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLE

50

PEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:4)、
またはその抗原結合フラグメントを含み、その例示的な例は、以下のアミノ酸配列を含む
か、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る：
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGTKVEIK (配列番号:26)。

デノスマブの重鎖および軽鎖の完全長配列はそれぞれ配列番号:7および8に示される：
MEFGLSWLFLVAIIKGVQCEVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYA
DSVKGRTTISRDNKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVE
RKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:27)
(ここでIgG₂シグナルペプチドには下線が付されている)；および
METPAOLLFLLLLWLPDPTTGEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配
列番号:28) (ここでカップシグナルペプチドには下線が付されている)。

10

【0060】

本発明の実施で用いることができる他の例示的な抗RANKL抗原結合分子には、EP 125764
8 (その内容は参照によってその全体が本明細書に含まれる) に開示された抗RANKL抗原結
合分子が含まれる。代表的な実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、表2に示すCDR配列
を含む。

20

表2：

重鎖		軽鎖	
CDR 1	NYAIYH (配列番号:29)	CDR1	RASQISRYLN (配列番号:32)
CDR 2	WINAGNGNTKFSQKFQG (配列番 号:30)	CDR2	GASSLQS (配列番号:33)
CDR 3	DSSNMVRGIIIAYYFDY (配列番号: 31)	CDR3	QHTRA (配列番号:34)

30

これらの実施態様のいくつかでは、抗RANKL抗原結合分子は、下記に例示のために示す
重鎖アミノ酸配列：

AQVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTAASTA
YMELRSLRSEDYAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号
:35)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、その例示的な例は、以下のアミノ酸配列を含む
か、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る：

40

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTAASTAY
MELRSLRSEDYAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGGQGLTVTVSS (配列番号:36)。

これらの実施態様および他の実施態様のいくつかでは、抗RANKL抗原結合分子は、下記
に例示のために示す軽鎖アミノ酸配列：

SHSALEIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SRYLNWYQLKPGKAPRLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGAEFTLT
SSLQPEDYATYYCQHTRAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESATEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:37)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、その代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含む
か、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る：

50

EIVMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSI SRYLNWYQLKPGKAPRLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPED
EDIATYYCQHTRAFGQGTKVEIK (配列番号:38)。

【0061】

他の代表的な実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、表3に示すCDR配列を含む。

表3:

重鎖		軽鎖	
CDR1	NYAIYH (配列番号:39)	CDR1	RASQSVGSYLA (配列番号:42)
CDR2	WINAGNGNTKFSQKFQG (配列番号:40)	CDR2	DATNRAT (配列番号:43)
CDR3	DSSNMVRGIIIAYYFDY (配列番号:41)	CDR3	QHRRT (配列番号:44)

10

これらの実施態様のいくつかでは、抗RANKL抗原結合分子は、下記に例示のために示す重鎖アミノ酸配列:

AEVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGR I TVTRDTAASTAY
YMEIRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I IAYYFDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV VTPSSSLGTQTY I CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号:45) 、

またはその抗原結合フラグメントを含み、その例示的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る:

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGR I TVTRDTAASTAY
MELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I IAYYFDYWGQGT LTVTVSS (配列番号:46) 。

これらの実施態様および他の実施態様のいくつかでは、抗RANKL抗原結合分子は、下記に例示のために示す軽鎖アミノ酸配列:

SHSALEIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVGSYLA WYQQRPGQAPRPLIYDATNRATG I PTRFSGSGSGTDFTLT I
SSLEPEDFATYYCQHRRTFGRGTKLE I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:47) 、

またはその抗原結合フラグメントを含み、その代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、またはそれから成るか、または本質的にそれから成る:

EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVGSYLA WYQQRPGQAPRPLIYDATNRATG I PTRFSGSGSGTDFTLT I SSLEP
EDFATYYCQHRRTFGRGTKLE I K (配列番号:48) 。

【0062】

多様な実施態様で、抗RANKL抗原結合分子は、可変軽鎖 (V_L) アミノ酸配列および可変重鎖 (V_H) アミノ酸配列を含む。ここで個々の V_L 鎖は、フレームワークアミノ酸配列によって分離されるCDR1 (V_L)、CDR2 (V_L) およびCDR3 (V_L) と称されるCDRアミノ酸配列を含み、

CDR1 (V_L) は、RASQSI SRYLN (配列番号:49)、RASQSVGSYLA (配列番号:50)、RASQSVSSSLA (配列番号:51) およびSGDALPKQY (配列番号:52) から成る群から選択され、

CDR2 (V_L) は、GASSLQS (配列番号:53)、DATNRAT (配列番号:54)、GASSRAT (配列番号:55)、およびEDSERPS (配列番号:56) から成る群から選択され、

CDR3 (V_L) は、QHTRA (配列番号:57)、QHRRT (配列番号:58)、QQYGA (配列番号:59)、およびQSTDSSGTYVV (配列番号:60) から成る群から選択され、

ここで、CDR1 (V_L)、CDR2 (V_L) およびCDR3 (V_L) は互いにそれぞれ独立に選択され、

ここで、各 V_H 鎖は、フレームワークアミノ酸配列によって分離されるCDR1 (V_H)、CDR2 (V_H) およびCDR3 (V_H) と称されるCDRアミノ酸配列を含み、

CDR1 (V_H) は、NYAIH (配列番号:61)、NYPMH (配列番号:62)、およびDXAMH (配列番号:63) から成る群から選択され、

CDR2 (V_H) は、WINAGNGNTKFSQKFQG (配列番号:64)、VISYDGNNKYYADSVKG (配列番号:65)、およびGISMNSGRIGYADSVKO (配列番号:66) から成る群から選択され、

50

CDR3 (V_H) は、DSSNMVRGIIIIAYYFDY (配列番号:67)、GGGGFDY (配列番号:68)、およびGGSTSARYSSGWYY (配列番号:69) から成る群から選択され、

ここで、CDR1 (V_H)、CDR2 (V_H) およびCDR3 (V_H) は互いにそれぞれ独立に選択される。

具体的な実施態様では、抗RANKL抗原結合分子はV_LおよびV_H鎖を含み、ここで、

V_L鎖は、配列RASQSI SRYLN (配列番号:49) を有するCDR1、配列GASSLQS (配列番号:53) を有するCDR2、および配列QHTRA (配列番号:57) を有するCDR3を含み、

V_H鎖は、配列NYAIH (配列番号:61) を有するCDR1、配列WINAGNGNTKFSQKFQG (配列番号:64) を有するCDR2、および配列DSSNMVRGIIIIAYYFDY (配列番号:67) を有するCDR3を含み、ここで、各V_LおよびV_H鎖のCDR1、CDR2およびCDR3はフレームワークアミノ酸配列によって分離される。

10

【0063】

他の実施態様では、RANKLアンタゴニストは間接的アンタゴニストであり、前記はRANKL結合パートナーと特異的に結合する。例示すれば、RANKLアンタゴニストは、RANKの機能活性を阻害または無効にする。RANK (TNFRSF11A、NF- κ Bの受容体活性因子、およびCD265としても知られている) は、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) 分子サブファミリーのメンバーである。RANKは、骨格筋、胸腺、肝臓、結腸、小腸、副腎、破骨細胞、乳腺上皮細胞、前立腺、血管細胞および脾臓で構成的に発現される。

いくつかの実施態様では、RANKアンタゴニストは、RANKLと相互作用するRANKの領域に対応するアミノ酸配列を含むか、それらから成るか、または本質的に前記から成り、その代表的な例は、CDR2 (すなわち残基44 - 85) およびCRD3 (すなわち残基86 - 123) から選択される少なくとも1つのCRDを含む。このタイプの非限定的な例では、RANKアンタゴニストは、RANK CRD3に対応するアミノ酸配列を含むか、それらから成るか、または本質的に前記から成り、その代表的な例はYCWNSDCECCY (配列番号:5)、YCWSQYLCY (配列番号:6) を含む。

20

他の実施態様では、RANKアンタゴニストは、抗RANK抗原結合分子 (例えばMabまたはその抗原結合フラグメント) であり、前記は、自然のままのRANK、例えば自然のままのヒトRANK (UniProt accession no. Q9Y6Q6) (下記の代表的な完全長アミノ酸配列を有する) の領域またはエピトープと特異的に結合する:

MAPRARRRRPLFALLLLCALLARLQVALQIAPPCTSEKHYEHLGRCCNKCEPGKYMSSKCTTTSDSVCLPCGPDEYLDSW
NEEDKCLLHKV/CDTGKALVAVVAGNSTTPRRCACTAGYHWSQDCECCRRNTECAPGLGAQHPLQLNKDVTCKPCLAGYFS
DAFSSTDKCRPWTNCTFLGKRVEHHGTEKSDAVCSSSLPARKPPNEPHVYLPGLI I LLLFASVALVAAI I FGVCYRKKGK
ALTANLWHWI NEACGRLSGDKESSGDSCVSTHTANFGQQGACEGVLLL TLEKTFPEDMCYPDQGGVCQGTGCVGGGPYAQ
GEDARMLSLVSKTE I EEDSFRQMPTED EYMDRPSQPTDQLLFLTEPGSKSTPPFSEPLEVGENDSLSQCFGTGTQSTVGSE
SCNCTEPLCRTDWTMPMSSENYLQKEVD SGHCPHWAASPSPNWADVCTGCRNPPGEDCEPLVGSPKRGPLPQCAYGMGLPP
EEEASRTEARDQPEDGADGRLPSSARAGAGSGSSPGGQSPASGNVTGNSNSTFI SSGQVMNFKGD I I VVYVSQTSQEGAA
AAAEPMGRPVQEETLARRDSFAGNGPRFPDPCGGPEGLREPEKASRPVQEQGGA (配列番号:8)。

30

【0064】

本発明の抗RANK抗原結合分子は、一般的に、RANKの細胞外ドメインの領域 (例えば、配列番号:8に示すヒトRANK配列の残基30から212に対応する) と結合し、その非限定的な例は以下を含む: VSKTE I EEDSFRQMPTED EYMDRPSQPTDQLLFLTEPGSKSTPPFSEPLEVGENDSLSQCFGTGTQS
TVGSESCNCTEPLCRTDWTMPMS (配列番号:7) (すなわち、配列番号:8に示す自然のままのRANK配列の残基330 - 417)。このタイプのいくつかの実施態様では、抗RANK抗原結合分子は、Mab 64C1385 (Abcam)、N-1H8、およびN-2B10、またはその抗原結合分子 (前記のキメラおよびヒト化抗原結合分子を含む) から選択される。他の実施態様では、抗RANK抗原結合分子は、RANKとの結合についてMab 64C1385、N-1H8またはN-2B10と競合する。

40

いくつかの実施態様で、抗RANK抗原結合分子は、Newaら (2014、上掲書) による例示のために開示される短鎖Fv (scFv) 抗原結合分子またはその抗原結合フラグメントである。このタイプの代表的な抗原結合分子は、表4に示すCDR配列を含むことができる。

表4:

重鎖		軽鎖	
CDR1	GFTFSSY (配列番号:70)	CDR1	RASQSISSYLN (配列番号:73)
CDR2	SGDGY (配列番号:71)	CDR2	YASSLQS (配列番号:74)
CDR3	NAYSFDY (配列番号:72)	CDR3	QQGSSSPNT (配列番号:75)

より具体的な実施態様では、抗RANK抗原結合分子は、以下の重鎖アミノ酸配列:

MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGDGYYTDYADSVGRFTISRDNKNTLYLQNSLRAEDTAVYYCAKNAYSFDYWGQGTSLTVTS (配列番号:76) もしくはMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGDGYYTDYADSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYSFDYWGQGTSLTVTS (配列番号:77)、

10

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGDGYYTDYADSVGRFTISRDNKNTLYLQNSLRAEDTAVYYCAKNAYSFDYWGQGTSLTVTS (配列番号:78)、またはEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGDGYYTDYADSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYSFDYWGQGTSLTVTS (配列番号:79)。

同じまたは他の実施態様のいくつかでは、抗RANK抗原結合分子は、以下の軽鎖アミノ酸配列:

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGSSSPNTFGQGTKVEIKRAAA (配列番号:80)、

またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGSSSPNTFGQGTKVEIK (配列番号:81)。

【0065】

3.2免疫チェックポイント分子(ICM)アンタゴニスト

治療に用いることができる適切な任意のICMアンタゴニストが本発明の実施で使用するために意図される。例えば、適切なICMアンタゴニストは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、および小分子を含む。いくつかの好ましい実施態様では、ICMアンタゴニストは抗原結合分子である。

30

本発明の治療薬組合せと拮抗するICMには、以下から選択される阻害性ICMの任意の1つ以上が含まれる:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、OX40、OX40L、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL、4-1BB、CD27L、CD28、CD80、CD86、SIRP-1、CD47、CD48、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HLA2、VEG1、TNFRS25およびICOLG。治療薬組合せがRANKLアンタゴニストおよびただ1つのICMアンタゴニストを含む実施態様では、ICMは適切にはCTLA-4以外である。

いくつかの好ましい実施態様では、治療薬組合せに含まれるICMアンタゴニストはPD-1アンタゴニストである。これに関して、“PD-1アンタゴニスト”には、任意の化学的化合物または生物学的分子が含まれ、前記は、PD-L1 (例えば癌細胞表面で発現されるPD-L1) とPD-1 (免疫細胞 (例えばT細胞、B細胞、またはNKT細胞) で発現される) との結合を阻む。PD-1のまた別の名称または同義語には、PDCD1、PD1、CD279およびSLEB2が含まれる。ヒトPD-1の代表的な成熟アミノ酸配列 (UniProt accession no. Q15116) は以下に示される:

40

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEDGNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGWVGGLLGSLVLLVWVLAVICRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSPGMGTS SPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (配列番号:)。

50

【 0 0 6 6 】

ヒトPD-1と結合し、したがって本発明で使用されるMAbの例は、以下に記載されている：米国特許公開US2003/0039653、US2004/0213795、US2006/0110383、US2007/0065427、US2007/0122378、US2012/237522、および国際PCT公開WO2004/072286、WO2006/121168、WO2006/133396、WO2007/005874、WO2008/083174、WO2008/156712、WO2009/024531、WO2009/014708、WO2009/114335、WO2010/027828、WO2010/027423、WO2010/036959、WO2010/029435、WO2010/029434、WO2010/063011、WO2010/089411、WO2011/066342、WO2011/110604、WO2011/110621、およびWO2012/145493（前記の完全な内容は参照によって本明細書に含まれる）。本発明の目的に有用な特別なMAbには、抗PD-1MAbニボルマブ、ペムブロリズマブ、およびピジリズマブとともにヒト化抗PD-1抗体h409A11、h409A16、およびh409A17（国際特許公開WO2008/156712に記載）が含まれる。

10

本発明の抗PD-1抗原結合分子は、好ましくは、PD-1の細胞外ドメインの領域と結合する。例示すれば、抗PD-1抗原結合分子は、ヒトPD-1の細胞外ドメインの領域と特異的に結合でき、前記領域は、アミノ酸配列SFVLNWWYRMSPSNQTDKLAAPFEDR（配列番号：9）（すなわち、配列番号：10に示す自然のままのPD-1配列の残基62から86）およびSGTYLCGAI SLAPKAQIKE（配列番号：11）（すなわち、配列番号：10に示す自然のままのPD-1配列の残基118から136）の一方または両方を含む。別の例では、抗PD-1抗原結合分子は、ヒトPD-1の細胞外ドメインの領域と特異的に結合でき、前記領域は、アミノ酸配列NWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRV（配列番号：12）（すなわち、配列番号：10に示す自然のままのヒトPD-1配列の残基66から97に対応する）を含む。

20

ある種の実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、完全にヒト化されたIgG4 MAbニボルマブ（米国特許8,008,449号（前記は参照によってその全体が本明細書に含まれる））に詳細に記載（“5C4”と称される））またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な例では、抗PD-1抗原結合分子は表5に示すCDR配列を含む。

表5：

重鎖		軽鎖	
CDR1	NSGMH（配列番号:82）	CDR1	RASQSVSSYLA（配列番号:85）
CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKKG（配列番号:83）	CDR2	DASNRAT（配列番号:86）
CDR3	NDDYW（配列番号:84）	CDR3	QQSSNWPRT（配列番号:87）

30

【 0 0 6 7 】

より具体的な実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、例えば下記に示されるニボルマブの重鎖アミノ酸配列：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGIFTFSNSGMHWRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK（配列番号：88）、

40

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGIFTFSNSGMHWRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGQGLTVTVSS（配列番号：89）。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗PD-1抗原結合分子は、例えば下記に示すニボルマブの軽鎖アミノ酸配列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC（配列番号：90）、

50

またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGKVEIK (配列番号:91)。

【0068】

また別の実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、ヒト化IgG4 MAbペムプロリズマブまたはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの非限定的な例では、抗PD-1抗原結合分子は、表6に示すCDR配列を含む。

表6：

重鎖		軽鎖	
CDR1	NYMY (配列番号:92)	CDR1	RASKGVSTSGYSYLH (配列番号:95)
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN (配列番号:93)	CDR2	LASYLES (配列番号:96)
CDR3	RDYRFDMGFDY (配列番号:94)	CDR3	QHSRDLPLT (配列番号:97)

10

いくつかの実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、PD-1との結合についてMAbペムプロリズマブと競合する。

追加の実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、例えば下記に示すペムプロリズマブの重鎖アミノ酸配列：

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号:98)。

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS (配列番号:99)。

同様に、抗PD-1抗原結合分子は、例えば下記に示すペムプロリズマブの軽鎖アミノ酸配列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVTPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:100)。

またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVTPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK (配列番号:101)。

40

【0069】

このタイプのさらに他の実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、MAbビジリズマブまたはその抗原結合フラグメントを含む。いくつかの関連する実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、表7に示すCDR配列を含む。

表7:

重鎖		軽鎖	
CDR1	NYGMN (配列番号:102)	CDR1	SARSSVSYMH (配列番号:105)
CDR2	WINTDSGESTYAEFEK (配列番号:103)	CDR2	RTSNLAS (配列番号:106)
CDR3	VGYDALDY (配列番号:104)	CDR3	QQRSSFPLT (配列番号:107)

より具体的な実施態様では、抗PD-1抗原結合分子は、下記に示すピジリズマブの重鎖アミノ酸配列:

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEKGRFVFSLDTSVNTAY
LQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:108)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る:

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEKGRFVFSLDTSVNTAY
LQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSS (配列番号:109)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗PD-1抗原結合分子は、下記に示すピジリズマブの軽鎖アミノ酸配列:

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVSYMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYCLTINSIQPE
DFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
SVTEQDSKSTSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:110)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る:

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVSYMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYCLTINSIQPE
DFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK (配列番号:111)。

【0070】

他の適切なMAbは国際特許公開WO2015/026634に記載される(前記は参照によってその全体が本明細書に含まれる)。これらにはMAbまたはその抗原結合フラグメントが含まれ、前記は以下を含む:(a)アミノ酸配列RASKSVSTSGFSYLH(配列番号:112)、LASNLES(配列番号:113)およびQHSWELPLT(配列番号:114)(それぞれCDR1、CDR2およびCDR3)を有する軽鎖、並びにアミノ酸配列SYLY(配列番号:115)、GVNPSNGGTNFESEKFS(配列番号:116)およびRDSNYDGGFDY(配列番号:117)(それぞれCDR1、CDR2およびCDR3)を有する重鎖;または(b)アミノ酸配列RASKGVSTSGYSYLH(配列番号:118)、LASYLES(配列番号:119)およびQHSRDLPLT(配列番号:120)(それぞれCDR1、CDR2およびCDR3)を有する軽鎖、並びにアミノ酸配列NYMY(配列番号:121)、GINPSNGGTNFESEKFN(配列番号:122)およびRDYRFDMGFDY(配列番号:123)(それぞれCDR1、CDR2およびCDR3)を有する重鎖。

例示すれば、そのようなMAbは、(a)以下を含む重鎖可変領域:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKISCKASGYTFTNYMYWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFESEKFNRTLTDSSTTTAY
MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS (配列番号:124)またはその変種もしくは抗原結合フラグメント、および

以下から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAYLESGLVPARFSGSGSGTDFTLTIS
SLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK (配列番号:125)、

IIVLTQSPSLSPVTPGEPASISCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQSPQLLIYLAYLESGLVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDGVYYCQHSRDLPLTFGGGTKLEIK (配列番号:126)、もしくは

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQSPQLLIYLAYLESGLVPDRFSGSGSGTAFTLKIS

RVEAEDVGLYYCQHSRDLPLTFGQGKLEIK (配列番号:127)、またはその変種もしくは抗原結合フラグメント。

【 0 0 7 1 】

さらにまた例示的な実施態様では、PD-1 MAbは、以下を含むIgG1重鎖：

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFKNEFKNRVLTITDSSTTTAY
MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号:128) またはその変種も

10

しくは抗原結合フラグメント、および

以下のいずれか1つを含む軽鎖を含む：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
SLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:129)、

EIVLTQSPSLPVPVTPGEPASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLLQKPGQSPQLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVYYCQHSRDLPLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:130)、

DIVMTQTPLSLPVPVTPGEPASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLLQKPGQSPQLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSGTAFTLKIS
RVEAEDVGLYYCQHSRDLPLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:131)、またはその変種もしくは抗原結合フラグメント。

20

【 0 0 7 2 】

他の実施態様では、ICMアンタゴニストはPD-L1アンタゴニストである。PD-L1のまた別の名称または同義語には、PDCD1L1、PDL1、B7H1、B7-4、CD274、およびB7-Hが含まれる。

一般的に、PD-L1アンタゴニストは、下記に示すヒトPD-L1 (UniProt accession no. Q9NZQ7) の自然のままのアミノ酸配列に特異的に結合する：

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVQHSS
YRQRARLLKQQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKINQRILVVDPVTSEHELTCAEGY
PKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPLEPLAHPNERTH
LVILGAILLCLGLVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (配列番号:14)。

30

適切には、PD-L1アンタゴニストは抗PD-L1抗原結合分子である。例示すれば、本発明での使用に適切な抗PD-L1抗原結合分子には、抗PD-L1 MAbデュルバルマブ (MEDI4736)、アテゾリズマブ (Tecentriq)、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480、MPDL3280Aが含まれる。これらおよびその他の抗PD-L1抗体は以下に記載される：国際公開WO2007/005874およびWO2010/077634、並びに米国特許8,217,149号および8,779,108号 (前記の各々の全体は参照によって本明細書に含まれる)。さらにまた、抗PD-L1 MAbは、国際PCT特許公開WO2016/007,235 (その全内容はまた参照によって本明細書に含まれる)に記載される。

抗PD-L1抗原結合分子は、PD-L1の細胞外ドメインの領域と適切に結合する。例示すれば、抗PD-L1抗原結合分子は、アミノ酸配列SKKQSDTHLEET (配列番号:13) (すなわち配列14に示す自然のままのPD-L1配列の残基279から290)を含むヒトPD-L1の細胞外ドメインの領域と特異的に結合することができる。ある種の実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、完全にヒト化されたIgG1 MAbデュルバルマブ (国際PCT公開WO2011/066389および米国特許公開2013/034559 (参照によってその全体が本明細書に含まれる)で“MEDI4736”に関連して記載される)またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は表8に示すCDR配列を含む。

40

表8：

重鎖		軽鎖	
CDR1	RYWMS (配列番号:132)	CDR1	RASQRVSSSYLA (配列番号:135)
CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVK (配列番号:133)	CDR2	DASSRATGIPD (配列番号:136)
CDR3	EGGWFGELAFDY (配列番号:134)	CDR3	QQYGSLPWT (配列番号:137)

【 0 0 7 3 】

10

より具体的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、例えば下記に示すデュルバルマブの重鎖アミノ酸配列：

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号:138)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLTVSS (配列番号:139)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗PD-L1抗原結合分子は、以下の軽鎖アミノ酸配列：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWEYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:140)、

またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWEYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK (配列番号:141)。

また別には、抗PD-L1抗原結合分子は、PD-L1との結合についてMAbデュルバルマブと競合する。

【 0 0 7 4 】

他の実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、完全にヒト化されたIgG1 MAbアテゾリズマブ (米国特許8,217,148号 (参照によってその全体が本明細書に含まれる) に記載) またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は表9に示すCDR配列を含む。

20

30

表9：

重鎖		軽鎖	
CDR1	GFTFSX ₁ SWIH (配列番号:142)	CDR1	RASQX ₄ X ₅ X ₆ TX ₇ X ₈ A (配列番号:145)
CDR2	AWIX ₂ PYGGSX ₃ YYADSVKG (配列番号:143)	CDR2	SASX ₉ LX ₁₀ S (配列番号:146)
CDR3	RHWPGGFDY (配列番号:144)	CDR3	QQX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ PX ₁₅ T (配列番号:147)
<p>ここで、X₁はDまたはG；X₂はSまたはL；X₃はTまたはS；X₄はDまたはV；X₅はVまたはI；X₆はSまたはN；X₇はAまたはF；X₈はVまたはL；X₉はFまたはT；X₁₀はYまたはA；X₁₁はY、GまたはF；X₁₂はL、YまたはF；X₁₃はY、N、T、G、FまたはI；X₁₄はH、V、P、TまたはI；およびX₁₅はA、W、R、PまたはTである。</p>			

10

より具体的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、例えば下記に示すアテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:148)、

20

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSS (配列番号:149)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗PD-L1抗原結合分子は、例えば以下に提供されるアテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:150)、

30

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK (配列番号:151)。

また別に、抗PD-L1抗原結合分子は、PD-L1との結合についてMAbアテゾリズマブと競合する。

【0075】

他の実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、完全にヒト化されたIgG1 MAbアベルマブ (米国特許8,217,148号 (参照によってその全体が本明細書に含まれる) に記載) またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は表10に示すCDR配列を含む。

40

表10：

重鎖		軽鎖	
CDR1	X ₁ YX ₂ MX ₃ (配列番号:152)	CDR1	TGTX ₇ X ₈ DVGX ₉ YNYVS (配列番号:155)
CDR2	SIYPSGGX ₄ TFYADX ₅ VKG (配 列番号:153)	CDR2	X ₁₀ VX ₁₁ X ₁₂ RPS (配列番号:156)
CDR3	IKLGTVTTVX ₆ Y (配列番号:15 4)	CDR3	SSX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ RV(配列番号:157)
<p>ここで、X₁はM、IまたはS；X₂はR、K、L、MまたはI；X₃はFまたはM；X₄はFまたはI； X₅はSまたはT；X₆はEまたはD；X₇はNまたはS；X₈はT、RまたはS；X₉はAまたはG；X₁₀ はEまたはD；X₁₁はI、NまたはS；X₁₂はD、HまたはN；X₁₃はFまたはY；X₁₄はNまたはS ；およびX₁₅はR、TまたはS；X₁₆はGまたはS；およびX₁₇はまたはTである。</p>			

10

具体的な実施態様では、抗PD-L1抗原結合分子は、例えば以下に提供されるアベルマブの重鎖アミノ酸配列：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号：158)、

20

またはその抗原結合フラグメントを含ことができ、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTSLVTVSS (配列番号：159)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗PD-L1抗原結合分子は、例えば以下に示されるアベルマブの軽鎖アミノ酸配列：

QSALTQPASVSGSPGQSITIISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIISGL
QAEDADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号：160)、

30

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

QSALTQPASVSGSPGQSITIISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIISGL
QAEDADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL (配列番号：161)。

また別には、抗PD-L1抗原結合分子は、PD-L1との結合についてMAbアベルマブと競合する。

【0076】

いくつかの実施態様では、ICMアンタゴニストはCTLA4のアンタゴニストである。CTLA4のまた別の名称または同義語にはALPS5、CD、CD152、CELIAC3、CTLA-4、GRD4、GSE、IDDM
12が含まれる。一般的には、CTLA4アンタゴニストは、例えば下記に示すヒトCTLA4 (UniProt accession no. P16410) の成熟アミノ酸配列と特異的に結合する：

40

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIINGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSP
LTTGVVYKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (配列番号：16)。

適切には、CTLA4アンタゴニストは抗CTLA4抗原結合分子である。例示すれば、本発明での使用に適切な抗CTLA4抗原結合分子には、抗CTLA4 MAbイピリムマブ (BMS-734016、MDX-010、MDX-101) およびトレメリムマブ (チシリムマブ、CP-675,206) が含まれる。

抗CTLA4抗原結合分子は、CTLA4の細胞外ドメインの領域と適切に結合する。例示すれば、抗CTLA4抗原結合分子は、以下のアミノ酸配列のいずれか1つ以上を含む、ヒトCTLA4の

50

細胞外ドメインの領域と特異的に結合することができる：YASPGKATEVRVTVLRQA（配列番号：15）（すなわち、配列番号：16に示す自然のままのCTLA4配列の残基26から42）、DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD（配列番号：17）（すなわち、配列番号：16に示す自然のままのCTLA4配列の残基43から65）、およびVELMYPPPYLIG（配列番号：18）（すなわち、配列番号：16に示す自然のままのCTLA4配列の残基96から109）。また別に或いは加えるに、抗CTLA4抗原結合分子は、CTLA4の成熟形の以下の残基のいずれか1つ以上および好ましくは全てを含むヒトCTLA4の細胞外ドメインの領域と特異的に結合することができる：K1、A2、M3、E33、R35、Q41、S44、Q45、V46、E48、L91、I93、K95、E97、M99、P102、P103、Y104、Y105、L106、I108、N110。

ある種の実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子は、ヒトIgG1 MAブイピリムマブ（例えば国際公開WO2014/209804および米国特許公開No 2015/0283234（参照によってその全体が本明細書に含まれる）に記載）またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子は表11に示すCDR配列を含む。

表11：

重鎖		軽鎖	
CDR1	SYTMH（配列番号:162）	CDR1	RASQSVGSSYLA（配列番号:165）
CDR2	FISYDGNNKYYADSVKG（配列番号:163）	CDR2	GAFSRAT（配列番号:166）
CDR3	TGWLGPFDY（配列番号:164）	CDR3	QQYGSSPWT（配列番号:167）

10

20

【0077】

より具体的な実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子は、例えば下記に示すイピリムマブの重鎖アミノ酸配列：

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号：168）、

30

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDDYWGQGTLLVTVSS（配列番号：169）。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗CTLA4抗原結合分子は、例えば以下に示す軽鎖アミノ酸配列：

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号：170）、

40

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK（配列番号：171）。

【0078】

抗CTLA4抗原結合分子は、ヒトIgG2 MAブトレメリムマブ（例えば米国特許公開No 2009/0074787（参照によってその全内容が本明細書に含まれる）に記載）またはその抗原結合フラグメントを含む。このタイプの代表的な実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子は表12に示すCDR配列を含む。

表12：

重鎖		軽鎖	
CDR1	GIITSSYGMII (配列番号:172)	CDR1	RASQSINSYLD (配列番号:175)
CDR2	VIWYDGSNKYYADSV (配列番号:173)	CDR2	AASSLQS (配列番号:176)
CDR3	DPRGATLYYYYYGMDV (配列番号:174)	CDR3	QYYSTPIIT (配列番号:177)

より具体的な実施態様では、抗CTLA4抗原結合分子は、例えば下記に示すトレメリムマブの重鎖アミノ酸配列：

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAVIWDGSGNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTITCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:178)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記の非限定的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、それから成るか、または本質的にそれから成る：

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTITVTVSS (配列番号:179)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗CTLA4抗原結合分子は、例えば以下に示すトレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号:180)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記の代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIK (配列番号:181)。

【0079】

他の実施態様では、ICMアンタゴニストはB7-H3アンタゴニストである。一般的に、本発明のB7-H3アンタゴニストは、例えば下記に示すヒトB7-H3 (UniProt accession no. Q5ZPR3) の自然のままのアミノ酸配列と特異的に結合する：

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVVQPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDQGVPPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPGPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSKEDDGQEIA (配列番号:182)

適切には、B7-H3アンタゴニストは抗B7-H3抗原結合分子である。例示すれば、本発明の使用に適切な抗B7-H3抗原結合分子は、MAbエノブリツズマブまたはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施態様では、抗B7-H3抗原結合分子は表13に示すCDR配列を含む。

10

20

30

40

表13:

重鎖		軽鎖	
CDR1	FGMH (配列番号:183)	CDR1	KASQNVDTNVA (配列番号:186)
CDR2	YISSDSSAIYYADTVK (配列番号:184)	CDR2	SASYRYS (配列番号:187)
CDR3	GRENIYYGSRLDY (配列番号:185)	CDR3	QQYNNYPFT (配列番号:188)

10

より具体的な実施態様では、抗B7-H3抗原結合分子は、例えば下記に示すエノブリツズマブの重鎖アミノ酸配列:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIIYGSRLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:189)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記の非限定的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIIYGSRLDYWGQGTITVTVSS (配列番号:190)。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗B7-H3抗原結合分子は、例えば以下に提供するエノブリツズマブの軽鎖アミノ酸配列:

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIIYSASYRYSRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:191)、

またはその抗原結合フラグメントを含み、前記の代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る:

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIIYSASYRYSRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK (配列番号:192)。

いくつかのまた別の実施態様では、抗B7-H3抗原結合分子は、B7-H3との結合についてMAbエノブリツズマブと競合する。

【0080】

他の実施態様では、ICMアンタゴニストはIDOアンタゴニストである。ヒトIDOの成熟アミノ酸配列 (UniProt accession no. P14902) は例えば以下に示される:

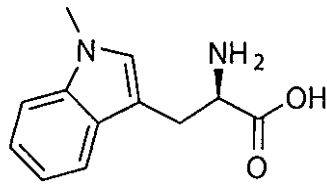
MAHAMENSWTISKKEYHIDEEVGAFALPNPQENLPDFYNDWMFI AKHLPDLIESGQLRERVEKLNMLSIDHLTDHKSQRLARLVLCITMAYVWGKGHGDVRKVLPRNIAVPYCQLSKKLELPPILVYADCVLANWKKKDPNKPLTYENMDVLFSFRDGDCKSGFFLVSLLEIAAASAIKVIPTVFKAMQMQRDITLLKALLEIASCLEKALQVFHQIHDHVNPKAFFSVLRILYLSGWKGNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLGIIQQTAGGGHAAQFLQDMRRYMPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPASQQPKENKTSSEDPKLEAKGTGGTDLNMFLLKTVRSTTEKSLLEK (配列番号:193)。

いずれのIDOアンタゴニストも本発明の治療薬での使用に適切である。これまでのところ、以下の3つの小分子IDO阻害剤が臨床使用のために開発されている: GDC-0919 (1-シクロヘキシル-2- (5H-イミダゾ [5,1-a] イソインドール-5-イル) エタノール)、インドキシモド (1-メチル-D-トリプトファン)、およびエパカドスタット (1,2,5-オキサジアゾール-3-カルボキシミダミド, 4- ((2- ((アミノスルホニル) アミノ) エチル) アミノ) -N- (3-プロモ-4-フルオロフェニル) -N'-ヒドロキシ-, (C(Z))-)。これら分子の各々の分子構造は下記に提供される:

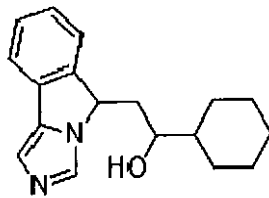
【0081】

50

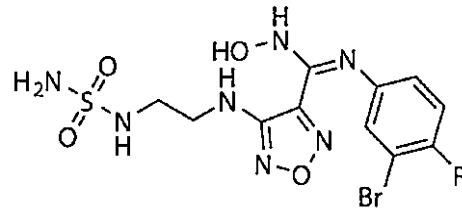
【化 1】



インドキシモド



GDC-0919



エパカドスタット

10

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施態様では、ICMアンタゴニストはKIRアンタゴニストである。このタイプの好ましい実施態様では、KIRアンタゴニストは、KIR2-DL-1、-2、および-3、並びにそれらのリガンド間の相互作用を封鎖する。ヒトKIR（すなわちKIR2-DL1（UniProt accession no. P43626）の成熟アミノ酸配列は例えば下記に提供される：

HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLHREGMFNDTLRLIGEHHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVILGLYEKPSLSAQPGPTVLAGEVNTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFHDSPEYEWKSSDPDLLVSVTGNPNSWPSPTPESSKTGNPRHLHILIGTSVVIIILFILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVITYQLNHCVFTRKILTRPSQRPKTPPTDIIIVYTELPNAESRSKVVSCP（配列番号：194）。

20

本発明での使用に適切な抗KIR抗原結合分子は、当業界で周知の方法を用いて生成することができる。また別に、当業界で承認されているKIR抗原結合分子を用いてもよい。例えば、抗KIR抗原結合分子は、例えばW02014/066532（その全内容は参照によってその全体が本明細書に含まれる）に記載される、完全にヒト化されたMAbリリルマブまたはその抗原結合フラグメントを含む。適切には、抗KIR抗原結合分子は表14に示すCDR領域を含む。

表14：

重鎖		軽鎖	
CDR1	FYAIS（配列番号:195）	CDR1	RASQSVSSYLA（配列番号:198）
CDR2	GFIPIFGAANYAQKFQ（配列番号:196）	CDR2	DASNRAT（配列番号:199）
CDR3	IPSGSYYYDYDMDV（配列番号:197）	CDR3	QQRSNWMYT（配列番号:200）

30

【 0 0 8 3 】

このタイプの代表的な実施態様では、抗KIR抗原結合分子は、例えば下記に示す、リリルマブの重鎖可変ドメインアミノ酸配列：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK（配列番号：201）、

40

またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記の代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

MELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTITVSS（配列番号：202）。

同じおよび他の実施態様のいくつかでは、抗KIR抗原結合分子は、例えば以下に示す、リリルマブの軽鎖可変ドメインアミノ酸配列：

EIVLTQSPVTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP

50

EDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:203)、
またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記の代表的な例は、以下のアミノ
酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：
EIVLTQSPVTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRT (配列番号:204)。

【0084】

また別の実施態様では、ICMアンタゴニストはLAG-3アンタゴニストである。LAG-3は503
アミノ酸のI型トランスメンブレンタンパク質であり、4つの細胞外Ig様ドメインを有す
る。LAG-3は、活性化T細胞、NK細胞、B細胞および形質細胞様DC上で発現される。ヒトLAG
-3 (UniProt accession no. P18627) の代表的な成熟アミノ酸配列は下記に示される：
LQPGAIEVPIVWQEGAPALPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVL
SVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRAS
DWVILNCSFSRDRPASVHWFNRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSI MYNLTVLGL
EPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSF LTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYTCH IHLQEQL
NATVTLAIIITVTPKSFSGPSGLKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLG
AAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKI EEL
EQEPEPEPEPEPEPEPEPEQL (配列番号:205)。

いくつかの実施態様では、LAG-3アンタゴニストは抗LAG-3抗原結合分子である。例示す
れば、適切な抗LAG-3抗原結合分子は抗LAG-3ヒト化Mab BMS-986016である。他の抗LAG-3
抗体は、米国特許公開No. 2011/0150892並びに国際PCT公開No. WO2010/019570およびWO20
14/008218 (前記の各々は参照によってその全体が本明細書に含まれる) に記載される。

いくつかの実施態様では、抗LAG-3抗原結合分子は表15に示すCDR配列を含む。

表15：

重鎖		軽鎖	
CDR1	DYYWN [SEQ ID NO:206]	CDR1	RASQSISSYLA (配列番号:209)
CDR2	EINHRGSTNSNPSLKS (配列番号: 207)	CDR2	DASNRAT (配列番号:210)
CDR3	GYSDYEYNWFDP (配列番号:208)	CDR3	QQRSNWPLT (配列番号:211)

【0085】

抗LAG-3抗原結合分子は適切には、Mab BMS-986016またはその抗原結合フラグメントを
含む。より具体的には、いくつかの実施態様では、抗LAG-3抗原結合分子は、例えば以下
に示すBMS-986016の重鎖アミノ酸配列、

QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPSLKSRLVTLSDTSKNQFSL
KLRSVTAADTA VYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号:212)、

またはその抗原結合フラグメントを有し、前記の代表的な例は、以下のアミノ酸配列を含
むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPSLKSRLVTLSDTSKNQFSL
KLRSVTAADTA VYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQGT LVTVSS (配列番号:213)。

同様に、抗LAG-3抗原結合分子は、配列番号:45に示され、さらに下記に提供されるBMS-
986016の軽鎖アミノ酸配列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ

ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:214)、
またはその抗原結合フラグメントを含むことができ、前記の代表的な例は、以下のアミノ
酸配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFAVYYCQQRNWLPLTFGQGTNLEIK (配列番号:215)。

【0086】

4. マルチ特異性抗原結合分子

本発明は、異なる特異性を有する抗原結合分子から形成されるマルチ特異性抗原結合分子を提供し、前記は、RANKLまたはRANKおよび少なくとも1つのICMと結合する。ある種の実施態様では、第一の抗原結合特異性を有する抗原結合分子は、1つ以上の他の分子実体、例えば第二の抗原結合特異性を有する別の抗原結合分子に機能的に連結されて（例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合または他の態様によって）、二重特異性抗原結合分子を生成することができる。本発明の関係で使用できる具体的な例示的マルチ特異性様式には以下が含まれる（ただしそれらに限定されない）：単鎖ジアボディ（scDb）、タンデムscDb（Tandab）、直鎖状ダイマー-scDb（LD-scDb）、環状ダイマー-scDb（CD-scDb）、二重特異性Tsaibouエンゲージャー（BiTE；タンデムdi-scFv）、ジスルフィド安定化Fvフラグメン（Brinkmann et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 7538-7542）、タンデムtri-scFv、トリボディ、二重特異性Fab₂、ニミニ抗体、テトラボディ、scFv-Fc-scFv融合物、ニジアボディ、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合物、例えばbsAb（軽鎖C-末端に連結されたscFv）、Bs1Ab（軽鎖N-末端に連結されたscFv）、Bs2Ab（重鎖N-末端に連結されたscFv）、Bs3Ab（重鎖C-末端に連結されたscFv）、Ts1Ab（重鎖および軽鎖の両方のN-末端に連結されたscFv）、Ts2Ab（重鎖のC-末端に連結されたdsscFv）、およびノブイントゥホール（KiHs）（KiH技術によって調製された二重特異性IgG）、SEED技術（SEED-IgG）およびデュオボディ（デュオボディ技術によって調製された二重特異性IgG）、-VH-VLドメイン（KiHまたはデュオボディの2つの異なる重鎖の1つのC-末端に各々が融合して1つの機能的ドメインが形成される）。本明細書での使用に特に適切なものは、単鎖ジアボディ（scDb）、特に二重特異性モノマー-scDbである。多様なマルチ特異性構築物を考察および提示する概論のためには、例えば以下を参照されたい：Chan Carter, Nature Reviews Immunology 10 (2010) 301-316; Klein et al., MAbs 4 (2012) 1-11; Schubert et al., Antibodies 1 (2012) 2-18; Byrne et al., Trends in Biotechnology 31 (2013) 621; Metz et al., Protein Engineering Design & Selection 25 (2012) 571-580; および前記に引用された参考文献。

