

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7395471号
(P7395471)

(45)発行日 令和5年12月11日(2023.12.11)

(24)登録日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15		
請求項の数 23 (全129頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2020-521372(P2020-521372)	(73)特許権者	518210384
(86)(22)出願日	平成30年10月15日(2018.10.15)		オーセ イミュノセラピューティクス
(65)公表番号	特表2020-536573(P2020-536573 A)		OSE IMMUNOTHERAPEUTICS
(43)公表日	令和2年12月17日(2020.12.17)		フランス、44200 ナント、ブルヴァール ベノニ ゴーリン、22
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/078082		22, boulevard Benon
(87)国際公開番号	WO2019/073080		iGoullin, 44200 Na
(87)国際公開日	平成31年4月18日(2019.4.18)		ntes, France
審査請求日	令和3年10月8日(2021.10.8)	(74)代理人	100091683
(31)優先権主張番号	17306396.7		弁理士 吉川 俊雄
(32)優先日	平成29年10月13日(2017.10.13)	(74)代理人	100179316
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 市川 寛奈
		(72)発明者	ボワリエ, ニコラス
			フランス国 44119 トライリエール
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改変抗S I R P a抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) H C D R 1、H C D R 2、ならびにH C D R 3を含む重鎖可変ドメイン、及び
- b) L C D R 1、L C D R 2、ならびにL C D R 3を含む軽鎖可変ドメイン

を含み、

- a) 前記H C D R 1が、配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記H C D R 2が、配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記H C D R 3が、配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 1が、配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 2が、配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 3が、配列番号23に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり
- 、あるいは、

- b) 前記H C D R 1が、配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記H C D R 2が、配列番号16に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記H C D R 3が、配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 1が、配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 2が、配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記L C D R 3が、配列番号23に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり
- 、あるいは、

- c) 前記H C D R 1が、配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、

- 前記 H C D R 2 が、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 H C D R 3 が、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 L C D R 1 が、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 L C D R 2 が、配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 L C D R 3 が、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり

、あるいは、

- d) 前記 H C D R 1 が、配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 H C D R 2 が、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 H C D R 3 が、配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 1 が、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 2 が、配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 3 が、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり

10

、あるいは、

- e) 前記 H C D R 1 が、配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 前記 H C D R 2 が、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 H C D R 3 が、配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 1 が、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 2 が、配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - 前記 L C D R 3 が、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、

20

重鎖定常ドメインまたは少なくとも C_H1 ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤機能的断片、及びその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は 5 0 ~ 3 0 0 アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号 7 4 の 3 5 番目から 1 4 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 5 の 1 9 番目から 1 2 7 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 5 の 1 3 3 番目から 2 2 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 6 の 3 5 番目から 1 3 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 6 の 1 4 2 番目から 2 3 0 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 8 の 9 3 番目から 2 5 4 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

30

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5 および配列番号 8 8 からなる群から選択される 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を共有する、二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

前記免疫療法剤機能的バリエーションまたは前記免疫療法剤機能的断片は、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L の細胞外ドメインを含むかまたはそれからなる、請求項 1 に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

抗 S I R P a アンタゴニスト抗体であり、ヒト C D 4 7 のヒト S I R P a に対する結合を阻害する、請求項 1 または 2 に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 4】

ヒト S I R P g に特異的に結合せず、ヒト C D 4 7 のヒト S I R P g に対する結合を阻害せず、ヒト T 細胞の増殖及び/又は活性化を阻害せず、好ましくは増加させる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 5】

- 配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、ならびに配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

50

- 配列番号 3 1、配列番号 3 2、ならびに配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメインを含み、
特に、

- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、ならびに配列番号 3 0、特に配列番号 2 9、配列番号 3 0、より詳しくは配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン

を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 6】

- 配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインまたは

- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

20

または

- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

30

または

- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

40

または

- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

50

または

- 配列番号 28 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

10

または

- 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

20

または

- 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 7】

前記免疫療法剤が、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 85、及び配列番号 88 からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

30

【請求項 8】

重鎖が、好ましくは配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、GGG、GGS、及び配列番号 93 からなる群から選択されるリンカー配列によって前記免疫療法剤に連結されている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 9】

前記免疫療法剤が、前記二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片の前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片の C 末端に連結されている、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 10】

前記二機能性抗ヒト S I R P a 抗体がヒト化モノクローナル抗体であり、特に抗体軽鎖定常ドメインが、ヒトカッパ軽鎖定常ドメインに由来し、より詳しくは前記抗体軽鎖定常ドメインが配列番号 35 の配列からなり、及び/または抗体重鎖定常ドメインが、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、もしくは IgG4 重鎖定常ドメイン、特にヒト IgG4 重鎖定常ドメインに由来し、より詳しくは前記抗体重鎖定常ドメインが配列番号 34 の配列からなる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 11】

- 配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 85、ならびに配列番号 8

50

- 配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にその C 末端で連結されている、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にその C 末端で連結されている、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にその C 末端で連結されている、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にその C 末端で連結されている、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖

を含む、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 2】

- 配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 8、ならびに配列番号 1 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 5、ならびに配列番号 1 7 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 2、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 2、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 9、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 9、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

10

20

30

40

50

または

- 配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

10

または

- 配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 3、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 3、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

20

または

- 配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

30

または

- 配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 7、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖

または

- 配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 7、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖

40

を含む、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 3】

P D 1、P D L 1、C D 8 0、及び 4 - 1 B B L バリエーションからなる群から選択される前記免疫療法剤機能的バリエーションが、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、及び配列番号 8 8 からなる群から選択される 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を共有する、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 4】

医薬として使用するための、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト

50

S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片、または、

配列番号 3 のアミノ酸配列と、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドとを含むかまたはそれからなる線形エピトープに特異的に結合され、特に、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒト S I R P a アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくとも C_H1 ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は 5 0 ~ 3 0 0 アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号 7 4 の 3 5 番目から 1 4 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 5 の 1 9 番目から 1 2 7 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 5 の 1 3 3 番目から 2 2 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 6 の 3 5 番目から 1 3 5 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 6 の 1 4 2 番目から 2 3 0 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号 7 8 の 9 3 番目から 2 5 4 番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5 および配列番号 8 8 からなる群から選択される 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を共有し、

前記二機能性抗ヒト S I R P a アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒト C D 4 7 のヒト S I R P a に対する結合を阻害し、ヒト S I R P g に特異的に結合せず、特にヒト T 細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはヒト C D 4 7 のヒト S I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくはヒト P B M C ならびに/もしくは T 細胞による T N F a の分泌を増加させ、及び/もしくはヒト P B M C による I F N g の分泌を増加させ、及び/もしくはヒトマクロファージによる M I P 1 a の分泌を増加させ、及び/もしくは前記ヒト T 細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 1 5】

がん、特に炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有するがん、特に浸潤性の M D S C ならびに/または T A M 細胞を有するがん、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患、特にシュードモナス (P s e u d o m o n a s) ならびに C M V、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、I I 型糖尿病、及び移植機能障害からなる群から選択される疾患の予防もしくは処置における請求項 1 4 に記載の使用、またはワクチン接種での使用のための、

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片、または

配列番号 3 のアミノ酸配列と、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドとを含むかまたはそれからなる線形エピトープに特異的に結合され、特に、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒト S I R P a アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくとも C_H1 ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションから

10

20

30

40

50

なる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は50～300アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号74の35番目から145番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の19番目から127番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の133番目から225番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の35番目から135番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の142番目から230番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号78の93番目から254番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85および配列番号88からなる群から選択される1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を共有し、

10

前記二機能性抗ヒトSIRPαアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒトCD47のヒトSIRPαに対する結合を阻害し、ヒトSIRPβに特異的に結合せず、特にヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはヒトCD47のヒトSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはヒトPBMCならびに/もしくはT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくは前記ヒトT細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒトSIRPα抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項16】

20

がん、特に炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有するがん、特に浸潤性のMDS Cならびに/またはTAM細胞を有するがんの予防もしくは処置における請求項15に記載のその使用のための、

請求項1から13のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒトSIRPα抗体またはその抗原結合性断片、または、

配列番号3のアミノ酸配列と、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5および配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドを含むかまたはそれらからなる線形エピトープに特異的に結合され、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒトSIRPαアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

30

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくともC_H1ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は50～300アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号74の35番目から145番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の19番目から127番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の133番目から225番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の35番目から135番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の142番目から230番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号78の93番目から254番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

40

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85および配列番号88からなる群から選択される1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を共有し、

前記二機能性抗ヒトSIRPαアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒトCD47のヒトSIRPαに対する結合を阻害し、ヒトSIRPβに特異的に結合せず、特にヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくは前記ヒトCD47の前記ヒトSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはヒトPBMCならびに

50

ノもしくはT細胞によるTNF α の分泌を増加させ、及びノもしくは前記ヒトPBMCによるIFN γ の分泌を増加させ、及びノもしくはヒトマクロファージによるMIP1 α の分泌を増加させ、及びノもしくは前記ヒトT細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒトSIRP α 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項17】

前記二機能性抗ヒトSIRP α 抗体またはその抗原結合性断片が、SIRP α 陽性腫瘍を提示する患者に投与される、請求項16に記載のその使用のための、

請求項1から13のいずれか一項に記載の二機能性抗ヒトSIRP α 抗体またはその抗原結合性断片、または、

配列番号3のアミノ酸配列と、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5および配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドを含むかまたはそれからなる線形エピトープに特異的に結合され、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒトSIRP α アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくともC_H1ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は50～300アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号74の35番目から145番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の19番目から127番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の133番目から225番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の35番目から135番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の142番目から230番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号78の93番目から254番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85および配列番号88からなる群から選択される1つのアミノ酸配列と少なくともとも90%の同一性を共有し、

前記二機能性抗ヒトSIRP α アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒトCD47のヒトSIRP α に対する結合を阻害し、ヒトSIRP γ に特異的に結合せず、特にヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及びノもしくは前記ヒトCD47の前記ヒトSIRP γ に対する結合を阻害せず、及びノもしくはヒトPBMCならびにノもしくはT細胞によるTNF α の分泌を増加させ、及びノもしくは前記ヒトPBMCによるIFN γ の分泌を増加させ、及びノもしくはヒトマクロファージによるMIP1 α の分泌を増加させ、及びノもしくは前記ヒトT細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒトSIRP α 抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項18】

請求項1から13のいずれか一項に記載の二機能性抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸分子または単離された核酸分子の群。

【請求項19】

請求項18に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項20】

請求項18に記載の核酸分子または単離された核酸分子の群、及びノまたは請求項19に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

【請求項21】

請求項1から13のいずれか一項に記載の少なくとも1つの二機能性抗ヒトSIRP α 抗体またはその抗原結合性断片；及びノまたは、

配列番号3のアミノ酸配列と、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5およ

10

20

30

40

50

び配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドとを含むかまたはそれからなる線形エペトープに特異的に結合され、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒトSIRPaアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくともC_H1ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は50～300アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号74の35番目から145番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の19番目から127番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の133番目から225番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の35番目から135番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の142番目から230番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号78の93番目から254番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85および配列番号88からなる群から選択される1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を共有し、

前記二機能性抗ヒトSIRPaアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒトCD47のヒトSIRPaに対する結合を阻害し、ヒトSIRPgに特異的に結合せず、特にヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトCD47の前記ヒトSIRPgに対する結合を阻害せず、ならびに/もしくはヒトPBMCならびに/もしくはT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、ならびに/もしくはヒトマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトT細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片；及び/または

請求項18に記載の単離された核酸分子または単離された核酸分子の群；及び/または
請求項19に記載のベクター；及び/または

請求項20に記載の細胞；及び
薬学的に許容される担体
を含む医薬組成物。

【請求項22】

請求項1から13のいずれか一項に記載の少なくとも1つの二機能性抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片；及び/または、

配列番号3のアミノ酸配列と、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5および配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも別のペプチドとを含むかまたはそれからなる線形エペトープに特異的に結合され、特に、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合される二機能性抗ヒトSIRPaアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片であって、

抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインもしくは少なくともC_H1ドメインを含むその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたは前記その断片が、免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤機能的断片、ならびにその免疫療法剤機能的バリエーションからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、前記免疫療法剤機能的断片は50～300アミノ酸残基からなり、かつ、配列番号74の35番目から145番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の19番目から127番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号75の133番目から225番目のアミノ酸残

10

20

30

40

50

基のアミノ酸配列、または配列番号76の35番目から135番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号76の142番目から230番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列、または配列番号78の93番目から254番目のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むかまたはそれらからなり、

前記免疫療法剤機能的バリエーションは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85および配列番号88からなる群から選択される1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を共有し、

前記二機能性抗ヒトSIRPaアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片は、ヒトCD47のヒトSIRPaに対する結合を阻害し、ヒトSIRPgに特異的に結合せず、特にヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトCD47の前記ヒトSIRPgに対する結合を阻害せず、ならびに/もしくはヒトPBMCならびに/もしくはT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、ならびに/もしくはヒトマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ならびに/もしくは前記ヒトT細胞の活性化を増加させる、二機能性抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片；及び/または

請求項18に記載の単離された核酸分子または単離された核酸分子の群；及び/または請求項19に記載のベクター；及び/または

請求項20に記載の細胞；及び

化学療法剤、放射線療法剤、細胞療法剤、免疫療法剤、抗生物質、プロバイオティクス、治療ワクチン、特に適応免疫細胞、特にTならびにBリンパ球の免疫チェックポイント遮断剤もしくは活性化剤、ならびに抗体-薬物コンジュゲートからなる群から選択される第2の治療剤

を含む組合せ産物。

【請求項23】

前記二機能性抗ヒトSIRPaアンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片、または前記単離された核酸分子または単離された核酸分子の群、または前記ベクター、または前記細胞、及び前記第2の治療剤が、個別、連続的、または組合せ治療のために、特に組合せまたは連続的使用のために製剤化される、請求項22に記載の組合せ産物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫療法の分野に関する。本発明は、二機能性であり、免疫応答を特異的に増強することができる免疫療法剤に連結された新規改変抗SIRPa抗体及びその使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

適応免疫の免疫チェックポイントの標的化は、多数の疾患、特にがんと闘うために大きい治療有効性を示しているが、患者集団は限定される。自然骨髄系細胞（マクロファージ、樹状細胞、MDS C、PMN）に対する免疫チェックポイントは、あまり研究されていないが、これらの細胞は、多くの固形腫瘍における最も数が多い免疫細胞型を表し、しばしば、予後不良に関連している。自然免疫応答（骨髄系細胞によって媒介される）ならびに適応免疫応答（T細胞によって媒介される）の両方を標的とする免疫チェックポイント治療を組み合わせることは、前臨床モデルでは高い有効性を証明したが、臨床ではなおも課題である。

【0003】

本発明は、免疫療法剤を抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片の重鎖にグラフトした場合に有効性の増強を示すが、抗SIRPa抗体の軽鎖にグラフトした場合には有効性の増強を示さない独自の構造を有する二機能性抗SIRPa抗体または抗原結合性断片を開示する。本明細書において、本発明者らは、i) SIRPa-CD47相互作用に拮抗するが（骨髄系細胞に対するブレーキを放出する）、SIRPgには特異的に結合せず