【0087】

具体的な実施態様では、本発明は、RANKまたはRANKLと特異的に結合する第一の抗原結合分子（例えば抗体または抗体フラグメント）、およびICMと特異的に結合する第二の抗原結合分子（例えば抗体または抗体フラグメント）を含む二重特異性抗原結合分子を提供する。具体的な実施態様では、ICMはCTLA-4以外である。二重特異性抗原結合分子は、適切には、上記および本明細書の他の場所で詳細に記載される抗原結合分子のいずれかを含む。

例示すれば、第一の抗原結合分子はヒトRANKLの領域に特異的に結合することができ、第二の抗原結合分子は、ヒトPD-1の領域に、好ましくはヒトPD-1の細胞外ドメインの領域に特異的に結合することができる。

これらの実施態様の非限定的な例は、表1-3のいずれか1つに示されるCDR配列を含む第一の抗原結合分子を含む。このタイプの具体的な例では、第一の抗原結合分子は、MAbデノスマブの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含むことができる。

適切には、PD-1と特異的に結合する第二の抗原結合分子は、表4-6のいずれか1つに示されるCDR配列を含む。このタイプの具体的な例では、第二の抗原結合分子は、ニボルマブ、ペムブロリズマブおよびピジリズマブから選択されるMAbのいずれか1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含むことができる。

【0088】

10

20

30

40

50

他の実施態様では、第二の抗原結合分子は、ヒトPD-L1の領域に、好ましくはヒトPD-L1の細胞外ドメインの領域に特異的に結合する。したがって、いくつかの実施態様では、第二の抗原結合分子はPD-L1の領域と特異的に結合し、表5 - 9のいずれか1つに示されるCDR配列を含む。このタイプの具体的な例では、第二の抗原結合分子は、デュルバルマブ、アテゾリズマブおよびアベルマブから選択されるMabのいずれか1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含むことができる。

さらに他の実施態様では、第二の抗原結合分子はヒトCTLA4の領域と特異的に結合する。したがって、いくつかの実施態様では、第二の抗原結合分子はヒトCTLA4と特異的に結合し、表10 - 11のいずれか1つに示されるCDR配列を含む。このタイプの具体的な例では、第二の抗原結合分子は、イピリムマブおよびトレメリムマブから選択されるMabのいずれか1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含む。

10

本発明はまた、RANKLまたはRANKに対して特異性を有するRANKアンタゴニスト抗原結合分子、および2つ以上のICMに対して特異性を有する複数のICMアンタゴニスト抗原結合分子を含むマルチ特異性構築物を提供する。非限定的な例では、複数のICMアンタゴニスト抗原結合分子は、以下から選択されるICM組合せに対して特異性を有する：(1) PD-1およびPD-L1、(2) PD-1およびCTLA4、(3) PD-L1およびCTLA4、並びに(4) PD-1、PD-L1およびCTLA4。マルチ特異性構築物は、特定のICM組合せに対して特異性を有する任意の適切な抗体または抗原結合フラグメント(本明細書に開示する抗体または抗原結合フラグメントを含む)を含むことができる。

本発明のマルチ特異性抗原結合分子は、当業界で周知の多数の方法によって生成できる。適切な方法には以下が含まれる：生物学的方法(例えば体細胞ハイブリダイゼーション)、遺伝学的方法(例えば所望の抗体構造をコードする自然のままではないDNA配列の生物での発現)、化学的方法(例えば2つの構造の化学的結合)、または前記の組合せ(以下を参照されたい：Kontermann R E (ed.), Bispecific Antibodies, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 1-28, 2011)。

20

【0089】

4.1二重特異性抗原結合分子を作製する化学的方法

化学的に結合させた二重特異性抗原結合分子は、2つの現存抗体または抗体フラグメント(例えば上記および本明細の他の場所に記載されたもの)の化学的カップリングから生じる。典型的なカップリングは、2つの異なる完全長抗体の架橋、2つの異なるFab'フラグメントの架橋による二重特異性F(ab')₂の生成、およびF(ab')₂フラグメントと異なるFab'フラグメントとの架橋による二重特異性F(ab')₃の生成を含む。化学的結合のためには、酸化再結合手法を用いることができる。従来の方法は、ホモまたはヘテロ官能性架橋試薬の使用を含む(上掲書)。

30

ヘテロ二官能性架橋試薬は、2つの別個の反応基(例えば抗体分子上の)に対する反応性を有する。ヘテロ二官能性架橋試薬の例には以下が含まれる：SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、SATA(スクシンイミジルアセチルチオアセテート)、SMCC(スクシンイミジルtrans-4-(マレイミジルエチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、PEAS(N-((2-ピリジルジチオ)エチル)-4-アジドサリチルアミド)、ATFB-SE(4-アジド-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸、スクシンイミジルエステル)、ベンゾフェノン-4-マレイミド、ベンゾフェノン-4-イソチオシアネート、4-ベンゾイル安息香酸、スクシンイミジルエステル、アジ化ヨードアセトアミド、ヨードアセトアミドアルキン、Click-iTマレイミドDIBOアルキン、アジド(PEO)₄プロピオン酸、スクシンイミジルエステル、アルキン、スクシンイミジルエステル、Click-iTスクシンイミジルエステルDIBOアルキン、スルホ-SBED(スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミジル-2-(6-[ピオチンアミド]-2-(p-アジドバンズアミド)-ヘキサノアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート)、光反応性アミノ酸(例えばL-photo-ロイシンおよびL-photo-メチオニン)、NHS-ハロアセチル架橋剤(例えばスルホ-SIAB)、SIAB、SBAP、SIA、NHS-マレイミド架橋剤(例えばスルホ-SMCC)、SM(PEG)_nシリーズ架橋剤、SMCC、LC-SMCC、スルホ-EMCS、EMCS、スルホ-GMBS、

40

50

GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、MBS、スルホ-SMPB、SMPB、AMAS、BMPS、SMPH、PEG12-S PDP、PEG4-SPDP、スルホ-LC-SPDP、LC-SPDP、SMPT、DCC (N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド)、スルホ-NHS (N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)、BMP H、EMCH、KMUH、MPBH、PDPHおよびPMPI。

ホモ二官能性架橋試薬は、分子（例えば抗体）上の同じ反応基に対して反応性を有する。ホモ二官能性架橋試薬の例には以下が含まれる：DTNB（5,5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸））、o-PDM（o-フェニレンジマレイミド）、DMA（ジメチルアジピミデート）、DMP（ジメチルピメリミデート）、DMS（ジメチルスベリミデート）、DTBP（ジチオビスプロピオンイミデート）、BS（PEG）₅、BS（PEG）₉、BS³、BSOCOEES、DSG、DSP、DSS、DST、DT SSP、EGS、スルホ-EGS、TSAT、DFDNB、BM（PEG）_n架橋リンカー、BMB、BMDB、BMH、BMOE、DTMEおよびTMEA。

10

【0090】

4.2 二重特異性抗原結合分子を作製する生物学的方法

体細胞ハイブリダイゼーションは、2つの別個のハイブリドーマ細胞株の融合（特異的抗体生成B細胞とミエローマ細胞の融合）であり、前記は、異なる抗体重鎖（すなわちV_HAおよびV_HB）および軽鎖（すなわちV_LAおよびV_LB）を生成することができるクアドローマを生じる（Kontermann（上掲書））。これらの重鎖および軽鎖は細胞内でランダムに組み合わせられ、二重特異性抗原結合分子（例えばV_LA鎖と組み合わせられたV_HA鎖およびV_LB鎖と組み合わせられたV_HB鎖）とともに、いくつかの非機能性（例えば2つのV_LB鎖と組み合わせられた2つのV_HA鎖）および一特異性（例えば2つのV_HA鎖と組み合わせられた2つのV_HA鎖）抗原結合分子を生じる。続いて二重特異性抗原結合分子を、確立された方法（例えば2つの異なる親和性クロマトグラフィーカラム）を用いて精製することができる。

20

一特異性抗原結合分子と同様に、二重特異性抗原結合分子はまた、抗原結合の下流でFc媒介作用を引き出すFc領域を含むことができる。これらの作用は、例えばペプシン消化により二重特異性抗体からFc領域をタンパク分解切断することによって低下させて、二重特異性F(ab')₂分子を生成することができる（上掲書）。

4.3 マルチ特異性抗原結合分子を作製する遺伝学的方法

マルチ特異性抗原結合分子はまた、当業界で確立された遺伝学的手段、例えば所望の抗体構造に対応するDNA配列を含むプラスミドのin vitro発現によって生成することができる（例えば上掲書（Kontermann）を参照されたい）。

30

【0091】

4.4 ジアボディ

いくつかの実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子はジアボディである。ジアボディは、例えばRANKLおよびICMと結合する抗体に由来する2つの別々のポリペプチド鎖で構成され、各鎖は2つの可変ドメイン（V_HA-V_LBおよびV_HB-V_LAまたはV_LA-V_HBおよびV_LB-V_HA）を有する。典型的には、可変ドメインを接合させるポリペプチドリinkerは短い（すなわち約2、3、4、5、6、7、8、8または10アミノ酸）。短いポリペプチドリinkerは、同じ鎖上のV_HおよびV_Lドメインの結合を防ぎ、したがって異なる鎖上のV_HおよびV_Lドメインの結合を促進する。形成されるヘテロダイマーは両標的抗原に対して機能性である（例えばV_HB-V_LAを有するV_HA-V_LBまたはV_LB-V_HAを有するV_LA-V_HB）。しかしながら、ホモダイマーもまた形成され（例えばV_HA-V_LBを有するV_HA-V_LB、V_HB-V_LAを有するV_HB-V_LAなど）、非機能性分子をもたらす。ホモダイマー化を防ぐいくつかの手法が当業界で公知であり、以下が含まれる：ジスルフィド結合を導入して2つのポリペプチド鎖を共有結合により接合する方法、一方の鎖に大きなアミノ酸を他方の鎖に小さなアミノ酸を含むようにポリペプチド鎖を改変する方法（上記および本明細書の他の場所で考察されるノブイントゥホール構造物）、およびC-末端伸長部にシステイン残基を付加する方法。別の手法は、2つのポリペプチド鎖をポリペプチドリinker配列によって接合して、taFvよりもコンパクトな構造を示す単鎖ジアボディ分子（scDb）を生成する。scDbまたはジアボディをまたIgG1 CH3ドメインまたはFc領域に融合させて、二ジアボディを生成することができる。二ジアボディ

40

50

の例にはscDb-Fc、Db-Fc、scDb-CH3、およびDb-CH3が含まれるが、ただし前記に限定されない。加えて、scDbを用いて四価の二重特異性分子を作製することができる。scDbのポリペプチドリinker配列を約15アミノ酸から約5アミノ酸に短くすることによって、ダイマー性単鎖ジアボディ分子を生じる。前記はTandAbとして知られる (Muller and Kontermann, *Bispecific Antibodies* Kontermann R E (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 83-100, 2011)。

【0092】

4.5抗原結合分子を生成する他の結合技術

本発明のマルチ特異性抗原結合分子を生成する別の適切な手法は、ヘテロダイマー形成ペプチドを抗体分子 (例えばscFvまたはFab) のC-末端に接合あるいは連結する工程を含む。

この手法の非限定的な例は、jun-fosロイシンジッパーに連結した抗体フラグメントの使用である (例えば、scFv-Jun/FosおよびFab'-Jun/Fos)。

二重特異性抗原結合分子を生成する追加の方法は、ビオチンを有する異なる抗原結合フラグメントを用いて2つの抗体を誘導し、続いて2つの抗体をストレプトアビジンを介して連結し、得られた二重特異性抗体をその後で精製および単離する。

本発明の二重特異性抗原結合分子の追加のタイプには、各抗原について2つ以上の抗原結合部位を含むものが含まれる。例えば、追加のV_HおよびV_Lドメインを現存する抗体のV_HおよびV_LドメインのN-末端に融合させて、抗原結合部位をタンデムに効果的に並べることができる。これらのタイプの抗体は二重可変ドメイン抗体 (DVD-Ig) として公知である (以下を参照されたい: Tarcsa, E. et al., in *Bispecific Antibodies*. Kontermann (上掲書、ページ171-185))。1つの抗原に対して2つ以上の抗原結合部位を含む抗体を生成する別の方法は、scFvフラグメントを重鎖のN-末端または軽鎖のC-末端に融合させることである (下記で詳細に考察される)。

抗体またはマルチ特異性抗原結合分子複合体もしくは構築物の抗原結合フラグメントは、IgM、IgG、IgD、IgA、IgE (前記はそれらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって互いに区別される) またはそのフラグメントから成る群からそれぞれ独立に選択される。これらIgクラスのいくつかはさらにまた、サブクラス (例えばIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、IgA1およびIgA2) に分割される。抗体の種々のクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 γ 、 α 、 δ および μ と呼ばれる。5つの抗体クラスの全てに見出すことができる軽鎖定常領域 (C_L) は、 κ (カッパ) および λ (ラムダ) から選択される。抗原認識および結合能力を保持する抗体フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂ およびFvフラグメントである。さらにまた、第一および第二の抗原結合フラグメントは直接的またはリンカー (例えばペプチドリinker) によって接続される。

【0093】

IgG足場を用いる二重特異性抗原結合分子の生成

定常免疫グロブリンドメインを適切に用いて、2つのポリペプチド鎖のヘテロダイマー化 (例えばIgG様抗体) を促進することができる。二重特異性抗体作製のためのこの手法には、2つのポリペプチドへのノブイントゥホール構造の導入およびC_LおよびC_H1ドメインの天然に存在するヘテロダイマー形成の利用が含まれる (以下を参照されたい: Kontermann, supra, pp. 1-28, 2011; Ridgway et al., *Protein Eng.* 1996 Jul;9(7):617-21; Atwell et al., *J Mol Biol.* 1997 Jul 4;270(1):26-35)。

本発明の組換え抗原結合分子の大半は操作されて、IgG様 (それらはまたFcドメインを含むことを意味する) であることができる。操作されたポリペプチド鎖のヘテロダイマー化を必要とするジアボディと同様に、IgG様抗原結合分子もまた、異なる特異性を有する2つの抗体の類似の重鎖または重鎖および軽鎖の相互作用を防ぐためにヘテロダイマー化を必要とする (Jin, P. and Zhu, Z. In: *Bispecific Antibodies*. Kontermann RE (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 151-169, 2011)。

【0094】

ノブイントゥホール (knobs-into-holes) 構造は、所望のヘテロダイマーの1つの鎖に

大きなアミノ酸（ノブ）（knob）を導入し、所望のヘテロダイマーの他の鎖に小さなアミノ酸（ホール）（hole）を導入することによってポリペプチド鎖のヘテロダイマー化を促進する。立体相互作用は、ノブとノブとの相互作用またはホールとホールとの相互作用よりもノブとホールとの相互作用に有利に働くであろう。二重特異性IgG様抗体に関しては、ノブイントゥホール（KiH）構造をFc領域のCH3ドメインに導入することによって、類似の重鎖のホモダイマー化を防ぐことができる。同様に、同じ抗原に対して特異的な重鎖および軽鎖の相互作用の促進は、VH-VL境界面でKiH構造を操作することによって達成することができる。具体的には、KiH方法論では、大きなアミノ酸が重鎖の1つのCH3ドメインに導入される（その側鎖は他の重鎖のCH3ドメインの適切に設計された窪みに適合する）（例えば以下を参照されたい：Ridgeway et al., Protein Eng. 9 (1996), 617-621; およびAtwell et al., J. Mol. Biol. 270 (1997), 677-681（前記文献は参照によって本明細書に含まれる））。したがって、重鎖のヘテロダイマーはどちらかのホモダイマーよりも安定である傾向を有し、発現されるポリペプチドでより大きな割合を占める。加えて、所望の軽鎖/重鎖対の会合は、二重特異性抗体の1つのFab（Fab領域）の改変（軽鎖と重鎖の間で定常領域または定常および可変領域を“交換”する）によって誘導することができる。したがって、改変Fabドメインではそれぞれ、重鎖は例えばCL-V_HまたはCL-V_Lドメインを含み、軽鎖はCH₁-V_LまたはCH₁-V_Hドメインを含むことになる。これは、改変鎖の重鎖/軽鎖Fab部分（すなわち改変軽鎖または重鎖）と標準/非改変アームの重鎖/軽鎖Fab部分との相互作用を防ぐ。解説すれば、改変アームのFabドメインの重鎖（CLドメインを含む）は、好ましくは、非改変アーム/Fabドメインの軽鎖（前記もまたCLドメインを含む）と相互作用しない（重鎖/軽鎖の“不適切な”または望ましくない対形成を防ぐ）。“不適切な”軽鎖/重鎖の結合を防ぐこの技術は、“CrossMAb”技術と称され、KiH技術と併用されるときには、所望の二重特異性分子の目覚ましく増強された発現をもたらす（例えば以下を参照されたい：Schaefer et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108 (27) : 11187-92; および米国特許公開No 2010/0159587（前記は参照によってその全体が本明細書に含まれる））。KiH構造の他の例も存在し、上記に考察した例を制限と解釈してはならない。Fc領域のヘテロダイマー化を促進する他の方法には、Fcドメインへの荷電極性の操作（Gunasekaran et al., 2010）およびSEED技術（SEED-IgG）（Davis et al., Protein Eng Des Sel. 2010 Apr;23 (4) :195-202, 2010）が含まれる。

10

20

30

40

50

【0095】

具体的な実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子はCrossMAbであり、前記は、抗体ドメイン交換がKiH方法論に基づき、それぞれ別個の親抗体から誘導される。軽鎖の誤対形成は、ドメインクロスオーバーおよびKiH方法によりヘテロダイマー化された重鎖を用いて克服される。ドメインクロスオーバーでは、可変ドメインまたは定常ドメインのどちらかが軽鎖および重鎖間で交換されて2つの非対称性Fabアームを形成して軽鎖の誤対形成を回避し、一方、“クロスオーバー”は抗原結合親和性を維持する。天然の抗体と比較して、CrossMAbはより高い安定性を示す。いくつかの異なるCrossMAb様式が存在する：例えば異なる領域で交換されるFab、V_H-V_LおよびC_{H1}-C_L。好ましい実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子はCrossMAb^{CH1-CL}様式に基づき、前記は二重特異性抗体のC_{H1}およびC_L領域を交換する。

追加のヘテロダイマー化IgG様抗原結合分子には、ヘテロFc-scFvs、Fab-scFvs、IgG-scFv、およびscFv-IgGが含まれる（ただし前記に限定されない）。ヘテロFc-scFvsは2つの別個のscFvをヘテロダイマー化が可能なFcドメインに連結し、一方、Fab-scFvsは1つのエピトープに特異的なFabドメインを含み、前記Fabドメインは異なるエピトープに特異的なscFvに連結されている。IgG-scFvおよびscFv-IgGはIgG様抗体であり、前記はそれらのC-末端およびN-末端にそれぞれ連結されたscFvを有する（上掲書（Kontermann R E (ed.))の151 - 169ページ参照されたい）。

【0096】

代表的なCrossMAbの実施態様は本明細書のセクション5.4に記載される。前記では、操作された突起が、第一のIgG様ポリペプチドの境界面に、そのCH3ドメイン内の当該ポリ

ペプチドの少なくとも1つの接触残基を置き換えることによって作出される。具体的には、第一のポリペプチド上で置き換えられるべき接触残基は366位のIgG残基（残基の番号付与はFc結晶構造による（Deisenhofer, Biochem. 20:2361, 1981））に対応し、ここで操作される突起は、最初の残基をコードする核酸を最初の残基よりも大きな側鎖体積を有する持込み残基をコードする核酸で置き換える工程を含む。具体的には、366位のスレオニン（T）残基がトリプトファン（W）に変異させられる。第二の工程では、操作された窪みが、第二のポリペプチドの境界面に、そのC_H3ドメイン内の当該ポリペプチドの少なくとも1つの接触残基を置き換えることによって作出され、ここで操作される窪みは、最初の残基をコードする核酸を最初の残基よりも小さな側鎖体積を有する持込み残基をコードする核酸で置き換える工程を含む。具体的には、第二のポリペプチド上で置き換えられるべき接触残基は407位のIgG残基に対応する。具体的には、407位のチロシン（Y）残基がアラニン（A）に変異させられる。この操作手順は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびIgG4から成る群から選択される、種々のIgGサブタイプで実施することができる。

CrossMAbの別の例示的な例では、マルチ特異性抗原結合分子は、例えばWO2008119353およびWO 2011131746（その各々は参照によってその全体が本明細書に含まれる）に記載されたデュオポディプラットフォーム/cFAE（GenMAb）を土台にすることができ、前記では、二重特異性抗体は、2つの異なる宿主で別々の成分抗体の発現によって作出され、続いて精製および組立てられて、2つの一特異的抗体間での制御されたFabアームの交換により二特異的ヘテロダイマー抗体が得られる。2つの一特異性出発タンパク質のCH3領域に非対称性で適合する変異（例えばF405LおよびK409R（EU番号付与インデックスによる））を導入することによって、Fabアーム交換と同様な力が働いて、方向が定められた、したがって収量が安定したヘテロダイマー対が減数的条件下でもたらされ得る（例えば以下に記載される：Labrijn et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110（13）:5145-5150；Gramer et al. MAbs 2013;5（6）:962-973；Labrijn et al. Nature Protocols 2014;9（10）:2450-63（前記文献は参照によってその全体が本明細書に含まれる））。実際、二重特異性ヒトIgG1 Abを2つの精製親抗体から作製することができる（親抗体の各々に対応するただ1つの相補的な変異（K409RまたはF405L）を有する）。この同じ手法をヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4骨格で実施することができる（上掲書（Labrijn 2013））。

【0097】

4.7 静電氣的ステアリング

他の実施態様では、マルチ特異性抗原結合分子は静電氣的ステアリングに基づく（Amgen、前記では、CH3における荷電相補性が選択した変異により変更され、静電氣的ステアリング効果を介して抗体Fcヘテロダイマー形成増強がもたらされる（Gunasekaran et al., J Biol Chem 2010;285（25）:19637-46；WO 2009089004 A1（前記は参照によって本明細書に含まれる））。この同じ手法をヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4骨格で実施することができる（WO 2009089004 A1）。リンカー。

リンカーを用いて異なる抗原結合分子を共有結合させ、少なくとも2つの抗原結合分子を含むキメラ分子を形成することができる。抗原結合分子間の連結は空間的關係を提供して、個々の結合分子とそれらの対応する同族エピトープとの結合を可能にすることができる。これに関して、個々のリンカーは、2つの別個の機能的な抗原結合分子の結合のために機能する。リンカーのタイプには、化学リンカーおよびポリペプチドリリンカーが含まれるが、ただし前記に限定されない。

リンカーは化学的リンカーであることができ、例えば以下が含まれる：アルキレン鎖、ポリエチレングリコール（PEG）鎖、ポリコハク酸無水物、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ（エチレンイミン）、オリゴ糖、アミノ酸鎖、または他の任意の適切な連結。ある種の実施態様では、リンカーそのものは生理学的条件下で安定であることができ（例えばアルキレン鎖）、或いは、前記は、生理学的条件下で、例えば酵素によって（例えば結合はペプチダーゼのための基質であるペプチド配列を含む）、または加水分解によって（例えば結合は加水分解可能な基、例えばエステルまたはチオエステルを含む）切断可能であることができる。リンカーは生物学的に非活性であることができ（例えばPEG、ポリグリコール酸

、またはポリ乳酸鎖)、或いは、前記は生物学的に活性であることができる(例えばオリゴもしくはポリペプチドなどで、前記は当該部分から切断されたとき、受容体と結合し酵素を不活化する)。リンカーは、第一および第二の抗体または抗原結合フラグメントと、任意の適切な結合または官能基(炭素-炭素結合、エステル、エーテル、アミド、アミン、カルボネート、カルバメート、スルホンアミドなどを含む)によって結合させることができる。

【0098】

ある種の実施態様では、リンカーは、少なくとも1つ(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11以上)の誘導または非誘導アミノ酸である。このタイプの例示的な例では、リンカーは、好ましくは非免疫原性で可撓性で、例えばセリンおよびグリシン配列またはAla-Ala-Alaの繰返しを含むものである。実際の構築物に応じて、リンカーは長くても(例えば長さが12アミノ酸を超える)、短くてもよい(例えば長さが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12アミノ酸)。例えば、単鎖ジアボディを作製するために、第一および第三のリンカーは好ましくは長さが約3から約12アミノ酸であり(より好ましくは長さが約5アミノ酸)、第二のリンカーは好ましくは長さが12アミノ酸より長い(より好ましくは長さが約15アミノ酸)。リンカーの長さを3残基未満に減少させることによって、二重特異性抗体を所望にしたがって二価、三価、または四価にすることを可能にする本発明に単鎖抗体を強制することができる。

代表的なペプチドリリンカーは、 $[AAA]_n$ 、 $[SGGGG]_n$ 、 $[GGGGS]_n$ 、 $[GGGGG]_n$ 、 $[GGGKGGGG]_n$ 、 $[GGGNGGGG]_n$ 、 $[GGGCGGGG]_n$ から選択することができ、ここでnは1から10、適切には1から5、より適切には1から3の整数である。

【0099】

5. マルチ特異性抗原結合構築物

本発明のある特徴は、異なる特異性を有する複数の抗原結合分子を含み、それらが直接的にまたはリンカーを介して一緒に融合或いは接合されているキメラ構築物に関する。

5.1 抗RANKL-抗PD-1ジアボディ

本発明は、二重特異性で抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分子を含むマルチ特異性構築物を意図し、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS $[SGGGG]_n$ eivltqspatls
lspgeratls
crasqsvssylawyqqkp g qaprlliydasnrat g iparfs g s g s g tdf t l t i s s l e p e d f a v y c q q s s n w p r t
f g q g t k v e i k $[SGGGG]_n$ QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKR
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSS $[SGGGG]_n$ eivltqsp g t l s l s
p g e r a t l s c r a s q s v r g r y l a w y q q k p g q a p r l l i y g a s s r a t g i p d r f s g s g s g t d f t l t i s r l e p e d f a v
f y c q q y g s s p r t f g q g t k v e i k (配列番号:216)

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

$[SGGGG]_n$ の各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

b) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSS $[SGGGG]_n$ eivltqsp g t l s l s p g e r a t l s c r a s q s v r
g r y l a w y q q k p g q a p r l l i y g a s s r a t g i p d r f s g s g s g t d f t l t i s r l e p e d f a v y c q q y g s s p r t f g q
g t k v e i k $[SGGGG]_n$ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS $[SGGGG]_n$ eivltqspat
l s l s p g e r a t l s c r a s q s v s s y l a w y q q k p g q a p r l l i y d a s n r a t g i p a r f s g s g s g t d f t l t i s s l e p e d f a

vyyccqssnwprtf g q g tkveik (配列番号:217)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 0 1 0 0 】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW INAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRGII IAYYFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsisp ger
atls crasqsvssylawyqqkp g qaprlliydasnrat g iparfs g s g s g tdf tltisslepedfavyyccqssn
wprtf g q g tkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYD
GSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspssl
sasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpedia
tyycqhtraf g q g tkveik (配列番号:218)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcrasqsisr
yl nwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpediatyycqhtraf g q g tkveik
[SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW INAGNGNTKFSQKFQGRITV
TRDTA ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRGII IAYYFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsis
p geratls crasqsvssylawyqqkp g qaprlliydasnrat g iparfs g s g s g tdf tltisslepedfavyycc
qssnwprtf g q g tkveik (配列番号:219)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

e) EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsisp geratls
crask g vsts g ysylhwyqqkp g qaprlliy lasyles g vparfs g s g s g tdf tltisslepedfavyycqhs
rdlpltf g g g tkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGI
NPSNGGTNFNEKFKNR/TLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGGTTVTVSS [SGGGG]_n e
ivltqsp g tltisp geratls crasqsvr g rylawyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf

10

20

30

40

50

tltisrlepedfavfycqqy g ssprtf g q g tkveik (配列番号:220)

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 0 1 0 1 】

f) QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSS
TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g tislsp g eratls
crask g vsts g ysylhwyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf
tltisrlepedfavfycqqy g ss
prtf g q g tkveik [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSGITGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTV
VSS [SGGGG]_n eiv
ltqspatlsisp g eratls
crask g vsts g ysylhwyqqkp g qaprlliy
lasyles g vparfs g s g s g tdf
tltisrlepedfavfycqqy g ss
prtf g q g tkveik (配列番号:221)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AASTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGGQTLTV
VSS [SGGGG]_n eivltqspatlsisp g e
ratls
crask g vsts g ysylhwyqqkp g qaprlliy
lasyles g vparfs g s g s g tdf
tltisrlepedfavy
ycqhsrdlptf g g g tkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGVEVKKPGASVKV
SCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLE
WMGGINPSNGGTNFNEKFKNRV
TLTTDSS
TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVT
VSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g a
eftltisslqpediatyycqhtraf g q g tkveik (配列番号:222)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

h) QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSS
TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVT
VSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcr
asqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpediatyycqhtraf g q
g tkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKV
SCKASGYDFSNYA
IHWVRQAPGQRLEWMGW
INAGNGNTKFSQ
KFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED
TAVYYCARDSSNMVRGII
IAYYFDYWGGQTLTV
VSS [SGGGG]_n eivltq
spatlsisp g eratls
crask g vsts g ysylhwyqqkp g qaprlliy
lasyles g vparfs g s g s g tdf
tltisrlepedfavyycqhsrdlptf g g g tkveik (配列番号:223)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【0102】

10

5.2抗RANKL-抗PD-1ジアボディ

また別に、二重特異性構築物は、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含み、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g tislsp g erat l
scrasqrvssylawyqqkp g qaprlliydassrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrlpedfavyyccqy g sl
pwtf g q g tkveik [SGGGG]_n VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGS
EKYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n eivlt
qsp g tislsp g erat lscrasqsvr g rylawyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf tlti
srlepedfavfycqy g ssprtf g q g tkveik (配列番号:224)

20

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

b) VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYVDSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g tislsp g erat lsc
rasqsvr g rylawyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrlpedfavfycqy g ss
prtf g q g tkveik [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n eiv
ltqsp g tislsp g erat lscrasqrvssylawyqqkp g qaprlliydassrat g ipdrfs g s g s g tdf tlti
srlepedfavyyccqy g slpwtf g q g tkveik (配列番号:225)

30

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

40

【0103】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I A YFYDYWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g tislsp g e
rat lscrasqrvssylawyqqkp g qaprlliydassrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrlpedfavyyccqy
g slpwtf g q g tkveik [SGGGG]_n VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK
QDGSEKYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTTLVTVSS [SGGGG]_n e

50

ivmtqspsslsasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftlt
isslqpediatyycqhtraf g q g tkveik (配列番号:226)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcr
asqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpediatyycqhtraf g q
g tkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVCKASGYDFSNIYIHWRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQ
KFQGRITVTRDTAASTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIAYYFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltq
sp g t l s l s p g e r a t l s c r a s q r v s s s y l a w y q q k p g q a p r l l i y d a s s r a t g i p d r f s g s g s g t d f t l t i s r l
e p e d f a v y c q q y g s l p w t f g q g t k v e i k (配列番号:227)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 0 1 0 4 】

e) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv g drvtit
crasqdvstavaawyyqqkp g kapklliysasflys g vpsrfs g s g s g t d f t l t i s s l q p e d f a t y y c q q y l y h p a t
f g q g t k v e i k [SGGGG]_n EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g
t l s l s p g e r a t l s c r a s q s v r g r y l a w y q q k p g q a p r l l i y g a s s r a t g i p d r f s g s g s g t d f t l t i s r l e p
e d f a v f y c q q y g s s p r t f g q g t k v e i k (配列番号:228)

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

f) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g t l s l s p g e r a t l s c r a
s q s v r g r y l a w y q q k p g q a p r l l i y g a s s r a t g i p d r f s g s g s g t d f t l t i s r l e p e d f a v f y c q q y g s s p r
t f g q g t k v e i k [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGS
TYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n diqmt

qspsslsasv g drvtitcrasqdvstavawyqqkp g kapkllysasflys g vpsrfs g s g s g tdftltisslq
pedfatyycqylyhpatf g q g tkveik (配列番号:229)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

10

【0105】

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AASTAMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIAYFDYWGQGTLVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv g d
rvtitcrasqdvstavawyqqkp g kapkllysasflys g vpsrfs g s g s g tdftltisslqpedfatyycqyly
hpatf g q g tkveik [SGGGG]_n EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
YGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivmt
qspsslsasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltissl
qpeditatyycqhqtraf g q g tkveik (配列番号:230)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

20

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

h) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTS
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWQGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcras
qsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpeditatyycqhqtraf g q g t
kveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQ
GRITVTRDTAAASTAMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIAYFDYWGQGTLVTVSS [SGGGG]_n diqmtqsp
ssslsasvgdrvtitcrasqdvstavawyqqkpgkapkllysasflysgvpsrfsgsgsgtdftltisslqpedf
atyycqylyhpatfgqgtkveik (配列番号:231)

30

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

40

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【0106】

5.3抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ

また別に、二重特異性構築物は、抗RANKL抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子を含み、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記から成るか、または本質的に前記から成る：

50

a) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratls
scrasqsvgssylawyqqkpgqaprlliygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavvycqyg
sspwtfgqgtkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISY
DGNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivlt
qspgtlslspgeratlsscrasqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftlti
srlepedfavfycqyggssprtfgqgtkveik (配列番号:232)

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

b) QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlsscra
sqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqyggsspr
tfgqgtkveik [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGS
TYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivlt
qspgtlslspgeratlsscrasqsvgssylawyqqkpgqaprlliygafsratgipdrfsgsgsgtdftlti
srlepedfavvycqyggsspwtfgqgtkveik (配列番号:233)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【0107】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIAYYFDYWQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspge
ratlsscrasqsvgssylawyqqkpgqaprlliygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavvycq
qygsspwtfgqgtkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWV
FISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWQGLTVTVSS [SGGGG]_n e
ivmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsgsgsgaefltl
isslqpediatyycqhtrafgqgtkveik (配列番号:234)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgdrvtitcras

qsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftlttisslqpediatyycqhtraf g q g t
kveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQ
GRITVTRDTAASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRGII IAYYFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp
g tllslsp g eratls crasqsv g ssylawyqqkp g qaprlliy g afsrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrl
epedfavyycqy g sspwtf g q g tkveik (配列番号:235)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、
小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、
[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

e) EVQLLESGGGVLPQGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLLVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv g drvtit
crasqsinsyldwyqqkp g kapklliyaasslqs g vpsrfs g s g s g tdf tltisslqpedfatyycqyystpft
f g p g tkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNK
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g
tllslsp g eratls crasqsvr g rylawyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrlep
edfavyfycqy g ssprtf g q g tkveik (配列番号:236)

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

f) QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n eivltqsp g tllslsp g eratls cr
asqsvr g rylawyqqkp g qaprlliy g assrat g ipdrfs g s g s g tdf tltisrlep edfavyfycqy g sspr
tf g q g tkveik [SGGGG]_n EVQLLESGGGVLPQGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGS
TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLLVTVSS [SGGGG]_n diqmt
qspsslsasv g drvtitcrasqsinsyldwyqqkp g kapklliyaasslqs g vpsrfs g s g s g tdf tltisslq
pedfatyycqyystpftf g p g tkveik (配列番号:237)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 0 1 0 8 】

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRGII IAYYFDYWGGGTLVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv g d
rvtitcrasqsinsyldwyqqkp g kapklliyaasslqs g vpsrfs g s g s g tdf tltisslqpedfatyycqyy
stpftf g p g tkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISY

DGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmt
qspsslsasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltissl
qpeditatyyqcqhtraf g q g tkveik (配列番号:238)

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

h) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv g drvtitcras
qsisrylnwyqlkp g kaprlliy g asslqs g vpsrfs g s g s g aeftltisslqpeditatyyqcqhtraf g q g t
kveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQ
GRITVTRDTAASTAYMELRSLRSEDVAYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n diqmtqsp
slsasv g drvtitcrasqsisrylnwyqlkp g kapklliyaasslqs g vpsrfs g s g s g tdf tltisslqpedit
atyyqcqqyystpftf g p g tkveik (配列番号:239)

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 0 1 0 9 】

5.4抗RANKL-抗PD-1 CrossMAb構築物

本発明はまたCrossMAbマルチ特異性抗原結合分子を意図する。CrossMAb構築の第一の工程では、操作された突起が、第一のIgG様ポリペプチドの境界面に、そのCH3ドメイン内の当該ポリペプチドの少なくとも1つの接触残基を置き換えることによって作出される。具体的には、第一のポリペプチド上で置き換えられるべき接触残基は366位のIgG残基（残基の番号付与はFc結晶構造による（Deisenhofer, Biochem. 20:2361, 1981））に対応し、ここで、操作される突起は、最初の残基をコードする核酸を最初の残基よりも大きな側鎖体積を有する持込み残基をコードする核酸で置き換える工程を含む。具体的には、366位のスレオニン（T）残基がトリプトファン（W）に変異させられる。第二の工程では、操作された窪みが、第二のポリペプチドの境界面に、そのC_H3ドメイン内の当該ポリペプチドの少なくとも1つの接触残基を置き換えることによって作出され、ここで、操作される窪みは、最初の残基をコードする核酸を最初の残基よりも小さな側鎖体積を有する持込み残基をコードする核酸で置き換える工程を含む。具体的には、第二のポリペプチド上で置き換えられるべき接触残基は407位のIgG残基に対応する。具体的には、407位のチロシン（Y）残基がアラニン（A）に変異させられる。この操作手順は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびIgG4から成る群から選択される、種々のIgGサブタイプで実施することができる。

続く工程では、ヘテロダイマー二重特異性IgGで起こり得る2つの軽鎖/重鎖相互作用間の識別を促進するために、所望される軽鎖/重鎖対の結合を、二重特異性抗体の1つのFab

(Fab領域)を改変することによって誘発し、軽鎖および重鎖間で定常領域または定常領域と可変領域を“交換”することができる(例えば上掲書(Schaefer et al., 2011)参照)。したがって、改変Fabドメインではそれぞれ、重鎖は例えば C_L-V_H または C_L-V_L ドメインを含み、軽鎖は $C_{H1}-V_L$ または $C_{H1}-V_H$ ドメインを含むことになる。これは、改変鎖の重鎖/軽鎖Fab部分(すなわち改変軽鎖または重鎖)と標準/非改変アームの重鎖/軽鎖Fab部分との相互作用を防ぐ。解説すれば、改変アームのFabドメインの重鎖(C_L ドメインを含む)は、好ましくは、非改変アーム/Fabドメインの軽鎖(前記もまた C_L ドメインを含む)と相互作用しない(重鎖/軽鎖の“不適切な”または望ましくない対形成を防ぐ)。“不適切な”軽鎖/重鎖の結合を防ぐこの技術は、“CrossMAb”技術と称され、KiH技術と併用されるときには、所望の二重特異性分子の目覚ましく増強された発現をもたらす(例えば上掲書(Schaefer et al.)を参照されたい)。

10

ヘテロダイマー二重特異性IgG抗体の作製は、第一に、二重特異性IgGの4鎖をコードする抗体遺伝子を哺乳動物系発現ベクターでクローニングし、哺乳動物細胞(例えばHEK293)での分泌性発現を可能にする。抗体鎖cDNAの各々を一緒に等モル比で、HEK293細胞に293フェクチンまたは同様な技術を用いてトランスフェクトし、抗体含有細胞培養上清を採集し、タンパク質Aセファロースを用いて抗体を上清から精製する。

いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分子の両方を含む二重特異性ヘテロダイマーIgGは、2重鎖2軽鎖構築物を用いて構築することができ、この場合、重鎖 C_{H3} ドメインの一方は366位で改変され($T366W$)(“ノブ”と称される)、他方の重鎖 C_{H3} ドメインは407位で改変されて($Y407A$)(“ホール”と称される)、重鎖のKiHヘテロダイマー化を促進する。

20

【0110】

5.4.1 デノスマブCrossMAbのための構築物 - $C_{H1}-C_L$ 交換

例示的デノスマブCrossMAbはIgG₂に由来する重鎖配列を含むことができ、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig鎖間で C_{H1} および C_L ドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb $C_{H1}-C_L$ hui g G2 ノブ (KNOB) 変異、重鎖

【0111】

30

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
KGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQG
TLVTVSSRtvaapsvfifpppsdeqlksgrtasvvcilnnfybreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdkdstylsstltlsk
adyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgecerkccvecppcpappvagpsvlfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqf
nwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwingkeyckvsnkglpapiektisktgqprepqvytlppsreemtknqvsl
Wclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsfflyskltvdkswqqgnvfscsvmhlealnhhtqkslsispkg

【0112】

40

(配列番号240)

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_H は通常大文字で表示され、デノスマブ C_L は太字の小文字で表示され、ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、デノスマブ $C_{H2}-C_{H3}$ ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2

デノスマブCrossMAb $C_{H1}-C_L$ 軽鎖

【0113】

METPAQLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPG
 QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYSSPRTFGQGTKVEIK**astkgpsvfpl**
apcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqytycnvdhkpsntkv
dktv

【 0 1 1 4 】

(配列番号 2 4 1)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示される。

10

構築物3

ニボルマブI g G2ホール変異、重鎖

【 0 1 1 5 】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSS**astkgpsvfplapcsrstsest**
aalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslgtktytcnvdhkpsntkvdkrverkcvec
ppcpappvagpsvfifppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngk
 eykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttpmldsdgsffl**As**
 kltdvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

20

【 0 1 1 6 】

(配列番号 2 4 2)

ここで、ニボルマブV_Hは通常大文字で表示され、ニボルマブC_{H1}は太字の小文字で表示され、HuI g G2ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、HuI g G2C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQSSNWPRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 : 243)。

30

【 0 1 1 7 】

5.4.2 デノスマブCrossMAbのための構築物 - V_H-V_L 交換

デノスマブCrossMAbのための別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、I g 鎖間でV_HおよびV_Lドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。ある実施態様では、前記は、I g G2に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はKiH改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb V_H-V_L huI g G2ノブ変異、重鎖

40

【 0 1 1 8 】

MEFGLSWLFLVAILKGVOCIEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYSSPRTFGQGTKVEIK**astkgpsvfpla**
pcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqytycnvdhkpsntkv
dkrverkcvecppcpappvagpsvfifppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvlt
 vvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsl**W**clvkgfypsdiavewesngqpennykttpmldsdgsfflyskltdvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

50

【 0 1 1 9 】

(配列番号 2 4 4)

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示され、ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、デノスマブC_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2デノスマブCrossMAb V_H-V_L 軽鎖

【 0 1 2 0 】

METPAOLLFLLLWLPDITTEGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP

GKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQ

GTLVTVSSrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltiskadyekkhv

yacevthqglsspvtksfnrgec

10

【 0 1 2 1 】

(配列番号 2 4 5)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Hは通常大文字で表示され、デノスマブC_Lドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖

【 0 1 2 2 】

QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY

YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTTLTVSSastkqpsvflapcsrstsest

aalgcivkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavilqssglyslssvvtvpssslgtktytcnvdkhpsntkvdkrverkcvec

ppcpappvagpsvflfpkpdktdlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngk

eyckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltcivkgfypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsfflAs

klvtvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksislspgk

20

30

【 0 1 2 3 】

(配列番号 2 4 6)

ここで、ニボルマブV_Hは通常大文字で表示され、ニボルマブC_{H1}は太字の小文字で表示され、HuIgG2ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、HuIgG2C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEP
EDFAVYYCQQSSNWPRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:247)

40

【 0 1 2 4 】

5.4.3デノスマブCrossMAbのための構築物 - Fab-Fab交換

デノスマブCrossMAbのさらに別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig鎖間でFabドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。この実施態様では、前記は、IgG2に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はKiH改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb Fab huIgG2ノブ変異、重鎖

【 0 1 2 5 】

50

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYQSSPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifpp
sdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdkdstylsstltlskadyekhkvyacevthqqls
spvtksfnrgecerkcckvecppcppappvagsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeq
 fnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsl**W**clvkgfypsdiavewesngq
 pennykttppmldsdgsfflyskitvdksrwqqgnvfscsvmhlehnhytqkslsispkg

【 0 1 2 6 】

(配列番号 2 4 8)

10

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_Lドメインは太字の小文字で表示され、ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、デノスマブC_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2

デノスマブCrossMAb Fab軽鎖

【 0 1 2 7 】

METPAOLLFLLLWLPDITTEGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
 GKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWQG
 GTLTVSSastkgpsvfplapcsrcstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavilqssglylsssvtvpssn
fgtqtytcnvdhkpstnkvdktv

20

【 0 1 2 8 】

(配列番号 2 4 9)

ここで、カッパシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Hは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖

【 0 1 2 9 】

30

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTTLTVSSastkgpsvfplapcsrcstse
aalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavilqssglylsssvtvpssslgktytcnvdhkpstnkvdkrverkcckve
pcppappvagsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngk
eykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsffl**As**
 kltvdksrwqqgnvfscsvmhlehnhytqkslsispkg

【 0 1 3 0 】

40

(配列番号 2 5 0)

ここで、ニボルマブV_Hは通常大文字で表示され、ニボルマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示され、HuIgG2ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、HuIgG2C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEP
 EDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:251)。

【 0 1 3 1 】

50

5.4.4 デノスマブ CrossMAb のための構築物 - C_{H1}-C_L 交換

デノスマブ CrossMAb のさらに別の実施態様では、デノスマブ CrossMAb は Ig G4 に由来する重鎖配列を含む。この実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig 鎖間で C_{H1} および C_L ドメインが交換されるように抗 RANKL 抗原結合分子の Fab ドメインを改変することによって誘導され得る。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブ CrossMAb C_{H1}-C_L hui g G4 ノブ変異、重鎖

【 0 1 3 2 】

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
KGLEWVSGITSGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQG
TLTVSSRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcilnnfyprcakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltisk
adyekhhkvacevthqglsspvtksfnrgeceskygppcpapcpeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevq
fnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakggpprepqvytlppsqeemtknqvsl
Wclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflysriltvdkswrqegnvfscsvmhealhnhytqkslsislsgk

10

【 0 1 3 3 】

(配列番号 2 5 2)

ここで、Ig G₂ シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_H は通常大文字で表示され、デノスマブ C_L ドメインは太字の小文字で表示され、Ig G₄ ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、Ig G₄ C_{H2}-C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、T366W 置換は太字の大文字で表示される。

20

構築物2

デノスマブ CrossMAb C_{H1}-C_L 軽鎖

【 0 1 3 4 】

METPAOLLFLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPG
QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYQGSSPRTFGQGTKVEIK**astkgspsvfpl**
apcsrstsestaalgclvkdyppepvtvswnsgaltsgvhtfpavliqssglyslssvvtvpssnfgtqytycnvdhkpsntkv
dktv

30

【 0 1 3 5 】

(配列番号 2 5 3)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_L は通常大文字で表示され、デノスマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブ Ig G4 ホール変異、重鎖

【 0 1 3 6 】

QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTTLTVSS**astkgspsvfplapcsrstsest**
aalgclvkdyppepvtvswnsgaltsgvhtfpavliqssglyslssvvtvpssslgktytycnvdhkpsntkvdkrveskygpp
cpccpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlng
keykckvsnkglpssiektiskakggpprepqvytlppsqeemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsffl**As**
rltvdksrwqegnvfscsvmhealhnhytqkslsislsgk (配列番号:254)、

40

【 0 1 3 7 】

(配列番号 2 5 4)

50

ここで、ニボルマブ V_H は通常大文字で表示され、ニボルマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示され、IgG4ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG4 C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEP
EDFAVYYCQQSSNWPRFTGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:255)。

【0138】

5.4.5デノスマブCrossMAbのための構築物 - V_H - V_L 交換 - IgG4 C_H

デノスマブCrossMAbのさらに別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig鎖間で V_H および V_L ドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。この実施態様では、前記は、IgG4に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はKiH改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb V_H - V_L hui g G4 ノブ変異、重鎖

【0139】

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQ
APRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSSPRFTGQGTKVEIKastkqpsvfpla
pcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqttytcnvdhkpsntkvd
ktveskygpppcscpapeflgppsflfpkpkdtkimistpevtcvvvdvsqdepevqfnwvydgvgevhnahtkpreeqfnstyrvvsv
ltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslWclvkgfypsdiavewesngqpennyktp
pvldsdgsfflysrvtvdksrwqegnvfscsvmhcalhnhytqkslsislgk

【0140】

(配列番号256)

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_L は通常大文字で表示され、デノスマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示され、IgG₄ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₄ C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2

デノスマブCrossMAb V_H - V_L 軽鎖

【0141】

METPAQLLFLLLLWLPDITGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSGITSGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWQG
GTLTVTVSSrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltiskadyekhk
vacevthqglsspvtksfnrgec

【0142】

(配列番号257)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_H は通常大文字で表示され、デノスマブ C_L ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブIgG4ホール変異、重鎖

【0143】

10

20

30

40

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSastkgpsvfplapcsrcstsest
aalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkrveskygpp
cpccpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsltlvhdwlng
 keykckvsnkglpssiectiskakgqprepvytlppsqeemtknqvsltlclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflAs
 ritvdksrwqegnvfscsvmhcalhnhytqkslsislglk

【 0 1 4 4 】

(配列番号 2 5 8)

10

ここで、ニボルマブ V_H は通常大文字で表示され、ニボルマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示され、Ig G4ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、Ig G4 C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
 EDFAVYYCQQSSNWPRFTGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 : 259) 。

【 0 1 4 5 】

5.4.6デノスマブCrossMAbのための構築物 - Fab-Fab交換 - Ig G₄ CH

20

デノスマブCrossMAbの別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig 鎖間でFabドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。この実施態様では、前記は、Ig G4に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はKiH改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb Fab hui g G4ノブ変異、重鎖

【 0 1 4 6 】

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSPPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifpp
sdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstylsstltiskadyekkhvyacevthqgls
**spvtskfnrgeceskygppcpccpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeq
 fnstyrvvsltlvhdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslWclvkgfypsdiavewesngq
 pennykttpvldsdgsfflyslritvdksrwqegnvfscsvmhcalhnhytqkslsislglk**

30

【 0 1 4 7 】

(配列番号 2 6 0)

ここで、Ig G₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_L は通常大文字で表示され、デノスマブ C_L ドメインは太字の小文字で表示され、Ig G₄ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、Ig G₄ C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

40

構築物2

デノスマブCrossMAb Fab軽鎖

【 0 1 4 8 】

METPAOLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
 GKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGGQ
 GTLTVTVSSastk~~g~~psvfplapcsrstsestaalgclvkdyfepv~~t~~svwnsgaltsgvhtfpav~~l~~qssglyslssv~~t~~vpssn
 fgtq~~t~~ycnvdhkpsntkvdktv

【 0 1 4 9 】

(配列番号 2 6 1)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブ V_H は通常大文字で表示され、デノスマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブ Ig G4 ホール変異、重鎖

【 0 1 5 0 】

QVQLVESGGGVVQPG~~R~~SLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT~~L~~TVTVSSastk~~g~~psvfplapcsrstsest
 aalgclvkdyfepv~~t~~svwnsgaltsgvhtfpav~~l~~qssglyslssv~~t~~vpssslg~~t~~kyt~~c~~ncv~~d~~hkpsntkvdk~~r~~veskygpp
 cpcpapeflg~~g~~psvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevf~~n~~wyvdgvevhnaktkpreeqfnstyr~~v~~svltv~~h~~qdwlng
 keykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvsl~~t~~clvkgyfypsdiavewesngqpennyk~~t~~tpvldsdgsfflAs
 rltvdksrwqegnvfscsvmh~~e~~alhnhytqksls~~l~~sgk

【 0 1 5 1 】

(配列番号 2 6 2)

ここで、ニボルマブ V_H は通常大文字で表示され、ニボルマブ C_{H1} は太字の小文字で表示され、Ig G4 ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、Ig G4 C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEP
 EDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 : 263) 。

【 0 1 5 2 】

5.4.7 デノスマブ CrossMAb のための構築物 - C_{H1} - C_L 交換 - Ig G₄ C_H

デノスマブ CrossMAb のさらに別の実施態様は Ig G1 に由来する重鎖配列を含む。この実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig 鎖間で C_{H1} および C_L ドメインが交換されるように抗 RANKL 抗原結合分子の Fab ドメインを改変することによって誘導され得る。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブ CrossMAb C_{H1} - C_L hui g G1 ノブ変異、重鎖

【 0 1 5 3 】

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG
 KGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGGQ
 TLTVTVSSR~~t~~vaapsvfifppsdeqlksgtasv~~v~~clnnfy~~p~~reakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdystyls~~s~~titisk
 adyekhkvyacevthqgl~~s~~spv~~t~~ksfnrgecepkscdktht~~c~~pcpapeflg~~g~~psvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe
 vkfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyr~~v~~svltv~~h~~qdwlngkeykckvsnk~~a~~papiektiskakgqprepvytlppsr~~d~~eltknqv
 slWclvkgyfypsdiavewesngqpennyk~~t~~tpvldsdgsfflyskltvdksrwqggnvfscsvmh~~e~~alhnhytqksls~~l~~spgk [SEQ

【 0 1 5 4 】

(配列番号 264)

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Hは通常大文字で表示され、デノスマブC_Lドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2デノスマブCrossMAb C_{H1}-C_L軽鎖

【0155】

METPAOLLFLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPG
QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGSSPRTFGQGKVEIKastkgpsvfpl
apcsrstsastaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqttytcnvdhkpsntkv
dktv

10

【0156】

(配列番号 265)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3ニボルマブIgG₁ホール変異、重鎖

【0157】

QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSastkgpsvfplapcsrsts
aalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpsslgtktytcnvdhkpsntkvdkrvepkscdk
htcpccpapellggpsvfifppkpkdtlmisrtpetvcvvvdvshdepvkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwl
ngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsrdeitknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgssfflA
skltvdksrwqggvnfscsvmhcalhnhytqskslspgk

20

【0158】

(配列番号 266)

ここで、ニボルマブV_Hは通常大文字で表示され、ニボルマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:267)。

30

【0159】

5.4.8デノスマブCrossMAbのための構築物 - V_H-V_L交換 - IgG₁ C_H

デノスマブCrossMAbの別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig鎖間でV_HおよびV_Lドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。ある実施態様では、前記は、IgG1に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はKiH改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1デノスマブCrossMAb V_H-V_L hui gG1ノブ変異、重鎖

【0160】

40

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKP
 GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSSPRTFGQGTKEIKastkgpsvfp
lapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqytycnvdhkpsntkv
dktevpekscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpetvcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr
 vsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsrdeitknqvsIWclvkgfypsdiavewesngqpennyk
 ttpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslsispkg

【 0 1 6 1 】

(配列番号 2 6 8)

10

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2

デノスマブCrossMAb V_H-V_L軽鎖

【 0 1 6 2 】

METPAOLLFLLLWLPTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
 GKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGGQ
 GTLVTVSSrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfybreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvy
 yacevthqglsspvtksfnrge-

20

【 0 1 6 3 】

(配列番号 2 6 9)

ここで、カップシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Hは通常大文字で表示され、デノスマブC_Lドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブIgG₁ホール変異、重鎖

30

【 0 1 6 4 】

QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGT LTVTVSSastkgpsvfp**lapcsrstsest**
aalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslgtktytcnvdhkpsntkvdkrvepkscdk
htccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpetvcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdw
 lngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsrdeitknqvsItclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflA
 skltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslsispkg

40

【 0 1 6 5 】

(配列番号 2 7 0)

ここで、ニボルマブV_Hは通常大文字で表示され、ニボルマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEP
 EDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 : 271) 。

50

【 0 1 6 6 】

5.4.9 デノスマブCrossMAbのための構築物 - IgG₁ CH

デノスマブCrossMAbの別の実施態様では、所望の軽鎖/重鎖対形成は、Ig鎖間でFabドメインが交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを改変することによって誘導され得る。ある実施態様では、前記は、IgG₁に由来する重鎖配列を含み、重鎖のヘテロダイマー化はK1H改変によって促進される。この構築のために、以下の4つの構築物が用いられる。

構築物1

デノスマブCrossMAb Fab h₁ IgG₁ ノブ変異、重鎖

【 0 1 6 7 】

10

MEFGLSWLFLVAILKGVOCEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQ
APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGS
SPRTFGQGTKVEIK**rtvaapsvfifpp**
sdeqiksgtasvvc**llnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltiskadyekhkvyacevthqgls**
spvtskfnrgecepkscdkthtccppcpapellggpsvlfppkpkdtl**misrtp****evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr**
eeqynstyrvvsvltvlhqdwl**ngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsrdeltknqvs****lWclvkgfypsdiavewesn**
gqpennykttppvldsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmh**eahhnytkslslspgk**

【 0 1 6 8 】

20

(配列番号 272)

ここで、IgG₂シグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Lは通常大文字で表示され、デノスマブC_Lドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2}-C_{H3}ドメインは通常小文字で表示され、T366W置換は太字の大文字で表示される。

構築物2

デノスマブCrossMAb Fab軽鎖

【 0 1 6 9 】

30

METPAOLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSGITSGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQ
GTLTVSS**astk****gpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpav****lqssglyslssvvtvpssn**
fgtqtytcnv**dhkpsntkvdktv**

【 0 1 7 0 】

(配列番号 273)

ここで、カッパシグナルペプチドは下線付き大文字で表示され、デノスマブV_Hは通常大文字で表示され、デノスマブC_{H1}ドメインは太字の小文字で表示される。

構築物3

ニボルマブIgG₁ホール変異、重鎖

【 0 1 7 1 】

40

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS**astk****gpsvfplapcsrstsest**
aalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpav**lqssglyslssvvtvpsssgtktytcnv****dhkpsntkvdkrvepkscdk**
thtccppcpapellggpsvlfppkpkdtl**misrtp****evtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwl**
ngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsrdeltknqvs**ltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsgsffl****A**
skltvdksrwqqgnvfscsvmh**eahhnytkslslspgk**

【 0 1 7 2 】

50

(配列番号 274)

ここで、ニボルマブ V_H は通常大文字で表示され、ニボルマブ C_{H1} ドメインは太字の小文字で表示され、IgG₁ヒンジ領域は下線付き小文字で表示され、IgG₁ C_{H2} - C_{H3} ドメインは通常小文字で表示され、Y407A置換は太字の大文字で表示される。

構築物4

ニボルマブ軽鎖

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:275)。

【0173】

一特異性二価親抗体の作製および精製に続いて、記載のように (Labriijn et al. *Nature Protocols* 2014;9 (10):2450-63)、2つの一特異性抗体間における制御されたFabアーム交換を介して、二重特異性ヘテロダイマーを組み立てることができる。

多様な実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、FabドメインがIg鎖間で交換されるように抗RANKL抗原結合分子のFabドメインを含み、配列番号:272 (デノスマブCrossMAb Fab hulgG1ノブ変異、重鎖) および配列番号:273 (デノスマブCrossMAb Fab軽鎖) を含む。

他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子のFabドメインは、 V_H および V_L ドメインがIg鎖間で交換されるように改変されて、配列番号:268 (デノスマブCrossMAb V_H - V_L hulgG1ノブ変異、重鎖) および配列番号:269 (デノスマブCrossMAb V_H - V_L 軽鎖) を含む。

【0174】

6. 医薬組成物

本発明の医薬組成物は概して、上記および本明細書の他の場所に記載の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子を含み、前記は1つ以上の医薬的に許容できる担体とともに処方される。場合によって、医薬組成物は1つ以上の他の化合物、薬剤、成分および/または物質を含む。選択される投与経路に関係なく、本発明の治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子は、当業者に公知の通常的方法によって医薬的に許容できる剤形に処方される (例えば以下を参照されたい: Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*; 21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.)。

本発明の医薬組成物は、所望される効果的な任意の方法で対象動物に投与することができる。例えば、医薬組成物は、経口摂取のために、または眼への局所投与のための軟膏もしくは点眼液として、または非経口もしくは任意の適切な他の投与 (例えば腹腔内、皮下、外用、皮内、吸入、肺内、直腸、膺、舌下、筋肉内、静脈内、動脈内、またはリンパ内投与) のために処方され得る。さらにまた、本発明の医薬組成物は、下記に詳細に記載する1つ以上の補助的治療と一緒に投与され得る。所望の場合には、本発明の医薬組成物を被包化するか、さもなければ胃または他の分泌物に対して保護することができる。

本発明の医薬組成物は1つ以上の活性成分を含むことができ、前記は、1つ以上の医薬的に許容できる担体、場合によって1つ以上の他の化合物、薬剤、成分および/または物質と混合物されてある。選択される投与経路に関係なく、本発明の二重特異性抗体は、当業者に公知の通常的方法によって医薬的に許容できる剤形に処方される (例えば以下を参照されたい: Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*; 21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.)。

【0175】

医薬的に許容できる担体は当業界で周知であり (例えば以下を参照されたい: Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*; 21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.; および米国局方 (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.))、以下が含まれる: 糖 (例えばラクトース、シュクロース、マンニトール、およびソルビトール)、デンプン、セルロース調製物、リン酸カルシウム (例えばリン酸二カルシウム、リン酸三カルシウムおよびリン酸水素カルシウム)、クエン酸ナトリウム、水、水溶液 (例えば食塩水、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロース塩化ナトリウム注射液、乳酸リンゲル注射液)、アル

10

20

30

40

50

コール（例えばエチルアルコール、プロピルアルコール、およびベンジルアルコール）、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ポリエチレングリコール）、有機エステル（例えばオレイン酸エチルおよびトリグリセリド）、生物分解性ポリマー（例えばポリラクチド-ポリグリコリド、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物））、弾性マトリックス、リボソーム、微小球、油（例えばトウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油、ゴマ油、綿実油、および落花生油）、カカオ脂、ワックス（例えば座薬ワックス）、パラフィン、シリコン、タルク、シリシレートなど。本発明の医薬組成物で用いられる医薬的に許容できる担体の各々は、処方物の他の成分と適合でき対象動物に対して傷害性でないという意味で“許容できる”必要がある。選択される剤形および意図される投与経路に適する担体は当業界で周知であり、選択剤形および投与方法で許容できる担体は、当業界で通常の技量を用いて決定され得る。

10

【0176】

本発明の医薬組成物は、場合によって、医薬組成物（治療用抗原結合分子調製物を含む）で普通に用いられる追加の成分および/または物質を含む。これらの成分および物質は当業界で周知であり、以下が含まれる：（１）充填剤または増量剤、例えばデンプンラクトース、シュクロース、グルコース、マンニトール、ケイ酸；（２）結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、シュクロースおよびアカシア；（３）保湿剤、例えばグリセロール；（４）崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび炭酸ナトリウム；（５）薬剤保持溶液、例えばパラフィン；（６）吸収促進剤、例えば四級アンモニウム化合物；（７）湿潤剤、例えばセチルアルコールおよびステアリン酸グリセロール；（８）吸収剤、例えばカオリンおよびベントナイト粘度；（９）滑沢剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、およびラウリル硫酸ナトリウム；（１０）懸濁剤、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、寒天およびトラガカント；（１１）緩衝剤；（１２）賦形剤、例えばラクトース、乳糖、ポリエチレングリコール、動植物脂肪、油、ワックス、パラフィン、カカオ脂、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、サリチル酸塩、酸化亜鉛、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末；（１３）不活性希釈剤、例えば水または他の溶媒；（１４）保存料；（１５）界面活性剤；（１６）分散剤；（１７）制御放出または吸収遅延剤、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、生物分解性ポリマー、リボソーム、微小球、ステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、およびワックス；（１８）乳白剤；（１９）アジュバント；（２０）湿潤剤；（２１）乳化および分散剤；（２２）可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、カルボン酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、ひまし油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル；（２３）噴射剤、例えばクロロフルオロ炭化水素および揮発性非置換炭化水素、例えばブタンおよびプロパン；（２４）抗酸化剤；（２５）処方物を目的のレシピエントの血液と等張にする薬剤、例えば糖および塩化ナトリウム；（２６）膨張剤；（２７）被覆物質、例えばレシチン；および（２８）甘味剤、風味剤、着色剤、香料および保存料。そのような成分または物質の各々は、処方物の他の成分と適合でき対象動物に対して傷害性でないという意味で“許容できる”必要がある。選択される剤形および意図される投与経路に適する成分および物質は当業界で周知であり、選択剤形および投与方法で許容できる成分および物質は、当業界で通常の技量を用いて決定され得る。

20

30

40

【0177】

経口投与に適する本発明の医薬組成物は、カプセル、カシェー、ビル、錠剤、散剤、顆

50

粒、溶液または懸濁液、エリキシルまたはシロップ、トローチ、ポーラス、舐め薬またはペーストの形態であることができる。これらの処方物は、当業界で公知の方法によって、例えば通常のパンコーティング、混合、顆粒化または凍結乾燥プロセスの手段によって調製することができる。

経口投与用の固体剤形（カプセル、錠剤、ピル、糖衣錠、散剤、顆粒など）は、例えば活性成分を以下と混合することによって調製できる：1つ以上の医薬的に許容できる担体、および場合によって1つ以上の充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、溶解遅延剤、吸収促進剤、湿潤剤、吸収剤、滑沢剤および/または着色剤。同様なタイプの固体組成物は、適切な賦形剤を用い充填軟質および硬質ゼラチンカプセルとして利用され得る。錠剤は、打錠または成形によって、場合により1つ以上の付属成分とともに製造できる。打錠錠剤は、適切な結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤、界面活性または分散剤を用いて調製できる。成形錠剤は適切な機械で成形することによって製造できる。錠剤および他の固体剤形（例えば糖衣錠、カプセル、ピルおよび顆粒）は、場合によって刻み目をつけるか、またはコーティングおよび殻（例えば腸溶皮および製薬業界で周知の他のコーティング）を用いて調製できる。それらはまた、その中の活性成分の徐放出または制御放出を提供するために処方され得る。それらは、例えば細菌保持フィルターでろ過することによって滅菌することができる。これらの組成物はまた場合によって乳白剤を含むことができ、さらに、活性成分のみを好ましくは胃腸管の一定の部分で場合によって遅延態様で放出する組成物であってもよい。活性成分はまたマイクロカプセル化された形態であってもよい。

【0178】

直腸または膣投与用の本発明の医薬組成物は座薬として提供でき、前記は、1つ以上の活性成分を1つ以上の適切な非刺激性担体と混合することによって調製され得る。前記非刺激性担体は、室温で固体であるが体温では液体で、したがって直腸または膣腔で融解して活性化合物を放出する。膣投与に適切な本発明の医薬組成物にはまたペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム剤が含まれ、前記は、当業界で適切であることが知られている医薬的に許容できる担体を含む。

経口投与用の液体剤形には、医薬的に許容できるエマルジョン、ミクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシルが含まれる。液体剤形は、当業界で普通に用いられる適切な不活性希釈剤を含む。不活性希釈剤の他に、経口組成物はまた、アジュバント、例えば湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、風味剤、着色剤、香料、および保存料を含むことができる。懸濁液は懸濁剤を含むことができる。

非経口投与に適切な本発明の医薬組成物は、1つ以上の薬剤/化合物/抗原結合分子を含み、それらは、1つ以上の医薬的に許容できる無菌的な等張の水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、或いは無菌的散剤（使用直前に無菌的注射可能溶液または分散液に再構成される）と組合される。前記は、適切な抗酸化剤、緩衝剤、処方物を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁もしくは膨張剤を含む。適切な流動性は、例えばコーティング物質の使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持できる。これら組成物はまた、適切なアジュバント、例えば湿潤剤、乳化剤および分散剤を含むことができる。前記はまた等張剤を含むことが所望され得る。加えて、注射可能医薬形の吸収延長は、吸収を遅延させる薬剤の含有によって達成され得る。

【0179】

局所投与または経皮投与のための剤形には、パウダー、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、膏薬、点滴剤および吸入剤が含まれる。活性薬剤（例えば治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子）は、無菌的条件下で適切な医薬的に許容できる担体と混合できる。軟膏、ペースト、クリームおよびゲルは賦形剤を含むことができる。パウダーおよびスプレーは賦形剤および噴射剤を含むことができる。

いくつかの事例では、医薬組成物の効果を延長させるために、皮下注射または筋肉内注射の吸収速度を遅くすることが所望される。これは、水への溶解性が低い結晶または非晶

質物質を液体懸濁物に混合することによって達成できる。

活性薬剤（例えば治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子）の吸収速度はその分解速度に左右され、前記は順に結晶サイズおよび結晶形に左右され得る。また別には、非経口投与薬剤または抗体の吸収遅延は、活性薬剤または抗体を油性ビヒクルに溶解または懸濁することによって達成できる。注射可能なデポ剤は、活性成分のミクロ被包化マトリックスを生物分解性ポリマーで形成することによって製造できる。活性成分対ポリマー比および利用される具体的なポリマーの性質に応じて、活性成分放出速度を制御することができる。注射可能なデポ剤処方物はまた、身体組織に適合するリポソームまたはミクロエマルジョンに薬剤を閉じ込めることによって調製できる。注射可能な物質は、例えば細菌保持フィルターでろ過することによって滅菌することができる。

処方物は、単位用量またはマルチ用量封入容器（例えばアンプルおよびバイアル）で提供でき、凍結乾燥状態で保存することができる（前記は、使用直前に無菌的な液状担体、例えば注射水の添加のみを必要とする）。上記に記載したタイプの無菌的散剤、顆粒および錠剤から即席の注射溶液および懸濁液を調製することができる。

【0180】

6.1補助治療

上記および本明細書の他の場所で開示する治療薬組合せ、マルチ特異性抗原結合分子、および医薬組成物は、1つ以上の追加の治療薬剤（例えば、抗ガン剤、細胞傷害性または細胞増殖抑制剤、ホルモン治療、ワクチン、および/または免疫治療）と共同投与することができる。また別に或いは加えるに、治療薬剤、二重特異性抗体、および医薬組成物は、他の治療用式（外科手術、放射線照射、冷凍外科手術および/または温熱療法を含む）と併用して投与される。そのような併用療法は、有利には、投与される治療薬剤のより低い投薬量の使用を可能にし、したがって生じ得る毒性または合併症を回避する。

例えば、本明細書で開示する併用療法はまた標準的癌治療と組み合わせることができる。例えば、PD-1単一療法は、化学療法レジメンと効果的に併用されることが知られている。これらの例では、投与される化学療法剤の用量を減少させることが可能である（Mokyr, M. et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304）。ある種の実施態様では、本明細書に記載の方法および組成物は、1つ以上の他の抗体分子、化学療法、他の抗癌療法（例えば標的誘導抗癌療法、または腫瘍溶解薬剤）、細胞傷害薬剤、免疫系療法（例えばサイトカイン）、外科的および/または放射線照射工程と併用して投与される。併用投与できる例示的な細胞傷害剤には、抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗代謝剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、インターカレーション剤、シグナル伝達経路に干渉できる薬剤、アポトーシス促進薬剤、プロテアソーム阻害剤および放射線照射（例えば局所または全身照射）が含まれる。

【0181】

いくつかの実施態様では、治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子は、対象動物の治療で既に日常的に標準物として用いられる化学療法剤と合わせて用いられる。適切な化学療法剤には以下が含まれる：アナストロゾール（ARIMIDEX）、ピカルタミド（CASODEX）、ブレオマイシン硫酸塩（BLENOXANE）、ブスルファン（MYLERAN）、ブスルファン注射液（BUSULFEX）、カペシタピン（XELODA）、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン（PARAPLATIN）、カルムスチン（BICNU）、クロラムブシル（LEUKERAN）、シスプラチン（PLATINOL）、クラドリピン（LEUSTATIN）、シクロホスファミド（CYTOXANまたはNEOSAR）、シタラビン、シトシンアラビノシド（CYTOSAR-U）、シタラビンリポソーム注射液（DEPOCYT）、ダカルバジン（DTIC-DOME）、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD、Cosme g an）、ダウノルビシン塩酸塩（CERUBIDINE）、ダウノルビシンクエン酸塩リポソーム注射液（DAUNOXOME）、デキサメタゾン、ドセタキセル（TAXOTERE）、ドキソルビシン塩酸塩（ADRIAMYCIN, RUBEX）、エトプシド（VEPESID）、フルダラビンリン酸塩（FLUDARA）、5-フルオロウラシル（ADRUCIL, EFUDEX）、フルタミド（EULEXIN）、テザシチピン、ゲムシタピン（GEMZAR）、ヒドロキシウレア（HYDREA）、イダルビシン（IDAMYCIN）、イフォスファミド（IFEX）、イリノテカン（CAMPTOSAR）

、L-アスパラギナーゼ (ELSPAR)、ロイコボリンカルシウム、メルファラン (ALKERAN)、6-メルカプトプリン (PURINETHOL)、メトトレキセート (FOLEX)、ミトキサントロン (NOVANTRONE)、ミロターグ、パクリタキセル (TAXOL)、nab-パクリタキセル (ABRAXANE)、フェニックス (イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、ポリフェプロサン20 (カルムスチンインプラントを伴う (GLIADEL ウェファー)、タモキシフェンクエン酸塩 (NOLVADEX)、テニポシド (VUMON)、6-チオグアニド、チオテパ、チラパザミン (TIRAZONE)、トポテカン塩酸塩 (注射用) (HYCAMPTIN)、ビンブラスチン (VELBAN)、ピンクリスチン (ONCOVIN)、およびビノレルビン (NAVELBINE) (ただしこれらに限定されない)。

【0182】

10

例示的アルキル化剤には以下が含まれる：ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルフォネート、ニトロソウレア、およびトリアゼン：ウラシルマスタード (AMINO URACIL MUSTARD、CHLORETHAMINACIL、DEMETHYLDOPAN、DESMETHYLDOPAN、HAEMANTHAMINE、NORDOPAN、URACIL NITROGEN MUSTARD、URACILLOST、URACILMOSTAZA、URAMUSTIN、URAMUSTINE)、クロルメチン (MUSTARGEN)、シクロホスファミド (CYTOXAN、NEOSAR、CLAFEN、ENDOXAN、PROCYTOX、REVIMMUNE)、ダカルバジン (DTIC-DOME)、イフォスファミド (MITOXANA)、メルファラン (ALKERAN)、クロラムブシル (LEUKERAN)、ピボプロマン (AMEDEL、VERCYTE)、トリエチレンメラミン (HEMEL、HEXALEN、HEXASTAT)、トリエチレンチオホスホルアミド、テモゾロミド (TEMODAR および TEMODAL)、チオテパ (THIOPLEX)、ブスルファン (BUSILVEX、MYLERAN)、カルムスチン (BICNU)、ロムスチン (CCNUCEENU)、ストレプトゾシン (ZANOSAR)、オキサリプラチン (ELOXATIN)；ダクチノマイシン (アクチノマイシンDとしても知られている、COSMEGEN)；メルファラン (L-PAM、L-サルコリシン、フェニルアラニンマスタード、ALKERAN)、アルトレタミド (ヘキサメチルメラミン (HMM)、HEXALEN)、ベンダムスチン (TREANDA)、ブスルファン (BUSULFEX および MYLERAN)、カルボプラチン (PARAPLATIN)、シスプラチン (CDDP、PLATINOL および PLATINOL-AQ)、クロラムブシル (LEUKERAN)、ダカルバジン (DTIC、DIC および イミダゾールカルボキサミド、DTIC-DOME)、アルトレタミン (ヘキサメチルメラミン (HMM)、HEXALEN)、イフォスファミド (IFEX)、プレドヌムスチン、プロカルバジン (MATULANE)、およびチオテパ (チオホスファミド、TESPA および TSPA、THIOPLEX)。

20

【0183】

30

例示的なアントラサイクリンには例えば以下が含まれる：ドキソルピシン (ADRIAMYCIN および RUBEX)、ブレオマイシン (LENOXANE)、ダウノルピシン (ダウノルピシン塩酸塩、ダウノマイシン、ルビドマイシン塩酸塩、および CERUBIDINE)、ダウノルピシンリボソーマル (ダウノルピシンクエン酸リボソーム、および DAUNOXOME)、ミトキサントロン (DHAD および NOVANTRONE)、エピルピシン (ELLENCE)、イダルピシン (IDAMYCIN および IDAMYCIN PFS)、マイトマイシンC (MUTAMYCIN)、ゲルダナマイシン、ハービマイシン、ラビドマイシン、および デスアセチルラビドマイシン。

上記および本明細書の他の場所で開示する薬剤、抗体および方法で組合わせて用いることができる、例示的なピンカアルカロイドには以下が含まれる：ビノレルビン酒石酸塩 (NAVELBINE)、ピンクリスチン (ONCOVIN)、ビンデシン (ELDISINE)、およびビンブラスチン (ビンブラスチン硫酸塩、ピンカロイコブラスチン、VLB、ALKABAN-AQ および VELBAN) (ただしこれらに限定されない)。

40

本発明で用いることができる例示的なプロテアソーム阻害剤には以下が含まれる：ボルテゾミブ (VELCADE)、カルフィルゾミブ (PX-171-007)、マリゾミブ (NPI-0052)、イキサゾミブクエン酸塩 (MLN-9708)、デランゾミブ (CEP-18770)、O-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリナミド (ONX-0912)；ダノプレビル (RG7227、CAS 850876-88-9)、イキサゾミブ (MLN2238、CAS 1072833-77-2)、および (S)-N-[(フェニルメトキシ)カルボニル]-L-ロイシル-N-(1-ホルミル-3-メチルブチル)-L-ロイシニアミド (MG-132、CAS 133407-82-6) (ただしこれらに限定され

50

ない)。

いくつかの実施態様では、薬剤(例えば治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子)は、チロシンキナーゼ阻害剤(例えば受容体チロシンキナーゼ(RTK)阻害剤)と組合わせて用いることができる、例示的なチロシンキナーゼ阻害剤には以下が含まれる: 上皮増殖因子(EGF)経路阻害剤(例えば上皮増殖因子受容体(EGFR)阻害剤)、血管内皮増殖因子(VEGF)経路阻害剤(例えば血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)阻害剤(例えば阻害剤、VEGFR-2阻害剤、VEGFR-3阻害剤))、血小板由来増殖因子(PDGF)経路阻害剤(例えば血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)阻害剤(例えばPDGFR-阻害剤))、RAF-1阻害剤、KIT阻害剤およびRET阻害剤(ただしこれらに限定されない)。

【0184】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物はヘッジホッグ経路阻害剤とともに処方される。癌の治療で有効であることが知られている適切なヘッジホッグ阻害剤には以下が含まれる: アキシチニブ(AG013736)、ボスチニブ(SKI-606)、セディラニブ(RECENTIN、AZD2171)、ダサチニブ(SPRYCEL、BMS-354825)、エルロチニブ(TARCEVA)、ゲフィチニブ(IRESSA)、イマチニブ(GLEEVEC、CGP57148B、STI-571)、ラパチニブ(TYKERB、TYV-ERB)、レスタウルチニブ(CEP-701)、ネラチニブ(HKI-272)、ニロチニブ(TASIGNA)、セマキサニブ(セマキサニブ、SU5416)、スミチニブ(SUTENT、SU11248)、トセラニブ(PALLADIA)、パンデタニブ(ZACTIMA、ZD6474)、パタラニブ(PTK787、PTK/ZK)、トラスツズマブ(HERCEPTIN)、ベバシズマブ(AVASTIN)、リツキシマブ(RITUXAN)、セツキシマブ(ERBITUX)、パニツムマブ(VECTIBIX)、ラニビズマブ(Lucentis)、ニロチニブ(TASIGNA)、ソラフェニブ(NEXAVAR)、アレムツズマブ(CAMPATH)、ゲムツズマブオゾガミシン(MYLOTARG)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、ドビチニブ乳酸塩(TKI258、CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOKTM)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120(VARGATEF(商標))、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、チボザニブ(AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、XL228、AEE788、AG-490、AST-6、BMS-599626、CUDC-101、PD153035、ペリチニブ(EKB-569)、パンデタニブ(ザクチマ)、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ABT-869(リニファニブ)、AEE788、AP24534(ボナチニブ)、AV-951(チボザニブ)、アキシチニブ、BAY 73-4506(レゴラフェニブ)、プリバニブアラニネート(BMS-582664)、プリバニブ(BMS-540215)、セジラニブ(AZD2171)、CHIR-258(ドビチニブ)、CP673451、CYC116、E7080、Ki8751、マスチニブ(AB1010)、MGCD-265、モテサニブニリン酸塩(AMG-706)、MP-470、OSI-930、パゾパニブ塩酸塩、PD173074、ソラフェニブトシレート(Bay 43-9006)、SU 5402、TSU-68(SU6668)、パタラニブ、XL880(GSK1363089、EXEL-2880)、ビスモデギブ(2-クロロ-N-[4-クロロ-3-(2-ピリジニル)フェニル]-4-(メチルスルフォニル)-ベンズアミド、GDC-0449(PCT公開公報WO 06/028958で開示)、1-(4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-3-(3-(4-フルオロフェニル)-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-2-キナゾリニル)メチル)-ウレア(CAS 330796-24-2)、N-[(2S,3R,3'R,3aS,4'aR,6S,6'aR,6'bS,7aR,12'aS,12'bS)-2',3',3a,4,4',4'a,5,5',6,6',6'a,6'b,7,7',7a,8',10',12',12'a,12'b-エイコサヒドロ-3,6,11',12'b-テトラメチルスピロ[フロ[3,2-b]ピリジン-2(3H),9'(1'H)-ナフト[2,1-a]アズレン]-3'-イル]-メタンスルホンアミド(IPI926、CAS 1037210-93-7)、4-フルオロ-N-メチル-N-[1-[4-(1-メチル-1H-ピラゾール5-イル)-1-フタラジニル]-4-ピペリジニル]-2-(トリフルオロメチル)-ベンズアミド(LY2940680、CAS 1258861-20-9)、エリスモデギブ(LDE225)(ただし前記に限定されない)。

【0185】

ある種の実施態様では、本発明の組成物は血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤とともに処方される。前記阻害剤には以下が含まれる: ベバシズマブ(AVASTIN)、アキシチニブ(INLYTA)、プリバニブアラニネート(BMS-582664、(S)-(R)-1-(4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ)プロパン-2-イル)2-アミノプロパノエート)、ソラフェニブ(NEXAVA