10

20

30

40

50

(有効なT細胞活性化ならびに接着にとって必要なSIRP α -CD47相互作用に影響を及ぼさない)、同時にi)PD1/PDL1またはCTLA-4/CD80またはCD80/PDL1軸の阻害を通してT細胞の活性化ならびに/または増殖を誘導する、及び4-1BB/4-1BBLまたはCD80/CD28シグナルを強化する(強力な適応免疫応答、特に抗腫瘍応答を誘導する、ならびに/または長寿命のメモリーT細胞を誘導する)ことが可能である、改変抗SIRP α 抗体、特にヒト化抗体を提供する。

【0004】

他の抗体または個別にもたらされる抗体の組合せと比較すると、本発明に従う化合物の効果は、骨髄系細胞に関して、及びT細胞の活性化ならびに/または増殖に関して増強される。

【0005】

特定の構造が、分子にその標的に対する予想外の効率を与え、より大きい臨床有効性ならびにより低い治療コストに関する興味深い潜在性を示唆している。

【0006】

シグナル制御性タンパク質アルファ、またはSIRP α (SIRP α 、CD172a、またはSHPS-1とも呼ばれる)は、単球、組織マクロファージのほとんどの亜集団、顆粒球、リンパ系組織における樹状細胞のサブセット、一部の骨髄前駆細胞、ならびに様々なレベルでニューロンにおいて発現されるが、特に脳のシナプスに富む領域において高度に発現される。骨髄系細胞によって発現されるSIRP α と、ほとんどの健康な細胞によって低レベルで広く発現されるが一部のがん細胞では過剰発現される、遍在する受容体CD47との相互作用は、骨髄系機能の調節に関係する自然応答の重要な免疫チェックポイントである。CD47はSIRP α と相互作用して、食作用を有するマクロファージに対して「食べないで」というシグナルを伝達し、それによって標的細胞は影響を受けないままとなる。SIRP α /CD47経路は、今日ではマクロファージの食作用を増強するための異なる医薬品開発の対象である。CD47を標的とする作用剤を介したCD47/SIRP α 経路の遮断は、マクロファージによる抗体依存性食作用を増強することによって、トラスツズマブ(抗Her2)、セツキシマブ(抗EGFR)、リツキシマブ(抗CD20)、ならびにアレムツズマブ(抗CD52)などの枯渇性治療的抗がん抗体と相乗効果を示すことが記載されている。

【0007】

しかし、最近では、CD47を標的とする作用剤(抗CD47またはSIRP α -Fc)が、CD47の生理的役割に関連する血液毒性(貧血または血小板減少症)を呈することが示されている。その上、CD47はまた、SIRPファミリーの別のメンバー、すなわちヒトT細胞の表面に存在するが、ヒト骨髄系細胞には存在しないSIRP-ガンマ(SIRP γ 、SIRP γ 、CD172g、またはSIRPベータ2とも呼ばれる)とも結合する。SIRP γ は、ほぼ3500万年前に旧世界霊長類においてSIRP β 遺伝子が複製された結果であり、SIRP α が骨髄系細胞において発現されるのに対し、SIRP γ は、Tリンパ球において限定的に発現される。SIRP γ は、マウスには存在しない。SIRP γ -CD47相互作用は、細胞-細胞接着を媒介し、スーパー抗原依存的T細胞媒介性増殖を増強し、T細胞活性化を同時刺激することが示されている(Picciolet al., Blood, 105:6, 2005)。SIRP α とSIRP γ との間の、特にCD47と相互作用する領域における配列の高い類似性により、先行技術において開示された抗SIRP α 抗体もまたSIRP γ に結合し、ヒトにおいて不適当な作用、例えばT細胞増殖の阻害ならびに免疫応答の減少を有する。抗CD47または非選択的抗SIRP α 抗体のそのような副作用は、公知の抗体の試験が、SIRP γ 遺伝子を有しないマウスモデルにおいて実施されており、そのためそのような副作用が存在しないことから予想できなかった。

【0008】

免疫細胞の活性化は、同時刺激シグナルならびに同時阻害シグナルのバランスの統合によって支配される。T細胞受容体(TCR)媒介性T細胞活性化は、同時刺激シグナルな

10

20

30

40

50

らびに同時阻害シグナルの両方によって調節される。抗原非依存性の二次シグナルは、抗原性ペプチド - MHC複合体とTCRとの相互作用によって提供される一次シグナルを改変し、これは応答に対して特異性を与える。T細胞の同時刺激ならびに同時阻害経路は、エフェクター、メモリー、ならびに制御性T細胞、及びナイーブT細胞を制御する広い免疫制御機能を有する。それらの経路の治療的調節は、がんを処置するための有効な新規戦略となる（総説に関しては、Schilberg et al., 44(5), *Immunity*, 2016を参照されたい）。この二次シグナルは、2つのタイプの分子、すなわちIgスーパーファミリー（例えば、LAG3、CD226 - TIGIT - CD96）ならびにTNF - TNF受容体スーパーファミリーによって媒介される。T細胞活性化は、TCRによる抗原の認識（一次シグナル）、次に抗原提示細胞によって発現されるCD80ならびにCD86分子に結合するT細胞によって発現されるCD28同時刺激分子によって主に媒介される同時刺激シグナル（二次シグナル）によって開始される。

10

【0009】

これらの2つのシグナルはT細胞活性化を誘導すると同時に、誘導性の同時刺激ならびに同時阻害分子の発現を誘導し、これは既に抗原を経験しているならびに/またはメモリーTリンパ球の活性化の閾値を決定する。OX40のOX40リガンド（OX40L）との相互作用、ICOSのICOSリガンド（ICOSL）との相互作用、ならびに4-1BBの4-1BBリガンド（4-1BBL）との結合は、誘導型の同時刺激分子の主要な起源である。同時に、誘導型CTLA-4とCD80ならびにCD86（CD28である同じリガンド）との結合、及び誘導型PD-1とPD-L1またはPD-L2との結合は、過剰な活性化に対抗するための免疫細胞阻害の主要な起源である。今日まで、CD80とPDL-1の間の相互作用ならびにICOSLとCD28またはCTLA-4との間の相互作用はヒトにおいて記載されてきたことから、この経路間の相互接続は、所定の分子の解釈を複雑にする。

20

【0010】

PD1は、活性化T細胞に限って発現され、PDL1は、免疫系、上皮細胞ならびに内皮細胞を含む多くの細胞タイプにおいて発現され得る。PD1は、2つのリガンド、すなわちPDL1ならびにPDL2を有し、PDL2に対する親和性がより良好である。PD1は、ヒトPBMCにおいて発現される4つのスプライスバリエントを有する。これらのスプライスバリエントの多くの機能はなおも不明であるが、膜貫通部分を欠損している可溶性バリエントは、自己免疫疾患に関係し、炎症性疾患において検出される（Nielsen et al., *Cell Immunol*, 2005, 235: 109~116頁; Ueda et al., *Nature*, 2003, 423: 506~511頁; Wan et al., *J. Immunol*, 2006, 177: 8844~8850頁）。可溶性PD1をワクチンベクターに含めると、おそらくそのリガンドに結合してPD1シグナル活性化を阻害することによってワクチンの有効性を改善する。PD1のライゲーションは、T細胞におけるTCR刺激の下流のシグナルを低減させ、T細胞応答を阻害し、活性化の減少ならびにサイトカイン産生の減少をもたらす。抗PD1または抗PDL1を使用して相互作用を破壊する戦略はいずれも、がん治療において成功した（Brahmer et al., *N Eng J Med*, 366(26), 2012; Powles et al., *Nature*, 515(7528), 2014; Topalian et al., *N Eng J Med*, 366(26), 2012; Ansell, *Curr Opin Hematol*, 22(4), 2015）。

30

40

【0011】

PDL1は、他のPD1リガンドであるPDL2より広く発現される。PDL1は、多様な造血ならびに非造血細胞によって発現される。組織におけるその発現は、T細胞応答の局所的な制御を可能にする。炎症促進性の刺激は、PDL1発現を誘導して、組織におけるT細胞応答を下流で調節し、免疫の攻撃による腫瘍の免疫媒介性の損傷から組織を保護する。腫瘍ならびに慢性感染症を引き起こす微生物は、免疫防御を回避するために同時阻害経路を利用している。

50

【0012】

免疫応答の制御に関する進行中の試験によって、がん治療の開発の標的となり得る複数の他の免疫経路が同定された。それらの分子を本明細書において、免疫チェックポイント同時活性化剤または同時阻害剤と呼び、例えばCTLA4、CD28、CD80、CD86、OX40、OX40L、ならびに4-1BB、4-1BBL（総説に関しては、Sharma et al., Cell, 161(2), 2015ならびにPardoll, Nature Reviews Cancer, 12(4), 2012を参照されたい）である。

【0013】

T細胞におけるCD80(B7-1)ならびにCD86(B7-2)の役割もまた、免疫応答のダウンレギュレーションに寄与し得る。抗原提示細胞(APC)上のCD80ならびにCD86は、T細胞同時刺激分子として良好に認識された役割を有するが、T細胞におけるCD80ならびにCD86発現の機能的な重要性は、十分に理解されていない。CD86は、一部の休止T細胞において構成的に発現されるが、CD80は、休止T細胞には存在しない。いずれの分子もT細胞においてアップレギュレートされ得る。腫瘍はB7分子を発現せず、免疫系の制御を回避することができる。CD80ならびにCD86は、CD28より良好なアビディティでCTLA4に結合し、これは最終的に競合ならびに負のシグナル伝達によってCD28の同時刺激を減弱させるかまたは防止する。CD28の同時刺激は、T細胞活性化にとって極めて重要であることから、CD28/CD80/CD86の遮断を介した免疫制御は、移植の状況において不適切なT細胞活性化を防止するために、ならびにT細胞媒介性自己免疫疾患をおそらく処置するためにも有望なアプローチである(Crepeau et al., Expert Opin Biol Ther. 2017; 17(8): 1001~1012頁)。

【0014】

ICOSL、OX40L、ならびに4-1BBLはそれぞれ、同時刺激分子ICOS、OX40、ならびに4-1BBのリガンドであり、前臨床腫瘍モデルにおいて評価され、臨床ではがん患者において評価されている新規免疫チェックポイント剤である。ICOSLは、T細胞増殖ならびにサイトカイン産生の同時刺激シグナルとして作用し、B細胞の増殖ならびに形質細胞への分化を誘導し、炎症状態に対する局所組織応答の媒介において、ならびにメモリーT細胞機能の同時刺激による二次免疫応答の調節において重要な役割を果たし得る。OX40のそのリガンドOX40Lへの結合は、抗原特異的T細胞の増大ならびに生存において重要な役割を果たす。OX40は、抗原活性化後の早期にTリンパ球において主に発現されるが、OX40Lは、急性炎症環境内の活性化抗原提示細胞ならびに内皮細胞において発現される。OX40シグナル伝達の調節ならびに/または異なるT細胞サブセットの欠失は、自己免疫のための免疫抑制ならびに抗がん治療のための免疫刺激の両方を媒介する可能性を有する(Willoughby et al., Mol. Immunol., 2017 Mar; 83: 13~22頁)。

【0015】

OX40Lならびに4-1BBLは、TNFリガンドスーパーファミリーのメンバーであり、公知の可溶性型を有しない膜リガンドである。4-1BBLは、骨髄系、リンパ系、ならびに間質細胞において発現され、TNF受容体ファミリーのメンバーである4-1BB(CD137)に結合する。4-1BBまたは4-1BBLの標的化は、自己免疫疾患またはウイルス感染症などの、同様にがんを含む多くの臨床状態において重要な意味を有する(Wang et al., Immunol. Rev., 2009: 229(1): 192~215頁)(総論に関しては、Vinay et al., Expert Opin Ther Targets. 2016; 20(3): 361~73頁を参照されたい)。4-1BB媒介性の抗がん作用は、それが細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の活性化を誘導する能力、中でも多量のIFN- γ を誘導する能力に基づいている。4-1BB受容体は、Foxp3+ Tregならびに樹状細胞を含む複数の細胞において、低レベルではあるが構成的に発現されている。CD4+ならびにCD8+T細胞は、同等のレベルで4

10

20

30

40

50

- 1 B Bを発現するが、活性化されると、4 - 1 B Bを通してのシグナルは、in v i t r oならびにin v i v oの両方でC D 8 + T細胞へと偏向する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【文献】Piccio et al., Blood, 105:6, 2005

【文献】Schildberg et al., 44(5), Immunity, 2016

【文献】Nielsen et al., Cell Immunol, 2005, 235: 109~116頁

【文献】Ueda et al., Nature, 2003 423:506~511頁

10

【文献】Wan et al., J. Immunol, 2006, 177:8844~8850頁

【文献】Brahmer et al., N Eng J Med, 366(26), 2012

【文献】Powles et al., Nature, 515(7528), 2014

【文献】Topalian et al., N Eng J Med, 366(26), 2012

【文献】Ansell, Curr Opin Hematol, 22(4), 2015

【文献】Sharma et al., Cell, 161(2), 2015

【文献】Pardoll, Nature Reviews Cancer, 12(4), 2012)

【文献】Crepeau et al., Expert Opin Biol Ther. 2017; 17(8):1001~1012頁

20

【文献】Willoughby et al., Mol. Immunol., 2017 Mar; 83:13~22頁

【文献】Wang et al, Immunol. Rev., 2009:229(1):192~215頁

【文献】Vinay et al., Expert Opin Ther Targets . 2016; 20(3):361~73頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

30

腫瘍微小環境内での免疫抑制性ならびに低刺激性骨髄系細胞の蓄積は、T細胞応答の効率を制限し、免疫療法、特にCTLA-4またはPD-1/PD-L1などの免疫チェックポイントを標的とする療法の有効性を制限する。しかし、同時に、主に腫瘍の微小環境内では同時刺激が存在しないこと、ならびに/または腫瘍細胞もしくは抗原提示細胞によって発現されるリガンドと同時刺激分子との結合が存在しないことにより、T細胞応答が主に遮断されたままであることから、自然免疫チェックポイントを標的とする免疫療法は単独では限定的な有効性を示す。適応性(T細胞)ならびに自然(骨髄系細胞)細胞の両方の免疫チェックポイントを標的とする免疫療法の組合せは、前臨床レベルで強力な有効性を証明した。しかし、組合せ免疫療法の検証ならびに開発は、生物学的療法の費用ならびにそのような免疫療法に対する利用の制限によって強く制限されている。したがって、適応免疫応答、特にT細胞免疫応答に対して有効な正の影響を有する自然骨髄系免疫細胞を標的とする、特にがんに対する安全な免疫療法のための新規の改善された作用剤が当技術分野において有意に必要である。本発明者らは、本明細書に開示される本発明によって有意な一歩を踏み出した。

40

【課題を解決するための手段】

【0018】

本明細書において、本発明者らは、i) SIRPa-CD47相互作用に拮抗する(骨髄系細胞に対してブレーキを放出する)が、SIRPgには特異的に結合せず(有効なT細胞活性化ならびに接着にとって必要なSIRPg-CD47相互作用に影響を及ぼさない)、同時にii) PD1/PDL1またはCTLA-4/CD80またはCD80/P