10

20

30

40

50

R)、パゾパニブ(VOTRIENT)、スニチニブマレイン酸塩(SUTENT)、セジラニブ(AZD2171、CAS 288383-20-1)、バルガテフ(BIBF1120、CAS 928326-83-4)、フォレチニブ(GSK1363089)、テラチニブ(BAY57-9352、CAS 332012-40-5)、アパチニブ(YN968D1、CAS 811803-05-1)、イマチニブ(GLEEVEC)、ボナチニブ(AP24534、CAS 943319-70-8)、チボザニブ(AV951、CAS 475108-18-0)、レゴラフェニブ(BAY73-4506、CAS 755037-03-7)、パタラニブニ塩酸塩(PTK787、CAS 212141-51-0)、プリバニブ(BMS-540215、CAS 649735-46-6)、バンデタニブ(CAPRELSAまたはAZD6474)、モテサニブニリン酸塩(AMG706、CAS 857876-30-3、N-(2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-1H-インドール-6-イル)-2-[(4-ピリジニルメチル)アミノ]-3-ピリジニルカルボキサミド(PCT国際公開公報WO 02/066470に記載))、ドピチニブニ乳酸(TKI258、CAS 852433-84-2)、リンファニブ(ABT869、CAS 796967-16-3)、カボザンチニブ(XL184、CAS 849217-68-1)、レスタウルチニブ(CAS 111358-88-4)、N-[5-[[[5-(1,1-ジメチルエチル)-2-オキサゾリル]メチル]チオ]-2-チアゾリル]-4-ピペリジニルカルボキサミド(BMS38703、CAS 345627-80-7)、(3R,4R)-4-アミノ-1-(4-(3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール(BMS690514)、N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[(3a,5,6a)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロル-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリンアミン(XL647、CAS 781613-23-8)、4-メチル-3-[[1-メチル-6-(3-ピリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イル]アミノ]-N-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]-ベンズアミド(BHG712、CAS 940310-85-0)、およびアフリベルセプト(EYLEA)(ただしこれらに限定されない)。

10

20

【0186】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物はPI3K阻害剤とともに処方される。ある実施態様では、PI3K阻害剤は、PI3Kのデルタおよびガンマアイソフォームの阻害剤である。組み合わせで使用できる例示的なPI3K阻害剤は、例えばWO2010/036380、WO2010/006086、WO09/114870、WO05/113556(それらの内容は参照によって本明細書に含まれる)に記載される。適切には、PI3K阻害剤には以下が含まれる：4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[[4-(メチルスルフォニル)ピペラジン-1-イル]メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルフォリン(GDC-0941としても知られている(国際PCT公開公報WO 09/036082およびWO09/055730に記載))、2-メチル-2-[4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル]プロピオニトリル(BEZ235またはNVP-BEZ 235(国際PCT公開公報WO06/122806に記載))；4-(トリフルオロメチル)-5-(2,6-ジモルフォリノピリミジン-4-イル)ピリジン-2-アミン(BKM120またはNVP-BKM120(国際PCT公開公報WO2007/084786に記載))、トザセルチブ(VX680またはMK-0457、CAS 639089-54-6)；(5Z)-5-[[4-(4-ピリジニル)-6-キノリニル]メチレン]-2,4-チアゾリジンジオン(GSK1059615、CAS 958852-01-2)；(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(アセチルオキシ)-1-[(ジ-2-プロペニルアミノ)メチレン]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-オクタヒドロ-11-ヒドロキシ-4-(メトキシメチル)-4a,6a-ジメチル-シクロペンタ[5,6]ナフト[1,2-c]ピラン-2,7,10(1H)-トリオン(PX866、CAS 502632-66-8)；8-フェニル-2-(モルフォリン-4-イル)-クロメン-4-オン(LY294002、CAS 154447-36-6)、2-アミノ-8-エチル-4-メチル-6-(1H-ピラゾル-5-イル)ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(SAR 245409またはXL 765)、1,3-ジヒドロ-8-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-3-メチル-1-[4-(1-ピペラジニル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]-2H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2-オン、(2Z)-2-ブテンジオエート(1:1)(BGT 226)、5-フルオロ-3-フェニル-2-[(1S)-1-(9H-プリン-6-イルアミノ)エチル]-4(3H)-キナゾリノン(CAL101)、2-アミノ-N-[3-[N-[3-[(2-クロロ-5-メトキシフェニル)アミノ]キノキサリン-2-イル]スルファモイル]フェニル]-2-メチルプロパンアミド(SAR 245408またはXL 147)、および(S)-ピロリジン-1,2-ジカルボン酸2-アミド1-({4-メチル-5-[2-(2,2,2-トリフルオロ-1,1-ジメチル-エチル)-ピリジン-4-イル]-チアゾール-2-イル}-アミド)(BYL719)。

30

40

【0187】

いくつかの実施態様では、本明細書に開示する組成物はmTOR阻害剤とともに処方され、

50

前記阻害剤は、例えば以下の1つ以上から選択される1つ以上のmTORである：ラパマイシン、テムシロリムス（TORISEL）、AZD8055、BEZ235、BGT226、XL765、PF-4691502、GDC0980、SF1126、OSI-027、GSK1059615、KU-0063794、WYE-354、Palomid 529（P529）、PF-04691502、またはPKI-587、リダフォロリムス（正式にはデフェロリムス、（1R,2R,4S）-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルフォスフィネートとして知られ、AP23573およびMK8669としてもまた知られ、さらにPCT公開WO03/064383に記載されているもの）、エベロリムス（ARINITORまたはRAD001）、ラパマイシン（AY22989、SIROLIMUS）、シマピモド（CAS 164301-51-3）、エムシロリムス（5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルフォリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル）メタノール（AZD8055）、2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン（PF04691502、CAS 1013101-36-4）、およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルフォリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L-アスパルチル-L-セリン-、分子内塩（SF1126、CAS 936487-67-1）、（1r,4r）-4-(4-アミノ-5-(7-メトキシ-1H-インドール-2-イル)イミダゾ[1,5-f][1,2,4]トリアジン-7-イル)シクロヘキサノカルボン酸（OSI-027）；およびXL765。

10

20

【0188】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物は、BRAF阻害剤、例えばGSK2118436、RG7204、PLX4032、GDC-0879、PLX4720およびソラフェニブトシレート（Bay 43-9006）と組合わせて用いることができる。更なる実施態様では、BRAF阻害剤には以下が含まれる：レゴラフェニブ（BAY73-4506、CAS 755037-03-7）、ツビザニブ（AV951、CAS 475108-18-0）、ベムラフェニブ（ZELBORAF、PLX-4032、CAS 918504-65-1）、エンコラフェニブ（LGX818としても知られている）、1-メチル-5-[[2-[5-(トリフルオロメチル)-1H-イミダゾール-2-イル]-4-ピリジニル]オキシ]-N-[4-(トリフルオロメチル)フェニル-1H-ベンゾイミダゾール-2-アミン（RAF265、CAS 927880-90-8）、5-[1-(2-ヒドロキシエチル)-3-(ピリジン-4-イル)-1H-ピラゾール-4-イル]-2,3-ジヒドロインドエン-1-オンオキシム（GDC-0879、CAS 905281-76-7）、5-[2-[4-[2-(ジメチルアミノ)エトキシ]フェニル]-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-4-イル]-2,3-ジヒドロ-1H-インドエン-1-オンオキシム（GSK2118436またはSB590885）、(+/-)-メチル(5-(2-(5-クロロ-2-メチルフェニル)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-1-イル)-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)カルバメート（XL-281およびBMS908662としても知られている）、およびN-(3-(5-クロロ-1H-ピロリ[2,3-b]ピリジン-3-カルボニル)-2,4-ジフルオロフェニル)プロパン-1-スルホンアミド（PLX4720としても知られている）（ただしこれらに限定されない）。

30

【0189】

本発明の組成物はまたMEK阻害剤と組合わせて用いることができる。以下を含む任意のMEK阻害剤を組合わせて用いることができる：セルメチニブ（5-[(4-ブromo-2-クロロフェニル)アミノ]-4-フルオロ-N-(2-ヒドロキシエトキシ)-1-メチル-1H-ベンゾイミダゾール-6-カルボキサミド（AZD6244またはARRY 142886（PCT公開公報WO2003/077914に記載））、トラメチニブジメチルスルフォキシド（GSK-1120212、CAS 1204531-25-80）、RDEA436、N-[3,4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-6-メトキシフェニル]-1-[(2R)-2,3-ジヒドロオキシプロピル]-シクロプロパンスルホンアミド（RDEA119またはBAY869766（PCT公開公報WO2007/014011に記載））、AS703026、BIX 02188、BIX 02189、2-[(2-クロロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-N-(シクロプロピルメトキシ)-3,4-ジフルオロ-ベンズアミド（CI-1040またはPD184352としても知られている（PCT公開公報WO2000/035436に記載））、N-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロボキシ]-3,4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-ベンズアミド（PD0325901（PCT公開WO2002/00

40

50

6213に記載)) 2'-アミノ-3'-メトキシフラボン (PD98059)、2,3-ビス[アミノ[(2-アミノフェニル)チオ]メチレン]-ブタンジニトリル (U0126 (米国特許2,779,780号に記載))、XL-518 (GDC-0973、Cas No. 1029872-29-4)、G-38963、およびG02443714 (AS703206としても知られている)、または前記の医薬的に許容できる塩もしくは溶媒和化合物(ただしこれらに限定されない)。他のMEK阻害剤はWO2013/019906、WO03/077914、WO2005/121142、WO2007/04415、WO2008/024725およびWO2009/085983に記載されている(前記文献の内容は参照によって本明細書に含まれる)。MEK阻害剤の更なる例には以下が含まれる:

ベニメチニブ(6-(4-プロモ-2-フルオロフェニルアミノ)-7-フルオロ-3-メチル-3H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸(2-ヒドロキシエトキシ)-アミド (MEK162、CAS 1073666-70-2 (PCT公開公報WO2003/077914に記載))、2,3-ビス[アミノ[(2-アミノフェニル)チオ]メチレン]-ブタンジニトリル (U0126 (米国特許2,779,780号に記載))、(3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(エチルアミノ)-8,9,16-トリヒドロキシ-3,4-ジメチル-3,4,9,19-テトラヒドロ-1H-2-ベンゾキサシクロテトラデシン-1,7(8H)-ジオン] (E6201 (PCT公開WO2003/076424に記載))、ベヌラフェニブ (PLX-4032、CAS 918504-65-1)、(R)-3-(2,3-ジヒドロキシプロピル)-6-フルオロ-5-(2-フルオロ-4-ヨードフェニルアミノ)-8-メチルピリド[2,3-d]ピリミジン-4,7(3H,8H)-ジオン (TAK-733、CAS 1035555-63-5)、ピマセルチブ (AS-703026、CAS 1204531-26-9)、2-(2-フルオロ-4-ヨードフェニルアミノ)-N-(2-ヒドロキシエトキシ)-1,5-ジメチル-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリジン-3-カルボキサミド (AZD 8330)、および3,4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-N-(2-ヒドロキシエトキシ)-5-[(3-オキソ-[1,2]オキサジナン-2-イル)メチル]ベンズアミド (CH 4987655またはRo 4987655) (ただしこれらに限定されない)。

【0190】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物は、JAK2阻害剤(例えばCEP-701、INCB18424、CP-690550(タソシチニブ))と一緒に投与される。例示的なJAK阻害剤には以下が含まれる: ルクソリチニブ (JAKAFI)、トファシニチブ (CP690550)、アキシチニブ (AG013736、CAS 319460-85-0)、5-クロロ-N2-[(1S)-1-(5-フルオロ-2-ピリミジニル)エチル]-N4-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-12,4-ピリミジンジアミン (AZD1480、CAS 935666-88-9)、(9E)-15-[2-(1-ピロリジニル)エトキシ]-7,12,26-トリオキサ-19,21,24-トリアザテトラシクロ[18.3.1.12,5.114,18]-ヘキサコサ-1(24),2,4,9,14,16,18(25),20,22-ノナエン (SB-1578、CAS 937273-04-6)、モメロチニブ (CYT 387)、バリシチニブ (INCB-028050またはLY-3009104)、パクリチニブ (SB1518)、(16E)-14-メチル-20-オキサ-5,7,14,27-テトラアザテトラシクロ[19.3.1.12,6.18,12]ヘプタコサ-1(25),2,4,6(27),8,10,12(26),16,21,23-デカン (SB 1317)、ガンドチニブ (LY 2784544)、およびN,N-シシクロプロピル-4-[(1,5-ジメチル-1H-ピラゾール-3-イル)アミノ]-6-エチル-1,6-ジヒドロ-1-メチル-イミダゾ[4,5-d]ピロロ[2,3-b]ピリジン-7-カルボキサミド (BMS 911543) (ただしこれらに限定されない)。

さらに他の実施態様では、本発明の組成物は、ワクチン(例えば樹状細胞腎癌(DC-RCC)ワクチン)と併用して投与される。ある種の実施態様では、医薬組成物とDC-RCCワクチンとの組合せを用いて、癌、例えば本明細書に記載する癌(例えば腎癌、例えば転移腎細胞癌腫(RCC)または明細胞腎細胞癌腫(CCRCC))が治療される。

【0191】

さらに他の実施態様では、本明細書に記載する医薬組成物は、化学療法および/または免疫療法と併用して投与することができる。例えば、骨髄腫を治療するために当該組成物を単独でまたは以下の1つ以上と組合わせて用いることができる: 化学療法または他の抗癌剤(例えばサリドマイドアナログ、例えばレナリドミド)、抗TM3抗体、腫瘍抗原パルス処理樹状細胞、腫瘍細胞および樹状細胞の融合(電気的融合)、または悪性形質細胞によって生成された免疫グロブリンイディオタイプによるワクチン免疫。ある実施態様では、当該組成物を抗TIM-3抗体と組合わせて用い、骨髄腫(例えば多発性骨髄腫)を治療することができる。

いくつかの実施態様では、本発明の組成物を化学療法と組合わせて用い、肺癌(例えば

非小細胞肺癌)を治療する。いくつかの実施態様では、肺癌を治療するために、当該医薬組成物は白金ダブレット療法と一緒に用いられる。

さらに別の実施態様では、本明細書に開示する医薬組成物を用いて、腎癌、例えば腎細胞癌腫(RCC)(例えば明細胞腎細胞癌腫(CCRCC)または転移RCC)を治療することができる。抗PD-1またはPD-L1抗体分子は以下の1つ以上と併用して投与することができる:免疫系手法(例えばインターロイキン-2またはインターフェロン-)、標的誘導薬剤(例えばVEGF阻害剤、例えばVEGFに対するモノクローナル抗体;VEGFチロシンキナーゼ阻害剤(例えばスニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブおよびパゾパニブ);RNAi阻害剤;またはVEGFシグナリングの下流媒介因子の阻害剤、例えばラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の阻害剤、例えばエベロリムスおよびテムシロリムス。

10

【0192】

膵臓癌の治療のために、組合わせて用いられる適切な補助治療薬の例には以下が含まれる:化学療法剤、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤(例えばパクリタキセル処方物、たとえばTAXOL、アルブミン安定化ナノ粒子パクリタキセル処方物(例えばABRAXANE)またはリポソームパクリタキセル処方物)、ゲムシタビン(例えばゲムシタビン単独またはAXP107-11併用)、他の化学療法剤、例えばオキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カベシタビン、ルピテカン、エピルビシン塩酸塩、NC-6004、シスプラチン、ドセタキセル(例えばTAXOTERE)、マイトマイシンC、イフォスファミド、インターフェロン、チロシンキナーゼ阻害剤(例えばEGFR阻害剤(例えばエルロチニブ、パニツムマブ、セツキシマブ、ニモツズマブ)、HER2/neu受容体阻害剤(例えばトラスツズマブ)、二重キナーゼ阻害剤(例えばボスチニブ、サラカチニブ、ラパチニブ、バンデタニブ)、マルチキナーゼ阻害剤(例えばソラフェニブ、スニチニブ、XL184、パゾパニブ)VEGF阻害剤(例えばベバシズマブ、AV-951、プリパニブ)、放射性免疫療法(例えばXR303)、癌ワクチン(例えばGVAX、スルビピンペプチド)、COX-2阻害剤(例えばセレコキシブ)、IGF-1受容体阻害剤(例えばAMG 479、MK-0646)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス、テムシロリムス)、IL-6阻害剤(例えばCNT0328)、サイクリン依存キナーゼ阻害剤(例えばP276-00、UCN-01)、改変エネルギー代謝指向(AEMD)化合物(例えばCPI-613)、HDAC阻害剤(例えばボリノスタット)、TRAIL受容体2(TR-2)アゴニスト(例えばコナツムマブ)、MEK阻害剤(例えばAS703026、セルメチニブ、GSK1120212)、Raf/MEK二重キナーゼ阻害剤(例えばR05126766)、ノッチシグナリング阻害剤(例えばMK0752)、モノクローナル抗体-抗体融合タンパク質(例えばL19IL2)、クルクミン、HSP90阻害剤(例えばタネスピマイシン、STA-9090)、rIL-2、デニロイキンジフチトクス、トポイソメラーゼ1阻害剤(例えばイリノテカン、PEP02)、スタチン(例えばシムバスタチン)、第VIIa因子阻害剤(例えばPCI-27483)、AKT阻害剤(例えばRX-0201)、低酸素症活性化プロドラッグ(例えばTH-302)、メトフォルミン塩酸塩、ガンマ-セクレターゼ阻害剤(例えばR04929097)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(例えば3-AP)、イムノトキシン(例えばHuC242-DM4)、PARP阻害剤(例えばKU-0059436、ベリパリブ)、CTLA-4阻害剤(例えばCP-675,206、イピリムマブ)、AdV-tk療法、プロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ(Velcade)、NPI-0052)、チアゾリジンジオン(例えばピオグリタゾン)、NPC-1C、オーロラキナーゼ阻害剤(例えばR763/AS703569)、CTGF阻害剤(例えばFG-3019)、siG12D LODER、および放射線療法(例えば、and radiation therapy (e.g., トモセラピー、定位放射線照射、プロトン療法)、外科手術、および前記の組合せ(ただし前記に限定されない)。ある種の実施態様では、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤およびゲムシタビンの組合せを、本明細書に記載する医薬組成物と一緒に用いることができる。

20

30

40

【0193】

小細胞肺癌の治療に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる:化学療法剤(例えばエトポシド、カルボプラチン、シスプラチン、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタビン、リポソームSN-38、ベンダムスチン、テモゾロミド、ペロテカン、NK012、FR901228、フラボピリドール)、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばEGFR阻害剤(例えばエルロチニブ、ゲフチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ)、マルチキナーゼ阻害剤(例え

50

ばソラフェニブ、スニチニブ)、VEGF阻害剤(例えばベバシズマブ、バンデタニブ)、癌ワクチン(例えばGVAX)、Bcl-2阻害剤(例えばオブリメルセンナトリウム、ABT-263)、プロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ(Velcade)、NPI-0052)、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤、ドセタキセル、IGF-1受容体阻害剤(例えばAMG 479)、HGF/SF阻害剤(例えばAMG 102、MK-0646)、クロロキン、オーロラキナーゼ阻害剤(例えばMLN8237)、放射性免疫療法(例えばTF2)、HSP90阻害剤(例えばタネスピマイシン、STA-9090)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス)、Ep-CAM-/CD3-二重特異性抗体(例えばMT110)、CK-2阻害剤(例えばCX-4945)、HDAC阻害剤(例えばベリノスタット)、SMOアンタゴニスト(例えばBMS 833923)、ペプチド癌ワクチン、および放射線療法(例えば強度調整放射線療法(IMRT)、小分割放射線療法)、外科手術、および/または前記の組合せ(ただし前記に限定されない)。

10

【0194】

非小細胞肺癌の治療に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる: 化学療法剤(例えばビノレルビン、シスプラチン、ドセタキセル、ペメトレキセドナトリウム、エトポシド、ゲムシタビン、カルボプラチン、リボソームSN-38、TLK286、テモゾロミド、トポテカン、ペメトレキセドナトリウム、アザシチジン、イリノテカン、テガフル-ギメラシル-オテラシルカリウム、サバシタビン)、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばEGFR阻害剤(例えばエルロチニブ、ゲフィチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ、ネシツムマブ、PF-00299804、ニモツズマブ、R05083945)、MET阻害剤(例えばPF-02341066、ARQ 197)、PI3K阻害剤(例えばXL147、GDC-0941)、Raf/MEK二重キナーゼ阻害剤(例えばR05126766)、PI3K/mTOR二重キナーゼ阻害剤(例えばXL765)、SRC阻害剤(例えばダサチニブ)、二重阻害剤(例えばBIBW 2992、GSK1363089、ZD6474、AZD0530、AG-013736、ラパチニブ、MEHD7945A、リニファニブ)、マルチキナーゼ阻害剤(例えばソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、AMG 706、XL184、MGCD265、BMS-690514、R935788)、VEGF阻害剤(例えばエンドスター、エンドスタチン、ベバシズマブ、セディラニブ、BIBF 1120、アキシチニブ、チボザニブ、AZD2171)、癌ワクチン(例えばBLP25リボソームワクチン、GVAX、組換えDNAおよびアデノウイルス発現L523Sタンパク質)、Bcl-2阻害剤(例えばオブリメルセンナトリウム)、プロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、NPI-0052、MLN9708)、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤、ドセタキセル、IGF-1受容体阻害剤(例えばシクスツムマブ、MK-0646、OSI 906、CP-751、871、BIBB 022)、ヒドロキシクロロキン、HSP90阻害剤(例えばタネスピマイシン、STA-9090、AUY922、XL888)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス、テムシロリムス、リダフォロリムス)、Ep-CAM-/CD3-二重特異性抗体(例えばMT110)、CK-2阻害剤(例えばCX-4945)、HDAC阻害剤(例えばMS 275、LBH589、ボリノスタット、バルプロ酸、FR901228)、DHFR阻害剤(例えばプラトレキセート)、レチノイド(例えばベキサロテン、トレチノイン)、抗体-薬剤複合体(例えばSGN-15)、ビスホスホネート(例えばゾレドロン酸)、癌ワクチン(例えばベラゲンブマツセル-L)、低分子量ヘパリン(LMWH)(例えばチンザパリン、エノキサパリン)、GSK1572932A、メラトニン、タラクトフェリン、ジメンサ、トボイソメラゼ阻害剤(例えばアムルピシン、エトポシド、カレニテシン)、ネルフィナビル、シレンジチド、ErbB3阻害剤(例えばMM-121、U3-1287)、サバイビン阻害剤(例えばYM155、LY2181308)、エリブリンメシレート、COX-2阻害剤(例えばセレコキシブ)、ペグフィलगラスチム、ポロ様キナーゼ1阻害剤(例えばBI 6727)、TRAIL受容体2(TR-2)アゴニスト(例えばCS-1008)、CNGRCペプチド-TNFアルファ複合体、ジクロロアセテート(DCA)、HGF阻害剤(例えばSCH 900105)、SAR240550、PPAR-ガンマアゴニスト(例えばCS-7017)、ガンマ-セクレターゼ阻害剤(例えばR04929097)、エピジェネティック療法(例えば5-アザシチジン)、ニトログリセリン、MEK阻害剤(例えばAZD6244)、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤(例えばUCN-01)、コレステロール-Fus1、抗チューブリン剤(例えばE7389)、ファルネシル-OH-トランスフェラーゼ阻害剤(例えばロナファルニブ)、イムノトキシン(例えばBB-10901、SS1(dsFv)PE38)、フォンダパリヌクス、血管破壊剤(例えばAVE8062)、PD-L1阻害剤(例えばMDX-1105、MDX-1106)、ベータ-グルカン、NGR-h

20

30

40

50

TNF、EMD 521873、MEK阻害剤（例えばGSK1120212）、エボシロンアナログ（例えばイキサベピロン）、キネシン-スピンドル阻害剤（例えば4SC-205）、テロメア標的剤（例えばKML-001）、P70経路阻害剤（例えばLY2584702）、AKT阻害剤（例えばMK-2206）、血管新生阻害剤（例えばレナリドミド）、ノッチシグナリング阻害剤（例えばOMP-21M18）、放射線療法、外科手術、および前記の組合せ（ただしこれらに限定されない）。

【0195】

10 卵巣癌の治療に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる：化学療法剤（例えばパクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤、ドセタキセル、カルボプラチン、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、トポテカン、シスプラチン、イリノテカン、TLK286、イ
20 フォスファミド、オラパリブ、オキサリプラチン、メルファラン、ペメトレキセドニナトリウム、SJG-136、シクロフォスファミド、エトプシド、デシタピン）、グレリンアンタ
ゴニスト（例えばAEZS-130）、免疫療法（例えばAPC8024、オレゴボマブ、OPT-821）、チ
ロシンキナーゼ阻害剤（例えばEGFR阻害剤（例えばエルロチニブ）、二重阻害剤（例えば
E7080）、マルチキナーゼ阻害剤（例えばAZD0530、JI-101、ソラフェニブ、スニチニブ、
パゾパニブ）、ON 01910.Na、VEGF阻害剤（例えばベバシズマブ、BIBF 1120、セディラニ
ブ、AZD2171）、PDGFR阻害剤（例えばIMC-3G3）、パクリタキセル、トポイソメラーゼ阻
害剤（例えばカレニテシン、イリノテカン）、HDAC阻害剤（例えばバルプロエート、ボリ
ノスタット）、葉酸受容体阻害剤（例えばファルレッツズマブ）、アンギオポエチン阻害剤
（例えばAMG 386）、エボシロンアナログ（例えばイキサベピロン）、プロテアソーム阻
害剤（例えばカルフィルゾミブ）、IGF-1受容体阻害剤（例えばOSI 906、AMG 479）、PAR
P阻害剤（例えばベリパリブ、AG014699、イニパリブ、MK-4827）、オーロラキナーゼ阻害
剤（例えばMLN8237、ENMD-2076）、血管新生阻害剤（例えばレナリドミド）、DHFR阻害剤
（例えばプララトレキセート）、放射性免疫療法剤（例えばHu3S193）、スタチン（例え
ばロバスタチン）、トポイソメラーゼ1阻害剤（例えばNKTR-102）、癌ワクチン（例えばp
53合成長ペプチドワクチン、自家性OC-DCワクチン）、mTOR阻害剤（例えばテムシロリム
ス、エベロリムス）、BCR/ABL阻害剤（例えばイマチニブ）、ET-A受容体アンタゴニスト
（例えばZD4054）、TRAIL受容体2（TR-2）アゴニスト（例えばCS-1008）、HGF/SF阻害剤
（例えばAMG 102）、EGEN-001、ポロ様キナーゼ1阻害剤（例えばBI 6727）、ガンマ-セク
レターゼ阻害剤（例えばRO4929097）、Wee-1阻害剤（例えばMK-1775）、抗チューブリン
剤（例えばピノレルピン、E7389）、イムノトキシン（例えばデニロイキンジフチトクス
30 ）、SB-485232、血管破壊剤（例えばAVE8062）、インテグリン阻害剤（例えばEMD 525797
）、キネシンスピンドル阻害剤（例えば4SC-205）、レプリミド、HER2阻害剤（例えばMGA
H22）、ErrB3阻害剤（例えばMM-121）、放射線療法、および前記の組合せ（ただしこれら
に限定されない）。

【0196】

40 骨髄腫の治療（単独または併用療法がある）に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる：化学療法または他の抗癌剤（例えばサリドマイドアナログ、例えばレ
ナリドミド）、HSCT（Cook, R. (2008) J Manag Care Pharm. 14 (7 Suppl) :19-25）、
抗TIM3抗体（Hallett, WHD et al. (2011) J of American Society for Blood and M
arrow Transplantation 17 (8) :1133-145）、腫瘍抗原パルス処理樹状細胞、腫瘍細胞と
樹状細胞との融合（例えば電氣的融合）、または悪性形質細胞によって生成された免疫グ
ロブリンイディオタイプによるワクチン免疫（以下で概括される：Yi, Q. (2009) Canc
er J. 15 (6) :502-10）。

慢性リンパ球性白血病（CLL）の治療に本発明の組成物とともに用いられる適切な治療
の例には以下が含まれる：化学療法剤（例えばフルダラビン、シクロフォスファミド、ド
キシソルピシン、ビンクリスチン、クロラムブシル、ベンダムスチン、クロラムブシル、ブ
スルファン、ゲムシタピン、メルファラン、ペントスタチン、ミトキサントロン、5-アザ
シチジン、ペメトレキセドニナトリウム）、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばEGFR阻害剤
（例えばエルロチニブ）、BTK阻害剤（例えばPCI-32765）、マルチキナーゼ阻害剤（例
50 えばMGCD265、RGB-286638）、CD-20標的薬剤（例えばリツキシマブ、オフアツムマブ、R050

72759、LFB-R603)、CD52標的薬剤(例えばアレムツズマブ)、プレドニゾロン、ダルベポエチンアルファ、レナリドミド、Bcl-2阻害剤(例えばABT-263)、免疫療法(例えばアロジェニックCD4+メモリーTh1様T細胞/微粒子結合抗CD3/抗CD28、自家サイトカイン誘導キラー細胞(CIK))、HDAC阻害剤(例えばボリノスタット、バルプロ酸、LBH589、JNJ-26481585、AR-42)、XIAP阻害剤(例えばAEG35156)、CD-74標的薬剤(例えばミラツズマブ)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス)、AT-101、イムノトキシン(例えばCAT-8015、抗Tac(Fv)-PE38(LMB-2))、CD37標的薬剤(例えばTRU-016)、放射性免疫療法(例えば131-トシツモマブ)、ヒドロキシクロロキン、ペリフォシン、SRC阻害剤(例えばダサチニブ)、サリドマイド、PI3Kデルタ阻害剤(例えばCAL-101)、レチノイド(例えばフェンレチノイド)、MDM2アンタゴニスト(例えばRO5045337)、プレリキサホル、オーロラキナーゼ阻害剤(例えばMLN8237、TAK-901)、プロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ)、CD-19標的薬剤(例えばMEDI-551、MOR208)、MEK阻害剤(例えばABT-348)、JAK-2阻害剤(例えばINCB018424)、低酸素活性化プロドラッグ(例えばTH-302)、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤、HSP90阻害剤、AKT阻害剤(例えばMK2206)、HMG-CoA阻害剤(例えばシムバスタチン)、GNKG186、放射線療法、骨髄移植、幹細胞移植、および前記の組合せ(ただし前記に限定されない)。

10

【0197】

急性リンパ球性白血病(ALL)の治療に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる:化学療法剤(例えばプレドニゾロン、デキサメタゾン、ビンクリスチン、アスパラギナーゼ、ダウノルビシン、シクロフォスファミド、シタラビン、エトポシド、チオグアニン、メルカプトプリン、クロファラビン、リボソームアンナマイシン、ブスルファン、エトポシド、カペシタビン、デシタビン、アザシチジン、トボテカン、テモゾロミド)、チロシンキナーゼ阻害剤(例えばBCR/ABL阻害剤(例えばイマチニブ、ニロチニブ))、ON 01910.Na)、マルチキナーゼ阻害剤(例えばソラフェニブ)、CD-20標的薬剤(例えばリツキシマブ)、CD52標的薬剤(例えばアレムツズマブ)、HSP90阻害剤(例えばSTA-9090)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス、ラバマイシン)、JAK-2阻害剤(例えばINCB018424)、HER2/neu受容体阻害剤(例えばトラスツズマブ)、プロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ)、メトトレキセート、アスパラギナーゼ、CD-22標的薬剤(例えばエブラツズマブ、イノツズマブ)、免疫療法(例えば自家サイトカイン誘導キラー細胞(CIK)、AHN-12)、プリナツモマブ、サイクリン依存キナーゼ阻害剤(例えばUCN-01)、CD45標的薬剤(例えばBC8)、MDM2アンタゴニスト(例えばRO5045337)、イムノトキシン(例えばCAT-8015、DT2219ARL)、HDAC阻害剤(例えばJNJ-26481585)、JVRS-100、パクリタキセルまたはパクリタキセル系薬剤、STAT3阻害剤(例えばOPB-31121)、PARP阻害剤(例えばベリパリブ)、EZN-2285、放射線療法、ステロイド、骨髄移植、幹細胞移植、または前記の組合せ(ただしこれらに限定されない)。

20

30

【0198】

急性骨髄性白血病(AML)の治療に組合わせて用いられる適切な治療の例には以下が含まれる:化学療法剤(例えばシタラビン、ダウノマイシン、イダルビシン、クロファラビン、デシタビン、ボサロキシシン、アザシチジン、クロファラビン、リバビリン、CPX-351、トレオスルファン、エラシタラビン、アザシチジン)、チロシンキナーゼ阻害剤(例えばBCR/ABL阻害剤(例えばイマチニブ、ニロチニブ)、ON 01910.Na、マルチキナーゼ阻害剤(例えばミドスタウリン、SU 11248、キザルチニブ、ソラフィニブ))イムノトキシン(例えばゲムツズマブオゾガミシン)、DT388IL3融合タンパク質、HDAC阻害剤(例えばボリノスタット、LBH589)、プレリキサホル、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス)、SRC阻害剤(例えばダサチニブ)、HSP90阻害剤(例えばSTA-9090)、レチノイド(例えばベキサロテン)、オーロラキナーゼ阻害剤(例えばBI 811283)、JAK-2阻害剤(例えばINCB018424)、ポロ様キナーゼ阻害剤(例えばBI-6727)、セネルセン、CD45標的薬剤(例えばBC8)、シクリン依存キナーゼ阻害剤(例えばUCN-01)、MDM2アンタゴニスト(例えばRO5045337)、mTOR阻害剤(例えばエベロリムス)、LY573636-ナトリウム、ZRx-101、MLN4924、レナリドミド、免疫療法(例えばAHN-12)、ヒスタミン二塩酸塩、放射線療法、骨髄移

40

50

植、幹細胞移植、および前記の組合せ（ただしこれらに限定されない）。

【0199】

多発性骨髄腫（MM）の治療に本発明の組成物とともに用いられる適切な治療の例には以下が含まれる：化学療法剤（例えばメルファラン、アミフォスチン、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、クロファラビン、ベンダムスチン、フルダラビン、アドリアマイシン、SyB L-0501）、サリドマイド、レナリドミド、デキサメタゾン、プレドニゾロン、ボマリドミド、プロテアソーム阻害剤（例えばボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、MLN9708）、癌ワクチン（例えばGVAX）、CD-40標的薬剤（例えばSGN-40、CHIR-12.12）、ペリフォシン、ゾレドロン酸、免疫療法（例えばMAGE-A3、NY-ESO-1、HuMax-CD38）、HDAC阻害剤（例えばボリノスタット、LBH589、AR-42）、アブリジン、シクリン依存キナーゼ阻害剤（例えばPD-0332991、ジナシクリブ）、三酸化ヒ素、CB3304、HSP90阻害剤（例えばKW-2478）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えばEGFR阻害剤（例えばセツキシマブ）、マルチキナーゼ阻害剤（例えばAT9283））、VEGF阻害剤（例えばベバシズマブ）、プレリキサホル、MEK阻害剤（例えばAZD6244）、IPH2101、アトルバスタチン、イムノトキシシン（例えばB B-10901）、NPI-0052、放射性免疫療法（例えばイットリウムY90イブリットモマブチウキセタン）、STAT3阻害剤（例えばOPB-31121）、MLN4924、オーロラキナーゼ阻害剤（例えばE NMD-2076）、IMGN901、ACE-041、CK-2阻害剤（例えばCX-4945）、放射線療法、骨髄移植、幹細胞移植、および前記の組合せ（ただしこれらに限定されない）。

10

前立腺癌の治療に本発明の組成物とともに用いられる適切な治療の例には以下が含まれる：化学療法剤（例えばドセタキセル、カルボプラチン、フルダラビン）、アピラテロン、ホルモン療法（例えばフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド、シプロテロン酢酸塩、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、アバレリクス、デガレリクス、リュプロリド、ゴセレリン、トリプトレリン、ブセレリン）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば二重キナーゼ阻害剤（例えばラパタニブ）、マルチキナーゼ阻害剤（例えばソラフィニブ））、VEGF阻害剤（例えばベバシズマブ）、TAK-700、癌ワクチン（例えばBPX-101、PEP223）、レナリドミド、TOK-001、IGF-1受容体阻害剤（例えばシクスツムマブ）、TRC105、オーロラAキナーゼ阻害剤（例えばMLN8237）、プロテアソーム阻害剤（例えばボルテゾミブ）、OGX-011、放射性免疫療法（例えばHuJ591-GS）、HDAC阻害剤（例えばバルプロ酸、SB939、LBH589）、ヒドロキシクロロキン、mTOR阻害剤（例えばエベロリムス）、ドビチニブ乳酸、ジインドリルメタン、エファピレンズ、OGX-427、ゲニステイン、IMC-3G3、パフェチニブ、CP-675,206、放射線療法もしくは外科手術、または前記の組合せ（ただしこれらに限定されない）。

20

30

【0200】

併用療法は、外科手術、放射線療法（ただし前記に限定されない）を含む現存癌治療用の1つ以上と組合わせて実施できる。放射線療法は、例えば外部ビーム療法（照射野が設計される三次元原体照射療法を必要とする）、局所照射（例えば予め選択した標的または器官に向けられる照射）、または集束照射である。集束照射は、定位放射線手術、分割定位放射線手術、および強度調整放射線療法から成る群から選択できる。集束照射は、粒子ビーム（プロトン）、コバルト60（フォトン）、および線形加速器（x線）（WO2012/177624（参照によってその全体が本明細書に含まれる）に記載）から成る群から選択される放射線源を有する。

40

放射線療法は、いくつかの方法の1つまたは複数の方法の1つの組合せを介して実施され得る。前記方法には、外部ビーム療法、内部放射線療法、インプラント放射線、定位放射線手術、全身性放射線療法、照射療法および永続的または一過性組織内小線源療法が含まれる。“小線源療法”という用語は、腫瘍または他の増殖組織の疾患部位の近くで体内に挿入される空間的に閉じ込められた放射性物質を介してデリバリーされる放射線療法を指す。前記用語は、放射性同位元素（例えばAt-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、Bi-212、P-32、およびLuの放射性同位元素）（ただし前記に限定されない）への暴露を含むことが意図される。本開示の細胞コンディショナーとして使用される適切な放射線源には固体および液体の両方が含まれる。非限定的に例示すれば、放射線源は、放

50

放射性核種、例えば固体源としてI-125、I-131、Yb-169、Ir-192、固体源としてI-125、または光子、ベータ粒子、ガンマ放射線、また他の治療線を放出する他の放射性核種であり得る。放射性物質はまた、放射性核種の任意の溶液で作製された液体（例えばI-125またはI-131の溶液）でもよい。或いは、放射性の液体は、固体の放射性核種（例えばAu-198、Y-90）の小粒子を含む適切な液体のスラリーを用いて生成することができる。さらにまた、放射性核種はゲルまたは放射性微小球として具体化され得る。

【0201】

7. 治療方法

対象動物において癌を治療する方法はまた本発明によって要約される。前記方法は、上記および本明細書の他の場所で広範囲にに記載した薬剤（例えば治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子）の有効量を対象動物に投与する工程を含む。

本発明にしたがえば、RANKLに拮抗しかつ少なくとも1つのICMに拮抗する本発明の薬剤（例えば治療薬組合せまたはマルチ特異性抗原結合分子）は、癌または腫瘍と診断された後で治療的に用いられ得るか、或いは、対象動物が癌または腫瘍を発達させる前に予防的に用いられ得る。本発明は、したがって以下の（a） - （d）で使用される、RANKLおよび少なくとも1つのICMに拮抗する治療薬組合せ、マルチ特異性抗原結合分子、および医薬組成物を提供する：（a）癌の治療、（b）癌の進行の遅延、（c）癌罹患患者の生存延長、または（d）癌に対する細胞媒介免疫応答の刺激。したがって、本発明はまた以下の（a） - （d）のための方法を提供する：（a）癌の治療、（b）癌の進行の遅延、（c）癌罹患患者の生存延長、または（d）癌に対する細胞媒介免疫応答の刺激。本発明の実施により適切に治療され得る癌には、メラノーマ、乳癌、結腸癌、卵巣癌、子宮内膜および子宮の癌、胃に関する（gastric）または胃の癌、膵臓癌、前立腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝細胞癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝臓癌（liver cancer）、膀胱癌、ヘパトーマ、直腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌（hepatic carcinoma）、肛門癌腫、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆管の腫瘍、頭頸部癌、扁平上皮癌が含まれる。

【0202】

与えられた任意の対象動物のための同時発生的かまたは逐次的な特定の用量レジメンは、患者の個々の診断された疾患または患者の病期と併せたものに基づいて確立され得る。例えば、患者が攻撃性が低い癌を有すると、または癌がより早期と診断されたら、抗RANKL薬剤とその後に続く抗ICM薬剤の同時発生的投与および/または抗RANKL薬剤とその後に続くICM薬剤の逐次投与に対して臨床的利益および/または免疫関連応答が達成される蓋然性の増加を対象動物は有することができる。また別に、患者がより攻撃性の癌を有すると、または癌がより後期であると診断されたら、患者は、前記時を同時発生的投与および/または逐次的投与に対して臨床的利益および/または免疫関連応答が達成される蓋然性の低下を有する可能性があり、したがって、前記抗RANKL薬剤および/または抗ICM薬剤療法のより高用量を投与するか、或いはより攻撃的な用量レジメンまたはどちらかの薬剤もしくは併用療法を担保することを推奨し得る。ある特徴では、抗RANKL抗原結合分子、例えばデノスマブの用量レベル増加は、個々の適用または個体のための典型的な抗RANKL薬剤用量（例えば約0.3mg/kg、約1mg/kg、約3mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg）よりも約10、20、30、40、50、60、70、80、90または95%を超えるか、または個々の適用または個体のための典型的な用量よりも約1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、または10倍を超える抗RANKL薬剤であろう。別の特徴では、抗ICM薬剤の用量レベル増加は、個々の適用または個体のための典型的な抗PD-1薬剤用量（例えば約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約3mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg；または約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg、約11mg、約12mg、約13mg、約14mg、約15mgまたは約16mg）よりも約10、20、30、40、50、60、70、80、90または95%を超えるか、または個々の適用のための典型的な用量よりも約1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、または10倍を超える抗ICM薬剤であろう。

【0203】

抗RANKL薬剤および/または抗ICM薬剤の治療的に有効な量は、それがたとえば生物薬剤である場合には好ましくは対象動物に注射されるであろう。用いられる実際の投薬量は、患者の要件および治療される症状の重篤度に応じて変動し得る。個々の状況について適切な出発投薬量の決定は当業者の能力の範囲内であるが、ただし適応症および疾患の病期を考慮することは治療レジメンの評価に有益であろう。それにもかかわらず、任意の個々の対象動物のための具体的な用量レベルおよび投与頻度は変動可能であり、多様な要因（用いられる具体的な化合物の活性、化合物の代謝安定性および作用の長さ、患者の種、年齢、体重、一般的健康状態、性別および食事、投与態様および時期、排出速度、薬剤の組合せ、および個々の症状の重篤度を含む）に左右されることは理解されよう。治療のために好ましい対象には、動物、もっとも好ましくは哺乳動物種、例えば人間および家畜動物、例えばイヌ、ネコなどの癌患者（患者）が含まれる。

10

【0204】

8. キット

本発明の更なる実施態様は対象動物の癌を治療するキットである。このキットは本明細書で開示する任意の医薬組成物を含む。

本発明のキットで使用するために、医薬組成物は、適切な治療薬組合せおよび/またはマルチ特異性抗原結合分子、および場合によって癌治療のための指示を含む。キットはまた、対象動物に医薬組成物を投与する際に使用するために、各医薬組成物および同封の他の試薬のための適切な貯蔵容器（例えばアンプル、バイアル、チューブなど）を含む。医薬組成物および他の試薬は、任意の都合の良い形態で（例えば医薬組成物の溶液または散剤で）存在し得る。キットはさらにまた包装容器を含むことができ、場合によって前記は、医薬組成物および他の随意の試薬を収納する1つ以上の仕切りを有する。

20

本発明を容易に理解し実行するために、個々の好ましい実施態様が、非限定的な以下の例によってこれから記述されるであろう。

【実施例1】

【0205】

CTLA4およびRANKLの共同封鎖による肺転移の抑制はNK細胞およびIFN-ガンマに左右される

実験的B16F10メラノーマ肺転移を有するマウスで、ハムスター抗CTLA4（UC10-4F10）および抗RANKL（IK22/5）MAbの組合せで治療された野生型（WT）マウスは、いずれかの抗体だけまたはコントロール免疫グロブリン（cIg）で治療されたマウスと比較して転移に対して優れた転移耐性を示した（図1A）。抗CTLA4および抗RANKL併用療法の作用メカニズムを、CD8⁺もしくはNK細胞を枯渇させた野生型マウスまたはパーフォリンもしくはIFN 欠損マウスで決定した。図1Bに示すように、併用の有効性はNK細胞の存在を必要としたがCD8⁺ T細胞を必要とせず、さらにIFN は重要でありパーフォリンの重要度はIFN よりも低かった（図1C）。NK細胞に対する同様な依存性は、前記と同じ動物を抗CTLA4および抗RANKL併用療法で治療後に前立腺癌腫RM-1の実験的肺転移の効果的な制御で示された（図1D）。

30

【実施例2】

【0206】

抗RANKLはIg G2aアイソタイプのCTLA4抗体と最適な相乗作用を示す

抗CTLA4の免疫グロブリン定常領域が抗腫瘍活性に影響すると報告されたので（Selby et al., 2013, Cancer Immunol. Res., 1(1):32-42）、次に本発明者らは、実験的B16F10肺転移の抑制における抗RANKLとの相乗作用に種々の抗CTLA4抗体アイソタイプがどのように影響するかを評価した（図2）9D9は、多数のアイソタイプ（Ig G1、Ig G2aおよびIg G2bを含む）として生成された抗CTLAクローンであり、一方、別のアイソタイプ（Ig G1-D265A）は、全てのFc 受容体（Fc R）との結合を排除する変異を含んでいた（上掲書（Selby et al., 2013））。図2Aに示すように、抗CTLA4のIg G2aアイソタイプ（黒丸）単独は、抗CTLA4のハムスタークローン（黒逆三角形）と比較して肺転移のより強い抑制をもたらし、この抑制はどちらかの抗CTLA4クローンへの抗RANKLの添加によりさらに増加した。

40

50

同様に、RM-1およびLWT1肺転移の有意な抑制がまた、マウスI g G2a抗CTLA4および抗RANKL併用療法で認められた（図2C）。

興味深いことに、他の3つの抗CTLA4アイソタイプ単独（I g G2b（黒ダイヤモンド）、I g G1（黒四角）またはI g G1-D265A（黒六角形））は、抗CTLA4-I g G2aアイソタイプ（黒丸）と比較して肺転移抑制で有効ではなく、それらは、cI g 治療グループ（黒三角）と比較して有意な肺転移抑制をもたらさなかった（図2B）。しかしながら、抗CTLA4のハムスター（白逆三角形）またはマウスI g G2b（白ダイヤモンド）アイソタイプへの抗RANKLの添加は、cI g（黒三角形）と比較して有意な肺転移抑制をもたらした。それにもかかわらず、抗RANKLおよび抗CTLA4-I g G2aクローン（白丸）で治療されたグループは、抗RANKLと抗CTLA4-I g G2bとの併用よりも顕著に優れていた（図2B）。全体的に見れば、抗RANKL治療単独は有意には転移を抑制しなかったが、特定の抗CTLA4アイソタイプ（もっとも目覚ましくはI g G2aのそれ）と組合わせて用いられたとき転移制御を顕著に改善させた（図2A、B）。

【実施例3】

【0207】

抗RANKLおよび抗CTLA4は皮下B16F10メラノーマの増殖を抑制する

次に、RANKLおよびCTLA4の二重封鎖の有効性を、皮下B16F10メラノーマ（概して免疫原性が低い）を有するマウスで評価した（図3）。肺転移モデルと同様に、併用療法は単一療法と比較してより強い増殖抑制を再び示したが、抗CTLA4ハムスタータイプとの併用効果は有意ではなかった。

【実施例4】

【0208】

抗RANKLおよび抗CTLA4は皮下B16F10メラノーマの増殖を抑制する

肺転移モデルと同様に、併用療法は再び抗体アイソタイプに依存し、ハムスターアイソタイプ（図3）ではなくて抗CTLA4-I g G2aアイソタイプのときに有意な増殖抑制が観察された（図4）。7つのそれぞれ別個のプール実験の縦断的分析を実施し、抗CTLA4-I g G2aまたは抗CTLA4（I g G1-D265A）および/または抗RANKLのFcR非嵌合クローンをコントロールI gと比較した（図4C）。全体的に見れば、データは、抗CTLA4-I g G2aと抗RANKLの組合せは、単一療法またはcI gと比較して腫瘍増殖を有意に抑制することを示した（図4C）。対照的に、抗CTLA4-I g G1-D265Aおよび抗RANKLの組合せはcI g治療グループより優れていたが、単一療法としてのどちらの治療にも劣っていた（図4C）。同様に、抗CTLA4-I g G2aアイソタイプを含む併用療法で治療されたマウスの終了時点における腫瘍質量もまた、対応する単一療法治療グループと比較して有意に減少した。しかしながらこの利点は、抗CTLA4-I g G1-D265Aアイソタイプを含む併用療法で治療されたグループでは、抗CTLA4-I g G1-D265A単独で治療されたマウスと比較して観察されなかった（図4B）。

【実施例5】

【0209】

腫瘍ミクロ環境におけるRANKLおよびRANKの発現

次に、B16F10腫瘍のミクロ環境（TME）におけるRANKLおよびRANKの発現を明確にした（図5）。腫瘍内RANKLの大半はT細胞の小部分によって発現され、発現はより早い時点（9日目）で高く、脾臓よりも腫瘍で高く、CD4⁺ T細胞と比較してより多くのCD8⁺ T細胞が腫瘍内でRANKLを発現した（図5A）。全体的に見れば、腫瘍浸潤白血球（TIL）の約20%がRANKを発現し（ただしその幅は極めて広い）、CD11bの染色より90%多く（データは示していない）、腫瘍内RANKは腫瘍浸潤骨髄性細胞によってほぼ独占的に発現されることを示唆している。腫瘍浸潤マクロファージ（TAM）の約40%、MDSCの60%、およびDCの低い変動し得る割合（5-20%）がRANKを発現した（図4B）。抗RANKLによる治療は、これらの細胞タイプにおける骨髄性RANK発現を有意には変化させなかった（図5B）。最近、Ly6C^{low}MHCII^{high}腫瘍内マクロファージは、炎症性M1サブタイプと一致するRNA発現プロファイルを有することがB16メラノーマモデルで報告され、一方、MHCII^{low/negative}発現を有するものは、免疫抑制M2表現型を有すると考えられた（De Henau et al., 2016, Nature, 539

10

20

30

40

50

(7629):443-7)。特に、本発明者らのB16F10モデルでは、RANKを発現するLy6C/Ly6G (GR-1)^{low} TAMのより大きな割合が、RANKを発現しないものと比較して陰性または低いMHC II発現を有し、RANK発現TAM集団は、RANKを発現しないTAMよりも強い抑制性を有する可能性があることを示唆する(データは示していない)。しかしながら、抗RANKL治療は、B16F10またはRM-1皮下腫瘍で、CD11b⁺骨髄性TILの割合、CD206(M2マーカー)発現TAMの割合を変化させなかった(データは示していない)。RANKL発現またはRANK発現細胞の1%未満がCD45.2陰性であり(どちらのin vivo腫瘍内発現レベルも無視できることを示す)、加えてこの試験で用いられた全ての腫瘍株はフローサイトメトリーで評価したとき、RANKLまたはRANK発現について陰性であった(データは示していない)。

【実施例6】

【0210】

抗RANKLおよび抗CTLA4-IgG2aの併用療法の抗腫瘍有効性はFcγRIV受容体、IFN およびCD8⁺ T細胞依存性である

次に、本発明者らは、皮下B16F10腫瘍モデルにおけるエフェクターリンパ球の存在および機能と同様に、抗RANKLと抗CTLA4-IgG2aとの併用の有効性のFc受容体に対する依存性を評価した(図6)。抗CTLA4-IgG2aの公知の作用メカニズムと一致して、B16F10に対する抗RANKLとその併用活性は、FcγRIVまたはFcγE Rを欠くマウスでは停止したが、FcγRIIでは停止しなかった(図6A)。抗CTLA4 MAbはFcγRIV依存性であるが、RANKLの封鎖が同様な要求を有するか否かは明確ではなかった。次に、抗CTLA4-mIgG2aおよび抗RANKLによるB16F10腫瘍増殖の制御におけるCD8⁺ T細胞およびNK細胞の役割を、各サブセットの選択的枯渇によって評価した(図6B)。CD8⁺ T細胞を枯渇させたとき、併用療法の抗腫瘍有効性はほぼ完全に停止した。対照的に、NK細胞枯渇は影響がなく、この併用療法のCD8⁺ T細胞に対する依存性を示した(図6B)。転移環境で観察された結果と同様に、この併用療法はIFN 依存性であったが、パーフォリン依存性ではなかった。(図6C)。この併用療法における、クロスプレゼンテーション機能を有するCD8⁺の通常のDCに対する本質的役割はまた、転写因子Batf3に欠損を有するマウスを使用することによって明示された。併用療法の有効性はWT治療マウスと比較してこれらのマウスで停止した(図6D)。

【実施例7】

【0211】

CTLA4およびRANKL封鎖後のCD8⁺ T細胞腫瘍への流入

併用療法のメカニズムおよびCD8⁺ T細胞の役割の更なる理解のために、抗CTLA4(IgG2a)および抗RANKLの最適な併用療法で治療した皮下B16F10腫瘍でTILの組成を評価した(図7)。終了時点の腫瘍で評価したとき、CD45⁺ TILの割合は、cIgまたは単一療法治療グループと比較して併用療法で有意に増加した(図7A)。対照的に、この増加は、抗CTLA4-IgG1-D265Aアイソタイプを含む併用療法で治療したマウスでは観察されなかった(データは示していない)。併用療法治療グループにおけるCD45⁺ TILにおける増加は、CD8⁺ T細胞の目覚ましい増加(割合(図7B)および絶対数(図7C)の両方)によってほとんど説明された。繰り返せば、これらの変化は、9D9-IgG1-D265Aアイソタイプを含む併用療法では見られなかった(データは示していない)。

Treg(CD4⁺Foxp3⁺)の割合(腫瘍中のCD4⁺ T細胞のパーセンテージとして)は、抗CTLA4-IgG2a単一療法で減少した(このアイソタイプの作用の報告メカニズムと一致する(Selby et al., 2013, Cancer Immunol. Res., 1(1):32-42))が、しかしながら、抗RANKL抗体の添加によりさらにまた減少した。加えて、CD11b⁺細胞でのFcγ-IV発現は、腫瘍で併用療法を用いてもさらに増加することはなく(データは示していない)、TMEにおけるTreg枯渇の増強はこの併用の作用メカニズムを説明できないことを示唆する。脾臓では、Tregの割合または数に有意な変化は治療グループ間で検出されなかった(データは示していない)。全体的に見れば、本発明者らには、これらのモデルにおける併用療法の作用メカニズムはより効率的なTregの枯渇によるものとは思われない。

抗RANKLの別の潜在的な作用メカニズムはT細胞増殖の増強であり得よう。しかしながら、本発明者らは、抗CTLA4単一療法と比較して、併用治療群でのKi-67発現CD8⁺ T細胞の更

10

20

30

40

50

なる増加を全く観察しなかった（図7E）。このことは、併用治療後の腫瘍で観察される追加のCD8⁺ T細胞は選択的なCD8⁺ T細胞補充の結果の可能性を示唆している。したがって、併用療法によるCD8⁺ T細胞の流入は、抑制性免疫細胞（例えばTregまたは骨髄性細胞）の増加の欠如と相俟って、抗腫瘍活性に有利となるようにTMEを変化させることができる。実際、CD8⁺ 対Treg比の有意な増加が、早い時点（9日目）で測定したときに認められた（図7F）。加えて、MDSCに対するCD8⁺ T細胞の比は、併用療法で有意に増加した（図7H）。重要なことに、観察されたこれらの変化は腫瘍に特異的であった。なぜならば、白血球サブセットの割合における有意な変化は、これら腫瘍を有するマウスの脾臓では観察されなかったからである（データは示していない）。

【実施例 8】

【0212】

抗RANKLおよび抗CTLA4療法はT細胞のサイトカイン産生および多機能性を高める

本発明者らはまた、この併用免疫療法が、実験終了点（16日目）のB16F10腫瘍でCD8 およびCD4⁺ T細胞のTh1サイトカイン産生（IFN γ 、TNF、IL-2）に対してどのような影響を有するかを評価した（図8）。TNF α は刺激後ex vivoでもっとも一般的に産生されるサイトカインであったが、有意な相違は、cIgまたは単一療法と比較して、併用療法後のCD8⁺ T細胞によるIFN γ （図8A）およびIL-2（データは示していない）の産生で認められた。さらにまた、IFN γ およびIL-2（図8B）またはIFN γ 、IL-2およびTNF α （図8C）を共同発現するCD8⁺ T細胞もまた併用療法で増加した。同様な発見がCD4⁺ T細胞で、特にIFN γ を産生した割合で観察された（図8D）。cIg治療グループのCD8⁺ T細胞の大半は刺激後にサイトカインを産生せず、一方、併用療法は最大の多機能性を有するT細胞を産生し、単一療法グループは中間の表現型を示した（図8E）。サイトカイン多機能性に対する併用療法の効果は腫瘍特異的であった。なぜならばこれらの相違は、腫瘍を有するマウスの脾臓T細胞では観察されなかったからである（データは示していない）。

【0213】

実施例1-8のための材料と方法

細胞培養

マウスメラノーマ細胞株B16F10（ATCC）およびLWT1並びに前立腺癌腫細胞株RM-1は、以前の記載にしたがって維持、注射およびモニターした（Ferrari de Andrade et al., 2014, Cancer Res, 74:7298-7308）。線維肉腫細胞株MCA1956（MCA接種C57BL/6野生型マウスに由来）は、Robert Schreiber（Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA）から寄贈された。前立腺癌細胞株Tramp-C1は記載にしたがって（Dalezis et al., 2012, In Vivo, 26:75-86）維持したが、ただしデヒドロイソアンドロステロンは用いなかった。全ての細胞株はマイコプラズマ陰性について日常的に検査したが、細胞株信頼性は日常的には実施しなかった。

マウス

C57BL/6野生型（WT）マウスは所内交配されるか、または業者（Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research）から購入した。C57BL/6パーフォリン欠損（pfp^{-/-}）、インターフェロン欠損（IFN γ ^{-/-}）、Fc受容体欠損（Fc γ RIII、Fc γ RIVおよびFc γ RI）、Batf3転写因子欠損（Batf3^{-/-}）（以下に記載：Hildner et al., 2008, Science, 322:1097-1100）およびFoxP3-DTR（以下に記載：Teng et al., 2010, Cancer Res, 70:7800-7809）マウスは、QIMRB（QIMR Berghofer Medical Research Institute）で所内交配された。全マウスを6から16週齢で用いた。5から13匹のマウスのグループを実験的腫瘍転移アッセイおよび皮下（s.c.）腫瘍増殖に用いた。全ての実験がQIMRB動物倫理委員会で承認された。

抗体

精製抗マウス抗RANKL（IK22/5; rat IgG2a（Kamijo S. et al., 2006, Biochem Biophys Res Commun, 347:124-132））、抗CTLA4（UC10-4F10、ハムスターIgG）、およびコントロール抗体（ハムスターIgG、1-1またはIgG2a、2A3）は所内で作製するかまたは業者（BioXcell（West Lebanon, NH））から購入した。抗CTLA4クローン9D9（表示の多様な

10

20

30

40

50

アイソタイプ)およびコントロール抗体1D12(マウスIgG2a)は業者(Bristol-Myers Squibb (San Francisco, CA))から供給された。NK細胞を枯渇させるための抗体(抗asialoGM1(Wako))または抗CD8(53.5.8(BioXcell))は表示のように投与された。

皮下腫瘍モデル

B16F10(1×10^5)、RM-1(5×10^4)、MCA1956(1×10^6)またはTRAMP-C1(1×10^6)の腫瘍形成のために、雌(B16F10, MCA1956)または雄(RM-1, TRAMP-C1)マウスの脇腹の皮下に細胞を接種した。治療抗体の処置は表示のように腫瘍接種後3-12日目に開始し2-4日毎に最大4用量まで投与した。腫瘍はデジタルカリパーを用いて二次元で測定し、腫瘍サイズを平均 \pm SEMとして提示する。

実験的肺転移モデル

B16F10、RM-1またはLWT1の単一細胞懸濁物を表示のマウス株の尾静脈に静脈内注射した。14日目に肺を採集し、解剖顕微鏡下で表面の腫瘍結節をカウントした。腫瘍接種に対し-1日目、0日目および2日目に、表示の抗体治療を抗CTLA4および/または抗RANKL MAbを用いて実施した。CD8⁺ T細胞またはNK細胞を枯渇させる抗体は、腫瘍接種に対し-1日目、0日目および7日目に表示のように投与した。

【0214】

フローサイトメトリー

腫瘍を有するマウスを2つの時点(9日目または終了点(腫瘍が倫理的終点サイズに達したために実験を終了させる時点))で犠牲にした。腫瘍、流入領域リンパ節(鼠径部)および脾臓を収集し、湿潤重量を記録した。以前に記載されたように(上掲書(Teng et al., 2010))、表示の器官から単一細胞懸濁物を作成した。

以下の抗体(Biolegend、eBioscience、BD)を用いた: CD4-BV605(RM4-5)、CD8-BV711(53-6.7)、CD11b-BV650(M1/70)、CD11b-PE(M1/70)、CD11c-PE(N418)、精製CD16.2(9E9)その後にヤギ抗ハムスターFITC、CD206-AF647およびCD206-PECy7(C068C2)、およびZombie Aqua生存/死染料; TCR γ -PerCP-Cy5.5(H57-597)、CD45.2-A780(104)、Ly6C/Ly6G(GR-1)-EF450(RB6-8C5)、MHCII-APC(M5/114.15.2)、CD265(RANK)-PE(R12-31); RANKL-AF647(IK22/5)。細胞内サイトカイン染色(ICS)のためには、細胞を4時間細胞刺激カクテル(1/1000)(eBioscience)で刺激した。続いて、Cytofix/Cytoperm(BD)による固定/透過処理の前に、上記に記載したように細胞を表面染色し、さらにIFN γ -AF488(Biolegend)、TNF α -PE(BD)、およびIL-2-パシフィックブルー(Biolegend)で染色した。

細胞内転写因子染色のためには、固定する前に、上記に記載したように細胞を表面染色し、さらにFoxp3/転写因子染色緩衝液セット(eBioscience)を用い製造業者のプロトコルにしたがって透過処理し、FoxP3-EF450またはFoxP3-AF488(FJK-16s)およびKi67-EF450(Sol185)(eBioscience)で染色した。全ての免疫細胞分析は最初に生存単一CD45.2⁺でゲート分類した。T細胞はTCR γ ⁺NK1.1⁻と規定された。NK細胞はTCR γ ⁻NK1⁺と規定された。DCはCD11c⁺MHCII^{high}細胞と規定された。腫瘍関連マクロファージ(TAM)はCD11b⁺F4/80⁺ non-DC細胞と規定された。MDSCはCD11b⁺, Ly6C/Ly6G(GR-1)^{hi}, non-TAM, non-DC細胞と規定された。サンプルの絶対カウントを決定するために、サンプルをフローサイトメトリーにかけ直前に、流体カウントビーズ(BD Biosciences)を添加した。全てのデータをフォルテッサ(Fortessa)4(BD)フローサイトメーターで収集し、FlowJo v10ソフトウェア(Tree Star, Inc.)を用いて分析した。

統計分析

グラフパッドプリズム(GraphPad Prism)ソフトウェアを統計分析に用いた。カラム分析のためには、ブラウン-フォーサイス検定を用いて等分散を評価した。有意でない場合、ダンの多重比較による一元配置分散分析を用いた。グループ間で不等分散の場合には、シダックまたはダネットの多重比較によるクルスカール-ウォリス分析を適切に用いた。縦断的腫瘍増殖分析のためには、実験内マウスのみについて治療グループランダム効果モデルを用いた。P値が0.05未満である場合、データは統計的に有意であるとみなした。

。

10

20

30

40

50

【実施例 9】

【0215】

RANKLおよびPD-1-PD-L1相互作用の共同封鎖による肺転移の抑制

抗RANKLと抗PD-1（図9A - B）または抗RANKLと抗PD-L1（図9C - D）の併用は、メラノーマ（B16F10）または前立腺癌（RM1）の肺転移モデルで転移に対する優れた耐性をもたらす。

【実施例 10】

【0216】

RANKLおよびPD-1の共同封鎖による皮下腫瘍増殖の抑制

実験的転移モデルのこれらの結果を広げるために、次に、皮下腫瘍を有するマウスでRANKLおよびPD-1の二重封鎖の有効性を評価した。PD-1感受性細胞株MC38およびPD-1中間応答細胞株CT26（ともに結腸癌モデル）で、抗RANKLの添加は抗PD-1有効性を増強した（図10A - B）。樹立がより進んだ腫瘍に対してより遅い時点で当該療法が開始されたときに、CT26に対する組合せの有効性は維持された（データは示していない）。 10

【実施例 11】

【0217】

抗RANKLの皮下腫瘍増殖抑制能力はBatF3に依存するがFc受容体発現には依存しない

いくつかの免疫調整抗体の有効性には、抗体依存細胞傷害性による抗原発現細胞の枯渇（Dahan et al., 2015, Cancer Cell, 28 (3):285-295）、或いは標的抗原のアゴニスト活性の枯渇（Dahan et al., 2016, Cancer Cell, 29 (6):820-831）が算入されている。 20
これらプロセスはともに腫瘍ミクロ環境内でのFc受容体の嵌合を必要とする。加えて、ある種の抗体（例えば抗CD137、抗PD-L1）は、CD103⁺ Batf3-依存樹状細胞の存在を要求する（Sanchez-Paulete et al., 2016, Cancer Discov. 6 (1):71-9）。したがって、抗RANKLの作用メカニズムの理解のために、Fc受容体またBatF3依存樹状細胞に対する抗RANKL有効性の依存を遺伝子標的マウスで試験した。C57Bl/6または遺伝子標的マウスのグループにMCA1956線維肉腫細胞（ 1×10^6 ）を皮下注射した。腫瘍接種に対して3、7、11および15日目に、抗RANKL（IK22/5、200 μ g i.p.）またはcIg（1-1、200 μ g i.p.）でマウスを処理した。抗RANKL MAb IK22/5は、MCA1956皮下腫瘍で単一療法として有効性を示した（図11）。抗RANKLの抗腫瘍有効性はFc R を欠くマウスで温存された。このことは、RANKLのその受容体、RANKに対する封鎖により生じ、RANKL発現細胞の枯渇を介して機能する 30
ものではない抗RANKLの作用メカニズムと一致する。対照的に、抗RANKL IK22/5の抗腫瘍有効性はBatF3を欠くマウスで停止し、CD103⁺ DC媒介クロスプレゼンテーションに関する本質的な役割を示唆した。これらのデータは、RANK発現骨髓性細胞（例えば樹状細胞、MDSCまたはマクロファージ）とRANKL発現細胞（例えばリンパ球、リンパ節細胞または他の間質成分）との間の免疫抑制性または免疫寛容原性機軸を腫瘍ミクロ環境において抗RANKLが破壊する作用メカニズムと一致する。

【実施例 12】

【0218】

腫瘍の浸潤骨髓性細胞におけるRANKおよびPD-L1の共同発現

上記に記載したMCA1956腫瘍における抗RANKLのメカニズムに関するデータが与えられたことを考慮すると、腫瘍ミクロ環境内のRANKLの潜在的役割は、RANKL受容体（RANK）を発現し得るBatF3依存樹状細胞における作用を介するものである。2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体の場合、同じ細胞タイプ上の複数の標的抗原の共同発現は、機能性が標的細胞そのものとなるので有利となろう。単一細胞タイプ上での複数標的抗原の共同発現もまた、腫瘍ミクロ環境内での二重特異性様式のより細胞特異的または組織特異的作用、およびより強い細胞選択性によるより低い周辺毒性を危険なものとして排斥し得る。また別に或いは付け加えて、2つの別個の細胞でトランス態様で発現される2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体もまた有益である。なぜなら、2つの別個の免疫抑制メカニズムを同時に阻害できるからである。 40

【0219】

したがって、骨髓性細胞区画におけるRANKおよびPD-L1または他の抗原の二重特異性標的誘導のための理論的根拠として、これらの因子の発現をフローサイトメトリーによって腫瘍浸潤骨髓性細胞で分析した。WT C57BL/6マウスにMCA1956細胞 (1×10^6 細胞/マウス) を皮下注射した。腫瘍がほぼ50mm³に達するまで一切治療しないで22日間増殖させた。腫瘍を収集し単一細胞懸濁物を作成し、上記のようにフローサイトメトリーを実施した。CD11c+/MHCII+樹状細胞 (DC) のフローサイトメトリー分析は、RANK陽性DCの100%がまたPD-L1およびCD103を発現することを示した (図12A)。MCA1956皮下腫瘍から単離した腫瘍浸潤マクロファージで同様な分析を実施した (CD11b+、F4/80+でゲート分類)。この分析は、腫瘍浸潤CD11b+/F480+細胞の52%がRANKおよびCD206を共同発現し、一方、RANK陰性CD11b+/F480+の7%のみがCD206を発現することを示した (図12B)。

要約すれば、抗RANKL IK22/5 MAbの抗腫瘍有効性はBatF3を欠くマウスで停止し、このことはCD103⁺樹状細胞 (DC) 媒介クロスプレゼンテーションに関する本質的役割を示唆する。これらのデータは、RANK発現骨髓性細胞 (例えば樹状細胞またはマクロファージ) とRANKL発現細胞 (例えばリンパ球、リンパ節細胞または他の間質成分) との間の免疫抑制性または免疫寛容原性機軸を腫瘍ミクロ環境で抗RANKLが破壊する作用メカニズムと一致する。腫瘍由来のCD11c⁺/MHCII⁺ DCのフローサイトメトリー分析は、RANK陽性DCの100%がまたPD-L1およびCD103を発現することを示した。同様な分析は、RANK陽性腫瘍浸潤マクロファージにおけるCD206発現の有意な豊富さを示した。2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体の場合、同じ細胞タイプ上の標的抗原共同発現は、機能性が標的細胞固有であるので有利となろう。単一細胞タイプ上での標的抗原の共同発現はまた、腫瘍ミクロ環境内での二重特異性様式のより細胞特異的または組織特異的作用およびより強い細胞選択性のためにより低い周辺毒性を排斥することができる。また別に或いは付け加えれば、2つの別個の細胞でin trans発現される2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体もまた有益である。なぜなら、2つの別個の免疫抑制メカニズムを同時に阻害できるからである。

総合すれば、これらの観察は、腫瘍内のRANK陽性DCにおけるPD-L1発現の顕著な豊富さを示し、cis状態のこれら2つの抗原の二重特異性標的誘導のための更なる理論的根拠を提供する。PD-L1を標的とする様式は腫瘍におけるチェックポイント阻害剤として確実に実証され、抗RANK二重特異性の合理的なパートナーを提供する。加えて、RANKに付随するCD103およびCD206の高度な共同発現は、RANKを標的とする二重特異性様式のための追加の抗原パートナーを提唱する。

【実施例 13】

【0220】

抗RANKおよび抗PD-1ジアボディ

二重特異性単鎖ジアボディを以下および図13Aに示すように構築する。具体的には、抗RANKL抗体 (例えばデノスマブ) の可変重鎖を、抗PD-1抗体の可変軽鎖に5アミノ酸リンカーを介して連結し、前記を続いて抗PD-1抗体の可変重鎖に15アミノ酸リンカーを介して連結し、前記を抗RANKL抗体の可変軽鎖に別の5アミノ酸リンカーを介して連結する。

二重特異性単鎖ジアボディの例示的構築物では、RANKL抗体の可変重鎖 (以下のアミノ酸配列を有するデノスマブV_H: EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号:3)) が、第一のリンカー (SG₄) を介して抗PD-1抗体の可変軽鎖 (以下のアミノ酸配列を有するニボルマブV_L: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKEIK (配列番号:91)) に連結され、前記は、続いて第二のリンカー ((SG₄)₃) を介して、抗PD-1抗体の可変重鎖 (以下の配列を有するニボルマブV_H: QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTLLVTVSS (配列番号:88)) に連結され、その後第三のリンカー (SG₄) を介して、抗RANKL抗体の可変軽鎖 (以下のアミノ酸配列を有するデノスマブV_L: EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSPRTFGQGTKEIK (配列番号:4)) に連結される

。

二重特異性抗体をコードするDNAを発現ベクター（例えばpSecTag 2/Hyg roA（Invitrogen））でクローニングする。続いて、得られた二重特異性抗体コードプラスミドを標準的プロトコルを用いて増幅、抽出および精製する。

発現プラスミドをヒト腎細胞株293Tに、LipfectAMINE-plus（Invitrogen）を用いて一過性にトランスフェクトし培養する。上清を0.22 μmのPVDFフィルターで滅菌し、40%のPEG20,000溶液を用いて濃縮する。HiTrapキレーティHPカラム（GE Healthcare）を用いて前記濃縮上清を精製する。

【実施例 1 4】

【0 2 2 1】

抗RANKLおよび抗PD-1トリボディ

図13Bに示すように、二重特異性トリボディの生成のために1対のプラスミドが要求される。具体的には、ヒト 軽鎖の定常領域に融合した抗PD-1抗体の可変軽鎖を含む単鎖ポリペプチドをコードする第一の構築物が調製され、前記は抗RANKL抗体の可変重鎖にアミノ酸リンカーを介して連結される。精製を容易にするために、タグ（例えばhisタグ（His₆））を単鎖ポリペプチドのC-末端に付加することができる。ヒトIgG2の定常領域1に融合した抗PD-1抗体の可変重鎖を含む単鎖ポリペプチドをコードする第二の構築物もまた調製され、前記は抗RANKL抗体の可変重鎖に第一のアミノ酸リンカーを介して連結され、前記は次に、抗RANKL抗体の可変軽鎖に第二のアミノ酸リンカーを介して連結される。精製を容易にするために、タグ（例えばhisタグ（His₆））がまた当該単鎖ポリペプチドのC-末端に付加され得る。

2つの構築物を2つの別々の発現ベクターでクローニングする。前記は典型的にはプラスミド、例えばpCAGGSの形態であり得る（De Sutter et al., 1992, Gene 113, 223-230）。得られた二重特異性トリボディをコードするプラスミド対（pCAGGS-FabL-scFv-His₆およびpCAGGS-FabFd-scFv-His₆）を続いて増幅、抽出および精製する。

また別のプラスミド対が図13Cに示される。この実施態様では、ヒト 軽鎖の定常領域に融合した抗RANKL抗体の可変軽鎖を含む単鎖ポリペプチドをコードする第一の構築物が調製され、前記は抗PD-1抗体の可変重鎖にアミノ酸リンカーを介して連結される。精製を容易にするために、タグ（例えばhisタグ（His₆））がまた当該単鎖ポリペプチドのC-末端に付加され得る。ヒトIgG2の定常領域1に融合した抗RANKL抗体の可変重鎖を含む単鎖ポリペプチドをコードする第二の構築物が調製され、前記は抗PD-1抗体の可変重鎖に第一のアミノ酸リンカーを介して連結され、前記は次に、抗PD-1抗体の可変軽鎖に第二のアミノ酸リンカーを介して連結される。このタイプの例示的トリボディは図14に示される。

【実施例 1 5】

【0 2 2 2】

アンタゴニスト活性を決定するためのアッセイ

RANKLおよびRANKリガンド-受容体対はヒトおよびマウスタンパク質間で交差反応性を有し、等しい結合活性および機能活性が検出される（Bossen et al., 2006, J Biol Chem., 281 (20):13964-71）。抗原およびアッセイ調製物のために市場で入手できるRANKLおよびRANKの多様な組換え型が存在する。RANKLおよび抗RANK抗体はともに、RANKのCRD2およびCRD3または完全長RANK（すなわちCRD1、2、3、4を含む）と選択的に結合するであろう。

TNFスーパーファミリーリガンド/受容体相互作用はELISAによって評価でき（例えば以下を参照されたい：Schneider et al., 2014, Methods Enzymol., 545:103-25; Kostenuik et al., 2009, J. Bone Miner Res., 24 (2):182-95）、RANKLまたはRANKアンタゴニストのための単純明快なスクリーニングを提供する。RANKLおよびRANK阻害剤の生物学的活性は、以前に記載されたように、ネズミRAW264.7マクロファージ（破骨細胞の前駆細胞として機能する）の培養での破骨細胞形成（および条件付け培地でのTRAP5bの生成）を用いてELISAでモニターすることができる（Kostenuik et al., 2009（上掲書）；Xu et al., 2000, J. Bone Miner Res., 15 (11):2178-86）。

10

20

30

40

50

抗RANK抗体の交差反応性はTNFスーパーファミリーの他の関連メンバーに対してスクリーニングすることができる。フローサイトメトリーまたはELISAによるスクリーニングをこれに関して用いることができる。

RANKLまたはRANKアンタゴニストに対するアンタゴニスト活性の決定では、RANK受容体においてアゴニスト活性もまた有し得るいずれのRANKLまたはRANKアンタゴニストも排除することが好ましい。抗RANK抗体のアゴニスト活性の*in vitro*スクリーニングは、例えば以下の研究者によって記載されたように (Schneider et al., 2014 (上掲書) ; および Chypre et al., 2016, Immunol. Lett., 171:5-14)、RANK-Fas Jurkatアッセイで二価または一価抗体型を用いて実施することができる。関連するTNFRメンバー、EDARに対する抗体の分析は、アゴニスト活性との相関性は抗体の親和性ではなくいったん結合したものをゆっくりと切り離すそれらの能力 (小さな k_{off}) であることを示した (Kowalczyk-Quintas et al., 2011, J. Biol. Chem., 286 (35) :30769-79)。同様に、TNFRメンバー、FASに対する抗体の分析は、受容体親和性と (アゴニスト) 潜在能力との間の逆の相関性を示した (Chodorge et al., 2012, Cell Death Differ., 19 (7) :1187-95)。注目すべきことには、ファージスクリーンは、他のTNFRメンバー (例えばTRAILR) に対してアゴニスト活性を有するscFvを識別した (Dobson et al., 2009, MAbs, 1 (6) :552-62)。

10

【0223】

二重特異性形式で第二の標的 (例えばPD-L1) に関して抗RANK結合物質を試験して、結合性および機能性RANKLのアンタゴニスト作用の封鎖が維持されることを実証することもまた可能である。例えば、細胞株を操作してRANKをPD-L1と一緒に発現させ (例えばRANK-Fasキメラとして (Schneider et al., 2014 (上掲書))、RANKアンタゴニスト活性を確認することができよう。また別には、PD-L1の発現がRANK陽性破骨細胞前駆細胞で既に示されており (An et al., 2016, Blood, 128 (12) :1590-603)、*in vitro*機能アッセイを開発してRANK結合物質およびPD-L1結合物質を調べることが可能である。破骨細胞形成はRANK封鎖に対処し、一方、PD-1結合またはT細胞抑制を用いて、PD-L1封鎖に対処することができよう。後者を支持すれば、上掲書 (An et al., 2016) は、抗PD-L1は破骨細胞始原細胞培養のCTL活性を増加させることを示した。

20

抗RANKまたは抗RANKL抗体 (RANKLアンタゴニスト) の*in vivo*活性は、二価または一価抗体型を用いて調べて、破骨細胞アンタゴニスト機能をマウス試験で調べることができる。抗RANKまたは抗RANKL抗体でチャレンジしたマウスの骨密度の分析 (x-線またはDEXAによる) もまた実施できる。また別には、ヒトRANKLの皮下注射でチャレンジした正常マウスの高カルシウム血症に対する抗RANKまたは抗RANKL抗体の影響を、血中イオン化カルシウムまたは血清TRAP5bを毎日4日間モニターすることによって評価することができる。抗RANKまたは抗RANKL抗体 (RANKLアンタゴニスト) はまた、腫瘍応答について (陽性コントロール抗RANKL MAbについて本明細書の図9に示すように) MCA1956腫瘍モデルで試験することができよう。RANKL刺激 (例えばRANKLの組換え型) および阻害 (例えば組換えOPG-Fc) のための陽性コントロールは*in vitro*および*in vivo*試験のために容易に入手できる (Lacey et al., 2012, Nat Rev Drug Discov., 11 (5) :401-19)。

30

【実施例16】

【0224】

40

抗RANKL MAbの抗腫瘍有効性はT調節性細胞 (Treg) を必要としない

以前の発表で、RANK発現乳癌のマウスモデルの転移促進におけるRANK発現Tregの役割 (Tan et al., Nature 470 (2011), 548-553)、またはUV誘発皮膚炎症の抑制における皮膚RANKL-RANK相互作用を介する全身性Treg制御の役割 (Loser et al., Nat. Med 12 (2006), 1372-1379) が報告された。免疫療法の抗RANKL併用有効性におけるあらゆるTregの本質的役割をさらに評価するために、FoxP3-DTRマウスモデルを用いた。これらのマウスでは、ジフテリア毒素受容体 (DTR) がfoxp3遺伝子座の制御下で発現され、ジフテリア毒素 (DT) の投与を介してTregの条件性およびほぼ完全な枯渇を可能にし、抗腫瘍免疫増強がもたらされる (Teng et al., 2010 (上掲書))。より強いB16F10メラノーマ皮下腫瘍増殖抑制の傾向が観察され (図15A-C)、DTと併用して抗RANKL (IK22.5) が投与

50

されたときにDT単独と比較してより大きな割合のマウスが治癒した（図15A - C）。加えて、DTおよび抗RANKLで治療されたFoxP3-DTRマウスで、皮下RM-1前立腺癌の増殖抑制増強の同様な傾向もまた観察された（図15D）。終末点におけるRM-1腫瘍のFACS分析は、DT単独によるほぼ完全なTreg 枯渇を示し、抗RANKLがDTと併用されたときにTreg の更なる枯渇は認められなかった（図15E）。総合すれば、これらのモデルにおける併用療法の作用メカニズムは、より効果的なTreg 枯渇が原因であるとは思われず、ほぼ完全な腫瘍内Treg 枯渇の環境で抗RANKL mAbの有効性は損なわれない。実際、抗RANKLとDT誘発Treg 枯渇との併用で追加される有効性は、DT単独と比較してFoxP3-DTRマウスで観察され、この場合、両DT含有アームは、終末点のcI gと比較して95%を超えるTreg 枯渇を示し、したがって、抗RANKLの作用メカニズムはTreg に関して直接的ではないことを示している。

10

【実施例 17】

【0225】

腫瘍浸潤リンパ球でRANKLとCTLA4の共同発現と比較したRANKLおよびPD-1の別個の共同発現

前臨床の結果は、抗RANKL封鎖が、抗CTLA4またはPD-1/PD-L1封鎖の抗腫瘍有効性を高めることを示したが、これは別個のメカニズムを介して生じるという証拠が存在し、前記は、報告されたCTLA4対PD-1封鎖の非オーバーラップ作用メカニズムと一致する。例えば、マウスのCT26腫瘍から単離されたT細胞で、ほとんど全てのCD8⁺RANKL⁺ T細胞TIL（>90%）がPD-1を共同発現し、対照的にCD8⁺RANKL⁻T細胞TILの40%未満がPD-1陽性であった（図16A）。さらにまた、PD-1のMFIは、CD8⁺ RANKL⁻T細胞と比較してCD8⁺RANKL⁺で少なくとも3倍高く、前者はPD-1^{hi}細胞と識別された（図16B）。発現分析では、CTLA4発現は、RANKL⁺ CD8⁺ T細胞でそのRANKL-対応細胞と比較して有意に高いことが示された（図16C）。RANKL-発現細胞が一般的により増殖性で別の免疫チェックポイント（CTLA4）を低発現することを考慮すれば、PD-1共発現の豊富さにもかかわらず、CT26モデルにおけるRANKL⁺ CD8⁺ T細胞TILの特徴は疲弊表現型ではなく活性化表現型により一致する。