50

D L 1 軸の阻害、及び 4 - 1 B B / 4 - 1 B B L または C D 8 0 / C D 2 8 シグナル（強力な適応免疫応答、特に抗腫瘍応答を誘導する、ならびに / または長寿命のメモリー T 細胞を誘導する）の強化を通して、T 細胞の活性化ならびに / または増殖を誘導することが可能である、改変抗 S I R P a 抗体、特にヒト化抗体を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明の改変抗体は、それらが特異的抗 S I R P a 作用と、抗体にグラフトされた免疫療法剤の作用とを組み合わせることから、二機能性である。

【 0 0 2 0 】

本発明の改変抗体は、特に以下の利点を有する：

- それらは、チェックポイント阻害剤ならびに同時刺激剤の相乗効果によって自然ならびに適応免疫応答を活性化する；
- それらは、C D 4 7 標的化剤（抗 C D 4 7 m A b または S I R P a - f c 組換えタンパク質）とは対照的に、S I R P a の発現が制限されている（ヒト赤血球（R B C）ならびに血小板に結合しない）ことにより血液毒性を回避する；
- それらは単剤療法において、腫瘍の成長を低減させ、腫瘍の微小環境を改変する；それらは免疫の微小環境を改変し、免疫抑制を除去することによって適応免疫応答を刺激し、がん、ワクチン戦略、感染性疾患、または外傷後において持続的で強力なメモリー T 細胞応答をもたらす；
- それらは持続的で強力な抗腫瘍メモリー T リンパ球応答を誘導する；
- それらは、ヒト T 細胞免疫応答を可能にし、S I R P a - C D 4 7 相互作用の選択的アンタゴニストであり、C D 4 7 / S I R P g 相互作用を妨害しない。

【 0 0 2 1 】

意外にも、本発明者らは、S I R P a 配列と S I R P g 配列との間の高い配列同一性にもかかわらず、及び抗体にグラフトされた一部の免疫療法剤がその機能的特性を失い得るという事実にもかかわらず、そのような選択的ならびに機能的抗体を提供する。

【 0 0 2 2 】

これらの改変抗体は、多数の治療応用にとって、特に炎症性のがんならびに浸潤性の骨髄系細胞を有する（特に浸潤性の M D S C ならびに / または T A M 細胞を有する）がんを含む、がんの処置にとって特に有望である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

【 図 1 A 】 E L I S A アッセイによる抗 S I R P 抗体の結合分析（ヒト S I R P a - H i s コーティング及び抗ヒトカップ検出）。図 1 A は、キメラ（ ）、H A L A（ ）、H F L A（*）、H F L B（+）、H E F L A（ ）、H E F L B（ ）、S I R P 2 9（ ）、K w a r 2 3（○）の固定化 S I R P a - H i s での E L I S A による評価を示す図である。顕色はロバ抗ヒト抗体によって実施され、T M B 基質を使用して 4 5 0 n m での比色分析により曝露された。E D 5 0 は、このアッセイにおいてシグナルの 5 0 % に達する示した抗体の濃度である。

【 図 1 B 】 図 1 B は、H C L A（ ）、H C L B（x）、H E L A（ ）、H E L B（-）の固定化 S I R P a - H i s での E L I S A による評価を示す図である。

【 図 1 C 】 図 1 C は、H A L B（-）、H B L A（ ）、H B L B（ ）の固定化 S I R P a - H i s での E L I S A による評価を示す図である。

【 図 1 D 】 図 1 D は、m 1 8 D 5 クローン（ ）（n = 4）、S E 5 A 5 市販クローン（ ）（n = 7）、6 G 1 0 クローン（ ）（n = 3）及び 1 2 D 7 クローン（ ）（n = 4）の結合を示す図である。

【 図 2 】 図 2 は、ヒト S I R P a 組換えタンパク質での抗 S I R P 抗体の B i a c o r e による親和性分析を示す図である。S I R P a - H i s 組換えタンパク質は、5 μ g / m l（5 0 0 R U）で C M 5 チップ上に固定化され、示した抗体が異なる濃度で添加された。値は、3 分間の会合期間（k a）に続く 1 0 分間の解離期間（k d）後に測定され、親和定数（K D）が決定された。

10

20

30

40

50

【図3A】ヒト単球での抗SIRPa抗体の結合分析(SIRPaバリエーション1のホモ接合体(v1/v1))。キメラ()、HALA()、HFLA(*)、HFLB(+)、HEFLA()、HEFLB()、SIRP29()、Kwar23(O)のヒト単球v1/v1(ヒトFc受容体結合阻害剤抗体によって事前に染色した)での細胞蛍光測定による評価。顕色はCantoIIサイトメーターでPE標識マウス抗ヒトFc mAbによって実施され、値は染色された単球のパーセンテージに対応する。ED50は、このアッセイにおいてシグナルの50%に達する示した抗体の濃度である。図3Aは、染色された単球v1/v1のパーセンテージに対応する。

【図3B】図3Bは、単球v1/v1の蛍光強度の平均(MFI)に対応する。

【図3C】フローサイトメトリー(FACS)によるヒト単球でのSIRP抗体の結合試験：異なる抗SIRPa抗体が試験された：m18D5()(n=1)、SE7C2()(n=2)、12D7()(n=2)、6G10()(n=4)。図3Cは、異なる抗体の用量応答の平均蛍光強度を表す図である。

10

【図3D】図3Dは、抗体用量応答の染色された単球のパーセンテージを表す図である。可能な場合、統計分析が実施された。

【図3E】抗hSIRPa抗体による、集団におけるSIRPaバリエーション結合：32人のボランティアにおいて異なる抗hSIRPa抗体のSIRPaバリエーションに結合する能力が、PE-抗マウスIgGによるFACSによって測定された。全てのクローンは、10µg/mlで試験された：m18D5()、12D7()、6G10()、及び市販の抗体SE5A5()、SE7C2()。図3Eは、ホモ接合体バリエーション1ボランティアを表す図である(n=16)。

20

【図3F】図3Fは、ホモ接合体バリエーション2ボランティアを表す図である(n=8)。

【図3G】図3Gは、ホモ接合体V1/V2ボランティアを表す図である(n=8)。

【図4A】SIRPaでの抗SIRPa抗体のCD47との競合。図4Aは、一定濃度のビオチン化CD47-Fc(6µg/ml)とインキュベートした異なる濃度のキメラ()、HFLA(*)、HFLB(+)、HEFLA()、HEFLB()、SIRP29()、Kwar23(O)の固定化SIRPa-HisでのELISAによる評価を示す図である。顕色はストレプトアビジンペルオキシダーゼにより実施され、CD47分子を検出し、TMB基質を使用して450nmでの比色分析により曝露された。第2の実験の結果は、IC50値によって与えられる。IC50は、このアッセイにおいてシグナルの50%を阻害する示した抗体の濃度である。

30

【図4B】図4Bは、ELISAによるSIRPa-CD47相互作用への抗SIRPa抗体のアンタゴニスト活性試験を示す図である：異なる抗SIRP抗体は用量応答を試験された：m18D5クローン()(n=1)、市販の抗体SE5A5()(n=2)及びm12D7()(n=2)。図は、抗hSIRPa抗体の用量応答中にELISAによって測定されたCD47陽性SIRPa-CD47相互作用のパーセンテージを表す。

【図5A】ヒト単球での抗SIRPa抗体のCD47との競合。一定濃度のビオチン化CD47-Fc(10µg/ml)とインキュベートした異なる濃度のキメラ()、HFLA(*)、HFLB(+)、HEFLA()、HEFLB()のヒト単球(v1/v1)でのサイトメトリーによる評価。顕色はフィコエリトリンストレプトアビジンにより実施され、CD47分子を検出し、CantoIIサイトメーターによって曝露された。IC50は、このアッセイにおいてシグナルの50%を阻害する示した抗体の濃度である。図5Aは、陽性細胞のパーセンテージに対応する。

40

【図5B】図5Bは蛍光強度の平均に対応する。

【図5C】FACSによるSIRPa-CD47相互作用への抗SIRPa抗体のアンタゴニスト活性試験：異なる抗SIRPa抗体は用量応答を試験された：m18D5クローン()(n=1)、市販の抗体SE7C2()(n=2)及びm12D7()(n=2)。図5Cは、抗hSIRPa抗体による競合後のFACSによって測定されたCD47陽性細胞のパーセンテージを表す図である。

【図6A】図6Aは、SP-Dリガンドとプレインキュベートされたまたはされなかった

50

ヒトSIRPa組換えタンパク質への抗SIRP抗体のBlitzによる親和性分析を示す図である。SIRPa-His組換えタンパク質は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でNi-NTAバイオセンサー上に固定化され、SP-Dリガンドは $100\mu\text{g}/\text{ml}$ （飽和濃度）で添加された。次いで、抗SIRPa抗体は $20\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加され、親和性値は、120秒の会合期間（ka）に続く120秒の解離期間（kd）後に推測され、親和定数（KD）が決定された。

【図6B】図6Bは、マウス18D5抗体とプレインキュベートされたヒトSIRPa組換えタンパク質への抗SIRP抗体のBlitzによる親和性分析を示す図である。SIRPa-His組換えタンパク質は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でNi-NTAバイオセンサー上に固定化され、抗SIRPa抗体は $20\mu\text{g}/\text{ml}$ （飽和濃度）で添加された。次いで、SP-Dリガンドは $100\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加され、親和性値は、120秒の会合期間（ka）に続く120秒の解離期間（kd）後に推測され、親和定数（KD）が決定された。

10

【図7A】図7Aは、ヒトSIRPb組換えタンパク質への抗SIRP抗体のBlitzによる親和性分析を示す図である。SIRPb-His組換えタンパク質は、Ni-NTAバイオセンサー上に固定化され、示した抗体は $20\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加された。値は、120秒の会合期間（ka）に続く120秒の解離期間（kd）後に推測され、親和定数（KD）が決定された。

【図7B】図7Bは、抗SIRP抗体の結合分析を示す図である（ヒトSIRPb-Hisコーティング及び抗ヒトカップ検出）。HEFLB（）、SIRP29（）、Kwar23（○）、B4B6（）及びIgG4Ab対照（）の固定化SIRPb-HisのELISAによる評価。顕色は、マウス抗体によって曝露されたB4B6を除いて、ロバ抗ヒト抗体により実施され、TMB基質を使用して450nmでの比色分析により曝露された。

20

【図8A】図8Aは、ヒトSIRPg組換えタンパク質への抗SIRP抗体のBlitzによる親和性分析を示す図である。SIRPg-His組換えタンパク質は、Ni-NTAバイオセンサー上に固定化され、示した抗体は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加された。値は、120秒の会合期間（ka）に続く120秒の解離期間（kd）後に推測され、親和定数（KD）が決定された。

【図8B】図8Bは、SIRPgへの抗SIRP抗体のELISAアッセイによる結合分析を示す図である（ヒトSIRPg-Hisコーティング及び抗ヒトカップ検出）。HEFLB（）、SIRP29（）、Kwar23（○）、LSB2-20（）及びIgG4Ab対照（）の固定化SIRPg-HisでのELISAによる評価。顕色は、ロバ抗ヒト抗体により実施され、TMB基質を使用して450nmでの比色分析により曝露された。

30

【図9】図9は、抗SIRP抗体とプレインキュベートされたヒトSIRPg組換えタンパク質へのCD47のBlitzによる親和性分析を示す図である。SIRPg-His組換えタンパク質は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でNi-NTAバイオセンサー上に固定化され、示した抗体は $20\mu\text{g}/\text{ml}$ （飽和濃度）で添加された。次いで、CD47Fcは $100\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加され、親和性値は、120秒の会合期間（ka）に続く120秒の解離期間（kd）後に推測され、親和定数（KD）が決定された。

40

【図10A】図10Aは、異なるモノクローナル抗体による染色及び二次抗IgG蛍光抗体による曝露後の末梢ヒトCD3+T細胞のフローサイトメトリーによって測定された幾何平均蛍光強度を示す図である。

【図10B】図10Bは、異なるモノクローナル抗体による染色及び二次抗IgG蛍光抗体による曝露後の赤血球のフローサイトメトリーによって測定された幾何平均蛍光強度を示す図である。

【図10C】図10Cは、異なるモノクローナル抗体による染色及び二次抗IgG蛍光抗体による曝露後の血小板のフローサイトメトリーによって測定された幾何平均蛍光強度を示す図である。

【図11】図11は、異なるモノクローナル抗体による染色後の、陽性末梢ヒトCD3+

50

T細胞のパーセンテージを示す図である。表は、2回の実験における陽性細胞の%の値を示す。

【図12A】図12Aは、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、3日間、1:1の比で抗CD3+抗CD28ビーズによって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

【図12B】図12Bは、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、5日間、5 T細胞:1 DCの比で異なる濃度の同種樹状細胞(DC)によって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

10

【図12C】図12Cは、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、3日間、1:1の比で抗CD3+抗CD28ビーズによって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

【図12D】図12Dは、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、5日間、5 T細胞:1 DCの比で異なる濃度の同種樹状細胞(DC)によって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

【図12E】図12Eは、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、5日間、異なる濃度のツベルクリン未精製タンパク質誘導体(PPD)によって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

20

【図13】マウスCD8+T細胞は、ネイティブマウスの脾細胞から単離された。図13は、CD8T細胞が、3日間、1:1の比で抗CD3+抗CD28ビーズによって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

【図14】図14は、健康なボランティア由来の末梢血単核細胞から単離されたヒトT細胞が、5日間、5 T細胞:1 DCの比で同種樹状細胞(DC)によって刺激された図である。抗体は、培養0日目に添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

30

【図15A】図15Aは、マウス肝細胞腫の直交異方形モデル(2.5×10⁶個のHepa1.6細胞が0日目に門脈を通して注射された)における、抗4-1-BB mAb(3H3クローン、100μg/注射)の2回の注射(4日目&8日目)または抗PDL-1(10F.9G2クローン、200μg/注射、4週間の処置)の注射(週に2回)と組み合わせるまたは組み合わせない、4週間、週に3回の抗SIRPa(P84クローン) i.p.投与(300μg/注射)の抗腫瘍効果を示す図である。マウスは、全ての対照マウスが死滅するのに必要な時間よりも3倍長く生存した場合に、治癒したと考えられた。

【図15B】図15Bは、腫瘍浸潤細胞が、腫瘍接種後13日で分析された図である。

【図15C】図15Cは、腫瘍浸潤細胞及び脾臓細胞が、腫瘍接種後13日で分析された図である。

40

【図15D】図15Dは、抗SIRPa+抗4-1BB注射により肝細胞腫モデルの事前に治癒したマウスまたは抗4-1BBによって処置されたSIRPa変異マウスが、脾臓へのHepa1.6細胞注射によって再負荷された(2.5×10⁶個の細胞/マウス)図である。再負荷マウスと腫瘍発生を比較するため、ナイーブマウスは並行して同じ経路で注射された。マウスは次いで未処置のままにされた。

【図15E】図15Eは、抗SIRPa+抗4-1BB注射により肝細胞腫モデルの事前に治癒したマウスが、脾臓へのHepa1.6細胞注射によって再負荷され(2.5×10⁶個の細胞/マウス)、それらの脾臓が再負荷の30日後に採取された図である。脾臓細胞及びT細胞脾細胞が単離された。ナイーブマウスは、ビヒクル、全脾細胞(10×10