20

【実施例 18】

【0226】

抗PD-1、抗CTLA4および抗RANKL抗体の三重併用は腫瘍を有するマウスで抗腫瘍応答およびT細胞エフェクター機能を改善する

PD-1およびCTLA4の組合せ免疫チェックポイント封鎖（ICB）がある種の臨床環境（例えば進行メラノーマ）で新興の標準治療であるので、抗RANKLの付加が、抗CTLA4および抗PD-1/抗PD-L1併用療法の抗腫瘍有効性をさらに改善できるか否かを評価した（図17）。まず初めに樹立されたCT26腫瘍を有するWTマウスの抑制において、低用量抗PD-1（100 μg）を用いる組合せで抗RANKLを評価した（図17A）。抗PD-1への抗RANKLの付加は腫瘍増殖を有意に抑制したが、三重併用療法は、いずれの二重併用療法と比較してもCT26腫瘍マウスの腫瘍増殖を有意に抑制し、重要なことに、抗CTLA4プラス抗PD-1組合せへの抗RANKLの付加は腫瘍拒絶率を改善した（図17A）。次に、抗RANKLと併用された抗PD-1の抗CTLA4存在下または非存在下におけるCT26皮下腫瘍増殖抑制有効性を評価した（図17B）。抗PD-1単独と比較して、前記は（抗RANKLおよび抗PD-1単一療法と同様に）最少有効性を有し、抗PD-1および抗RANKLの組合せが腫瘍増殖を有意に抑制した（図17B）。加えて、抗PD-1および抗RANKLの抗CTLA4との三重併用が、CT26皮下増殖の抑制に最も有効で、この三重併用を特に二重ICB（抗PD-L1および抗CTLA4）と比較したとき、小さいが有意な相違が明白であった（図17B）。最後に、三重併用療法（抗PD-1 + 抗CTLA4 + 抗RANKL）の腫瘍増殖制御能力を自発性TRAMPトランスジェニックマウス（皮下Tramp-C1前立腺癌腫を有する）でも評価した。内因性腫瘍特異的T細胞が免疫寛容化され得る環境設定で、三重併用療法は、皮下腫瘍増殖の制御で再びもっとも有効であり、選択した二重療法およびcI gと比較して16匹のマウスうち15匹がそれらの腫瘍を完全に拒絶した（図17C）。三重併用療法で観察された腫瘍制御の増加は、抗CTLA4プラス抗PD-1二重併用療法と比較してIFN およびTFNの共同発現に反映されるように、腫瘍浸潤CD8⁺およびCD4⁺ T細胞のTh1型サイトカイン多機能性の有意な増加と相関関係があった。TILエフェクター機能におけるこの増加は腫瘍

30

40

50

でのみ観察され、三重併用療法で治療されたマウスの脾臓では観察されなかった。

【実施例 19】

【0227】

抗RANKLおよび抗PD-1/PD-L1併用療法或いは抗RANKLおよび抗CTLA4併用療法を別個に交差調整し得るTMEの固有の変化

CT26モデルで抗RANKLが免疫チェックポイント封鎖 (ICB) 療法を改善するメカニズムを調べるために、RANKLを発現するCD8⁺ T細胞の割合を評価した (図18A)。cI g 処置マウスで、約5%がRANKLを発現したが、これは抗PD-1単一療法後に10%以上増加した。さらにまた、RANKL発現は、gp70反応性CD8⁺ T細胞TILのサブセットの間で増え (cI g 処置マウスでは約15%)、抗PD-1単一療法、抗CTLA4単一療法またはcI g と比較して、二重ICBを受けた腫瘍で有意に増加した (図18B)。CD8⁺ T細胞TILと比較して、より小さな割合のCD4⁺ T細胞TILがRANKLを発現するが、抗PD-1は同様にRANKL発現を増加させた (図18C)。RANKL発現の主要な腫瘍内供給源のアップレギュレーションを介して、抗PD-1の投与はおそらくTMEをプライミングしてRANKL封鎖に応答し (図18A - C)、一方、抗CTLA4単一療法は、CD4⁺ またはCD8⁺ T細胞TILでRANKLレベルを有意には変化させなかった。抗PD-1単独 (または抗PD-1 + 抗CTLA4併用) はそれ自体RANKL発現を腫瘍浸潤T細胞によって増加させ、一方、RANKL増加は抗CTLA4単独後にTILで観察されないという観察は、抗RANKL + 抗PD-1/PD-L1併用を介して達成される抗腫瘍効能は、抗RANKL + 抗CTLA4併用と比較して別個のメカニズムを介して生じることを提唱する。この実験で抗CTLA4治療単独もまたRANKL発現レベルを変化させなかった理由は不明である。1つの説明は、RANKLは一般的に、T細胞活性化後初期に (特に免疫寛容環境下で) アップレギュレートされるという観察に基づく (Hochweller et al., 2005. Eur J Immunol 35:1086-96)。

【0228】

浸潤T細胞の表現型を調査すると、抗RANKLの抗PD-1療法への付加、対、抗RANKLの抗CTLA4療法への付加後に観察されるTMEの追加される別個の変化が観察された。以前の報告は、腫瘍浸潤PD-1^{hi} T細胞は抗PD-1療法に非感受性で疲弊表現型を提示することを示した。しかしながら、いくつかの免疫療法 (例えば抗CD40) は、PD-1^{hi} T細胞でのPD-1レベルを低下させそれらを再びPD-1封鎖に感受性にすることができる (Ng iow et al., 2015, Cancer Res 75:3800-11)。これと一致して、抗PD-1 + 抗RANKLの投与は、gp70特異性CD8⁺ T細胞TILで (非選別CD8⁺ T細胞TILでも同様に) PD-1発現を一層低下させた (図19A) (ただし、抗PD-1単一療法はcI g と比較してPD-1発現を有意に弱めた)。重要なことに、抗CTLA4 (単独または併用) の抗RANKLへの添加は、CD8⁺ T細胞TILのPD-1レベルを有意には変化させず、PD-1発現調整は、抗PD-1単一療法および抗RANKL + 抗PD-1併用療法で固有に観察され、抗CTLA4療法では観察されないことが示された。興味深いことに、gp70特異性CD8⁺ T細胞TILによるPD-1発現は、抗CTLA4を抗PD-1および抗RANKLにさらに添加してもさらに低下することはなかった

【0229】

加えて、腫瘍の非リンパ系CD45.2+構成要素におけるPD-L1 (PD-1のリガンド) の発現をCT26モデルで評価した (図19B)。ICBにとって二次的な適応免疫性耐性と歩調を合わせて、PD-L1を発現する細胞の割合は抗PD-1の一用量投与後にわずかに増加したが、前記は抗RANKLが抗PD-1とともに投与されたとき軽減された (図19B)。抗CTLA4の添加はPD-L1の発現に影響を与えなかった (図19A - B)。これらの結果は、抗RANKLは、非リンパ系TILにおける免疫抑制PD-L1の発現の調整を介して抗PD-1または抗PD-1 + 抗CTLA4療法を改善し、このメカニズムは抗RANKLと抗CTLA4との組み合わせとは別個であったことを暗示している。

総合すれば、これらのデータは、抗RANKLが抗PD-1/PD-L1有効性を増強するメカニズムは、抗RANKL封鎖による抗CTLA4有効性の増強とは別個であることを提唱する。第一に、これらのデータは、抗PD-1および抗CTLA4の抗腫瘍有効性はRANKL封鎖によってさらに改善され得ること、およびこの三重併用療法の抗腫瘍有効性はいずれの二重併用よりも優れていること示した。第二に、抗RANKLと異なる併用療法との固有メカニズムによる相互作用は、RANKL阻害時のTMEの変化によって説明できるかもしれない (前記メカニズムはある種の

10

20

30

40

50

併用療法と固有に交差調整するであろう)。抗CTLA4による治療はT細胞TILでのRANKLレベルを変化させなかった。したがって、通常、RANKLの低発現を示す腫瘍(例えばメラノーマ)では、交差調整仮説は、抗PD-1投与はTMEにおいてRANKLのアップレギュレーションをもたらし、したがってRANKシグナリングの増加を生じ、同時発生的かまたはその後続くRANKL封鎖への応答に対して腫瘍をブライミグし得ることを予測する。閾レベルを超えるT細胞TILによるPD-1発現は抗PD-1抗体に対する耐性をもたらし、このレベル以下に発現を低下させる手法(例えばまた別の免疫療法との併用)は治療利益をもたらすことが、以前に前臨床モデルで示された(Selby et al., 2013. Cancer Immunol Res 1:32-42; Ng iow et al., 2015(上掲書))。記載したこのCT26の分析では、二重抗RANKLおよび抗PD-1治療の治療感受性は、腫瘍ミクロ環境における有利な変化(T細胞によるPD-1発現の低下およびPD-L1発現の低下の両方を含む)と密接に関係していた。腫瘍ミクロ環境におけるこれらの変化は、抗CTLA4 mAb単独による治療時には観察されず、CTLA-4およびPD-1は、非オーバーラップ作用メカニズムを調節することを示唆し、同時発生的抗RANKLとの併用療法は、別個の阻害性経路および別個のメカニズムを介して生じることを提唱する。

10

【実施例 20】

【0230】

抗RANKL mAbの最適投与は免疫チェックポイント封鎖と同時発生的にまたは前記封鎖の後で実施される

二重免疫チェックポイント封鎖(ICB)療法(抗PD-1および抗CTLA4治療の併用)に対する抗RANKL抗体の最適な順序を評価した。結腸癌腫CT26の皮下増殖抑制で、同時発生的抗体療法(腫瘍接種後8、12、16、20日目に抗体治療)を逐次療法(8、12、または16、20日目に等しい抗体総用量)と比較した。有意に優れた増殖抑制が、二重ICB療法と同時発生的か、または前記療法の後で抗RANKL MAbを投与したときに達成された(図20)。同時発生的抗RANKL単一療法と比較して、二重ICB療法後の逐次抗RANKLは腫瘍増殖を有意に抑制した。しかしながら、この順序は同時発生的な二重ICB単独療法よりも有効性は低かった(図20)。

20

マウス3LL肺腺癌モデルで抗RANKLおよび抗PD-1併用の抗腫瘍効能もまた試験し、mAbの最適な順序を調べた。同時発生的なmAb療法の腫瘍増殖抑制活性を逐次療法として与えられるmAbの等しい総用量と比較した。前臨床データは、抗RANKLおよび抗PD-1 mAb併用は、療法が同時発生的に与えられるかまたは逐次的に与えられるかにかかわらず、単一療法またはコントロールIgと有効性において優れていた(図21)。抗RANKL治療前の逐次抗PD-1療法は、抗PD-1療法前の抗RANKL治療と比較して有意に大きな腫瘍体積減少をもたらした($p < 0.01$)(図21)。抗PD-1が後に続く逐次抗RANKLは有意に腫瘍増殖を抑制したが、しかしながらこの順序は抗RANKLおよび抗PD-1の同時発生的な治療よりも有効性は低かった。

30

総合すれば、これらのデータは、前臨床モデルで観察される抗腫瘍効能は、順序に関係なくRANKL封鎖および抗PD-1抗体の併用時に(各抗体単独と比較して)増強されることを示す。しかしながら、データは、二重ICB(抗PD-1および抗CTLA4)または抗PD-1単独が後に続く逐次抗RANKLは、同時発生的な治療よりも有効性が有意に低いことを確かに示した。したがって、これらのデータは、抗RANKL療法の実施は、抗PD-1/PD-L1または抗CTLA4(または両方)との併用治療と同時発生的か(またはその後で)生じるべきであることを提唱する。さらにまた、抗PD-1/PD-L1または抗CTLA4(または両方)との併用で、抗RANKLによる同時発生的な治療は、その後に関連する抗RANKLによる治療よりも優れた抗腫瘍応答を達成することを示すデータは、マルチ特異性(例えば二特異異性)抗体(前記は同時にRANKLおよびPD-1、PD-L1および/またはCTLA4を封鎖するであろう)の潜在的な活性を支持する。

40

【実施例 21】

【0231】

マルチ特異性アンタゴニストを用いてRANKLおよびPD-1を共同標的とする合理的根拠としてのRANKLおよびPD-1の細胞上での共同発現

50

2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体の場合、同じ細胞タイプ上での複数の標的抗原の共働発現は、機能が標的細胞そのものとなるために有利であろう。単一細胞タイプ上の複数の標的抗原の共同発現もまた、腫瘍ミクロ環境内の二重特異性様式のより細胞特異的または組織特異的作用、および腫瘍内のより強い細胞選択性によるより低い周辺毒性を危険なものとして排斥し得る。また別に或いは付け加えて、2つの別個の細胞でトランス態様で発現される2つの免疫抑制経路を封鎖する二重特異性抗体もまた有益である。なぜなら、2つの別個の免疫抑制メカニズムを同時に阻害できるからである。

したがって、TMEにおけるRANKおよびPD-1のマルチ特異性標的誘導のための理論的根拠として、腫瘍浸潤免疫細胞上でのこれらの因子の共同発現は斟酌されるべきである。CT26腫瘍モデルにおける抗PD-1併用抗RANKLの抗腫瘍有効性およびメカニズムに関するデータは既に述べ、上記に記載したように、T細胞TIL上でのRANKLおよびPD-1の共同発現はこのモデルで特徴づけた。例えば、マウスのCT26腫瘍から単離したT細胞では、ほとんど全てのCD8⁺RANKL⁺ T細胞TIL (>90%) がPD-1を共同発現し、比較して、CD8⁺RANKL⁻ T細胞TILの40%未満がPD-1陽性であった(図16)。さらにまた、PD-1のMFIは、CD8⁺RANKL⁻ T細胞と比較してCD8⁺RANKL⁺で3倍高く、前者をPD1^{hi}細胞として識別した(図16)。一例として、腫瘍浸潤CD8⁺RANKL⁺ T細胞の98.5%がPD-1を発現し、一方、CD8⁺RANKL⁻ T細胞の44%がPD-1を発現し(図22)、TILにおける非常に高レベルのRANKL/PD-1共同発現を提示した。

【実施例 2 2】

【0 2 3 2】

四価抗RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物(デノスマブ+ニボルマブ)の設計

RANKLおよび少なくとも1つのICMと拮抗するマルチ特異性抗体の一例は、2つの抗体(その1つはRANKLと結合し(mAb A)、その1つはPD-1と結合する(mAb B))から構築されるマルチ特異性FIT-Ig抗体として構築することができる。例示すれば、第一の抗原結合分子はヒトRANKLの領域と特異的に結合でき、第二の抗原結合分子はヒトPD-1の領域に(好ましくはヒトPD-1の細胞外ドメインの領域に)特異的に結合できる。本発明で使用される適切な1つのそのような抗RANKL mAbはデノスマブである。したがって、いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、完全にヒトのIgG2 mAbデノスマブ、またはその抗原結合フラグメントを含む。同じ実施態様のいくつかおよび他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、本明細書の表1に示すCDR配列を含む。マルチ特異性FIT-Ig抗体の具体的な例では、第二の抗原結合分子は、ニボルマブ、ペムブロリズマブおよびピジリズマブから選択されるmAbの任意の1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含むことができる。本発明で使用される適切な1つの抗PD-1 mAbはニボルマブである。

RANKLおよびPD-1の両方と結合しそれらと拮抗する三価マルチ特異性FIT-Ig分子を構築するために、デノスマブの軽鎖(VL-CL)ドメインをニボルマブの重鎖(V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3})とそのNH₂-末端でタンデムに直接融合させる。第二の構築物はデノスマブのV_H-C_{H1}であり、第三の構築物はニボルマブのV_L-C_Lである。抗RANKL/PD-1 FIT-Ig分子の模式図は図23Aに示され、抗RANKL/PD-1 FIT-IgのDNA構築設計は図23Bに示される。3つのDNA構築物の全てを哺乳動物発現ベクターでサブクローニングし、タンパク質の産生は、3つのDNA構築物の全ての哺乳動物発現ベクターへ(HEK-293)の一過性トランスフェクション時に達成することができる。RANKL/PD-1 FIT-Ig分子の精製はタンパク質A精製によって達成することができる。

【0 2 3 3】

RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#1: VL(デノスマブ)-CL(デノスマブ)-V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}(ニボルマブ)のアミノ酸配列(655aa):

【0 2 3 4】

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQYGGSSPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfyprea
 kvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslssltliskadyekhkvyacevthqglspsvtksfnrgec**QVQLVESGGGVVQPG**
RSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFL
QMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK

10

【0235】

(配列番号276)

ここで、抗RANKL抗体(デノスマブ)軽鎖(US 7,364,736 B2)可変領域(V_L)の成熟アミノ酸は列は大文字で示され、定常領域(C_L)は小文字で示され、抗PD-1抗体(ニボルマブ、WO2006/121 168)重鎖(V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3})は太字の大文字で示される。

RANKL/PD-1 FIT-I g 構築物#2: V_H - C_{H1} (デノスマブ)のアミノ酸配列(218aa):

EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
 LQMNSLRAEOTAVYYCAKDPGTTVIMSWFOPWGQGTLLTVSSastk g psvfplapcsrstsestaal g clvkdyfpep
 vtvswns g alts g vhtfpavllqss g lyslssvvtvpssnf g tqtytcnv dhkpsntkvdktv (配列番号:277)

20

ここで、抗RANKL抗体(デノスマブ)重鎖(US 7,364,736 B2)可変領域(V_H)の成熟アミノ酸配列は大文字で示され、定常領域(C_H1)は小文字で示される。

RANKL/PD-1 FIT-I g 構築物#3: V_L - C_L (ニボルマブ)のアミノ酸配列(214aa):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVaapsvfifppsdeqlks g tasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsg n
 sqesvteqdsksdstyslssltliskadyekhkvyacevthq g lsspsvtksfnr g ec (配列番号:278)、

ここで、抗PD-1抗体軽鎖(ニボルマブ、WO2006/121 168)可変領域(V_L)の成熟アミノ酸配列は大文字で示され、定常領域(C_L)は小文字で示される。

30

【実施例23】

【0236】

四価抗RANKL/CTLA4 FIT-I g 構築物(デノスマブ+イピリムマブ)の設計

RANKLおよび少なくとも1つのICMと拮抗するマルチ特異性抗体の1つの例は、2つの抗体(その1つはRANKLと結合し(mAb A)、その1つはCTLA4と結合する(mAb B))から構築されるマルチ特異性FIT-I g 抗体として構築することができる。例示すれば、第一の抗原結合分子はヒトRANKLの領域と特異的に結合でき、第二の抗原結合分子はヒトCTLA4の領域に(好ましくはヒトCTLA4の細胞外ドメインの領域に)特異的に結合できる。本発明で使用する適切な1つのそのような抗RANKL mAbはデノスマブである。したがって、いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、完全にヒトのIgG2 mAbデノスマブ、またはその抗原結合フラグメントを含む。同じ実施態様のいくつかおよび他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、本明細書の表1に示すCDR配列を含む。マルチ特異性FIT-I g 抗体の具体的な例では、第二の抗原結合分子は、イピリムマブおよびトレメリムマブから選択されるmAbの任意の1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメントを含む。本発明で使用する適切な1つのそのような抗CTLA4 mAbはイピリムマブである。

40

RANKLおよびCTLA4の両方と結合しそれらと拮抗する三価マルチ特異性FIT-I g 分子を構築するために、デノスマブの軽鎖(V_L - C_L)ドメインをイピリムマブの重鎖(V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3})とその NH_2 -末端でタンデムに直接融合させる。第二の構築物はデノスマブの V_H - C_{H1} であり、第三の構築物はイピリムマブの V_L - C_L である。抗RANKL/CTLA4 FIT-I g 分子の模式

50

図は図24Aに示され、抗RANKL/CTLA4 FIT-I g のDNA構築設計は図24Bに示される。3つのDNA構築物の全てを哺乳動物発現ベクターでサブクローニングし、タンパク質の産生は、3つのDNA構築物の全ての哺乳動物発現ベクターへ（HEK-293）の一過性トランスフェクション時に達成することができる。RANKL/CTLA4 FIT-I g 分子の精製はタンパク質A精製によって達成することができる。

RANKL/CTLA4 FIT-I g 構築物#1: VL (デノスマブ) -C_L (デノスマブ) -V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} (イピリムマブ) のアミノ酸配列 (663aa) :

【 0 2 3 7 】

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFCQQYQSSPRTFGQGTKEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvccllnnfyprea
kvqkwkdnaqlsgnsqesvteqdsdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec**QVQLVESGGGVVQPG**
RSLRLSCAASGFTTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL
QMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

【 0 2 3 8 】

(配列番号 2 7 9)

ここで、抗RANKL抗体（デノスマブ）軽鎖（US 7,364,736 B2）可変領域（V_L）の成熟アミノ酸は列は大文字で示され、定常領域（C_L）は小文字で示され、抗CTLA4抗体（イピリムマブ、US20150283234）重鎖（V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}）は太字の大文字で示される。

RANKL/CTLA4 FIT-I g 構築物#2: V_H-C_{H1} (デノスマブ) のアミノ酸配列 (214aa) :

本配列は、上記のRANKL/PD-1 FIT-I g 構築物 #2のために用いられたV_H-C_{H1}デノスマブ構築物（配列番号:277）と同じものである。

RANKL/CTLA4 FIT-I g 構築物#3: V_L-C_L (イピリムマブ) のアミノ酸配列 (215aa) :

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYQSSPWTFGQGTKEIKRTvaapsvfifppsdeqlks g tasvvccllnnfypreakvqkwkdnaqls g
nsqesvteqdsdstyslsstltlskadyekhkvyacevthq g lsspvtksfnr g ec (配列番号:280)、
ここで、抗CTLA4抗体軽鎖（イピリムマブ、US20150283234）可変領域（V_L）の成熟アミノ酸配列は大文字で示され、定常領域（C_L）は小文字で示される。

30

【実施例 2 4】

【 0 2 3 9 】

四価抗RANKL/PD-L1 FIT-I g 構築物 (デノスマブ + アテゾリズマブ) の設計

RANKLおよび少なくとも1つのICMと拮抗するマルチ特異性抗体の1つの例は、2つの抗体（その1つはRANKLと結合し（mAb A）、その1つはPD-L1と結合する（mAb B））から構築されるマルチ特異性FIT-I g 抗体として構築することができる。例示すれば、第一の抗原結合分子はヒトRANKLの領域と特異的に結合でき、第二の抗原結合分子はヒトPD-L1の領域に（好ましくはヒトPD-L1の細胞外ドメインの領域に）特異的に結合できる。本発明で使用する適切な1つのそのような抗RANKL mAbはデノスマブである。したがって、いくつかの実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、完全にヒトのIgG2 mAbデノスマブ、またはその抗原結合フラグメントを含む。同じ実施態様のいくつかおよび他の実施態様では、抗RANKL抗原結合分子は、本明細書の表1に示すCDR配列を含む。マルチ特異性FIT-I g 抗体の具体的な例では、第二の抗原結合分子は、デュルバルマブ（MED14736）、アテゾリズマブ（Tecentriq）、アベルマブ、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480およびMPDL3280Aから選択されるmAbの任意の1つの少なくとも1つの抗原結合フラグメ

40

50

ント、またはその抗原結合フラグメントを含む。本発明で使用される適切な1つのそのような抗PD-L1 mAbはアテゾリズマブである。

RANKLおよびPD-L1の両方と結合しそれらと拮抗する三価マルチ特異性FIT-Ig分子を構築するために、デノスマブの軽鎖 (V_L - C_L) ドメインをアテゾリズの重鎖 (V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}) とそのNH₂-末端でタンデムに直接融合させる。第二の構築物はデノスマブの V_H - C_{H1} であり、第三の構築物はアテゾリズの V_L - C_L である。抗RANKL/PD-L1 FIT-Ig分子の模式図は図25Aに示され、抗RANKL/PD-L1 FIT-Ig分子のDNA構築設計は図25Bに示される。3つのDNA構築物の全てを哺乳動物発現ベクターでサブクローニングし、タンパク質の産生は、3つのDNA構築物の全ての哺乳動物発現ベクターへのHEK-293での一過性トランスフェクション時に達成することができる。RANKL/PD-L1 FIT-Ig分子の精製はタンパク質A精製によって達成することができる。

10

RANKL/PD-L1 FIT-Ig 構築物#1: V_L (デノスマブ) - C_L (デノスマブ) - V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} (アテゾリズマブ) のアミノ酸配列 (663aa) :

【0240】

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCCQQYGSSPRTFGQGTKEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfyprea
kvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltiskadyekhkvyacevthqglsspvtksfngrec**EVQLVESGGGLVQPGG**
SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, -

20

【0241】

(配列番号281)

ここで、抗RANKL抗体 (デノスマブ) 軽鎖 (US 7,364,736 B2) 可変領域 (V_L) の成熟アミノ酸は列は大文字で示され、定常領域 (C_L) は小文字で示され、抗PD-L1抗体 (アテゾリズマブ、米国特許8,217,148号) 重鎖 (V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}) は太字の大文字で示される。

30

RANKL/PD-L1 FIT-Ig 構築物#2: V_H - C_{H1} (デノスマブ) のアミノ酸配列:

本配列は、上記のRANKL/PD-1 FIT-Ig 構築物 #2のために用いられる V_H - C_{H1} デノスマブ構築物 (配列番号:277) と同じものである。

RANKL/PD-L1 FIT-Ig 構築物#3: V_L - C_L (アテゾリズマブ) のアミノ酸配列 (214aa) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
EDFATYYCCQQLYHPATFGQGTKEIKRTVAAPsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltiskadyekhkvyacevthqglsspvtksfngrec (配列番号:282)、

ここで、抗PD-L1抗体 (アテゾリズマブ、米国特許8,217,148号) 軽鎖可変領域 (V_L) の成熟アミノ酸配列は大文字で示され、定常領域 (C_L) は小文字で示される。

40

【実施例25】

【0242】

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (IK22-5/RMP1-14) の構築

マウスRANKLおよびマウスPD-1の両方に結合するヘテロダイマー (二重特異性) 抗体を、Fabコード配列をヒトIgG1骨格に融合させることによって作製した。ヘテロダイマー二重特異性IgG抗体の組立ては、IgG重鎖へ相補性KIH変異をまず初めに導入することによって達成された。所望の軽鎖/重鎖対の結合は、“CrossMab”アプローチ (例えば以下を参照されたい: Schaefer et al., 2011. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 11187-11192) によって促進された (前記アプローチでは、二重特異性抗体の1つのFab (Fab領域) の改

50

変は、軽鎖と重鎖間の定常領域または定常および可変領域の“交換”である)。D265A変異もまたヒトIgG1 Fcドメインに導入し、Fc受容体との結合を低下させさらにエフェクター機能を低下させた。これらの技術を用いて、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体(RMP1-14 C_H-C_L X IK22/5 WT二重特異性とも呼ばれる)を構築し、標準的技術によって生成および精製した。さらにまた、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は両方の標的と結合でき、in vitroおよびin vivoでRANKLおよびPD-1に対してアンタゴニスト活性を有する。

mAb cDNA配列は、抗RANKL IK22-5 (Kamijo et al., 2006. Biochem Biophys Res Commun. 347 (1):124-32) および抗PD-1 RMP1-14 (Curran et al., 2010. Proc Natl Acad Sci U S A 107 (9):4275-80) をコードするラットハイブリドーマから得られた。全RNAは、市販試薬 (TRIzol (商標) 試薬 (Ambion, Cat. No.: 15596-026)) の技術マニュアルにしたがって当該ハイブリドーマ細胞から単離した。続いて、全RNAをcDNAに逆転写した。アイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを市販のcDNA合成キット (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Cat. No. 6110A)) の技術マニュアルにしたがって用いた。VHおよびVLの抗体フラグメントを、cDNA末端迅速増幅 (RACE) の標準的操作手順にしたがって標準的技術により増幅した。増幅抗体フラグメントを別々に標準的クローニングベクターでクローニングし、さらにDNA配列決定を実施した。抗RANKL mAb IK22-5並びに抗PD-1 mAb RMP1-14の可変ドメインおよびリーダー配列のアミノ酸配列が提供される(下記参照)。免疫グロブリン可変領域の配列分析並びにフレームワーク (FR) およびCDRの決定は、NCBIヌクレオチドBLAST、IMGT/V QuestプログラムおよびNCBI Ig BLASTアルゴリズムを用いて達成された。

【0243】

ラットモノクローナル抗体の抗RANKL mAb IK22-5の可変ドメインのアミノ酸配列：
重鎖IK22-5：アミノ酸配列 (135aa)

【0244】

リーダー配列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

【0245】

MDVLVLWLCLLTFSSCVLSQVQLKESGPGVLVSSATLSLTCTVSGFSLTNYDVSWIR
HLPKGKLEWMGGVWLSGNTEYNSDFKSRLSISRDISKSQVFLKMSNLKIEDTGTYYCARDIGTTSDYW
GQGVTVTVSS (配列番号:283)

【0246】

軽鎖IK22-5：アミノ酸配列 (126aa)

【0247】

リーダー配列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

【0248】

MMAVQQLGLLLLWLPALRCDIQVTQSPSFLSASVGDRVTFNCKTSONINKYLAWYQ
AKFGEGPKLLIFNADSLQSGIPPRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYFCLOQNSWPTFGSGTKLEIK
(配列番号:284)

【0249】

ラットモノクローナル抗体の抗PD-1 mAb RMP1-14の可変ドメインのアミノ酸配列：
重鎖RMP1-14：アミノ酸配列 (138aa)

【0250】

リーダー配列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

【0251】

10

20

30

40

50

MRMLVLLYLLTALPGILSEVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRK
 FPGNRLEWMGYINSAGISNYNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEAATYYCARSDNMGTTPFTY
 WGQGT LVT VSS (配列番号:285)

【 0 2 5 2 】

軽鎖RMP1-14：アミノ酸配列（131aa）

【 0 2 5 3 】

リーダー配列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

10

【 0 2 5 4 】

MRCSLQFLGLLVLWIPGLNGDIVMTQGTLNPNVPVSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLN
 WYLQRPQGSPQLLIYWWMSTRASGVSDRFGSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQOQLEFPTFGGGTK
 LELK (配列番号:286)

【 実施例 2 6 】

【 0 2 5 5 】

20

RANKLおよびPD-1と結合する能力を有するマルチ特異性抗原結合分子（二重特異性抗RANKL/PD-1抗体、RMP1-14 C_H-C_L X IK22/5 WT二重特異性とも呼ばれる）を作製するために、“CrossMab”技術を利用した。前記では、二重特異性抗体の1つのFab（Fab領域）を改変して軽鎖および重鎖の間で定常領域または定常領域および可変領域を“交換”することによって、所望の軽鎖/重鎖対を誘発することができる。第二に、重鎖のヘテロダイマーの特異的な対を生じるために、2つの重鎖のFcドメインの“ノブインホール”（knobs-in-holes）（KiH）変異を利用した。ラットモノクローナル抗体可変領域（IK22-5およびRMP1-14由来）をコードするDNAを、ヒトIgG1 Fcドメインとの融合物として合成した。“不適切な”軽/重鎖の結合を防ぐこの技術は、“CrossMab”技術と称され、KiH技術と併用されるとき、所望の二重特異性分子の目覚ましく増強された発現をもたらす（例えば以下を参照されたい：Schaefer et al., 2011. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 11187-11192）。

30

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体のCrossMab型を作製するために、RMP1-14（抗PD-1抗体）配列を操作し、C_{H1}およびC_L配列が交換された“CrossMabC_{H1}-C_L”とした（RMP1-14 C_H-C_L-hul g G1Fcと称される）。抗RANKL抗体（IK22-5）のFab領域は無変化であった（IK22-5-hul g G1Fc WTと称される）。ポリペプチド鎖のヘテロダイマー化は、大きなアミノ酸（ノブ）を所望のヘテロダイマーの一方の鎖に導入し、小さなアミノ酸（ホール）を所望のヘテロダイマーの他方の鎖に導入することによって促進された（“ノブインホール”（KiH）構造と呼ばれる）（例えば以下を参照されたい：Ridgeway et al., Protein Eng. 9 (1996), 617-621; およびAtwell et al., J. Mol. Biol. 270 (1997), 677-681）。具体的には、“ノブ”変異（T366W）がIK22-5-hul g G1Fc WTのC_{H3}ドメインに導入され、3つのホール変異（T366S、L368A、およびY407V）がRMP1-14 C_H-C_L-hul g G1Fcの重鎖に導入された。加えて、2つのCys残基が導入され（S354Cが“ノブ”（knob）側に、Y349Cが“ホール”（hole）側に）、安定的なジスルフィド結合を形成し、さらにヘテロダイマー化を増強した。さらにまた、D265A変異もまた、IK22-5-hul g G1Fc WTおよびRMP1-14 C_H-C_L-hul g G1Fcの両方のヒトIgG1 Fcドメインに導入された。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の模式図は図26に示される。

40

【 0 2 5 6 】

二重特異性CrossMab抗RANKL/PD-1抗体の4つの抗体鎖のアミノ酸配列

IK22-5-hul g G1Fc WT重鎖（465aa）：

【 0 2 5 7 】

50

リーダー配列 - **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} (Heavy 1)

【 0 2 5 8 】

MGWSCIIILFLVATATGVH**SQVQLKESG**PGLVLSSATLSLTCTVSGFSLTNYDV**SWIR**
HLPGK**GLEWM**GGVWLSGNT**EYNSDFKSRLSISRDISKSQVFLKMSNLKIEDTGTY**YCARDIGTTSDYW
GQGVTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVWVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPPCRDELTKNQVSL**WCL**VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFL**Y**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:287)

10

【 0 2 5 9 】

IK22-5-hul g G1Fc WT軽鎖 (232aa) :

【 0 2 6 0 】

リーダー配列 - **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**-C_L

20

【 0 2 6 1 】

MGWSCIIILFLVATATGVHSD**IQVTQSPSFLSASVGDRVTFNCKTSONINKYLAWYQA**
KFGEGPKLLIF**NADSLQSGIPPRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYFCLO**YNSWPT**FGSGTKLEIK**RTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:288)

【 0 2 6 2 】

RMP1-14 C_H-C_L-hul g G1Fc重鎖 (473aa) :

【 0 2 6 3 】

30

リーダー配列 - **FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**-C_L-C_{H2}-C_{H3}

【 0 2 6 4 】

MGWSCIIILFLVATATGVHSEV**QLQESG**PGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRW**NWI**
RKFPGNRLEWMGY**INSAGISNYNPSLKR**RISITRDT**SKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDNMGTTPFT**
YWGQGT**LVTVSS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVWVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**CT**LPPSRDELTKNQVSL**SCA**VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:289)

40

【 0 2 6 5 】

RMP1-14 C_H-C_L-hul g G1Fc軽鎖 (233aa) :

【 0 2 6 6 】

リーダー配列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-CH1

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQGSPQLL
 IYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIIYQCQGLEFPTFGGGTKLELKASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号:290)

【0267】

組換え二重特異性抗体を作製するために、4つの鎖の各々をコードするcDNAを哺乳動物細胞ベクターpcDNA3.4でサブクローニングし、トランスフェクション等級プラスミドを標準的技術を用いて大規模調製した。二重特異性抗体は、4つの発現プラスミド (RMP1-14 C_H-C_L-hul g G1FcおよびIK22-5-hul g G1Fc WTの重鎖および軽鎖をコードする) を等しい比率で用い、無血清ExpiCHO発現培地 (Thermo Fisher Scientific) で増殖させた懸濁ExpiCHO-S細胞での一過性発現によって生成された。細胞 (1Lの培養体積) をエーレンマイヤーフラスコ (Corning Inc.) で37°C、8%CO₂でオービタルシェーカーで維持し、トランスフェクションから14日目に収集した細胞培養上清を精製に用いた。抗体力価は、通常のIgG1抗体の一過性発現力価の範囲内であった。細胞培養ブラスを遠心分離し、続いてろ過した。モノフィニティA樹脂 (Monofinity A Resin) 事前充填カラム1mL (GenScript, Cat.No.L00433-11) にろ過上清を1.0mL/分でローディングした。洗浄し適切な緩衝液で溶出させた後、抗体の溶出分画をプールし、緩衝液をPBS (pH7.2) に交換した。タンパク質を0.22 μmフィルターで滅菌し、無菌的に梱包し-80°Cで保存した。

分子量、収量および純度の決定のために、続いて精製タンパク質を標準的プロトコルを用いSDS-PAGE、ウェスタンブロットおよびHPLCによって分析した。非還元状態のSDS-PAGEおよびウェスタンブロットに基づいて、~80kDa、~100kDa、および150kDa (計算M.W.は145kDa) の概算分子量の標的タンパク質が検出された (図27に示される)。提示したSDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析から、~55kDaおよび~25kDaの概算分子量を有する抗体重鎖および軽鎖が検出された。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の純度は85.86% (SEC-HPLCで概算) であり、濃度は3.69mg/mLであった (A280で測定 (透過係数: 1,494))。

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は、懸濁ExpiCHO-S細胞培養での発現後に、追加のin vitro実証およびin vivo試験のための標準的タンパク質A親和性クロマトグラフィーにより高純度で得られた。

【実施例27】

【0268】

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体のin vitro特徴付け

HEK-293上のmuRANKLと結合する二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (IK22-5/RMP1-14)

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体が細胞上で発現されるRANKLと結合する能力を特徴付けるために、フローサイトメトリー分析を実施した。muRANKLをコードするcDNAで一過性にトランスフェクトされたHEK-293細胞で測定したシグナル強度を、トランスフェクトされなかったHEK-293細胞で得られたシグナル強度と比較することによって、相互作用の特異性を決定した。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は非トランスフェクトHEK-293細胞を認識できなかったが、muRANKL発現細胞には結合した (図28)。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体とmuRANKLとの結合は、陽性コントロール、muRANKL-Fcで観察されたものと非常に類似していた (図28)。したがって、RANKL/PD-1抗体は、細胞表面で発現されたmuRANKLの細胞外ドメインを高親和性で認識した。

【実施例28】

【0269】

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体 (IK22-5/RMP1-14) のRANK-Fc結合との競合

リガンド結合を封鎖する二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の能力を、組換えmuRANKL-Fc (RANKLの高親和性受容体) との競合アッセイで試験した。HEK-293細胞をmuRANKLで一過性に

トランスフェクトし、アイソタイプコントロール抗体（ラットIgG2aおよびhuman IgG1）、陽性コントロール抗muRANKL抗体（IK22-5ラットIgG2a）および二重特異性抗RANKL/PD-1の存在下でRANK-Fcの結合を試験した。抗RANKL/PD-1二重特異性抗体は、RANK-FcのmuRANKL結合を、陽性コントロール抗RANKL抗体IK22-5と同様に完全に封鎖することができた（図29）。抗RANKL/PD-1二重特異性抗体はアンタゴニスト活性を示し、抗RANKL mAb IK22-5で観察されたIC₅₀（1.1 μg/mL）に対して2.6 μg/mLのIC₅₀でRANK-FcのmuRANKL結合を封鎖した。ラットIgG2aもヒトIgG1アイソタイプコントロールもRANK-FcのRANKL結合を封鎖しなかった。

【実施例29】

【0270】

10

二重特異性抗RANKL/PD-1（IK22-5/RMP1-14）のHEK-293細胞異所性発現PD-1との結合

細胞上で発現されるPD-1と結合する二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の能力を特徴付けるために、フローサイトメトリー分析を実施した。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は、muPD-1トランスフェクトHEK-293細胞と特異的に結合したが、非トランスフェクトHEK-293細胞とは結合しなかった（図30）。したがって、RANKL/PD-1抗体は、細胞表面で発現されるmuPD-1の細胞外ドメインを高い親和性で特異的に認識した。

【実施例30】

【0271】

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体（IK22-5/RMP1-14）のPD-L1-Fc結合との競合

リガンド結合を封鎖する二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の能力を、組換えmuPD-L1-Fc（PD-1の高親和性リガンド）との競合アッセイで試験した。HEK-293細胞をmuPD-1で一過性にトランスフェクトし、アイソタイプコントロール抗体（ラットIgG2aおよびhuman IgG1）、陽性コントロール抗muPD-1抗体（RMP1-14ラットIgG2a）および二重特異性抗RANKL/PD-1の存在下でPD-L1-Fcの結合を試験した。抗RANKL/PD-1二重特異性抗体は、PD-L1-FcのmuPD-1結合を陽性コントロール抗PD-1抗体RMP1-14と同様に封鎖することができた（図31）。抗RANKL/PD-1二重特異性抗体は、コントロール抗PD-1 mAb RMP1-14で観察されたものと比較してPD-L1-FcのPD-1結合の封鎖でアンタゴニスト活性を示した。ラットIgG2aもヒトIgG1アイソタイプコントロールもPD-L1-FcのPD-1結合を封鎖しなかった。

【実施例31】

【0272】

30

細胞ベース機能アッセイにおける抗RANKL/PD-1二重特異性抗体のアンタゴニスト活性

細胞ベース機能アッセイにおける二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の機能阻害効果を評価するために、in vitro破骨細胞形成におけるこの抗体の効果を試験した。in vitro TRAP⁺破骨細胞アッセイの方法は本質的に文献に記載された通りであった（Simonet et al., 1997, Cell 89（2）：309-19）。正常BL/6マウスの骨髄（BM）細胞を96ウェル平底プレートに25000細胞/ウェルの密度で、ヒト組換えCSF-1（Preprotech）（50ng/mL）補充完全DMEM（10%FCS+PS+Glu）（総体積200 μL/ウェル）に播種した。48時間培養後、培地をヒト組換えCSF-1（50ng/mL）および可溶性muRANKL（Miltenyi）（200ng/mL）を補充した完全DMEMに置き換えた。細胞をCSF-1およびRANKLとともに（抗体阻害剤存在下および非存在下で）4日間培養し、続いて、TRAP⁺の多核（3核を超える）破骨細胞をカウントした。破骨細胞形成は、以前に記載された（Simonet et al., 1997（上掲書））TRAP細胞化学染色によって評価した。陽性コントロール抗体IK22-5の効果と同様に、抗RANKL/PD-1二重特異性抗体の添加は用量依存態様でTRAP⁺多核細胞の形成を阻害したが、コントロールヒトIgGの添加は阻害しなかった（図32）。100ng/mLの濃度では、抗RANKL mAb IK22-5および二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の両方が、破骨細胞形成を完全に封鎖した。これらの結果は、抗RANKL/PD-1二重特異性抗体は、RANKLおよびin vitro破骨細胞分化に対するアンタゴニスト活性を維持することを示した。

【実施例32】

【0273】

40

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の腫瘍モデルでのin vitro試験

50

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は実験的肺転移の抑制において抗RANKLまたは抗PD-1単一療法よりも優れている

転移を制御する二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の効果を試験するために、実験的B16F10メラノーマ肺転移を有する野生型 (WT) マウスを用いた。マウスを-1、0および2日目に (腫瘍接種に対応) 以下で処置した: clg (200 μ g i.p., 組換えMac4-ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL (100 μ g i.p., 組換えIK22.5-ヒトIgG1 D265A)、抗PD-1 (100 μ g i.p., 組換えRMP1-14-ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL + 抗PD-1 (各々100 μ g i.p.)、および表示の用量力価の抗RANKL/PD-1二重特異性抗体 (50から200 μ g i.p., ヒトIgG1 D265A)。抗RANKLまたは抗PD-1単独は、コントロール免疫グロブリン (clg) 処置グループと比較して控えめな有効性を示し、一方、2抗体 (抗RANKLおよび抗PD-1) による併用治療または二重特異性抗RANKL/PD-1抗体による治療は転移制御を有意に改善した (図33)。 10

二重特異性抗体による治療は、どちらかの抗体単独または抗PD-1抗体および抗RANKL抗体の併用よりも強いin vivo肺転移阻害効果を有すると期待される。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は肺転移量で用量依存減少を示し、100および200 μ g用量グループは、抗PD-1単独と比較して優れた肺転移減少をもたらした (それぞれ $^*p < 0.05$ 、 $^{***}p < 0.001$)。抗PD-1抗体および抗RANKL抗体の併用治療と比較して (各抗体は100 μ gで投与され、すなわち合計抗体は200 μ g)、等しい抗体用量 (200 μ gの二重特異性抗RANKL/PD-1) での二重特異性抗RANKL/PD-1抗体による治療は、転移制御で少なくとも等しい改善を達成した (図33)。

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の同様な効果が、実験的PM1前立腺癌肺転移を有するWTマウスで観察された (図34)。-1、0および2日目に (腫瘍接種に対応) に、clg (200 μ g i.p., ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL (100 μ g i.p., IK22.5ヒトIgG1 D265A)、抗PD-1 (100 μ g i.p., ヒトIgG1 D265A)、抗RANKL + 抗PD-1 (それぞれ100 μ g i.p.)、表示したとおりの抗RANKL-PD-1二重特異性抗体 (100または200 μ g i.p., ヒトIgG1 D265A) でマウスを処置した。抗RANKLまたは抗PD-1単独は、コントロール免疫グロブリン (clg) 処置グループと比較して控えめな有効性を示し、一方、2抗体 (抗RANKLおよび抗PD-1) による併用治療または二重特異性抗RANKL/PD-1抗体による治療は転移制御を有意に改善した (図34)。 20

二重特異性抗体による治療は、どちらかの抗体単独または抗PD-1抗体および抗RANKL抗体併用よりも強いin vivo肺転移阻害効果を有すると期待される。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は肺転移量で用量依存減少を示し、200 μ g用量グループは、抗PD-1単独と比較して優れた肺転移減少をもたらした ($^{*****}p < 0.0001$)。抗PD-1抗体および抗RANKL抗体の併用治療と比較して (各抗体は100 μ gで投与され、すなわち合計抗体は200 μ g)、等しい全体的抗体用量 (200 μ gの二重特異性抗RANKL/PD-1) での二重特異性抗RANKL/PD-1抗体による治療は、転移制御で等価の改善を達成した (図34)。これらの結果は、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体は、等しい用量で治療された抗PD-1および抗RANKL mAb併用グループと比較して等価の転移制御を達成することを提示し、二重特異性抗RANKL/PD-1は優れた有効性を有することを示す。 30

【実施例 3 3】

【0 2 7 4】

二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は肺癌細胞株3LLの皮下腫瘍増殖を抑制する

皮下腫瘍の増殖における抗RANKL/PD-1二重特異性抗体の活性を試験するために、マウス3LL肺腺癌腫モデルを利用した。マウスを8、12、16および20日目に (腫瘍接種に対応) 以下で処置した: clg (400 μ g i.p., ラットIgG2a)、抗RANKL (100 μ g i.p., IK22-5ラットIgG2a)、抗PD-1 (100 μ g i.p., RMP1-14ラットIgG2a)、抗RANKL + 抗PD-1 (100 μ g i.p., それぞれIK22-5およびRMP1-14)、および表示の用量力価の抗RANKL/PD-1二重特異性 (100から400 μ g i.p., ヒトIgG1 D265A)。抗RANKL mAb IK22-5単独の治療は3LL皮下腫瘍増殖に全く効果はなく、一方、抗PD-1単独は、コントロール免疫グロブリン (clg) 処置グループと比較して控えめな有効性を提示した。二重特異性抗RANKL/PD-1抗 50

体の全ての用量が、clgまたはコントロール抗RANKL処置単独と比較して、3LLの皮下腫瘍増殖を軽減する活性を明確に有した。抗RANKL/PD-1抗体の200 μ g用量の抗腫瘍効果は、2抗体（抗RANKLおよび抗PD-1、各々100 μ g）による併用治療の等価の総用量（200 μ g）で観察されたものと同様であった。これらのデータは、皮下腫瘍モデルにおける二重特異性抗RANKL/PD-1抗体のin vivo有効性を確認した。

【実施例 3 4】

【0 2 7 5】

二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は結腸癌細胞株CT26の皮下腫瘍増殖を抑制する

二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の有効性を、皮下CT26結腸腫瘍を有するマウスで抗RANKLおよび抗PD-1抗体による併用治療と比較した（図36）。CT26腫瘍を有するマウスでは、抗RANKLまたは抗PD-1（100 μ g）のどちらも単一療法として最小限の効果を有したが、併用療法（抗RANKLプラス抗PD-1、各々100 μ g）が用いられたとき、樹立腫瘍の増殖抑制が観察された（図2A）。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の100 μ gおよび200 μ g用量は、clg、抗PD-1治療単独、またはコントロール抗RANKL治療単独と比較して、CT26の皮下腫瘍増殖を明確に軽減した。抗PD-1単一療法に対する応答の欠如は、この腫瘍がこの免疫療法および単一薬剤による治療に対していくらかの耐性を提示することを示し、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体はこの耐性を克服する。二重特異性抗体による治療はCT26腫瘍制御でin vivo阻害効果を有することが期待され、前記阻害効果は、単独抗体または抗PD-1抗体および抗RANKL抗体の併用よりも強い。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の200 μ g用量の抗腫瘍効果は、2抗体（抗RANKLおよび抗PD-1、各々100 μ g）による併用治療の等価の総用量（200 μ g）で観察されたものと同様であった（図36）。これらのデータは、皮下腫瘍モデルにおける二重特異性抗RANKL/PD-1抗体のin vivo有効性を確認した。

【実施例 3 5】

【0 2 7 6】

二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化はCT26腫瘍モデルにおける抗CTLA4治療の抗腫瘍有効性を増強する

本明細書に提示した結果は、抗PD-1/PD-L1および抗CTLA4療法の併用、抗PD-1/PD-L1単一療法、または抗CTLA4単一療法の抗腫瘍有効性は、RANKL封鎖を加えることによってさらに改善され得ることを示す。さらにまた、この三重併用療法（抗RANKLプラス抗PD-1プラス抗CTLA4）の抗腫瘍有効性はいずれの二重併用よりも優れていた。これらのデータは、抗RANKLが抗PD-1/PD-L1有効性を増強するメカニズムは、抗RANKL封鎖による抗CTLA4有効性増強のメカニズムとは別個であることを提唱する。

抗RANKL/PD-1二重特異性抗体が（単一薬剤治療として）、抗CTLA4 mAbの抗腫瘍有効性を増強し得るか否かを調べるために、皮下CT26結腸腫瘍を有するマウスで、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の有効性を（単独または抗CTLA4と併用して）以下と比較した：抗CTLA4治療単独、抗CTLA4プラス抗PD-1の併用治療、または抗RANKLプラス抗PD-1プラス抗CTLA4（三重治療療法）。このモデルでは、抗CTLA4による治療は、腫瘍増殖で控えめな減少をもたらし、前記減少は抗PD-1の添加に際して（抗CTLA4プラス抗PD-1組合せで）改善された（図37）。抗CTLA4プラス抗PD-1組合せへの抗RANKL mAbの添加（三重治療療法）は腫瘍制御をさらに改善した。抗RANKL/PD-1二重特異性抗体の抗CTLA4 mAbへの添加は、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体または抗CTLA4治療単独のどちらで観察されたものよりも強い程度で腫瘍増殖を確かに減少させ、三重療法（抗RANKLプラス抗PD-1プラス抗CTLA4）と比較して腫瘍制御を改善した（図37）。これらのデータは、抗CTLA4の皮下抗腫瘍有効性を増強する抗RANKL/PD-1（単一薬剤治療として）の能力を示す。

【実施例 3 6】

【0 2 7 7】

二重特異性抗RANKL/PD-1によるRANKLおよびPD-1の共同標的化は乳癌細胞株AT3^{OVA}の皮下腫瘍増殖を抑制する

AT3OVA乳房腫瘍を有するマウスで、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体を抗RANKLおよび抗PD-

1抗体による併用治療と比較した(図38)。AT30VA腫瘍を有するマウスで、抗RANKLまたは抗PD-1(100 μ g)は単一療法として最小限の効果を有したが、併用療法(抗RANKLプラス抗PD-1、各々100 μ g)が用いられたときは樹立腫瘍の抑制が観察された(図38)。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の100 μ gおよび200 μ g用量は、clg、抗PD-1治療単独またはコントロール抗RANKL治療単独と比較して、AT30VAの皮下腫瘍増殖を明確に減少させた。抗PD-1単一療法に対する応答の欠如は、この腫瘍がこの免疫療法および単一薬剤による治療に対していくらかの耐性を提示することを示し、二重特異性抗RANKL/PD-1抗体はこの耐性を克服する。二重特異性抗体による治療はAT30VA腫瘍制御でin vivo阻害効果を有することが期待され、前記阻害効果は、単独抗体または抗PD-1抗体および抗RANKL抗体の併用よりも強い。二重特異性抗RANKL/PD-1抗体の200 μ g用量の抗腫瘍効果は、2抗体(抗RANKLおよび抗PD-1、各々100 μ g)による併用治療の等価の総用量(200 μ g)で観察されたものと同様であった(図38)。これらのデータは、皮下乳房腫瘍モデルにおける二重特異性抗RANKL/PD-1抗体のin vivo有効性を確認する。

【0278】

本明細書に引用される全ての特許、特許出願、および特許公開は参照によってその全体が本明細書に含まれる。

本明細書のいずれの参考文献の引用も、そのような参考文献が本出願の“先行技術”として利用可能であることを容認するものと解されるべきではない。

本明細書を通してその目的は本発明の好ましい実施態様を記載することであり、いずれか1つの実施態様または特定の特徴収集物に本発明を限定しない。したがって、本開示に照らし、多様な改変および変更を本発明の範囲から外れることなく個々の実施態様で実行し得ることは当業者には理解されるであろう。そのような改変および変更は全て添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図1A - B】

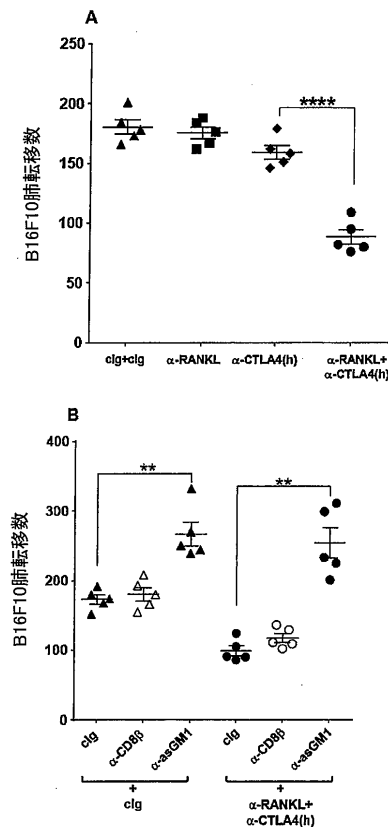


FIGURE 1

【図1C - D】

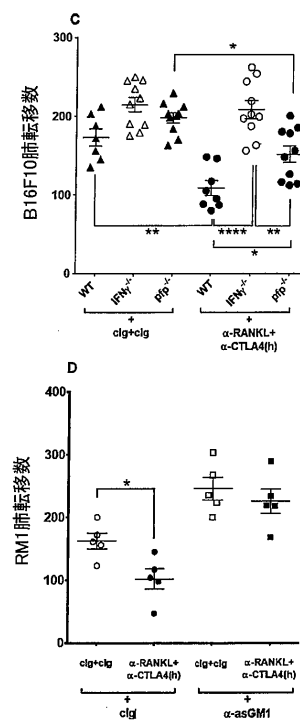


FIGURE 1 続き

【 図 3 】

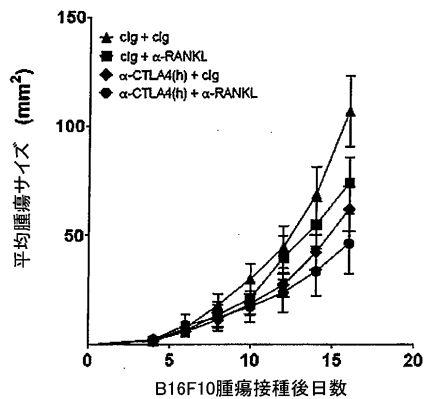


FIGURE 3

【 図 4 A - B 】

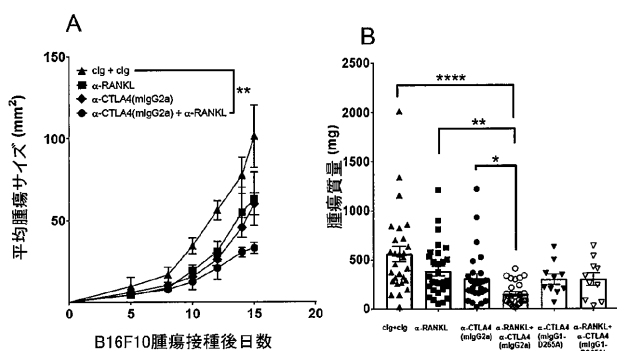
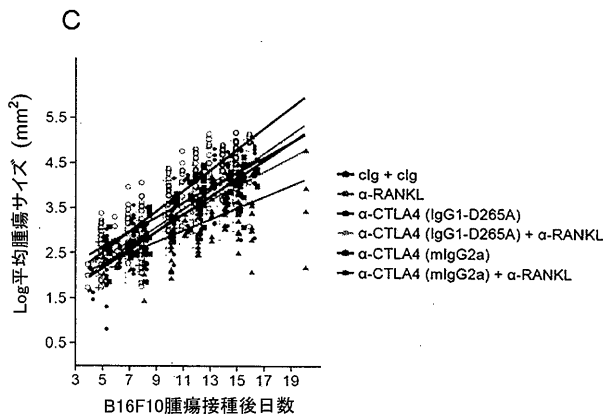


FIGURE 4

【 図 4 C 】



比較(治療グループ)	P値
clg + clg vs. α -CTLA4(mlgG2a) + α -RANKL	****
α -RANKL vs. α -CTLA4(mlgG2a) + α -RANKL	****
α -CTLA4(mlgG2a) vs. α -CTLA4(mlgG2a) + α -RANKL	****
clg + clg vs. α -CTLA4(mlgG1-D265A) + α -RANKL	**

FIGURE 4 続き

【 図 6 C - D 】

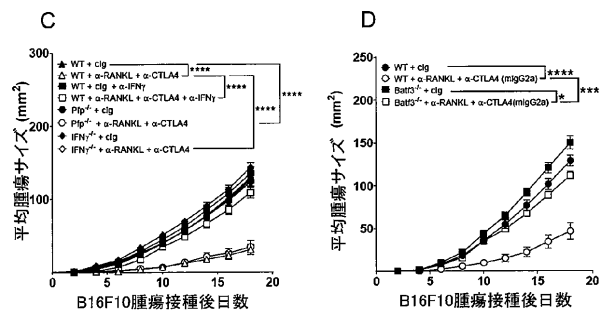
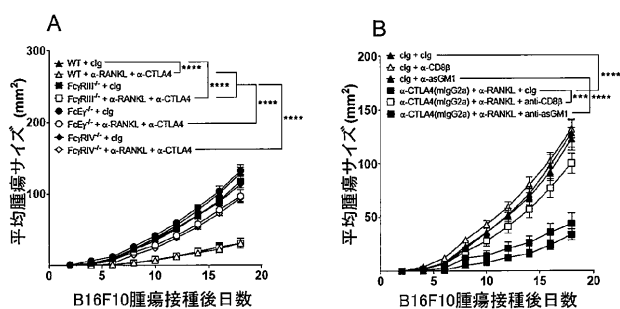


FIGURE 5

FIGURE 6



【 図 7 E - H 】

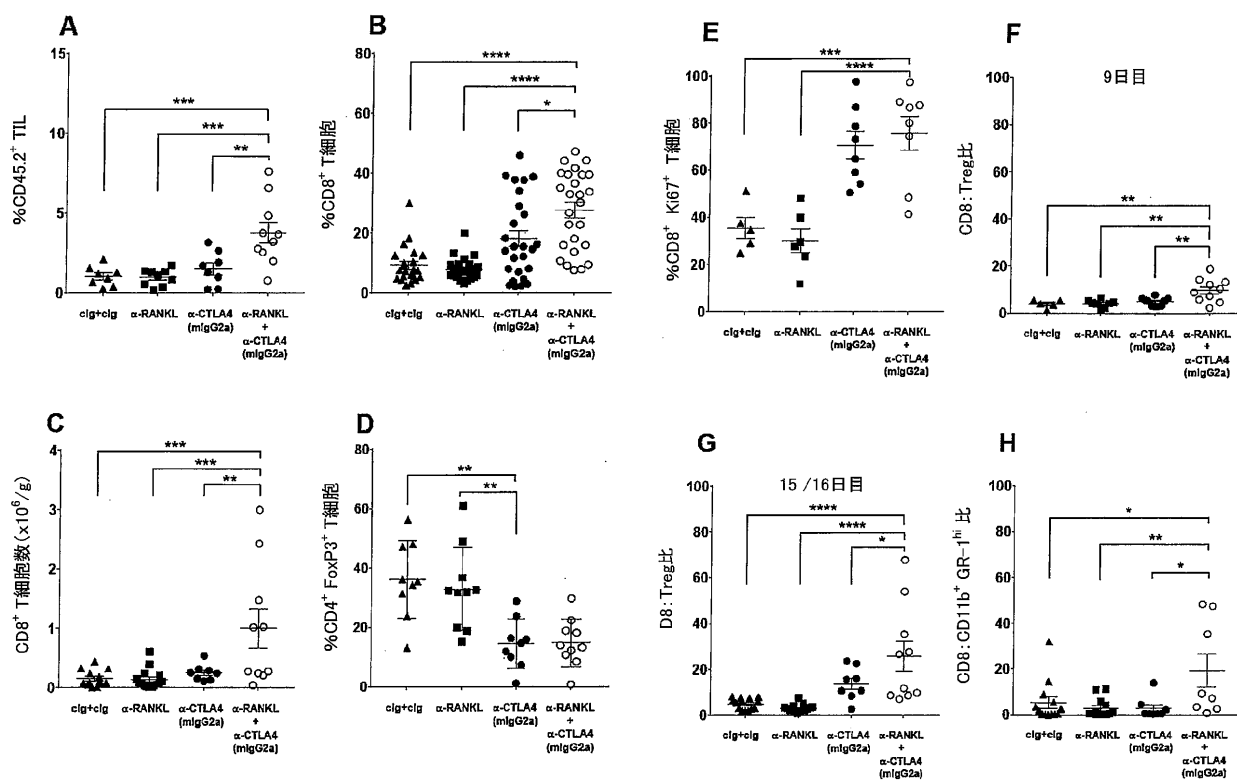


FIGURE 7 続き

【図 8 A - D】

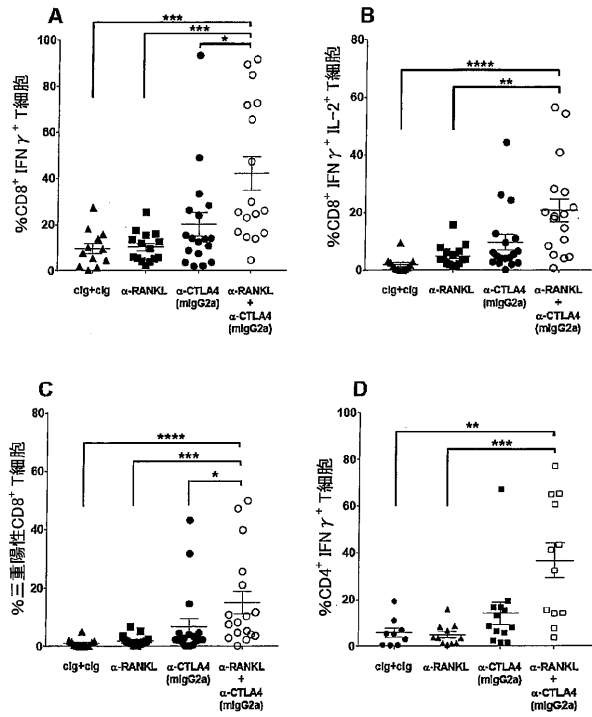


FIGURE 8

【図 8 E】

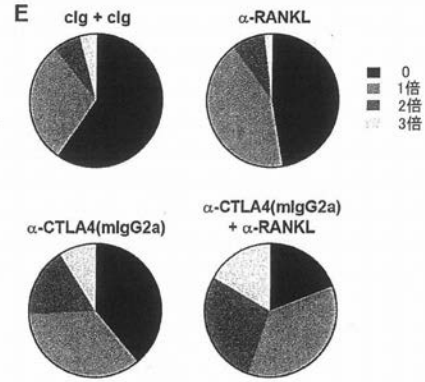


FIGURE 8 続き

【図 9】

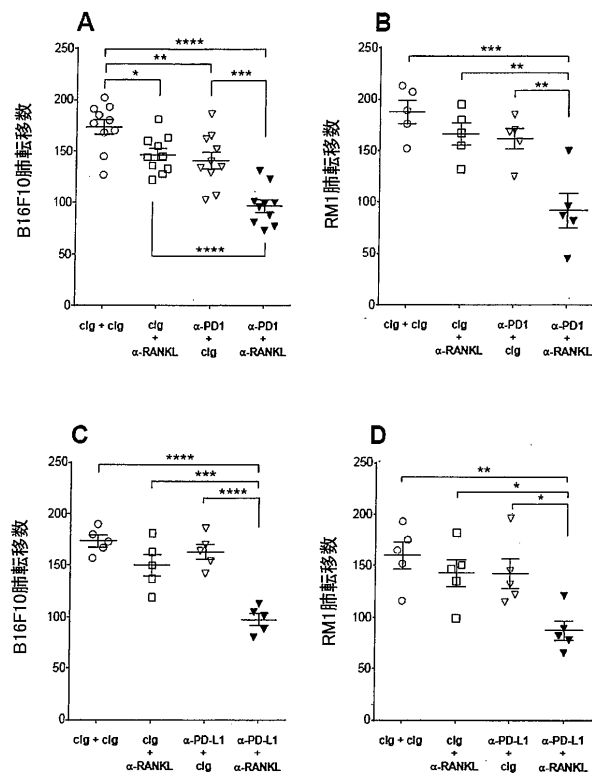


FIGURE 9

【図 10】

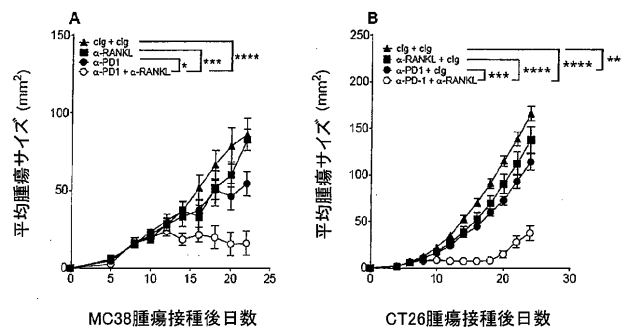


FIGURE 10

【図 1 1】

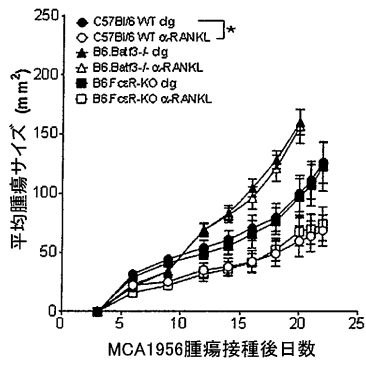
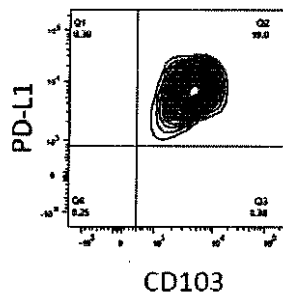


FIGURE 11

【図 1 2 A】

A.



【図 1 3】

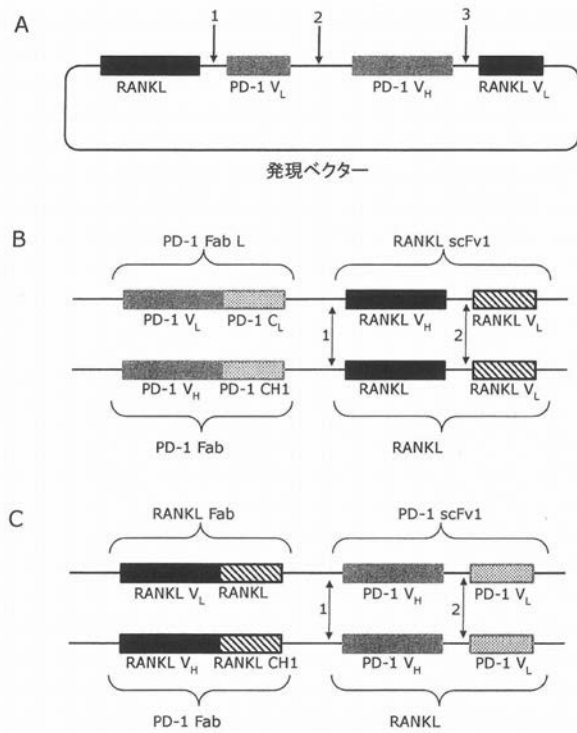
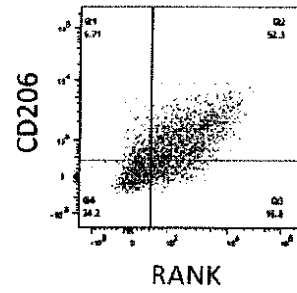


FIGURE 13

【図 1 2 B】

B.



【図 1 4】

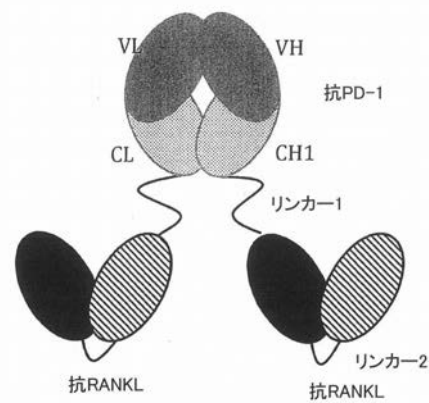


FIGURE 14

【図 15 A - C】

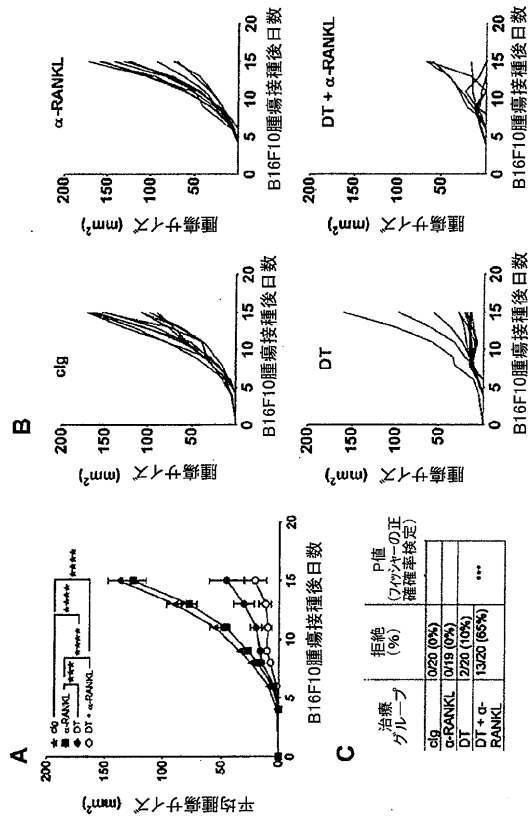


FIGURE 15

【図 15 D - E】

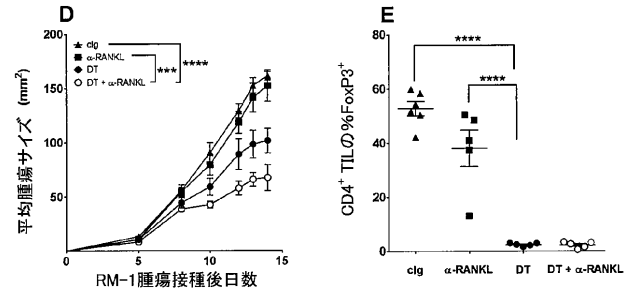


FIGURE 15 続き

【図 16】

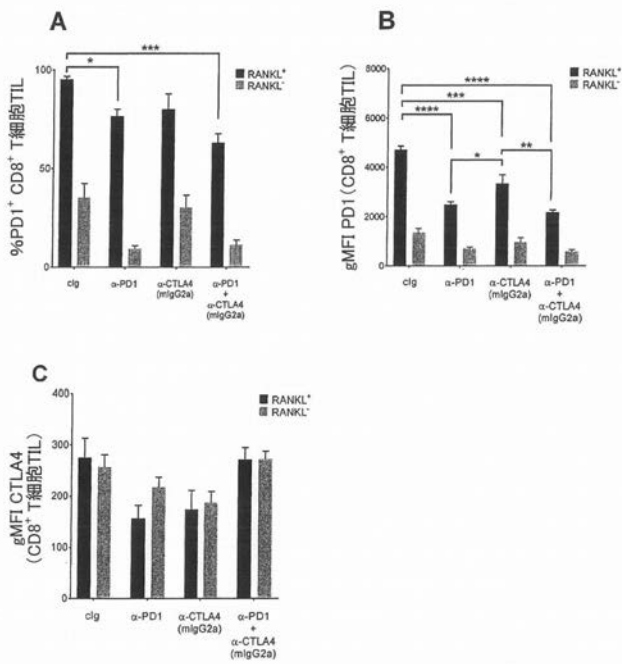


FIGURE 16

【図 17 A - B】

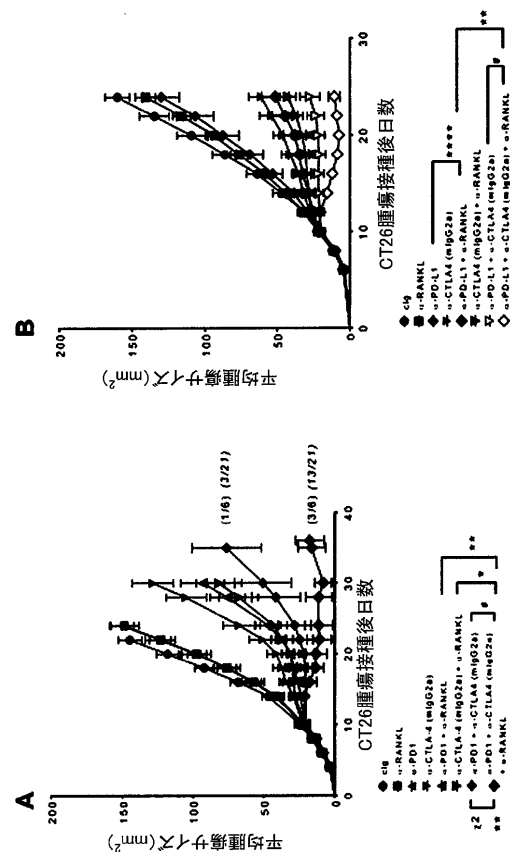


FIGURE 17

【図 17 C】

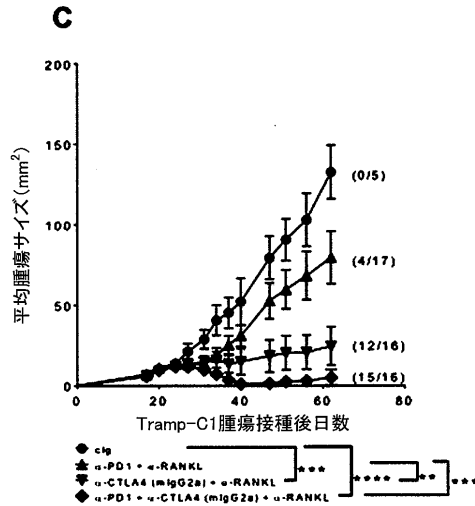


FIGURE 17 続き

【図 18 A - C】

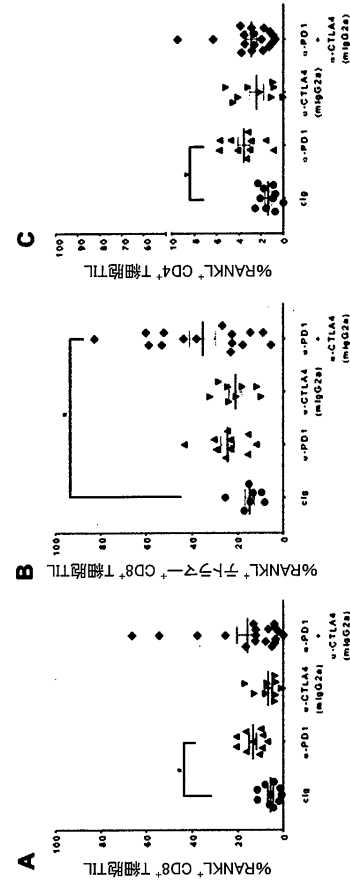


FIGURE 18

【図 19】

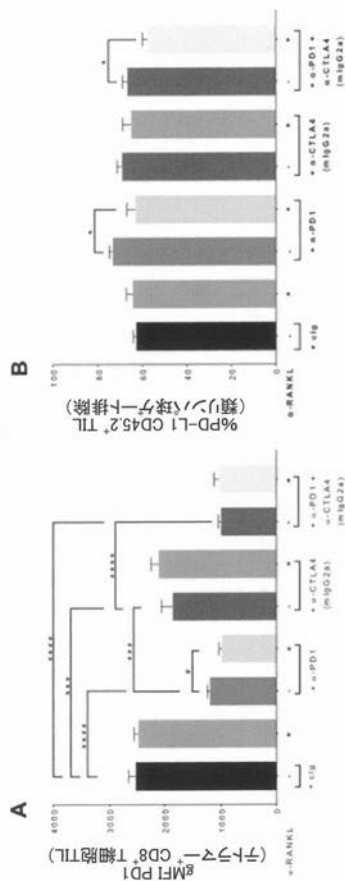


FIGURE 19

【図 20】

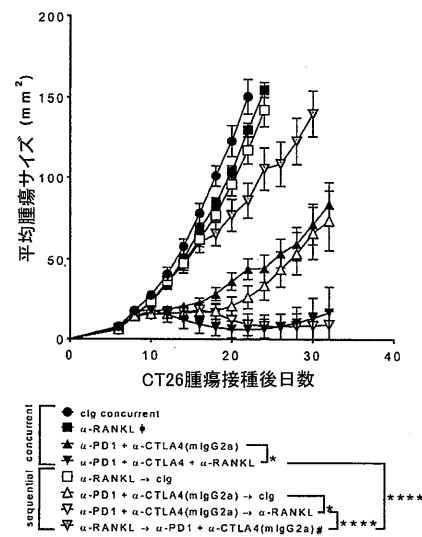


FIGURE 20

【図 2 1】

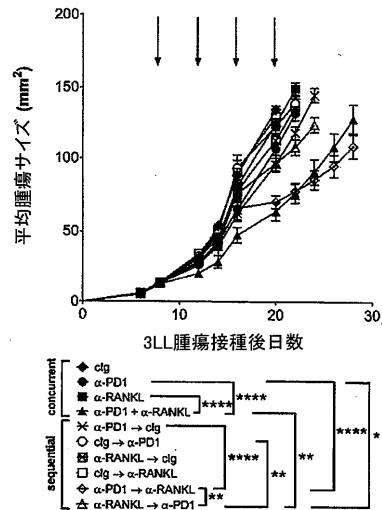


FIGURE 21

【図 2 2】

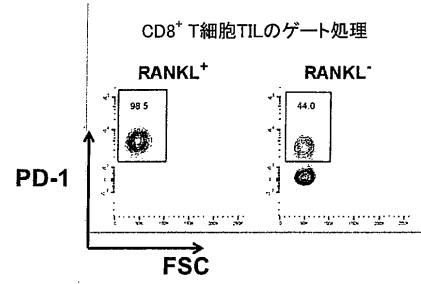


FIGURE 22

【図 2 3】

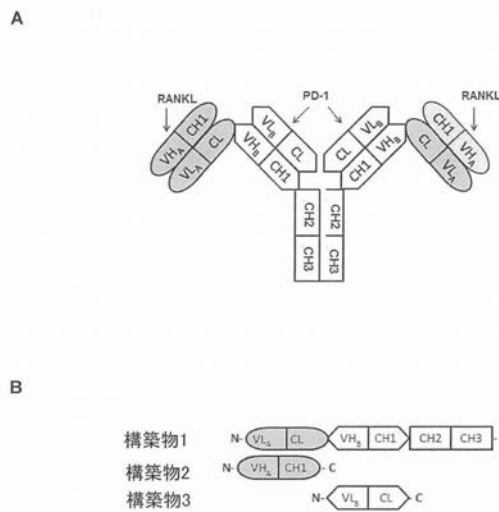


FIGURE 23

【図 2 4】

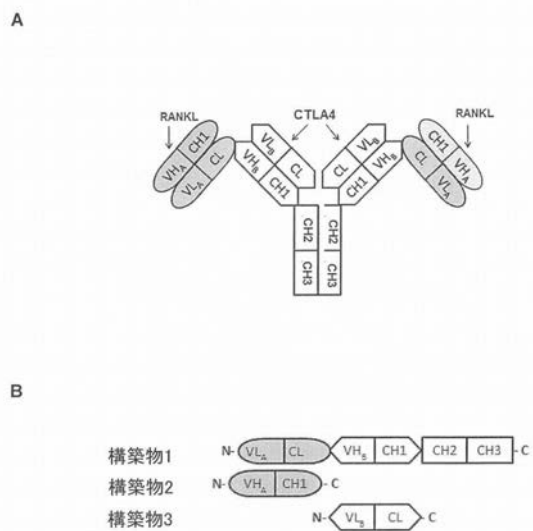


FIGURE 24

【 ㊦ 2 6 】

B

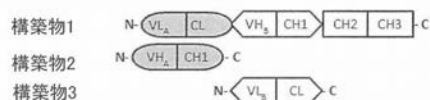
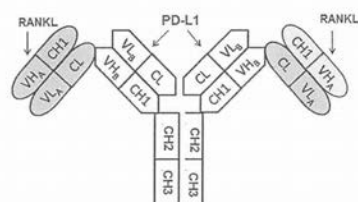