50

6個の細胞/マウス)または脾細胞から精製されたT細胞(2.5×10^6 個の細胞/マウス)を静脈内に注射され、全ては脾臓にHepa1.6細胞注射を受けた(2.5×10^6 個の細胞/マウス)。マウスは次いで未処置のままにされ、全ての対照マウスが死滅するのに必要な時間よりも3倍長く生存した場合に、治癒したと考えられた。

【図16】図16は、抗SIRPa+抗PDL1注射による肝細胞腫モデルの事前に治癒したマウスが、脾臓へのHepa1.6細胞注射によって再負荷された(2.5×10^6 個の細胞/マウス)図である。再負荷マウスと腫瘍発生を比較するため、ナイーブマウスは並行して同じ経路で注射された。マウスは次いで未処置のままにされた。

【図17】図17は、マウス乳癌の直交異方性モデル(0.25×10^6 個の4T1細胞が乳腺に注射された)における、4週間、週に3回の抗SIRPa(P84クローン) i.p.投与($200 \mu\text{g}$ /注射)の抗腫瘍効果を示す図である。腫瘍発生は、腫瘍の直径を測定することによって評価され、式： $= (0.52 * (d^2))^{1.5}$ によって算出された。マウスは、倫理指針に従って、腫瘍発生がほぼ 1000 mm^3 であった場合、安楽死させた。

【図18】図18は、マウス乳癌の直交異方性モデル(0.25×10^6 個の4T1細胞が乳腺に注射された)における、2週間、週に3回の抗SIRPa(P84クローン)またはctrl mAb i.p. ($200 \mu\text{g}$ /注射)によって処置されたマウスの脾臓、腫瘍、及びリンパ節の免疫細胞表現型分析を示す図である。免疫細胞分析は、腫瘍接種の2週間後に実施された。

【図19】図19は、抗SIRPa(P84クローン)、抗CD47(MIAP410クローン)及び無関係なアイソタイプ対照が、C57Bl/6マウスに 12 mg/kg で0日目と2日目に腹腔内に投与された図である。血液試料は、EDTA含有チューブに0日目と3日目に採取され、血球計算はXS-800i血液分析機(Sysmex)によって実施された。ヘモグロビンのレベル(左)及びヘマトクリットのパーセンテージ(右)は3日目に評価された。点線は、各パラメータのC57Bl/6マウスの正常範囲値を表す。

【図20】図20(上)は、健康なドナーの血液から新しく単離されたヒト血小板における対照mAb(点線)と比較した、抗SIRPa(HEFLB, グレー)及び抗CD47(B6H12, 黒)mAbのフローサイトメトリー分析を示す図である。図20(下)は、 $50 \mu\text{g/ml}$ の対照mAb、抗SIRPa(HEFLB)、抗CD47(B6H12)または凝集の阻害剤の陽性対照として抗インテグリン I Ibの存在下での、光学血小板凝集計を使用するヒト血小板凝集測定を示す図である。抗体は、非活性化及びADP活性化血小板で評価された。

【図21A】図21Aは、同種CD4+T細胞が、新しい卵巣がん性腹水から抽出されたCD14+骨髄性細胞と1:1の比で、 $10 \mu\text{g/ml}$ の対照抗体(白)、抗SIRPa HEFLB(黒)、または抗CD47mAb(グレー)と培養された図である。増殖は、 ^3H -チミジンの取り込みによって5日目に測定された。

【図21B】図21Bは、同種CD4+T細胞が、凍結した卵巣がん性腹水から抽出されたCD14+骨髄性細胞と1:1の比で、 $10 \mu\text{g/ml}$ の対照抗体(白)、抗SIRPa HEFLB(黒)、または抗CD47mAb(グレー)と培養された図である。増殖は、 ^3H -チミジンの取り込みによって5日目に測定された。

【図21C】図21Cは、代わりに、同種T細胞が、同種樹状細胞と5:1の比で、及び図21Aのように $10 \mu\text{g/ml}$ の抗体の存在下で卵巣がん性腹水から抽出された異なる比のCD14+骨髄性細胞と培養された図である。

【図22】図22は、改変抗体のSIRPa ELISA結合アッセイを示す図である。未改変抗SIRPa抗体(HEFLB)及び重鎖に連結した(VHprot+VL())または軽鎖に連結した(VH+VLprot())ポリペプチドを有する異なる改変抗SIRPa HEFLB抗体の固定化SIRPa-HisでのELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLの細胞外ドメイン(ECD)にコンジュゲートした改変抗SIRPa抗体によって得られた。

10

20

30

40

50

【図23】図23は、ELISAによる改変抗SIRPa抗体での融合タンパク質のECDの検出を示す図である。抗SIRPa抗体(HEFLB)及び重鎖に連結した(VHprot+VL())または軽鎖に連結した(VH+VLprot())融合タンパク質を有する異なる改変抗SIRPa HEFLB抗体の固定化SIRPa-HisでのELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLの細胞外ドメイン(ECD)にコンジュゲートした改変抗SIRPa抗体によって得られた。

【図24】図24は、ELISAによる異なる改変抗SIRPa抗体でのリガンド結合アッセイを示す図である。重鎖に連結した(VHprot+VL())または軽鎖に連結した(VH+VLprot())融合タンパク質を有する異なる改変抗SIRPa抗体の固定化SIRPa-HisでのELISAによる評価。検出は、異なる融合コンジュゲートの特異的リガンド：PDL1Fc(PD1のため)、PD1His(PDL1のため)、CTLA4-Fc(CD80及びCD86のため)、OX40Fc(OX40Lのため)、4-1BBFcHis(4-1BBLのため)、CD28Fc(ICOSLのため)で実施され、それぞれマウス抗ヒトPD1、マウス抗His、マウス抗ヒトCTLA4Fc、マウス抗ヒトOX40、マウス抗ヒトHis、マウス抗ヒトCD28、次いでペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG、次いでTMB基質を使用する450nmでの比色分析により曝露された。

【図25】図25は、ELISAによる異なる改変抗SIRPa抗体でのSIRPa-CD47相互作用の競合アッセイを示す図である。異なる改変抗SIRPa抗体のアンタゴニスト活性測定。一定濃度のビオチン化CD47-Fc(6µg/ml)とインキュベートされた、異なる濃度の抗SIRPa単独(HEFLB(X))、重鎖に連結した(VHprot+VL())または軽鎖に連結した(VH+VLprot())融合タンパク質を有する異なる改変抗SIRPa HEFLB抗体のコートしたSIRPa-HisでのELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLの細胞外ドメイン(ECD)にコンジュゲートした改変抗SIRPa抗体によって得られた。

【図26】図26は、可溶性改変抗SIRPa抗体によるPBMCでのTNFα分泌アッセイを示す図である。OKT3(1µg/ml)及び10µg/mlの可溶性抗SIRPa HEFLB抗体、抗PD1(Keytruda mAb)、HEFLB+組換えタンパク質(融合していない)、抗体の重鎖(VHprot+VL())または軽鎖(VH+VLprot())に融合タンパク質を有する改変抗SIRPa HEFLB抗体、または陽性対照としてPha-Lによって、37、5%CO₂で2日間活性化されたPBMCによるTNFα分泌のELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLに融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体によって得られた。結果は3人の異なるドナーの代表例である。

【図27】図27は、可溶性改変抗SIRPa抗体でのPBMC(n=3)によるIFNγ分泌アッセイを示す図である。OKT3(1µg/ml)及び10µg/mlの可溶性抗SIRPa HEFLB抗体、抗PD1(Keytruda mAb)、HEFLB+組換えタンパク質(融合していない)、抗体の重鎖VHprot+VLまたは軽鎖VH+VLprotに融合タンパク質を有する改変抗SIRPa HEFLB抗体、または陽性対照としてPha-Lによって、37、5%CO₂で2日間活性化されたPBMCによるIFNγ分泌のELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLに融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体によって得られた。

【図28】図28は、可溶性改変抗SIRPa抗体によるヒトの単離されたTリンパ球の増殖アッセイを示す図である。可溶性の異なるタンパク質：10µg/mlの抗SIRPa HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、組換えタンパク質、HEFLB+組換えタンパク質、または重鎖VHprot+VLもしくは軽鎖VH+VLprotのタンパク質に融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体、またはPha-L陽性対照

10

20

30

40

50

による、37、5%CO₂で3日間の、コートしたOKT3(1μg/ml)での、T細胞増殖の評価。³Hチミジンは、測定の前に8時間取り込まれ、結果はcpmで表され、増殖のレベルが決定された。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLに融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体によって得られた。

【図29】図29は、可溶性改変抗SIRPa抗体によるヒトの単離されたTリンパ球によるTNFa分泌アッセイを示す図である。可溶性の異なるタンパク質：10μg/mlの抗SIRPa HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、組換えタンパク質、HEFLB抗体+組換えタンパク質(融合していない)、または重鎖VHprot+VLもしくは軽鎖VH+VLprotのタンパク質に融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体、37、5%CO₂で2日間の、OKT3コートしたT細胞(1μg/ml)によるTNFa分泌のELISAによる評価。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLに融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体によって得られた。

10

【図30】図30は、未熟ヒトマクロファージでのELISAによるMIP1a(CCL3)分泌アッセイを示す図である。未熟マクロファージは、CD47Fcと培養され、次いで37、5%CO₂で24時間、10μg/mlの可溶性タンパク質が添加された：抗SIRPa HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、または重鎖VHprot+VLの改変抗SIRPa HEFLB抗体(PD1、PDL1、CD80または4-1BBLに融合した)。上清が回収され、MIP1a分泌がELISAによって測定された。結果は、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLに融合した改変抗SIRPa HEFLB抗体によって得られた。

20

【図31】図31は、改変抗SIRPa抗体及び抗SIRPg結合ELISAアッセイを示す図である。HEFLB抗体、VH鎖でPDL1、CD80、もしくはCD86に融合した改変抗SIRPa抗体、またはKwar23抗体の固定化ヒトSIRPg-HisでのELISAによる評価。顕色は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG-Fcによって実施され、TMB基質を使用して450nmでの比色分析により曝露された。

【図32】図32は、改変抗SIRPa抗体が、マクロファージ及びT細胞バイオアッセイでのMIP1a、TNFa及びIFNg分泌に作用する図である。CD47コートした(1μg/ml)未熟マクロファージ(2日間10ng/mlのGM-CSFによるヒト単球)の培養、37、5%CO₂で24時間、10μg/mlの以下に記載の異なる抗体の添加、及びOKT3プレ活性化T細胞の添加。可溶性HEFLB抗体単独または組換えタンパク質(PDL1Fc、4-1BBL1Fc、CD80HisまたはD86His)との組合せ、二機能性アイソタイプ対照抗体としてPDL1または4-1BBL1またはCD80またはCD86に融合した抗B12-4、または重鎖(VHprot+VL)上のPDL1、4-1BBL、CD80、またはCD86に融合した改変抗SIRPa抗体が試験された。A.可溶性改変抗SIRPa抗体での未熟マクロファージによるMIP1a(CCL3)分泌アッセイ。上清が回収され、MIP1a分泌がELISAによって測定された。B.37、5%CO₂で、10μg/mlの上記の異なる可溶性タンパク質の存在下でのTNFa分泌のELISAによる評価。C.37、5%CO₂で、10μg/mlの上記の異なる可溶性タンパク質の存在下でのIFNg分泌のELISAによる評価。

30

40

【図33】図33は、細胞内カルシウムタイムラプスアッセイを使用するT細胞活性化測定を示す図である。24時間CD47プレコートした未熟マクロファージは、VH鎖に融合したPDL1を有する改変抗SIRPa抗体の存在下でのFura-OKT3染色T細胞と共培養された。カルシウム活性は、T細胞の添加後、T0及びT38分で測定された。

【発明を実施するための形態】

【0024】

改変SIRPa抗体(エピトープを有する)

一態様では、本発明は、SIRPa内の配列番号1(SLIPVGP)、配列番号2(

50

G / A R E L I Y N Q K E G H)、配列番号3 (K F R K G S P D [D V] / [T] E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤を含み、特に免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0025】

本発明の改変抗 S I R P a 抗体は、免疫療法剤にカップリングされている、特許出願 P C T / 欧州特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 9 0 7 1 号明細書に記載されている抗 S I R P a 抗体に対応する。

10

【0026】

本発明の改変抗体の機能的特性は、いくつかの理由から予想外である。特に、本出願において、抗体にグラフトされた免疫療法剤は、それがなおもそのリガンドに結合することができるという事実にもかかわらず、その機能的特性を失い得ることが示されている。同様に、同じリガンドに結合する2つの免疫療法剤は、抗体にグラフトした場合に効率が異なり得る（実施例における C D 8 0 ならびに C D 8 6 を参照されたい）。意外にも、本出願は、抗 S I R P a ならびに免疫療法剤を、本発明に従う1つの二機能性抗体に組み合わせることによって相乗効果を示す（特に、実施例における P B M C による T N F a の分泌に関して）。

【0027】

特に定義していない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、関連する技術分野の当業者に一般的に理解される意味と同じ意味を有する。便宜上、本明細書、実施例、ならびに特許請求の範囲で使用されるある特定の用語ならびに語句の意味を提供する。

20

【0028】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、任意の種類抗体、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ならびにヒト化抗体を指す。

【0029】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体を含む。本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」は、異なるアミノ酸配列の抗体の混合物を含有する「ポリクローナル」抗体調製物とは対照的に、共通の重鎖ならびに共通の軽鎖アミノ酸配列を共有する抗体の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体は、ファージ、細菌、酵母、またはリボソームディスプレイなどのいくつかの公知の技術、及びハイブリドーマ由来抗体によって例証される古典的な方法によって生成することができる。このように、用語「モノクローナル」は、1つの核酸クローンに由来する全ての抗体を指すために使用される。

30

【0030】

本発明の抗体は、組換え抗体を含む。本明細書で使用される場合、用語「組換え抗体」は、組換え手段によって産生、発現、生成、もしくは単離された抗体、例えば宿主細胞にトランスフェクトさせた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体；組換えコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体；ヒト免疫グロブリン遺伝子によりトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体；または特定の免疫グロブリン遺伝子配列（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列）が他の D N A 配列と共にアセンブルされている、他の任意の方法で産生、発現、生成、もしくは単離された抗体を指す。組換え抗体は、例えばキメラならびにヒト化抗体を含む。

40

【0031】

本発明の抗体は、キメラ抗体を含む。本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」は、哺乳動物種、例えばマウスの生殖系列に由来する可変ドメインの配列が、別の哺乳動物種、例えばヒトの生殖系列に由来する定常ドメインの配列にグラフトされている抗体を指す。

【0032】

本発明の抗体は、ヒト化抗体を含む。本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」は、

50

別の哺乳動物種、例えばマウスの生殖系列に由来する C D R 配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を指す。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、「抗体の抗原結合性断片」は、おそらくそのネイティブ形態の S I R P a の抗原結合能を示す抗体の一部、すなわち、本発明の抗体の構造の一部に対応する分子を意味し；そのような断片は特に、対応する 4 本鎖の抗体の抗原結合特異性と比較して前記抗原に対して同じまたは実質的に同じ抗原結合特異性を示す。この目的に関して、抗体の抗原結合性断片は、H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン、及び重鎖定常ドメインの断片を含む重鎖を含む。重鎖定常ドメインの断片とは、抗原結合性断片が、したがって完全な重鎖定常ドメインの少なくとも一部を含むと理解すべきである。例として、重鎖定常ドメインは、重鎖の少なくとも C_H1 ドメイン、または重鎖の少なくとも C_H1 ならびに C_H2 ドメイン、または重鎖の少なくとも C_H1、C_H2、ならびに C_H3 ドメインを含み得るかまたはそれからなり得る。重鎖定常ドメインの断片もまた、重鎖の F_c (結晶化可能断片) ドメインの少なくとも一部を含むとして定義され得る。したがって、抗体の抗原結合性断片は、完全な抗体の F_ab 部分、完全な抗体の F_(a b') 部分、完全な抗体の F_ab' 部分を包含する。重鎖定常ドメインはまた、例えばいくつかの完全な重鎖定常ドメインが記載されている本明細書に例証される完全な重鎖定常ドメインを含み得るかまたはそれからなり得る。本発明の特定の実施形態では、ならびに抗体の抗原結合性断片が、完全な重鎖定常ドメインの一部を含むかまたはそれからなる重鎖定常ドメインの断片を含む場合、重鎖定常ドメイン断片は、少なくとも 10 アミノ酸残基からなり得るか；または 10 ~ 300 アミノ酸残基、特に 210 アミノ酸残基からなり得る。

10

20

【 0 0 3 4 】

有利には、抗原結合性断片は、対応する 4 本鎖抗体と類似の結合親和性を有する。しかし、対応する 4 本鎖抗体に関して低減された抗原結合親和性を有する抗原結合性断片もまた、本発明に包含される。抗原結合能は、抗体と標的断片との間の親和性を測定することによって決定することができる。これらの抗原結合性断片もまた、抗体の「機能的断片」とも呼ばれ得る。

【 0 0 3 5 】

抗体の抗原結合性断片は、C D R (相補性決定領域) と呼ばれるその超可変ドメインまたは抗原の認識部位を含むその一部、すなわち S I R P a の細胞外ドメインを含み、それによって抗原認識特異性を定義する断片である。

30

【 0 0 3 6 】

4 本鎖免疫グロブリンの各々の軽鎖ならびに重鎖可変ドメイン (それぞれ、V L ならびに V H) はそれぞれ、V L - C D R 1 (または L C D R 1)、V L - C D R 2 (または L C D R 2)、V L - C D R 3 (または L C D R 3) ならびに V H - C D R 1 (または H C D R 1)、V H - C D R 2 (または H C D R 2)、V H - C D R 3 (または H C D R 3) と呼ばれる 3 つの C D R を有する。

【 0 0 3 7 】

当業者は、この点に関して記載した、参照ナンバリングシステムを含む標準的な定義を参照することによって、K A B A T のナンバリングシステムを参照することによって、または I M G T 「c o l l i e r d e p e r l e」アルゴリズムの適用によって、抗体の様々な領域 / ドメインの位置を決定することができる。この点において、本発明の配列の定義に関して、領域 / ドメインの境界は、参照システムによって異なり得ることに注意されたい。したがって、本発明において定義される領域 / ドメインは、抗体の可変ドメインの完全長の配列内の関係する配列の長さまたは位置のおよそ ± 10 % の変動を示す配列を包含する。

40

【 0 0 3 8 】

4 本鎖免疫グロブリンの構造に基づいて、このように抗原結合性断片を、利用可能なデータベースならびに先行技術における抗体の配列との比較によって、特に、これらの配列

50

における機能的ドメインの位置の比較によって定義することができ、フレームワークならびに定常ドメインの位置は、様々なクラスの抗体に関して、特にIgGに関して、特に哺乳動物IgGに関して十分に定義されていることに注意されたい。そのような比較はまた、抗体の三次元構造に関連するデータも必要とする。

【0039】

本発明の特定の実施形態を例証する目的に関して、前記抗体のCDRを含む可変ドメインを含有する抗体の抗原結合性断片は、Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂を包含する。Fv断片は、疎水性相互作用によって共に会合した抗体のVLならびにVHドメインからなり；dsFv断片では、VH：VLヘテロ二量体がジスルフィド結合によって安定化され；scFv断片では、VLならびにVHドメインが、フレキシブルペプチドリンカーを介して互いに接続され、このように一本鎖タンパク質を形成する。Fab断片は、抗体のパイン消化によって得ることが可能な単量体断片であり；それらは、ジスルフィド結合を通して共に結合した完全なL鎖ならびにH鎖のVH-CH1断片を含む。F(ab')₂断片は、ヒンジジスルフィドより下の抗体のペプシン消化によって產生することができ；これは2つのFab'断片ならびにさらに免疫グロブリン分子のヒンジ領域の一部を含む。Fab'断片は、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を切断することによってF(ab')₂断片から得ることができる。F(ab')₂断片は二価であり、すなわちそれらはネイティブ免疫グロブリン分子のように2つの抗原結合部位を含む；他方、Fv(Fabの可変部分を構成するVHVL二量体)、dsFv、scFv、Fab、ならびにFab'断片は一価であり、すなわちそれらは、単一の抗原結合部位を含む。本発明のこれらの基本的な抗原結合性断片を共に組み合わせ、多価抗原結合性断片、例えばダイアボディ、トリボディ、またはテトラボディを得ることができる。これらの多価抗原結合性断片もまた、本発明の一部である。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「二特異性」抗体は、第1の抗原に対して特異的である少なくとも1つの領域（例えば、第1の抗体の可変領域に由来する）、ならびに第2の抗原に対して特異的である少なくとも第2の領域（例えば、第2の抗体の可変領域に由来する）を有することによって2つの異なる抗原を認識する抗体を指す。二特異性抗体は、2つの標的抗原に特異的に結合し、このため1つのタイプの多特異性抗体である。2つまたはそれより多くの異なる抗原を認識する多特異性抗体は、組換えDNA法によって產生することができるか、または任意の簡便な方法によって化学的に產生された抗体を含み得るがこれらに限定されない。二特異性抗体は、全ての抗体または抗体のコンジュゲート、または2つの異なる抗原を認識することが可能な抗体の多量体形態を含む。二特異性抗体は、その二価の特徴を保持するように還元ならびにリフォームされている抗体、ならびにそれらが、BiME（二特異性マクロファージ増強性抗体）、BiTE（二特異性T細胞誘導）、DART（二重親和性再標的化）；DNL（dock-and-lock）、DVD-Ig（二重可変ドメイン免疫グロブリン）、HAS（ヒト血清アルブミン）、knh（knobs into holes）などの、各々の抗原に対するいくつかの抗原認識部位を有することができるように化学的にカップリングされている抗体を含む。

【0041】

したがって、一部の二特異性抗体はSIRPaならびに第2の抗原に対する抗体であり得る。特に前記の第2の抗原は、免疫療法剤のリガンドとは異なる。

【0042】

一実施形態では、本発明は、二特異性である上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。例示的な改変抗体には、第1の抗原としてSIRPaを標的とする、ならびに第2の抗原として免疫制御性チェックポイント免疫細胞マーカー、例えばPD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、CD80、CD86、CD28、4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、ICOS、ICOS-L、OX40L、GITR、HVEM、BTLA、CD160、LIGHT、TNFRSF25、2B4、CD48、Tim1、Tim3、Tim4、Gal9、LAG-3、CD40、CD4

0L、CD70、CD27、VISTA、B7H3、B7H4(B7x)、TIGIT、CD112、HHLA2(B7-H7)、TMIGD2(CD28H)、ならびにプチロフィン様分子2(BTNL2)、特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLを標的とする抗体が挙げられる。

【0043】

治療抗体を開発するためのいくつかの研究により、Fc領域を操作して、抗体の特性を最適にし、それらにとって必要な薬理活性により適する分子の生成が可能となった。抗体のFc領域は、その血清中半減期ならびにエフェクター機能、例えば補体依存性細胞傷害性(CDC)、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、ならびに抗体依存性細胞食作用(ADCP)を媒介する。CH2とCH3ドメインの境界面に位置するいくつかの変異、例えばT250Q/M428LならびにM252Y/S254T/T256E+H433K/N434Fは、FcRnに対する結合親和性ならびに*in vivo*でのIgG1の半減期を増加させることが示されている。しかし、FcRn結合の増加と半減期の改善との間に必ずしも直接の関係はない。治療抗体の有効性を改善するための1つのアプローチは、その血清中での持続を増加させることであり、それによってより高い循環中レベル、より少ない投与回数、ならびに用量の低減が可能となる。Fc領域の操作は、抗体のエフェクター機能を低減または増加させるために望ましくなり得る。特に免疫細胞上の細胞表面分子を標的とする抗体の場合、エフェクター機能の除去が必要である。逆に、腫瘍学での使用が意図される抗体の場合、エフェクター機能の増加は、治療活性を改善し得る。4つのヒトIgGアイソタイプは、活性化Fc受容体(FcRI、FcRIIa、FcRIIIa)、阻害性FcRIIb受容体、ならびに補体第1成分(C1q)に異なる親和性で結合し、大きく異なるエフェクター機能を生じる。IgGのFcRまたはC1qに対する結合は、ヒンジ領域ならびにCH2ドメインに位置する残基に依存する。CH2ドメインの2つの領域は、FcRならびにC1q結合にとって極めて重要であり、IgG2ならびにIgG4ではユニーク配列を有する。

【0044】

本発明はまた、抗体ならびにその断片を含み得るが、本明細書において「抗原結合性抗体模倣体」とも呼ばれる抗体を模倣する抗原結合能を有する人工的なタンパク質、ペプチド、ならびに任意の化学化合物などの高分子も含み得る。そのようなタンパク質は、アフィチンならびにアンチカリンを含む。アフィチンは、選択的抗原結合能を有する人工タンパク質である。それらは古細菌ドメインに属する微生物であるスルホルプス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)において見出されるDNA結合タンパク質Sac7dに構造的に由来する。Sac7dの結合表面上のアミノ酸を無作為化することによって、例えばSac7dの結合境界面の11残基の無作為置換に対応するバリエーションを生成することによって、アフィチンライブラリを生成してもよく、得られたタンパク質ライブラリをリボソームディスプレイラウンドに供してもよく、親和性を様々な標的、例えばペプチド、タンパク質、ウイルス、ならびに細菌に向けることができる。アフィチンは、抗体模倣体であり、生物工学におけるツールとして開発されている。それらはまた、様々な酵素の特異的阻害剤としても使用されている(Krehenbrink et al., *J. mol. Biol.*, 383:5, 2008)。当業者は、当技術分野で公知の方法、特に特許出願国際公開第2008068637号ならびに上記で引用した刊行物に開示される方法、特にファージディスプレイならびに/またはリボソームディスプレイライブラリの生成、及び本明細書に開示される抗原を使用するそのスクリーニングを使用して必要な結合特性を有するアンチカリンを容易に開発することができる。アンチカリンは、抗原、タンパク質または低分子のいずれかに結合することができる人工タンパク質である。それらは、天然に結合するタンパク質のファミリーであるヒトリポカリンに由来する抗体模倣体である。アンチカリンは、約8倍小さく、約180アミノ酸のサイズならびに約20kDaの質量を有する(Skerra, *Febs J.*, 275:11, 2008)。アンチカリンファージディスプレイライブラリが生成されており、これは特に、特異的結合特性を有するアンチカリンのスクリーニングならびに選択を

10

20

30

40

50

可能にする。当業者は、当技術分野で公知の方法、特に欧州特許第1270725号明細書、米国特許第8536307号明細書(Schlehuber and Skerra、Biophys. Chem., 96:2~3頁、2002)、ならびに上記で引用した刊行物に開示される方法、特にファージディスプレイならびに/またはリボソームディスプレイライブラリの生成、及び本明細書で開示される抗原を使用するそのスクリーニングを使用して、必要な結合特性を有するアフィチンを容易に開発することができる。アンチカリンならびにアフィチンはいずれも、細菌発現系を含む複数の発現系において産生され得る。このように、本発明は、アフィチン、アンチカリン、ならびに本明細書に記載の改変抗体の特徴、特にSIRPaに対する結合、SIRPaとCD47との間の相互作用の阻害、SIRPgに対する非結合、T細胞の増殖の非阻害、T細胞の増殖の増加、SIRPgとCD47との間の相互作用の非阻害、に関する特徴を有する他の類似の抗体模倣体を提供し、その全てが本発明の高分子として企図される。抗体またはその断片に関して本明細書に開示される実施形態は全て、本発明の高分子、特に抗原結合性抗体模倣体に必要な変更を加えて置き換えられる。

10

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原の部分を意味する。タンパク質抗原のエピトープは、2つのカテゴリー、すなわちコンフォメーションナルエピトープならびに線形エピトープに分類することができる。コンフォメーションナルエピトープは、抗原からのアミノ酸の不連続な配列に対応する。線形エピトープは、抗原からのアミノ酸の連続する配列に対応する。

20

【0046】

本発明において、SIRPa内に存在し、抗SIRPa抗体によって結合されるペプチドは、これらの抗体によって特異的に認識されるエピトープを構成する。

【0047】

本明細書で使用される場合、「改変抗体」は、抗体またはその抗原結合性断片を含む分子に対応し、前記抗体またはその機能的断片は、機能的に異なる分子に関連する。本発明の改変抗体は、抗体または機能的断片の安定性ならびに/または半減期を改善するために、共有結合、グラフティング、化学もしくは生物基または分子、例えばPEGポリマーまたは*in vivo*でのプロテアーゼ切断に対する保護にとって適切な別の保護基もしくは分子との化学結合を含む任意の適した結合形態に起因する、融合キメラタンパク質またはコンジュゲートのいずれかであり得る。類似の技術によって、特に化学カップリングまたはグラフティングによって、毒素、特にシュードモナス(*Pseudomonas*)外毒素A、植物毒素リシンのA鎖、またはサポリン毒素、特に治療活性成分、抗体もしくは機能的断片をヒトの体の特定の細胞または組織に標的化するために適したベクター(特にタンパク質ベクターを含む)から選択される生物活性分子と共に改変抗体を調製することができ、または特に抗体の断片を使用する場合、改変抗体は標識もしくはリンカーに会合され得る。抗体またはその機能的断片のPEG化は、それが、特に治療応用に関して活性物質の宿主への送達条件を改善することから、特に興味深い実施形態である。PEG化は、抗体または機能的断片の認識部位との干渉を防止するために部位特異的であり得て、高分子量PEGによって実施され得る。PEG化は、抗体もしくは機能的断片の配列に存在する遊離のシステイン残基を通して、または抗体もしくは機能的断片のアミノ酸配列における追加の遊離のシステイン残基を通して達成することができる。

30

40

【0048】

本発明において、改変抗SIRPa抗体またはその断片は、免疫療法剤を含み、特に免疫療法剤に連結される。そのような改変抗体もまた、「二機能性」と呼ばれ、すなわち、それらは2つの治療効果：抗SIRPa抗体とSIRPaとの相互作用に起因する第1の効果、ならびに免疫療法剤とそのリガンドとの相互作用に起因する第2の効果を有する。本発明の二機能性抗体は、SIRPaならびに免疫療法剤のリガンドに結合するのみならず、CD47-SIRPaならびに免疫療法剤-リガンドの療法の相互作用に関連する機能的特性も維持する。