FIGURE 25

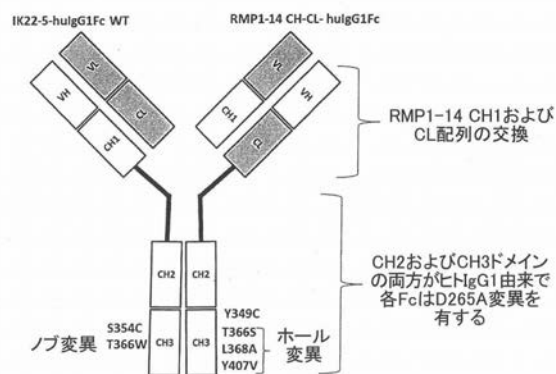


FIGURE 26

【 ㊤ 27 】

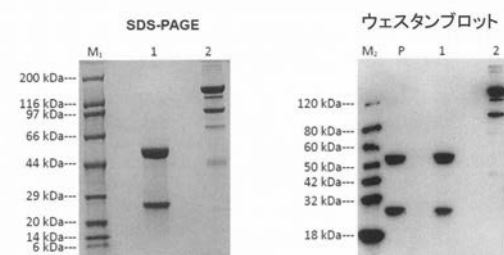


FIGURE 27

【 ㊦ 3 0 】

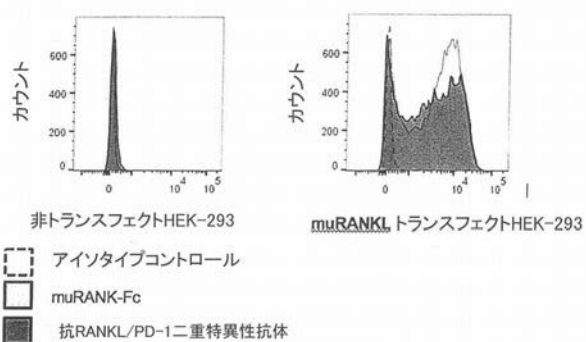


FIGURE 28

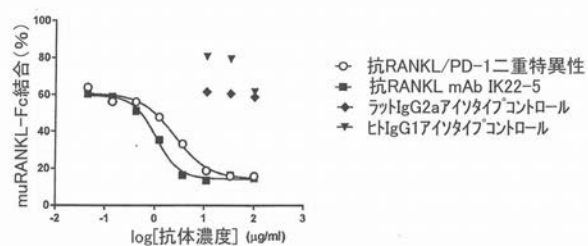


FIGURE 29

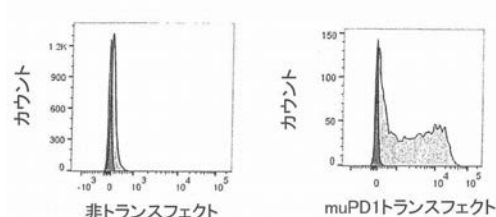


FIGURE 30

【 図 3 1 】

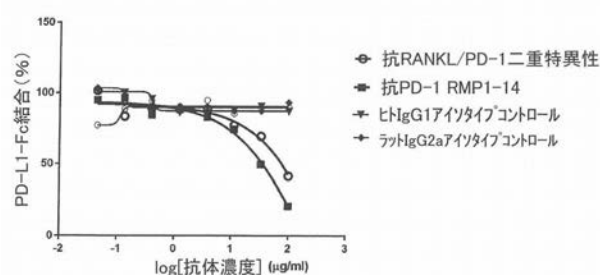


FIGURE 31

【図 3 2】

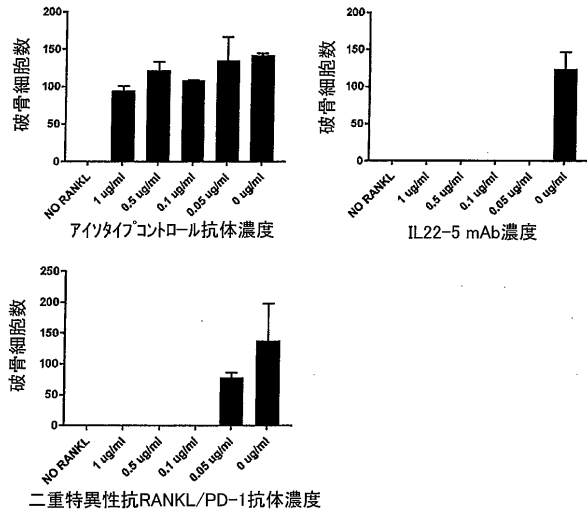


FIGURE 32

【図 3 3】

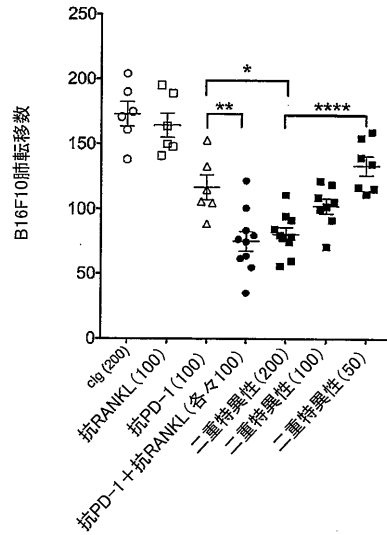


FIGURE 33

【図 3 4】

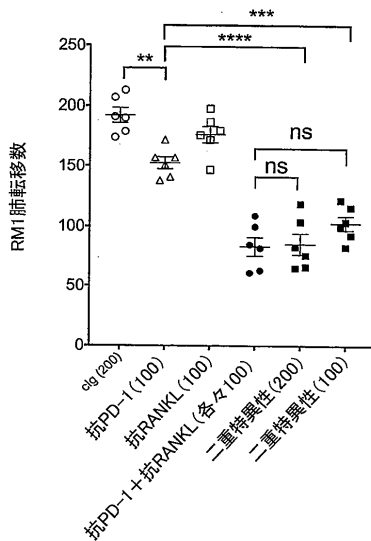


FIGURE 34

【図 3 5】

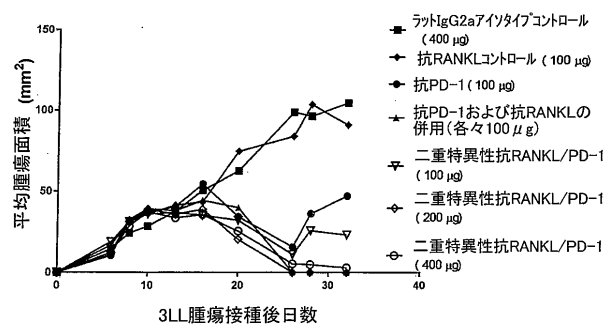


FIGURE 35

【図 3 6】

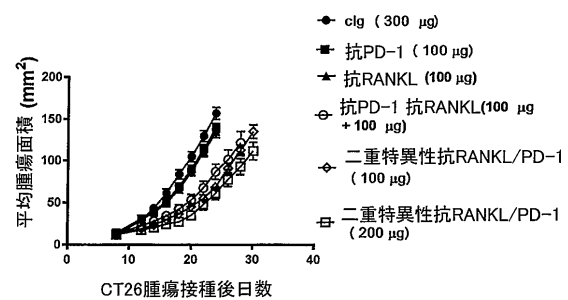


FIGURE 36

【図 37】

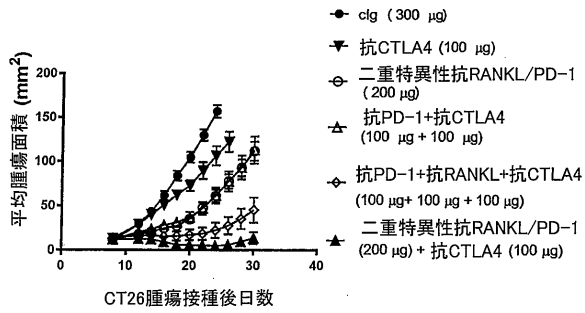


FIGURE 37

【図 38】

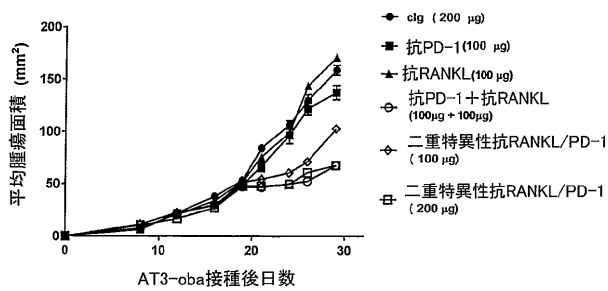


FIGURE 38

【配列表】

2020522529000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年2月12日 (2020.2.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

表A：配列の簡単な説明

配列番号	配列	長さ (aa)
配列番号:1	RANKLエピトープ 233-241	9
配列番号:2	自然のままのヒトRANKL (UniProt Acc. No. O14788)	317
配列番号:3	デノスマブ重鎖	452
配列番号:4	デノスマブ軽鎖	215
配列番号:5	RANK CDR3模倣アンタゴニスト	11
配列番号:6	RANK CDR3模倣アンタゴニスト	9
配列番号:7	RANKエピトープ330-417	88
配列番号:8	自然のままのヒトRANK (UniProt Acc. No. Q9Y6Q6)	616
配列番号:9	PD-1エピトープ62-86	25
配列番号:10	自然のままのヒトPD-1 (UniProt Acc. No. Q15116)	268
配列番号:11	PD-1エピトープ118-136	19
配列番号:12	PD-1エピトープ66-97	32
配列番号:13	PD-L1エピトープ279-290	12
配列番号:14	自然のままのヒトPD-L1 (UniProt Acc. No. Q9NZQ7)	290
配列番号:15	CTLA4エピトープ25-42	18
配列番号:16	自然のままのヒトCTLA4 (UniProt Acc. No. P16410)	188
配列番号:17	CTLA4エピトープ43-65	23
配列番号:18	CTLA4エピトープ96-109	14
配列番号:19	デノスマブ重鎖CDR1	5
配列番号:20	デノスマブ重鎖CDR2	17
配列番号:21	デノスマブ重鎖CDR3	13
配列番号:22	デノスマブ軽鎖CDR1	12
配列番号:23	デノスマブ軽鎖CDR2	7
配列番号:24	デノスマブ軽鎖CDR3	9
配列番号:25	デノスマブV _H	122

配列番号:26	デノスマブV _L	108
配列番号:27	デノスマブ重鎖完全長	467
配列番号:28	デノスマブ軽鎖完全長	235
配列番号:29	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	6
配列番号:30	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:31	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17
配列番号:32	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:33	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:34	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5
配列番号:35	EP 1257648抗RANKL抗体重鎖	230
配列番号:36	配列番号:35の抗原結合フラグメント	126
配列番号:37	EP 1257648抗RANKL抗体軽鎖	215
配列番号:38	配列番号:37の抗原結合フラグメント	103
配列番号:39	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	6
配列番号:40	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:41	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17
配列番号:42	EP 1257648抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:43	EP 1257648抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:44	EP 1257648抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5
配列番号:45	EP 1257648抗RANKL抗体重鎖	230
配列番号:46	配列番号:35の抗原結合フラグメント	126
配列番号:47	EP 1257648抗RANKL抗体軽鎖	215
配列番号:48	配列番号:37の抗原結合フラグメント	103
配列番号:49	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:50	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:51	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	12
配列番号:52	抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	9
配列番号:53	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:54	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:55	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:56	抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:57	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5
配列番号:58	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5
配列番号:59	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	5
配列番号:60	抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	11
配列番号:61	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5
配列番号:62	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5
配列番号:63	抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	5
配列番号:64	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:65	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:66	抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	17
配列番号:67	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	17
配列番号:68	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	7
配列番号:69	抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	14
配列番号:70	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR1 (V _H)	7

配列番号:71	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR2 (V _H)	5
配列番号:72	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR3 (V _H)	7
配列番号:73	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR1 (V _L)	11
配列番号:74	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR2 (V _L)	7
配列番号:75	Newa et al. 抗RANKL抗体CDR3 (V _L)	9
配列番号:76	Newa et al. 抗RANKL抗体V _H	115
配列番号:77	Newa et al. 抗RANKL抗体V _H	116
配列番号:78	配列番号:76の抗原結合フラグメント	113
配列番号:79	配列番号:77の抗原結合フラグメント	114
配列番号:80	Newa et al. 抗RANKL抗体V _L	111
配列番号:81	配列番号:80の抗原結合フラグメント	107
配列番号:82	ニボルマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:83	ニボルマブCDR2 (V _H)	17
配列番号:84	ニボルマブCDR3 (V _H)	5
配列番号:85	ニボルマブCDR1 (V _L)	11
配列番号:86	ニボルマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:87	ニボルマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:88	ニボルマブ重鎖	440
配列番号:89	ニボルマブV _H	113
配列番号:90	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:91	ニボルマブV _L	107
配列番号:92	ペムプロリズマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:93	ペムプロリズマブCDR2 (V _H)	17
配列番号:94	ペムプロリズマブCDR3 (V _H)	11
配列番号:95	ペムプロリズマブCDR1 (V _L)	15
配列番号:96	ペムプロリズマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:97	ペムプロリズマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:98	ペムプロリズマブ重鎖	447
配列番号:99	ペムプロリズマブV _H	120
配列番号:100	ペムプロリズマブ軽鎖	218
配列番号:101	ペムプロリズマブV _L	111
配列番号:102	ピジリズマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:103	ピジリズマブCDR2 (V _H)	17
配列番号:104	ピジリズマブCDR3 (V _H)	8
配列番号:105	ピジリズマブCDR1 (V _L)	10
配列番号:106	ピジリズマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:107	ピジリズマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:108	ピジリズマブ重鎖	447
配列番号:109	ピジリズマブV _H	117
配列番号:110	ピジリズマブ軽鎖	213
配列番号:111	ピジリズマブV _L	106
配列番号:112	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _L)	15
配列番号:113	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _L)	7
配列番号:114	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _L)	9
配列番号:115	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _H)	5

配列番号:116	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _H)	17
配列番号:117	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _H)	11
配列番号:118	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _L)	15
配列番号:119	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _L)	7
配列番号:120	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _L)	9
配列番号:121	WO2015/026634抗PD-1 CDR1 (V _H)	5
配列番号:122	WO2015/026634抗PD-1 CDR2 (V _H)	17
配列番号:123	WO2015/026634抗PD-1 CDR3 (V _H)	11
配列番号:124	WO2015/026634抗PD-1 V _H	120
配列番号:125	WO2015/026634抗PD-1 V _L	111
配列番号:126	WO2015/026634抗PD-1 V _L	<u>110</u>
配列番号:127	WO2015/026634抗PD-1 V _L	111
配列番号:128	WO2015/026634抗PD-1重鎖	447
配列番号:129	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	218
配列番号:130	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	<u>218</u>
配列番号:131	WO2015/026634抗PD-1軽鎖	218
配列番号:132	デュルバルマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:133	デュルバルマブCDR2 (V _H)	16
配列番号:134	デュルバルマブCDR3 (V _H)	12
配列番号:135	デュルバルマブCDR1 (V _L)	12
配列番号:136	デュルバルマブCDR2 (V _L)	11
配列番号:137	デュルバルマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:138	デュルバルマブ重鎖	449
配列番号:139	デュルバルマブV _H	120
配列番号:140	デュルバルマブ軽鎖	215
配列番号:141	デュルバルマブV _L	108
配列番号:142	アテゾリズマブCDR1 (V _H)	10
配列番号:143	アテゾリズマブCDR2 (V _H)	18
配列番号:144	アテゾリズマブCDR3 (V _H)	9
配列番号:145	アテゾリズマブCDR1 (V _L)	11
配列番号:146	アテゾリズマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:147	アテゾリズマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:148	アテゾリズマブ重鎖	448
配列番号:149	アテゾリズマブV _H	118
配列番号:150	アテゾリズマブ軽鎖	214
配列番号:151	アテゾリズマブV _L	107
配列番号:152	アベルマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:153	アベルマブCDR2 (V _H)	17
配列番号:154	アベルマブCDR3 (V _H)	11
配列番号:155	アベルマブCDR1 (V _L)	14
配列番号:156	アベルマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:157	アベルマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:158	アベルマブ重鎖	450
配列番号:159	アベルマブV _H	120
配列番号:160	アベルマブ軽鎖	216

配列番号:161	アベルマブV _L	110
配列番号:162	イピリムマブCDR1 (V _H)	5
配列番号:163	イピリムマブCDR2 (V _H)	17
配列番号:164	イピリムマブCDR3 (V _H)	9
配列番号:165	イピリムマブCDR1 (V _L)	12
配列番号:166	イピリムマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:167	イピリムマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:168	イピリムマブ重鎖	448
配列番号:169	イピリムマブV _H	118
配列番号:170	イピリムマブ軽鎖	215
配列番号:171	イピリムマブV _L	108
配列番号:172	トレメリムマブCDR1 (V _H)	10
配列番号:173	トレメリムマブCDR2 (V _H)	15
配列番号:174	トレメリムマブCDR3 (V _H)	16
配列番号:175	トレメリムマブCDR1 (V _L)	11
配列番号:176	トレメリムマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:177	トレメリムマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:178	トレメリムマブ重鎖	451
配列番号:179	トレメリムマブV _H	118
配列番号:180	トレメリムマブ軽鎖	214
配列番号:181	トレメリムマブV _L	107
配列番号:182	自然のままのヒトB7-H3 (UniProt Acc. No. Q5ZPR3)	534
配列番号:183	エノブリツズマブCDR1 (V _H)	4
配列番号:184	エノブリツズマブCDR2 (V _H)	16
配列番号:185	エノブリツズマブCDR3 (V _H)	13
配列番号:186	エノブリツズマブCDR1 (V _L)	11
配列番号:187	エノブリツズマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:188	エノブリツズマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:189	エノブリツズマブ重鎖	451
配列番号:190	エノブリツズマブV _H	121
配列番号:191	エノブリツズマブ軽鎖	214
配列番号:192	エノブリツズマブV _L	107
配列番号:193	自然のままのヒトIDO (UniProt Acc No. P14902)	403
配列番号:194	ヒト成熟KIR2-DL1 (UniProt Acc. No. P43626)	327
配列番号:196	リリルマブCDR2 (V _H)	16
配列番号:197	リリルマブCDR3 (V _H)	14
配列番号:198	リリルマブCDR1 (V _L)	11
配列番号:199	リリルマブCDR2 (V _L)	7
配列番号:200	リリルマブCDR3 (V _L)	9
配列番号:201	リリルマブ重鎖	450
配列番号:202	リリルマブV _H	123
配列番号:203	リリルマブ軽鎖	214
配列番号:204	リリルマブV _L	109
配列番号:205	ヒト成熟LAG-3 (UniProt Acc. No. P18627)	503
配列番号:206	BMS-986016 CDR1 (V _H)	5
配列番号:207	BMS-986016 CDR2 (V _H)	16

配列番号:208	BMS-986016 CDR3 (V _H)	12
配列番号:209	BMS-986016 CDR1 (V _L)	11
配列番号:210	BMS-986016 CDR2 (V _L)	7
配列番号:211	BMS-986016 CDR3 (V _L)	9
配列番号:212	BMS-986016重鎖	447
配列番号:213	BMS-986016 V _H	120
配列番号:214	BMS-986016軽鎖	214
配列番号:215	BMS-986016 V _L	107
配列番号:216	デノスマブV _H	122
配列番号:217	ニボルマブV _H	113
配列番号:218	EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:219	ニボルマブV _H	113
配列番号:220	デノスマブV _H	222
配列番号:221	ペムプロリズマブV _H	120
配列番号:222	抗EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:223	ペンプロリズマブV _H	120
配列番号:224	デノスマブV _H	122
配列番号:225	デュルバルマブV _H	120
配列番号:226	EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:227	デュルバルマブV _H	120
配列番号:228	デノスマブV _H	122
配列番号:229	アテゾリズマブV _H	118
配列番号:230	EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:231	アテゾリズマブV _H	118
配列番号:232	デノスマブV _H	122
配列番号:233	イピリムマブV _H	118
配列番号:234	EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:235	イピリムマブV _H	118
配列番号:236	デノスマブV _H	122
配列番号:237	トレメリムマブV _H	118
配列番号:238	EP1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:239	トレメリムマブV _H	118
配列番号:240	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L huIgG2 KNOB変異、重鎖	476
配列番号:241	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	226
配列番号:242	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439
配列番号:243	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:244	デノスマブCrossMAb V _H -V _L huIgG2 KNOB変異、重鎖	453
配列番号:245	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	249
配列番号:246	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439
配列番号:247	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:248	デノスマブCrossMAb Fab huIgG2 KNOB変異、重鎖	462
配列番号:249	デノスマブCrossMAb Fab軽鎖	240
配列番号:250	ニボルマブIgG2ホール変異、重鎖	439

配列番号:251	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:252	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L hulgG4 KNOB変異、重鎖	477
配列番号:253	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	226
配列番号:254	ニボルマブ IgG ₄ ホール変異、重鎖	440
配列番号:255	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:256	デノスマブCrossMAb V _H -V _L hulgG4 KNOB変異、重鎖	454
配列番号:257	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	249
配列番号:258	ニボルマブIgG ₄ ホール変異、重鎖	440
配列番号:259	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:260	デノスマブCrossMAb Fab hulgG4 KNOBノブ変異、重鎖	463
配列番号:261	デノスマブCrossMAb Fab軽鎖	240
配列番号:262	ニボルマブIgG ₄ ホール変異、重鎖	440
配列番号:263	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:264	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L hulgG1 KNOB変異、重鎖	480
配列番号:265	デノスマブCrossMAb C _{H1} -C _L 軽鎖	226
配列番号:266	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443
配列番号:267	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:268	デノスマブCrossMAb V _H -V _L hulgG1 KNOBノブ変異、重鎖	457
配列番号:269	デノスマブCrossMAb V _H -V _L 軽鎖	249
配列番号:270	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443
配列番号:271	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:272	デノスマブCrossMAb Fab hulgG1 KNOB変異、重鎖	466
配列番号:273	デノスマブCrossMAb Fab軽鎖	240
配列番号:274	ニボルマブIgG ₁ ホール変異、重鎖	443
配列番号:275	ニボルマブ軽鎖	214
配列番号:276	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#1	655
配列番号:277	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#2	218
配列番号:278	RANKL/PD-1 FIT-Ig構築物#3	214
配列番号:279	RANKL/CTLA4 FIT-Ig構築物#1	663
配列番号:280	RANKL/CTLA4 FIT-Ig構築物#3	215
配列番号:281	RANKL/PD-L1 FIT-Ig構築物#1	663
配列番号:282	RANKL/PD-L1 FIT-Ig構築物#3	214
配列番号:283	重鎖IK22-5	135
配列番号:284	軽鎖IK22-5	126
配列番号:285	重鎖RMP1-14	138
配列番号:286	軽鎖RMP1-14	131
配列番号:287	IK22-5-hulgG1Fc WT重鎖	465
配列番号:288	IK22-5-hulgG1Fc WT軽鎖	232
配列番号:289	RMP1-14 C _H -C _L - hulgG1Fc重鎖	473
配列番号:290	RMP1-14 C _H -C _L - hulgG1Fc軽鎖	233

配列番号:291	ニボルマブV _L	107
配列番号:292	ニボルマブV _H	113
配列番号:293	デノスマブV _L	108
配列番号:294	デノスマブV _L	108
配列番号:295	デノスマブV _H	122
配列番号:296	ニボルマブV _L	107
配列番号:297	ニボルマブV _L	107
配列番号:298	ニボルマブV _H	113
配列番号:294	デノスマブV _L	108
配列番号:295	デノスマブV _H	122
配列番号:296	ニボルマブV _L	107
配列番号:297	ニボルマブV _L	107
配列番号:298	ニボルマブV _H	113
配列番号:299	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:300	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:301	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:302	ニボルマブV _H	107
配列番号:303	ペムプロリズマブV _L	111
配列番号:304	ペムプロリズマブV _H	120
配列番号:305	デノスマブV _L	108
配列番号:306	デノスマブV _L	108
配列番号:307	デノスマブV _H	122
配列番号:308	ペムプロリズマブV _L	111
配列番号:309	ペムプロリズマブV _L	111
配列番号:310	ペムプロリズマブV _H	120
配列番号:311	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:312	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	103
配列番号:313	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:314	ペンプロリズマブ V _L	111
配列番号:315	デュルバルマブV _L	108
配列番号:316	デュルバルマブV _H	120
配列番号:317	デノスマブV _L	108
配列番号:318	デノスマブV _L	108
配列番号:319	デノスマブV _H	122
配列番号:320	デュルバルマブV _L	108
配列番号:321	デュルバルマブV _L	108
配列番号:322	デュルバルマブV _H	120
配列番号:323	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:324	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:325	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:326	デュルバルマブV _L	108
配列番号:327	アテゾリズマブV _L	107
配列番号:328	アテゾリズマブV _H	118
配列番号:329	デノスマブV _L	108
配列番号:330	デノスマブV _L	108

配列番号:331	デノスマブV _H	122
配列番号:332	アテゾリズマブV _L	107
配列番号:333	アテゾリズマブV _L	107
配列番号:334	アテゾリズマブV _H	118
配列番号:335	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:336	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:337	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:338	アテゾリズマブV _L	107
配列番号:339	イピリムマブV _L	108
配列番号:340	イピリムマブV _H	118
配列番号:341	デノスマブV _L	108
配列番号:342	デノスマブV _L	108
配列番号:343	デノスマブV _H	122
配列番号:344	イピリムマブV _L	108
配列番号:345	イピリムマブV _L	108
配列番号:346	イピリムマブV _H	118
配列番号:347	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:348	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:349	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:350	イピリムマブV _L	108
配列番号:351	トレメリムマブV _L	107
配列番号:352	トレメリムマブV _H	118
配列番号:353	デノスマブV _L	108
配列番号:354	デノスマブV _L	108
配列番号:355	デノスマブV _H	122
配列番号:356	トレメリムマブV _L	107
配列番号:357	トレメリムマブV _L	107
配列番号:358	トレメリムマブV _H	118
配列番号:359	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:352	トレメリムマブV _H	118
配列番号:353	デノスマブV _L	108
配列番号:354	デノスマブV _L	108
配列番号:355	デノスマブV _H	122
配列番号:356	トレメリムマブV _L	107
配列番号:357	トレメリムマブV _L	107
配列番号:358	トレメリムマブV _H	118
配列番号:359	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:360	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _L	103
配列番号:361	EP 1257648に開示される抗RANKL抗体のV _H	126
配列番号:362	トレメリムマブV _L	107

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 9 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 9 9 】

5. マルチ特異性抗原結合構築物

本発明のある特徴は、異なる特異性を有する複数の抗原結合分子を含み、それらが直接的にまたはリンカーを介して一緒に融合或いは接合されているキメラ構築物に関する。

5.1 抗RANKL-抗PD-1ジアボディ

本発明は、二重特異性で抗RANKL抗原結合分子および抗PD-1抗原結合分子を含むマルチ特異性構築物を意図し、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

a) EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN}
^{KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS} [SGGGG]_n eivltqspatlsispgeratls
crasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqssnwprtfgggtk
veik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKG
RFTISRDN^{SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS} [SGGGG]_n eivltqspgtlsispgeratls
crasqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygssprtfgggt
kveik

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:216）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:291）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:292）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:293）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

b) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN
^{KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS} [SGGGG]_n eivltqspgtlsispgeratls
crasqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygssprtfgggtkveik [SG
 GGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
^{SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS} [SGGGG]_n eivltqspatlsispgeratls
crasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqssnwprtfgggt
kveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:217）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:294）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:295）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:296）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGR I TVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsispgera
tlscrasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqssnwprtf
gqgkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASG I TFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV I WYDGSKRYYAD
SVKGRFT I SRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgrv
titcrasqsisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsfgsgsgaefltltisslqpeditatyycqhttrafgqgk
veik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:218）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:297）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:298）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:299）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASG I TFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV I WYDGSKRYYADSVKGRFT I SRDNS
KNTLFLQMNSLRAED TAVYYCATNDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgrv
titcrasqsisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsfgsgsgaefltltisslqpeditatyycqhttrafgqgk
veik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA I HWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGR I TVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsispgeratls
crasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqssnwprtf
gqgkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:219）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:300）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:301）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbニボルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:302）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

e) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG I TSGGGSTYYADSVKGRFT I SRDNS
KNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDPGTTV I MSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsispgeratls
raskgvstsgysylhwyqqkpgqaprlliyasylesgvparfsgsgsgtdftltisslepedfavyycqhsrdlpltf
gqgkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGG I NPSNGGTNFNE
KFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtls
ispgeratls
crasqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqqy
gssprtf
gqgkveik

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:220）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:303）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:304）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:305）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

f) QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSS
TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscra
sqsrvrgylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqqygssprtfgggtkv
eik [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTTLVTSS [SGGGG]_n eivltqspatlsisp
geratlscraskgvstsgysylhwyqqkpgqaprlliy lasylesgvparfsgsgsgtdftltisslepedfavvycqhs
rdlpltfgggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:221）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:306）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:307）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:308）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRGII IAYYFDYWGGQTLVTSS [SGGGG]_n eivltqspatlsispgera
tlscraskgvstsgysylhwyqqkpgqaprlliy lasylesgvparfsgsgsgtdftltisslepedfavvycqhsrdlp
ltfgggtkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGT
NFNEKFKNRVTLTTDSS TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTSS [SGGGG]_n eivmtqsp
sslsasvgdrv titcrasqsisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfs gsgsgaefltltisslqpediatyyc
qhtrafgggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:222）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:309）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:310）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:311）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合に

は $n=3$ である。

h) QVQLVQSGVEVKPGASVKVCKASGYTFTNYYMYWRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSS
TTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvqdrvtitcra
sqsisrylnwylkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsqsgsgaefltltisslqpediatyycqhtrafgqggtkveik [
 SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTR
DTAASTAYMELRSLRSEDYAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGQGTITVTVSS [SGGGG]_n eivltqspatlsisp
eratlsraskgvstsgysylhwyqqkpgqaprlliyasylesgvparfsgsgsgtdftltisslepedfavyycqhsr
dplptfgggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:223）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:312）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:313）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-1 MAbペムプロリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:314）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、 $n=1$ 、 2 、 3 、または 4 であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合は $n=1$ で、第二の可撓性リンカーの場合には $n=3$ である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

5.2 抗RANKL-抗PD-1ジアボディ

また別に、二重特異性構築物は、抗RANKL抗原結合分子および抗PD-L1抗原結合分子を含み、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記配列から成るか、または本質的に前記配列から成る：

a) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTITVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratls
rasqrvssylawyqqkpgqaprlliydassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygslpwtfgggt
kveik [SGGGG]_n VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVK
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTITVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslsp
geratlsrascsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygss
prtfgggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:224）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:315）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:316）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:317）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、 $n=1$ 、 2 、 3 、または 4 であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合は $n=1$ で、第二の可撓性リンカーの場合には $n=3$ である。

b) VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN

NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvrgrylawyqqkpgqaprllygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqyqgssprtfqggtkveik [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasqrvssylawyqqkpgqaprllydassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsipwtfqggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：225）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：318）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：319）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：320）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTASTAYMELRSLRSEDVAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGGTGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasqrvssylawyqqkpgqaprllydassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsipwtfqggtkveik [SGGGG]_n VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgrvtitcrasqsisrylnwyqlkpgkaprllygasslqsgvpsrfsrgsgsgaeftltisslqpediatyycqhttrafqggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：226）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：321）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：322）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：323）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgrvtitcrasqsisrylnwyqlkpgkaprllygasslqsgvpsrfsrgsgsgaeftltisslqpediatyycqhttrafqggtkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTASTAYMELRSLRSEDVAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGGTGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasqrvssylawyqqkpgqaprllydassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsipwtfqggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：227）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：324）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：2325）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbデュルバルマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：326）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【**手続補正7**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0104

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0104】

e) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv gdrvtitc rasqdvstavawyqqkpgkapkll iysasflysgvpsrfs gsgsgtdftlt isslqpedfatyycqqylyhpatfgggtk veik [SGGGG]_n EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKG RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspger atlscrasqsvrgrylawyqqkpgqaprll iygassratgipdrfsgsgsgtdftlt isrlpedfavfycqqygssprt fgggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：228）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：327）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：328）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：329）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

f) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISRDT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgerat lscrasqsvrgrylawyqqkpgqaprll iygassratgipdrfsgsgsgtdftlt isrlpedfavfycqqygssprtfgggtkvei k [SGGGG]_n EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv gdrvtitcrasqdvstavawyqqkpgkapkll iysasflysgvpsrfs gsgsgtdftlt isslqpedfatyycqqylyhpat fgggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：229）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：330）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：331）に

対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：332）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0105】

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv
gdrv
titcrasqdvstavawyqqkpgkapk lliysasf llysgvpsr fsgsgsgtdft lti ss lqpedfatyycqqylyhpatf g
ggtkveik [SGGGG]_n EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSW IHWVRQAPGKGLEWVAW I SPYGGSTYYAD
SVKGRFT I SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsas
vgdrv titcrasqsisrylnwyqlkpgkapr lliygass lqsgvpsr fsgsgsgaeft lti ss lqpediatyycqhtraf
ggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：230）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：333）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：334）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：335）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

h) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSW IHWVRQAPGKGLEWVAW I SPYGGSTYYADSVKGRFT I SADTS
KNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasv
gdrv titcrasq
sisrylnwyqlkpgkapr lliygass lqsgvpsr fsgsgsgaeft lti ss lqpediatyycqhtraf ggtkveik [SGGGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AAYSTAYMELRSLRSED TAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasv
gdrv titcrasqdvstavawyqqkpgkapk lliysasf llysgvpsr fsgsgsgtdft lti ss lqpedfatyycqqylyhpatf
ggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：231）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：336）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号：337）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗PD-L1 MAbアテゾリズマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号：338）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0106

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0106】

5.3抗RANKL-抗CTLA4ジアボディ

また別に、二重特異性構築物は、抗RANKL抗原結合分子および抗CTLA4抗原結合分子を含み、その代表的な例は、以下から選択される配列を含むか、前記から成るか、または本質的に前記から成る：

a) EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN}
^{KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlsc}
^{rasqsvgssylawyqqkpgqaprllygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsspwtfgggt}
<sup>kveik [SGGGG]_n QVQLVES^{GGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN}
^{SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspge}
^{ratlscrasqsvrgrylawyqqkpgqaprllygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygsspr}
^{tfgggtkveik}</sup>

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:232）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:339）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:340）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:341）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

b) QVQLVES^{GGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN}
^{SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasq}
^{svrgrylawyqqkpgqaprllygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygssprtfgggtkvei}
<sup>k [SGGGG]_n EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFT}
^{ISRDN}
^{SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspge}
^{ratlscrasqsvgssylawyqqkpgqaprllygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsspw}
^{tfgggtkveik}</sup>

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:233）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:342）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:343）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:344）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 0 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 0 7 】

c) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgera
tlscrasqsvgssylawyqqkpgqaprlliygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsspwtf
gggtkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA IYYCARTGWLGPFDYWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsa
svgdrvtitcrasqsisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsfgsgsgaeftltisslqpediatyyccqhtra
fggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:234）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:345）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:346）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:347）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

d) QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTA IYYCARTGWLGPFDYWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgdrvtitcrasq
sisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsfgsgsgaeftltisslqpediatyyccqhtrafggtkveik [SG
GGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYA IHWVRQAPGQRLEWMGW I NAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRG I I I AYYFDYWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspger
atlsrasqsvgssylawyqqkpgqaprlliygafsratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygsspwtf
fggtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:235）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:348）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:349）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbイピリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:350）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

e) EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n dqmtqspsslsasvgdrvtitc
rasqsinsyldwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsfgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyystpftfgpgtk
veik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVK
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA IYYCARTGWLGPFDYWGGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspger
atlsrasqsvrgrylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqygssprt
fggtkveik

ここで、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:236）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:351）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:352）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:353）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

f) QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFQYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivltqspgtlslspgeratlscrasq
svrgrylawyqqkpgkaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavfycqqygssprtfqggtkvei
k [SGGGG]_n EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n dqmtqspsslsasv
gdrvtitcrasqsinsyldwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyystpft
fgpgtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:237）に対応し、

小文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:354）に対応し、

大文字通常表示は、抗RANKL MAbデノスマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:355）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:356）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0108

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0108】

g) QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDTA
ASTAYMELRSLRSEDTAIYYCARDSSNMVRGIIIAIYFYDWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n dqmtqspsslsasv
gdrvtitcrasqsinsyldwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyystpftfg
pgtkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFQYWGQGLTVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsas
vgdrvtitcrasqsinsyldwyqqkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsqsgsgtaeftltisslqpediatyyccqhtraf
gqgtkveik

ここで、

大文字通常表示は、EP1257648で開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:238）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:357）に対応し、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:358）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:359）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

h) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLLVTVSS [SGGGG]_n eivmtqspsslsasvgdrvtitcrasq
sisrylnwyqlkpgkaprlliygasslqsgvpsrfsqsgsgaeftltisslqpediatyycqhtrafgggtkveik [SG
GGG]_n QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYDFSNYAIIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKFSQKFQGRITVTRDT
AASTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDSSNMVRGIIIAYYFDYWGQGTLLVTVSS [SGGGG]_n diqmtqspsslsasvgdr
vtitcrasqsinsyldwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftltisslqpedfatyycqqyystpftf
gpgtkveik

ここで、

大文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:239）に対応し、

小文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:360）に対応し、

大文字通常表示は、EP1257648に開示される抗RANKL抗体の別の実施態様の可変重鎖アミノ酸配列（配列番号:361）に対応し、

小文字下線付き表示は、抗CTLA4 MAbトレメリムマブの可変軽鎖アミノ酸配列（配列番号:362）に対応し、

[SGGGG]_nの各出現は可撓性リンカーであり、ここで、n=1、2、3、または4であり、好ましくは第一および第三の可撓性リンカーの場合はn=1で、第二の可撓性リンカーの場合にはn=3である。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2018/050557			
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPOQUE - PATENW (WIAP, EPODOC, full text English language databases) and MEDLINE; STN - CAPLUS, BIOSIS and EMBASE Databases; Internal Databases of IP Australia, Patentscope, PubMed and Worldwide databases of Espacenet. Keywords - RANK, RANKL, NF-KB, CTLA-4, PD-1, PD-L1, Immune checkpoint, checkpoint blockade, antagonize, reduce and like terms. THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH, DOUGALL, Bill, TENG, Michele, AHERN, Elizabeth, SMYTH, Mark					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
Documents are listed in the continuation of Box C					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex					
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search 13 August 2018		Date of mailing of the international search report 13 August 2018			
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au		Authorised officer Johanna Lowery AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832968			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2018/050557
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMYTH, M. J. et al "Combination Anti-CTLA-4 and Anti-RANKL in Metastatic Melanoma." Journal of Clinical Oncology, Vol. 34, No. 12, Page e104-e106. April 20 2016. Case Reports especially	1-110 and 113-124
X	WO 2011/017294 A1 (SCHERING CORPORATION et al) 10 February 2011 p51, line 3-33, p35, line 3-7, p36, line 16-22, p56-60, p72-73, p89-90, p60, line 6-16 and p84	1-110 and 113-124
X	TAEKO HAYAKAWA et al "Enhanced anti-tumor effects of the PD-1/PD-L1 blockade by combining a highly absorptive form of NF-κB/STAT3 inhibitor curcumin." Journal for Immunotherapy of Cancer, Vol 2(sup 3), page 210. 2014. Whole Document	1-7, 10-35, 39-40, 43-72, 75-84, 86-96 and 98-124
A	US 2015/0307620 A1 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 29 October 2015 claims especially	1-124
A	WO 2016/166139 A1 (EBERHARD KARLS UNIVERSITAT TUBINGEN) 20 October 2016 Claims especially	1-124
X	WO 2016/028672 A1 (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 25 February 2016 claims and P114, line 29-33	1-109, 113-124
A	ALOK C. BHARTI et al "Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Receptor Activator of NF-κB Ligand-Induced NF-κB Activation in Osteoclast Precursors and Suppresses Osteoclastogenesis." The Journal of Immunology, Vol. 172, page 5940-5947. 2004. Abstract especially	1-124
A	JOHNSON, D. B. et al "Immune Checkpoint Inhibitors in Challenging Populations." Cancer, Vol. 123, page 1904-1911. 1 June 2017. Abstract especially	1-124
A	TEELE KUUSK et al. "Antiangiogenic therapy combined with immune checkpoint blockade in renal cancer." Angiogenesis, Vol. 20, Iss. 2, page 205-215. May 2017. Abstract especially	1-124
P,X	WO 2018039022 A1 (LAM THERAPEUTICS, INC.) 01 March 2018 claims and [134]-[138]	1-9, 11, 13, 27-29, 33-36, 39-43, 87-90, 92-97, 100-101, 107-110, 113-117 and 119-124
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (January 2015)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2018/050557	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2011/017294 A1	10 February 2011	WO 2011017294 A1	10 Feb 2011
		AR 077709 A1	14 Sep 2011
US 2015/0307620 A1	29 October 2015	US 2015307620 A1	29 Oct 2015
WO 2016/166139 A1	20 October 2016	WO 2016166139 A1	20 Oct 2016
WO 2016/028672 A1	25 February 2016	WO 2016028672 A1	25 Feb 2016
		AR 103492 A1	17 May 2017
		AU 2015305770 A1	09 Mar 2017
		BR 112017003194 A2	28 Nov 2017
		CA 2957275 A1	25 Feb 2016
		CL 2017000311 A1	18 Aug 2017
		CN 107001470 A	01 Aug 2017
		CR 20170059 A	28 Apr 2017
		DO P2017000047 A	15 May 2017
		EA 201790403 A1	30 Jun 2017
		EP 3182999 A1	28 Jun 2017
		JP 2017532059 A	02 Nov 2017
		KR 20170043589 A	21 Apr 2017
		MD 20170031 A2	31 Jul 2017
		MX 2017002230 A	09 May 2017
		PE 02882017 A1	05 Apr 2017
		PH 12017500297 A1	17 Jul 2017
		SG 11201701090V A	30 Mar 2017
		TW 201613979 A	16 Apr 2016
		US 2017267759 A1	21 Sep 2017
US 2017290914 A1	12 Oct 2017		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(January 2015)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2018/050557	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2018039022 A1	01 March 2018	WO 2018039022 A1	01 Mar 2018
		TW 201811335 A	01 Apr 2018
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(January 2015)</p>			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
	C 0 7 K 16/24	Z N A
	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/46	

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

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ダウガル ビル
オーストラリア 4 0 0 6 クイーンズランド ハーストン ハーストン ロード 3 0 0

(72)発明者 テン ミシェル
オーストラリア 4 0 0 6 クイーンズランド ハーストン ハーストン ロード 3 0 0

(72)発明者 アハーン エリザベス
オーストラリア 4 0 0 6 クイーンズランド ハーストン ハーストン ロード 3 0 0

(72)発明者 スミス マーク
オーストラリア 4 0 0 6 クイーンズランド ハーストン ハーストン ロード 3 0 0

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA44
4C084 AA17 MA02 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC751
4C085 AA14 BB01 BB17 BB33 BB34 BB36 BB37 BB41 BB43 CC23
EE03 GG02
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74