50

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される場合、用語「免疫療法剤」は、特に、がんワクチンを興味深い生物現象から有効な治療剤にする作用剤を指し、これは、ナイーブT細胞の数ならびにレパトリーを増加させるためのT細胞増殖因子、樹状細胞(DC)の数を増加させるための増殖因子、DCならびに他の抗原提示細胞(APC)を活性化するためのアゴニスト、がんワクチンを可能にならびに増強するためのアジュバント、T細胞を活性化ならびに刺激するためのアゴニスト、T細胞チェックポイント遮断の阻害剤、免疫T細胞の成長ならびに生存を増加させるためのT細胞増殖因子、がん細胞を阻害、遮断、または中和するための作用剤、ならびに免疫細胞由来免疫抑制性サイトカインを含む。

【 0 0 5 0 】

より詳しくは、本発明の文脈において有用な免疫療法剤は、特に適応免疫細胞(TまたはBリンパ球)の免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤、治療ワクチン(DNA、RNA、またはペプチドワクチン)、または抗体薬物コンジュゲートなどの免疫コンジュゲートからなる群から選択される。

【 0 0 5 1 】

多数の免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤が当技術分野で公知である。本発明の文脈において、有用であり得る適応免疫細胞(BまたはTリンパ球)の免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤の例は、PD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、CD80、CD86、CD28、4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、ICOS、ICOS-L、OX40L、GITR、HVEM、BTLA、CD160、LIGHT、TNFRSF25、2B4、CD48、Tim1、Tim3、Tim4、Gal9、LAG-3、CD40、CD40L、CD70、CD27、VISTA、B7H3、B7H4(B7x)、TIGIT、CD112、HLA2(B7-H7)、TMIGD2(CD28H)、プチロフィリン様分子2(BTNL2)、そのバリエーションならびに断片、特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、そのバリエーションならびに断片、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションならびに断片である。

【 0 0 5 2 】

特に、本発明の抗体は、免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤の機能的バリエーションまたはその機能的断片を抗SIRPa抗体に付加することによって得ることができる。好ましくは、機能的断片は、免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤の細胞外ドメイン(ECD)に対応する。

【 0 0 5 3 】

特に、本発明の二機能性抗体に含まれる免疫療法剤のバリエーションならびに断片は、免疫療法剤-リガンドの相互作用に関連する機能的特性を維持する。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号1(SLIPVGP)、配列番号2(GARELIYNQKEGH)、配列番号3(KFRKGS PD [DV] / [T] E)、配列番号4(QHTVSFTCE SHGFSPRDITLKW F)、配列番号5(ICEVAHVTLQG)、及び配列番号6(YPQRLQLTWLE)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも2、3、4、または5個のペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

【 0 0 5 5 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号3(KFRKGS PD [DV] / [T] E)のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるペプチド、及びSIRPa内の配列番号1(SLIPVGP)、配列番号2(GARELIYNQKEGH)、配列番号4(QHTVSFTCE SHGFSPRDITLKW F)、配列番号5(ICEVAHVTLQG)、

10

20

30

40

50

ならびに配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

【 0 0 5 6 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 内の配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号2 (G / A R E L I Y N Q K E G H)、配列番号3 (K F R K G S P D [D V] / [T] E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

10

【 0 0 5 7 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 内の配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号7 (G R E L I Y N Q K E G H)、配列番号8 (K F R K G S P D D V E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

20

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 内の配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号7 (G R E L I Y N Q K E G H)、配列番号8 (K F R K G S P D D V E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) のペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号9 (A R E L I Y N Q K E G H)、配列番号10 (K F R K G S P D T E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

30

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 内の配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号9 (A R E L I Y N Q K E G H)、配列番号10 (K F R K G S P D T E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) のペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

40

【 0 0 6 1 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 内の配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号11 (G R E L I Y N)、D V E、配列番号12 (H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、及び配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

【 0 0 6 2 】

50

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号1 (SLIPVGP)、配列番号11 (GRELIYN)、DVE、配列番号12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF)、配列番号5 (ICEVAHVTLQG)、及び配列番号6 (YPQRLQLTWLE)のペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

【0063】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号1 (SLIPVGP)、配列番号13 (ARELIYN)、配列番号12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF)、配列番号5 (ICEVAHVTLQG)、及び配列番号6 (YPQRLQLTWLE)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる少なくとも1つのペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

10

【0064】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号1 (SLIPVGP)、配列番号13 (ARELIYN)、配列番号12 (HTVSFTCESHGFSPRDITLKWF)、配列番号5 (ICEVAHVTLQG)、及び配列番号6 (YPQRLQLTWLE)のペプチドに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

20

【0065】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、ならびに配列番号13のペプチドは線形エピトープに対応する。

【0066】

これらの線形エピトープは、本発明者らによってアレイに基づくオリゴペプチドスクリーニング(時にオーバーラップペプチドスクリーンまたはpepscanningと呼ばれる)によって同定されている。この技術は、標的タンパク質のオーバーラップセグメントならびに非オーバーラップセグメントからのオリゴペプチド配列のライブラリを使用し、それらが目的の抗体に結合する能力に関して試験する。標的タンパク質の異なる部分からの非隣接ペプチド配列を組み合わせて、この組み合わせたペプチドに立体構造の剛性を強化することによって(例えば、CLIPS足場を使用することによって)(Timmerman et al., 2007, J Mol Recognit., Sep-Oct; 20(5): 283-99)、不連続なエピトープを、非常に高い信頼性ならびに精度でマッピングすることができる(Gaseitsiwe et al., 2010 - Clin Vaccine Immunol. Jan; 17(1): 168~175頁)。HEFLBを含む本発明の試験した抗体は全て、前記エピトープに特異的に結合する。

30

【0067】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70 (ELIYNQKEGHFPR)、配列番号71 (RNNMDF SIRIGN)、及び配列番号72 (SPRDITLKW)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

40

【0068】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70 (ELIYNQKEGHFPR)、配列番号71 (RNNMDF SIRIGN)、及び配列番号72 (SPRDITLKW)のペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、免

50

疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

【0069】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号70 (ELIYNQKEGHFPR) 及び配列番号71 (RNNMDFSIRIGN) からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

【0070】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70 (ELIYNQKEGHFPR) 及び配列番号71 (RNNMDFSIRIGN) のペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

10

【0071】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号73 (YNQK) 及び「SIR」からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

【0072】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号73 (YNQK) に記載のアミノ酸配列のペプチド及びSIRアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションエピトープに特異的に結合し、疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片に関する。

20

【0073】

配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、ならびにSIRPのペプチドはコンフォメーションエピトープに対応する。これらのコンフォメーションエピトープは、当業者に周知であるように、目的のそのようなペプチドを検出ならびにシーケンシングするために、本発明者らによってタンパク質分解保護手順（酵素消化：アフィニティークロマトグラフィー上に固定した抗体-抗原複合体のキモトリプシン、トリプシン）の後に質量分析法（MALDI-TOF/TOF）を使用して決定されている（Vandewater et al., *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, vol. 85）。使用した抗原は、ヒトSIRPa（アクセッション番号NP__542970）であり、使用した本発明の抗体の1つはHEFLBバリエーションであった。

30

【0074】

本発明に従う抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片は、ネイティブSIRPa内のその立体構造配置で前記ペプチドを含むかまたはそれからなる前記コンフォメーションエピトープに特異的に結合する。

40

【0075】

配列番号73 (YNQK) に記載のアミノ酸配列のペプチドは、NP__542970アクセッション番号によって参照されるヒトSIRPaアミノ酸配列における80位～83位のアミノ酸からなるペプチドに対応する。

【0076】

SIRアミノ酸配列のペプチド、SIRペプチドは、NP__542970アクセッション番号によって参照されるヒトSIRPaアミノ酸配列における105位～107位のアミノ酸配列からなるペプチドに対応する。

【0077】

本明細書で使用される場合、用語「SIRPa」は、哺乳動物種のSIRPaタンパク

50

質、好ましくはヒトSIRPa（例えばアクセッション番号NP__542970（P78324）ならびにCAA71403）を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「抗SIRPa抗体」は、SIRPa、特にヒトSIRPaに特異的に結合する抗体を指す。

【0079】

本発明の抗体またはその抗原結合性断片とエピトープ（またはエピトープを含む領域）との間の特異的結合は、抗体が特定のタンパク質または抗原（本明細書では、SIRPaまたは抗体にカップリングされた免疫療法剤のリガンド）上のエピトープ（またはエピトープを含む領域）に関して認識可能な親和性を示すことを意味する。「認識可能な親和性」は、約 10^{-9} M（KD）またはそれより強い親和性での結合を含む。好ましくは、結合は、結合親和性が 10^{-9} M～ 10^{-12} Mの間、任意選択で 10^{-9} M～ 10^{-10} Mの間、特に 10^{-10} Mである場合に特異的であると考えられる。結合ドメインが標的と特異的反応するまたは結合するかは、中でも前記結合ドメインと標的タンパク質または抗原との反応を、前記結合ドメインと標的タンパク質以外のタンパク質または抗原との反応と比較することにより、容易に試験することができる。

10

【0080】

親和性は、当業者に周知の様々な方法によって決定することができる。これらの方法には、Biacore分析、Blitz分析、ならびにScatchardプロットが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0081】

一実施形態では、本発明は、特にBiacore分析によって、SIRPaに関して 10^{-9} Mより劣る、好ましくは 10^{-10} Mより劣る、より好ましくは $1 \cdot 10^{-11}$ Mより劣るKD値を有する、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0082】

一実施形態では、本発明は、SIRPaとCD47との間の相互作用を減少させる上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0083】

一実施形態では、本発明は、CD47のSIRPaに対する結合、特にヒトCD47のヒトSIRPaに対する結合を部分的または完全に、特に完全に阻害する上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

30

【0084】

本発明のそのような抗体は、SIRPaに特異的に結合し、SIRPaとCD47との間の相互作用に拮抗する。

【0085】

特に、本発明の抗SIRPaアンタゴニスト抗体は、結合アッセイにおいて陰性対照分子と比較して、CD47のSIRPaに対する結合を少なくとも50%、60%、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、または最も好ましくは100%低減または阻害することが可能である。

40

【0086】

特に、本発明の抗SIRPaアンタゴニスト抗体は、結合アッセイにおいて陰性対照分子と比較して、CD47のSIRPaに対する結合を、50%～100%、好ましくは60%～90%、より好ましくは70%～80%低減または阻害することが可能である。

【0087】

競合的阻害によって抗体の特異性ならびに親和性を決定する方法は、当技術分野で公知であり（例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan et al., *Current Protocols in Immunology*,

50

Green Publishing Assoc., NY (1992; 1993); Muller, Meth. Enzym., 92: 589~601頁(1983)を参照されたい)、以下の実施例に記載される。

【0088】

これらの方法には、Biacore分析、Blitz分析、フローサイトメトリー、ならびにELISAアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0089】

一実施形態では、本発明は、ELISAによってCD47と抗SIRPα抗体との間の競合的SIRPα結合アッセイによって決定した場合に、500ng/mlより低い、特に400ng/mlより低い、300ng/ml、より詳しくは200ng/mlより低いIC50を有する、上記で定義した改変抗SIRPα抗体に関する。

10

【0090】

一実施形態では、本発明は、ヒト単球においてCD47と抗SIRPα抗体との間の競合的サイトメトリーアッセイによって決定した場合に、500ng/mlより低い、特に400ng/ml、300ng/mlより低い、より詳しくは200ng/mlより低い、150ng/mlより低い、ならびにさらにより詳しくは100ng/mlより低いIC50を有する、上記で定義した改変抗SIRPα抗体に関する。

【0091】

一実施形態では、本発明は、SIRPγ、好ましくはヒトSIRPγに特異的に結合しない、上記で定義した改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

20

【0092】

本発明のそのような抗体は、SIRPγとCD47との間の相互作用に影響を及ぼさないか、または防止しない。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「SIRPγ」は、哺乳動物種、好ましくはヒトSIRPγからのシグナル制御性タンパク質ガンマ(SIRPガンマ、CD172γ、またはSIRPβ2とも呼ばれる)を指す。

【0094】

本出願の実施例に使用されるヒトSIRPγタンパク質の基準配列は、アクセッション番号Q9P1W8に関連する配列に対応する。

30

【0095】

一実施形態では、本発明は、特にBlitz分析によって、SIRPγに関して 10^{-9} Mより優れている、好ましくは 10^{-8} Mより優れている、より好ましくは 10^{-7} Mより優れているKD値を有する上記で定義した改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0096】

一実施形態では、本発明は、CD47のSIRPγに対する結合を有意に阻害しない、拮抗しない、CD47のSIRPγに対する結合と有意に競合しない上記で定義した改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0097】

このアンタゴニスト作用は、本出願の実施例に定義した方法を使用して決定することができる。

40

【0098】

本発明において、抗体(または抗原結合性断片)が、BlitzによるSIRPγ結合競合アッセイにおいてCD47のKD値の増加を誘導しない、または1対数より劣る増加を誘導する場合、前記抗体(またはその抗原結合性断片)は、CD47のSIRPγに対する結合に拮抗しないと考えることができる。

【0099】

一実施形態では、本発明は、SIRPγを介してT細胞、特にCD3+T細胞に特異的に結合しない、上記で定義した改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

50

【0100】

特に、本発明の改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片は、SIRPgを介して哺乳動物種のT細胞、特にヒトT細胞に結合しない。

【0101】

この作用は、本出願の実施例に記載される方法によって測定することができる。

【0102】

一実施形態では、本発明は、好ましくは哺乳動物種のT細胞、特にCD3+T細胞、より好ましくはヒトT細胞の増殖を有意に阻害しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0103】

特に、抗SIRPa抗体は、T細胞の増殖が、前記抗体の非存在下での陽性対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む陽性対照と比較して30%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満低減される場合、T細胞の増殖を有意に阻害しないと考えられる。

【0104】

好ましくは、本発明は、好ましくは哺乳動物種のT細胞、特にCD3+T細胞、より詳しくはヒトT細胞の増殖を増加させる上記の改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0105】

抗体（またはその抗原結合性断片）は、前記抗体（またはその抗原結合性断片）が、前記抗体の非存在下での対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む対照と比較して、少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも10倍大きいT細胞の増殖を誘導する場合、T細胞の増殖を増加させると考えられる。

【0106】

T細胞の増殖は、様々な方法によって決定することができる。例えば、T細胞の増殖は、本出願の実施例に記載の³H-チミジンの取り込みによって測定することができる。

【0107】

一実施形態では、本発明は、サーファクタントタンパク質のSIRPaに対する結合を有意に阻害しない、拮抗しない、サーファクタントタンパク質のSIRPaに対する結合と有意に競合しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0108】

本明細書で使用される場合、「サーファクタントタンパク質」は、コラーゲン含有C型（カルシウム依存性）レクチンであり、これはサーファクタントの恒常性ならびに肺の免疫に有意に寄与する（総説に関しては、Kishore et al., *Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors*, *Mol Immunol*, 43(9), 1293~315頁、2006を参照されたい）。

【0109】

本明細書で使用される場合、用語「サーファクタントタンパク質」は、哺乳動物種からのサーファクタントタンパク質、好ましくはヒトサーファクタントタンパク質を指す。

【0110】

一実施形態では、本発明は、ヒトサーファクタントタンパク質D（SP-D）のSIRPaに対する結合を阻害しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0111】

一実施形態では、本発明は、ヒトサーファクタントタンパク質A（SP-A）のSIRPaに対する結合を阻害しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結

10

20

30

40

50

合性断片に関する。

【0112】

一実施形態では、本発明は、サーファクタントタンパク質とSIRPaとの間の相互作用に拮抗しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0113】

SIRPaとサーファクタントタンパク質との間の競合は、当業者に周知の方法を使用して競合アッセイによって決定することができる。これらの方法には、Biacore分析、Blitz分析、ならびにELISAアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0114】

本発明において、抗体（またはその抗原結合性断片）が、BlitzによるSIRPa結合競合アッセイにおいて、サーファクタントタンパク質の増加を誘導しないか、またはKD値の1対数より劣る増加を誘導する場合、前記抗体（またはその抗原結合性断片）は、サーファクタントタンパク質の前記SIRPaに対する結合に拮抗しないと考えることができる。

【0115】

一実施形態では、本発明は、SIRPbに弱く結合するかまたは特異的に結合しない、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0116】

本明細書で使用される場合、用語「SIRPb」は、哺乳動物種のSIRPbタンパク質（SIRP、シグナル制御性タンパク質ベータ-1、SIRP-ベータ-1、CD172抗原様ファミリーメンバーBまたはCD172bとも呼ばれる）、好ましくはヒトSIRPbを指す。

【0117】

本出願の実施例で使用されるヒトSIRPbタンパク質の基準配列は、アクセッション番号Q5TFQ8-1に関連する配列に対応する。

【0118】

一実施形態では、本発明は、特にBlitz分析において、SIRPbに関して 10^{-9} Mより優れている、好ましくは 10^{-8} Mより優れているKD値を有する、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0119】

一実施形態では、本発明は、PBMCならびに/またはTリンパ球によるTNFaの分泌を増加させる、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0120】

TNFaの分泌は、当業者に周知の方法を使用してELISAアッセイによって決定することができる（本発明の実施例に示すように）。

【0121】

本発明では、抗体（またはその抗原結合性断片）が、前記抗体の非存在下での陰性対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む陰性対照と比較して、TNFaの分泌を少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍大きく誘導する場合、前記抗体（またはその抗原結合性断片）は、TNFaの分泌を増加させると考えることができる。

【0122】

一実施形態では、本発明は、PBMCによるIFNgの分泌を増加させる、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0123】

IFNgの分泌は、当業者に周知の方法を使用してELISAアッセイによって決定することができる（本発明の実施例に示すように）。

【0124】

10

20

30

40

50

本発明では、抗体（またはその抗原結合性断片）が、前記抗体の非存在下での陰性対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む陰性対照と比較して、IFN γ の分泌を少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも4倍大きく誘導する場合、前記抗体（またはその抗原結合性断片）は、IFN γ の分泌を増加させると考えることができる。

【0125】

一実施形態では、本発明は、マクロファージによるMIP1aの分泌を増加させる、上記で定義した改変抗SIRP α 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0126】

MIP1aの分泌は、当業者に周知の方法を使用してELISAアッセイによって決定

10

【0127】

本発明では、抗体（またはその抗原結合性断片）が、前記抗体の非存在下での陰性対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む陰性対照と比較して、MIP1aの分泌を少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも10倍大きく誘導する場合、前記抗体（またはその抗原結合性断片）は、MIP1aの分泌を増加させると考えることができる。

【0128】

一実施形態では、本発明は、ヒトT細胞、特にヒトTリンパ球の活性化を増加させる、上記で定義した改変抗SIRP α 抗体またはその抗原結合性断片に関する。本明細書で使用される場合、T細胞ならびにTリンパ球は同じ意味を有し、互換的に使用することができる。

20

【0129】

ヒトT細胞ならびにヒトTリンパ球の活性化は、当技術分野で公知の方法、例えばCDマーカー、特にCD25ならびにノもしくはCD69の分析、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、ELISA、及びノまたは本発明の実施例に例証されるように、IFN γ の分泌を評価することによって、または本発明の実施例に例証されるように、ヒトT細胞、すなわちヒトTリンパ球によるカルシウム取り込みのタイムラプス分析などの、しかしこれらに限定されない方法によって決定することができる。

【0130】

本発明では、抗体またはその抗原結合性断片が、前記抗体の非存在下での陰性対照、特に前記抗体の非存在下であるが第1の活性化シグナルを産生する作用剤（例えば、抗CD3）を含む陰性対照と比較して、ヒトT細胞（すなわち、ヒトTリンパ球）の活性化を少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも4倍大きく増加させる場合、前記抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトT細胞（すなわち、ヒトTリンパ球）の活性化を増加させると考えることができる。

30

【0131】

第1の実施形態に従って、本発明は、

- a) HCDR1、HCDR2、ならびにHCDR3を含む重鎖可変ドメイン、及び
b) LCDR1、LCDR2、ならびにLCDR3を含む軽鎖可変ドメイン

40

- を含み、
- HCDR1が、配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - HCDR2が、配列番号15または配列番号16に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - HCDR3が、配列番号17、配列番号18、配列番号19、または配列番号20に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - LCDR1が、配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - LCDR2が、配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
 - LCDR3が、配列番号23に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、
- 重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたはその断片が免疫療

50

法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、及びその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなる、二機能性抗ヒトSIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0132】

別の実施形態に従って、本発明は、

a) HCDR1、HCDR2、ならびにHCDR3を含む重鎖可変ドメイン、及び重鎖定常ドメインまたはその断片を含む重鎖、及び

b) LCDR1、LCDR2、ならびにLCDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む軽鎖を含み、

前記CDRが、

- 配列番号14 (SYWVH)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR1、

- 配列番号15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD)または配列番号16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR2、

- 配列番号17 (GGTGTMAWFAY)配列番号18 (GGTGTLAWFAY)、配列番号19 (GGTGTMAWFAY)または配列番号20 (GGTGTLAYFAY)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR3、

- 配列番号21 (RSSQSLVHSYGNTYLY)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるLCDR1、

- 配列番号22 (RVSNRFS)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるLCDR2、及び

- 配列番号23 (FQGTHVPYT)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるLCDR3

として定義され、

重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたはその断片が、特にそのC末端で免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、PD1、PDL1、CD80、ならびに4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、及びその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなる、改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0133】

別の実施形態に従って、本発明は、

a) HCDR1、HCDR2、HDCR3、ならびに重鎖定常ドメインの少なくとも1つの断片、特に重鎖定常ドメインの少なくともCH1ドメイン；または少なくともCH1ドメインならびにCH3ドメイン；または少なくともCH2ドメインならびにCH3ドメイン、または少なくともCH1ドメイン、CH2ドメイン、ならびにCH3ドメインを含む断片を、特にFc領域の少なくとも断片ならびに/またはヒンジ領域と組み合わせて含む重鎖；及び

b) LCDR1、LCDR2、ならびにLCDR3を含む軽鎖を含み、

前記CDRが、

- 配列番号14 (SYWVH)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR1、

- 配列番号15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD)または配列番号16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR2、

- 配列番号17 (GGTGTMAWFAY)配列番号18 (GGTGTLAWFAY)、配列番号19 (GGTGTMAWFAY)または配列番号20 (GGTGTLAYFAY)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるHCDR3、

10

20

30

40

50

- 配列番号 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 1、
 - 配列番号 22 (RVSNRFS) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 2、及び
 - 配列番号 23 (FQGTHVPYT) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 3
- として定義され、

前記重鎖定常ドメインまたはその断片が、特にその C 末端で免疫療法剤に連結されており、前記免疫療法剤が、PD1、PDL1、CD80、ならびに 4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、及びその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなる、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

10

【0134】

以下の説明の部において、用語「H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖」はまた、用語「H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン、及び重鎖定常ドメインまたはその断片を含む重鎖」、「H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン」、ならびに「その N 末端からその C 末端に H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、ならびに重鎖定常ドメインの少なくとも断片、特に重鎖定常ドメインの少なくとも C_H1 ドメインを含む断片を含む重鎖」も包含する。

【0135】

20

以下の説明の部において、特色「重鎖またはその断片が免疫療法剤に連結されている」と列挙されている場合、これはまた、「改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片が、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒト PD1、ヒト PDL1、ヒト CD80、ヒト 4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、及びその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなる」ことも包含する。

【0136】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

- a) H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖、及び / または
 - b) L C D R 1、L C D R 2、ならびに L C D R 3 を含む軽鎖
- を含み、

30

前記 C D R が、

- 配列番号 14 (SYWVH) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 1、
 - 配列番号 15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) または配列番号 16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 2、
 - 配列番号 17 (GGTGTMAWFAY) 配列番号 18 (GGTGTLAWFAY)
- 、配列番号 19 (GGTGTMAWFAY) または配列番号 20 (GGTGTLAYFAY) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 3、
- 配列番号 21 (RSSQSLVHSYGNTYLY) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 1、
 - 配列番号 22 (RVSNRFS) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 2、及び
 - 配列番号 23 (FQGTHVPYT) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 3
- として定義され、

40

前記改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されており、特に、抗体またはその抗原結合性断片が、重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記

50

重鎖定常ドメインまたは断片が免疫療法剤に連結されている、
 改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 1 3 7 】

1 8 D 5 / バリエーション A / バリエーション B

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

a) H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖、及び / または

b) L C D R 1、L C D R 2、ならびに L C D R 3 を含む軽鎖

を含み、

前記 C D R が、

- 配列番号 1 4 (S Y W V H) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 1、

- 配列番号 1 5 (N I D P S D S D T H Y N Q K F K D) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 2、

- 配列番号 1 7 (G G T G T M A W F A Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 3、

- 配列番号 2 1 (R S S Q S L V H S Y G N T Y L Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 1、

- 配列番号 2 2 (R V S N R F S) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 2、及び

- 配列番号 2 3 (F Q G T H V P Y T) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R、

として定義され、

前記改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 1 3 8 】

バリエーション C

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

a) H C D R 1、H C D R 2、ならびに H C D R 3 を含む重鎖、及び / または

b) L C D R 1、L C D R 2、ならびに L C D R 3 を含む軽鎖

を含み、

前記 C D R が、

- 配列番号 1 4 (S Y W V H) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 1、

- 配列番号 1 6 (N I D P S D S D T H Y S P S F Q G) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 2、

- 配列番号 1 7 (G G T G T M A W F A Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 3、

- 配列番号 2 1 (R S S Q S L V H S Y G N T Y L Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 1、

- 配列番号 2 2 (R V S N R F S) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 2、及び

- 配列番号 2 3 (F Q G T H V P Y T) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 3

として定義され、

前記改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 1 3 9 】

バリエーション E

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗S I R P a抗体またはその抗原結合性断片であって、

- a) H C D R 1、H C D R 2、ならびにH C D R 3を含む重鎖、及び/または
- b) L C D R 1、L C D R 2、ならびにL C D R 3を含む軽鎖

を含み、

前記C D Rが、

- 配列番号14 (S Y W V H)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 1、
- 配列番号16 (N I D P S D S D T H Y S P S F Q G)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 2、
- 配列番号18 (G G T G T L A W F A Y)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 3、
- 配列番号21 (R S S Q S L V H S Y G N T Y L Y)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 1、
- 配列番号22 (R V S N R F S)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 2、及び
- 配列番号23 (F Q G T H V P Y T)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 3

として定義され、

前記改変抗S I R P a抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されている、
改変抗S I R P a抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0140】

バリエーションF

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗S I R P a抗体またはその抗原結合性断片であって、

- a) H C D R 1、H C D R 2、ならびにH C D R 3を含む重鎖、及び/または
- b) L C D R 1、L C D R 2、ならびにL C D R 3を含む軽鎖

を含み、

前記C D Rが、

- 配列番号14 (S Y W V H)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 1、
- 配列番号16 (N I D P S D S D T H Y S P S F Q G)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 2、
- 配列番号19 (G G T G T M A Y F A Y)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるH C D R 3、
- 配列番号21 (R S S Q S L V H S Y G N T Y L Y)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 1、
- 配列番号22 (R V S N R F S)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 2、及び
- 配列番号23 (F Q G T H V P Y T)に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるL C D R 3

として定義され、

前記改変抗S I R P a抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されている、
改変抗S I R P a抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0141】

バリエーションE F

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗S I R P a抗体またはその抗原結合性断片であって、

- a) H C D R 1、H C D R 2、ならびにH C D R 3を含む重鎖、及び/または
- b) L C D R 1、L C D R 2、ならびにL C D R 3を含む軽鎖

10

20

30

40

50

を含み、

前記 C D R が、

- 配列番号 14 (S Y W V H) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 1、
 - 配列番号 16 (N I D P S D S D T H Y S P S F Q G) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 2、
 - 配列番号 20 (G G T G T L A Y F A Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる H C D R 3、
 - 配列番号 21 (R S S Q S L V H S Y G N T Y L Y) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 1、
 - 配列番号 22 (R V S N R F S) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 2、及び
 - 配列番号 23 (F Q G T H V P Y T) に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる L C D R 3
- として定義され、

前記改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片が免疫療法剤に連結されている、
改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 1 4 2 】

本発明の抗 S I R P a 抗体は、本明細書に提供されるヒト抗体の H C D R 1 ならびに / もしくは H C D R 2 ならびに / もしくは H C D R 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; 及び / または本明細書に提供されるヒト抗体の L C D R 1 ならびに / もしくは L C D R 2 ならびに / もしくは L C D R 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有し得る。

【 0 1 4 3 】

一実施形態では、改変抗体は、そのバリエーションが、C D R 残基内もしくは C D R 残基に隣接した 1 つもしくは複数のアミノ酸挿入、ならびに / または C D R 残基内もしくは C D R 残基に隣接した欠失、ならびに / または C D R 残基の置換 (置換はそのようなバリエーションを生成するための好ましいタイプのアミノ酸変化である) を含む、提供されるヒト抗体の C D R の 1 つまたは複数のアミノ酸配列バリエーションを含む。

【 0 1 4 4 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

- 配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、ならびに配列番号 30 から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び / または

- 配列番号 31、配列番号 32、ならびに配列番号 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン

を含み、

免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 1 4 5 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

- 配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、ならびに配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 31、配列番号 32、ならびに配列番号 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン

を含み、

免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

10

20

30

40

50

【0146】

特定の可変ドメインの配列を以下の表1に示す。

【0147】

【表1】

表1. 本発明に従う抗体の重鎖可変ドメインならびに軽鎖可変ドメインの例

野生型抗体（キメラ ならびにマウス18 D5）の重鎖可変ド メイン	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYVHWVKRPIQ GLEWIGNIDPSDSPTHYNQKFKDKASLTVDKSSSTAYMLSSL TFEDSAVYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSA	配列番号24
ヒト化バリエント （HA）の重鎖可変 ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVHWVVRQMPGK GLEWIGNIDPSDSPTHYNQKFKDHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSS	配列番号25
ヒト化バリエント （HB）の重鎖可変 ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSPTHYNQKFKDHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSS	配列番号26
ヒト化バリエント （HC）の重鎖可変 ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSPTHYSPFQGHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSS	配列番号27
ヒト化バリエント （HE）の重鎖可変 ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSPTHYSPFQGHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSS	配列番号28
ヒト化バリエント （HF）の重鎖可変 ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSPTHYSPFQGHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGMAWFAYWQQGTLVTVSS	配列番号29
ヒト化バリエント （HEF）の重鎖可 変ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSPTHYSPFQGHVTLVVDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGGTGLAYFAYWQQGTLVTVSS	配列番号30
野生型抗体（キメラ ならびにマウス18 D5）の軽鎖	DVVTQTPLSLPVSLGQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYLQ KPGQSPKLLIYRYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGIVYFCFQGTHTVPTFGSGTKLEIK	配列番号31
ヒト化バリエントA （LA）の軽鎖可変 ドメイン	DVVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQQ RPGQSPRLLIYRYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGIVYFCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	配列番号32
ヒト化バリエント （LB）の軽鎖可変 ドメイン	DVVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQQ RPGQSPRLLIYRYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGIVYFCFQGTHTVPTFGGGTKVEIK	配列番号33

【0148】

本発明において例証される抗体の可変ドメインの配列は、表2に示す配列の組合せから推定することができる。

【0149】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 本発明に従う特定の抗体の重鎖可変ドメインならびに軽鎖可変ドメイン

抗体	重鎖可変ドメイン	軽鎖可変ドメイン
18D5 (キメラならびにマウス)	配列番号 24	配列番号 31
HALA	配列番号 25	配列番号 32
HALB	配列番号 25	配列番号 33
HBLA	配列番号 26	配列番号 32
HBLB	配列番号 26	配列番号 33
HCLA	配列番号 27	配列番号 32
HCLB	配列番号 27	配列番号 33
HELA	配列番号 28	配列番号 32
HELB	配列番号 28	配列番号 33
HFLA	配列番号 29	配列番号 32
HFLB	配列番号 29	配列番号 33
HEFLA	配列番号 30	配列番号 32
HEFLB	配列番号 30	配列番号 33

10

20

30

【0150】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号 33 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメインを含み、免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0151】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

40

- 配列番号 33 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、ならびに配列番号 30 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、

好ましくは

- 配列番号 29 ならびに配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、

より好ましくは

- 配列番号 30 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重

50

鎖可変ドメイン

を含み、

免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

【 0 1 5 2 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

- 配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、
または
- 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、
及び
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

または

- 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び
- 配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含み

免疫療法剤に連結されている、

改変抗 S I R P a 抗体または抗原結合性断片に関する。

【0153】

一実施形態では、改変抗体または抗原結合性断片は、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、もしくは配列番号 30 に関して同定されている重鎖可変ドメインの 33 位のアミノ酸 W (W33) の置換を有さず、及び/または配列番号 31、配列番号 32、もしくは配列番号 33 に関して同定されている軽鎖可変ドメインの 39 位のアミノ酸 Y (Y39)、55 位のアミノ酸 R (R55) ならびに/もしくは 60 位のアミノ酸 F (F60) の置換を有さず、特に重鎖可変ドメインの W33 位で置換を有さず、軽鎖可変ドメインの Y39、R55、ならびに F60 位で置換を有さない。

【0154】

本発明において、改変抗体は、任意の重鎖ならびに軽鎖定常ドメイン、及びその断片によって産生することができる。

【0155】

一実施形態では、本発明の改変抗ヒト S I R P a 抗体は、ヒト化モノクローナル抗体であり、特に抗体軽鎖定常ドメインは、ヒトカップ軽鎖定常ドメインに由来し、より詳しくは軽鎖定常ドメインは、配列番号 35 の配列からなり、及び/または抗体重鎖定常ドメインは、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくは I g G 4 (野生型または変異型) 重鎖定常ドメインに由来し、特にヒト I g G 4 重鎖定常ドメインに由来し、より詳しくは抗体重鎖定常ドメインは、配列番号 34 を有する配列からなる。

【0156】

当業者に周知であるように、重鎖定常ドメインの I g G アイソタイプの選択は、特定の機能が必要であるか否か、ならびに適した *in vivo* 半減期にとっての必要性に重点を置く。例えば、がん細胞の選択的撲滅のために設計された抗体は、典型的に補体の活性化ならびに抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性によるエフェクター媒介性細胞殺滅を可能にする活性なアイソタイプを必要とする。ヒト I g G 1 ならびに I g G 3 (短い半減期) アイソタイプはいずれも、これらの基準を満たし、特にヒト I g G 1 アイソタイプ (野生型ならびにバリエーション) はこれらの基準を満たす。特に、重鎖定常ドメインの I g G アイソタイプ (特に、ヒト野生型ならびにバリエーション I g G 1 アイソタイプ) に応じて、本発明の抗ヒト S I R P a 抗体は、CDC、ADCC ならびに/または ADCP 機構を介して S I R P a を発現する細胞に対して細胞傷害性であり得る (Salfeld, *nature biotechnology*, vol. 25, N° 12, 2007; Irani et al. *Molecular Immunology*, vol. 67, issue 2, part A, 2015)。実際に、結晶化可能断片 (Fc) 領域は、多様なアクセサリ分子と相互作用して、間接的なエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞性細胞傷害性 (ADCC)、抗体依存性細胞食作用 (ADCP)、ならびに補体依存性細胞傷害性 (CDC) を媒介する。

【0157】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 本発明に従う抗体にとって適した重鎖定常ドメインならびに軽鎖定常ドメインの例

<p>重鎖定常ドメイン (I g G 4 m - S 2 2 8 P) 配列番号 3 4</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPKSTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDVQEDPEVQFNWYVDG EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK</p>
<p>軽鎖定常ドメイン (C L カ ヱ ヲ) 配列 番号 3 5</p>	<p>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

10

【 0 1 5 8 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体であって、

20

- 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

30

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

40

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

50

- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖

10

を含み、

免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体に関する。

【 0 1 5 9 】

20

30

40

50

【表 4】

本発明に従う特定の抗体の重鎖ならびに軽鎖配列

<p>野生型抗体（マウス 18D5）の重鎖</p>	<p>QVQLQQPGAELVVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYVWHVVKQRPIQ GLEWIGNIDPSDS<th>THY</th>NQKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSL TFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSAAKTTPPSVY PLAPGCGDTTGSSTVTLGCLVKGYFPESVTVTWSGSLSSSVHT FPALLQSGLYTMSSSVTPSSSTWPSQIVTCSVAHPASSTTVDK KLEPSGPISTINPCPPCKECKCPA PNLEGGPSVFIAPPNIKDVLMISLTPKVTCTVVDVSEDDPDVQ ISWVFNNEVHTAQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQWMSGK EFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAQVYILPPPAEQLSR KDVSLTCLVCGFNPQDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGS YFIYSKLNKMTSKWEKTDSPFCNVRHEGLKNVYLKKTISRSPG K</p>	THY	<p>配列番号 56</p>
<p>野生型抗体（キメラ 18D5）の重鎖</p>	<p>QVQLQQPGAELVVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYVWHVVKQRPIQ GLEWIGNIDPSDS<th>THY</th>NQKFKDKASLTVDKSSSTAYMQLSSL TFEDSAVYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	THY	<p>配列番号 36</p>
<p>ヒト化バリエント（ HA）の重鎖</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYVWHVVRQMPGK GLEWIGNIDPSDS<th>THY</th>NQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	THY	<p>配列番号 37</p>
<p>ヒト化バリエント（ HB）の重鎖</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVWHVVRQMPGK GLEWGNIDPSDS<th>THY</th>NQKFKDHVTLSDVKSISTAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	THY	<p>配列番号 38</p>

10

20

30

40

【 0 1 6 0 】

50

【表 5】

ヒト化バリエーション (HC) の重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSSTHYSPSPQGHVTLSDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWQGGTLVTYSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD KRVEVKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 39
ヒト化バリエーション (HE) の重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSSTHYSPSPQGHVTLSDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWQGGTLVTYSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD KRVEVKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 40
ヒト化バリエーション (HF) の重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSSTHYSPSPQGHVTLSDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWQGGTLVTYSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD KRVEVKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 41
ヒト化バリエーション (HEF) の重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYVHWVRQMPGK GLEWMGNIDPSDSSTHYSPSPQGHVTLSDKSI STAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWQGGTLVTYSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD KRVEVKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 42

10

20

30

40

【 0 1 6 1 】

【表 6】

野生型抗体（マウス 18D5）の軽鎖	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYLQ KPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYFCFQGTHTVPTFCGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNPFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQD SKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSSTSPIVKSFN RNEC	配列番号 57
野生型抗体（キメラ 18D5）の軽鎖	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYLQ KPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYFCFQGTHTVPTFCGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	配列番号 43
ヒト化バリエントA（LA）の軽鎖	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQQ RPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYFCFQGTHTVPTFCGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	配列番号 44
ヒト化バリエント（LB）の軽鎖	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQ RPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYFCFQGTHTVPTFCGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	配列番号 45

10

20

【0162】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、骨髄系由来サブレッサー細胞（MDS C）の分化MDS Cへの分化、特にCD80、CD86、ならびにCD103からなる群から選択される少なくとも1つのヒトマーカー、特にCD80、CD86、ならびにCD103からなる群から選択される少なくとも2つのヒトマーカーを発現する分化MDS Cへの分化、及びより詳しくはヒトマーカーCD80、CD86、ならびにCD103を発現する細胞；及び/またはCD11bを発現する分化MDS Cへの分化を誘導することができる、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

30

【0163】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記非抑制性細胞が、IL6、IL12、及びTNFなどの炎症促進性サイトカインを分泌し、IL10及びTGF などの抗炎症性サイトカインレベルがないかまたは低い、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

40

【0164】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記非抑制性細胞がiNOSを発現する、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0165】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記非抑制性細胞がMHCクラスIIマーカーを発現せず、マーカーCD80 - CD86を発現しない、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0166】

50

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記非抑制性細胞が、ナチュラルキラー細胞(NK)細胞の少なくとも1つのマーカーを発現する、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0167】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、マクロファージのM2極性を阻害することができ、及び/または炎症促進性M1型マクロファージに好都合である、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0168】

本発明の改変抗体は、炎症促進性の環境を誘導するために、マクロファージ極性を修飾することができ、すなわち本発明の改変抗体は、M2型マクロファージによって提供される抗炎症性シグナルを阻害することができ、ならびに/またはM1型マクロファージによって提供される炎症促進性シグナルに好都合となり得る。このアプローチは、特にがん細胞の除去におけるエフェクターT細胞の作用に好都合である炎症性環境を再度確立することを可能にする。

【0169】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、重鎖またはその断片、特に重鎖定常ドメインまたはその断片が、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0170】

意外にも、本発明者らは、試験した免疫療法剤が、重鎖またはその断片にグラフトした場合には機能的であるままであるが、軽鎖にグラフトした場合には、それらの全てがそのリガンドに結合することができるが機能的ではないことを観察した。

【0171】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記免疫療法剤が、前記抗体の重鎖定常ドメインまたはその断片のC末端に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0172】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記免疫療法剤が、前記抗体の重鎖定常ドメインまたはその断片のN末端に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0173】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、軽鎖、特に軽鎖定常ドメインまたはその断片が、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0174】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記免疫療法剤が、前記抗体の軽鎖定常ドメインのC末端に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0175】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、前記免疫療法剤が、前記抗体の軽鎖定常ドメインのN末端に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0176】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、PD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、CD80、CD86、CD28、4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、ICOS、ICOS-L、OX40L、GITR、HVEM、BTLA、CD160、LIGHT、TNFRSF25、2B4、CD48、Tim1、Tim3、Tim4、Gal9、LAG-3、CD40、CD40L、CD70、CD27、VISTA、B7H3、B7H4

10

20

30

40

50

(B7x)、TIGIT、CD112、HLA2(B7-H7)、TMIGD2(CD28H)、ブチロフィリン様分子2(BTNL2)、そのバリエーション及び断片からなる群から選択され、特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、そのバリエーション及び断片からなる群から選択され、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、そのバリエーション及び断片からなる群から選択される、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0177】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が哺乳動物種、特にヒトに由来する、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

10

【0178】

ヒトPD1の基準配列は、配列番号74の配列に対応する。上記で言及したように、PD1タンパク質に関して、PD1の可溶性型を含む4つのスプライスバリエーションが公知である(Nielsen et al., Cellular immunology, 235:2, 109~116頁, 2005)。本発明において、用語「PD1」は、Nielsen et al., 2005に記載される4つのPD1バリエーションを含む。

【0179】

ヒトPDL1の基準配列は、配列番号75の配列に対応する。

【0180】

ヒトCD80の基準配列は、配列番号76の配列に対応する。

20

【0181】

ヒトOX40Lの基準配列は、配列番号77の配列に対応する。

【0182】

ヒト4-1BBLの基準配列は、配列番号78の配列に対応する。

【0183】

ヒトICOSLの基準配列は、配列番号79の配列に対応する。

【0184】

ヒトCD86の基準配列は、配列番号80の配列に対応する。

【0185】

30

40

50

【表 7】

PD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86の基準配列

PD1 (UniProt Q15116) 配列番号74	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRFVNPFTFSALLVVTEDGNA TFTCSFSNTSESFVLNWRMSFSNQTDKLAFFPEDRSQPGQDCRFVVTQL PNGRDFHMSVVRARRRNDSTYLCGAI SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE VPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGTI GARRTGQPLKEDPSAVPVFVSDYGELEDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYAT IVFPSCMGTS SPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHC SWPL
PDL1 (UniProt Q9NZQ7) 配列番号75	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDL AALIVWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKQDLSLGNAAALQ ITDVKLQDAGVYRCMI SYGGADYKRI TVKVNA PYNKINQRILVVDPVTSE HELTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTNSKREKLFNVTSTLRIN TTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVI PELPLAHPPNERTHLVILGAILLC LGVALTFIFRLRKGRRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
CD80 (UniProt P33681) 配列番号76	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSC GHNVSVEELAQTRIYWQKBEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLS IVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAPKREHLAEVTL SVKADFFTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAV SSKLDNFMTTNSHFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPONLLPSWAIT LISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
OX40L (UniProt P23510) 配列番号77	MERVQPLEENVGNAARPRFRFNKLLLVASVIQGLGLLFCFTYICLHPSAL QVSHRYPRIQS IKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDIMKVQNN SVIINCDFG YLISLKGYP SQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVY LNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
4-1BBL (UniProt P41273) 配列番号78	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLA CPWAVSGARASPGSAAS PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVVFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGPQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVVLGLFRVTPEI PAGLPS PRSE
ICOSL (UniProt O75144) 配列番号79	MRLGSPGLLFLFSSLRADTQEKEVRAMVGS DVELSCACPEGSRFDLNDV YVYWQTSSEKTVVYHI PQNSSLENVDSRYRNRALMS PAGMLRGDFSLRL FNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFVVPVVSAPHSPS QDELTFCTCSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVV SVLRIARTPSVNI GCCIENVLLQONLTVGSGQTGNDIGERDKITENPVSTG EKNAATWSILAVLCLLVVAVAIGWVCRDRCLQHSYAGAWAVSPETELTG HV
CD86 (UniProt P42081) 配列番号80	MDPQCTMGLSNILFVMAFLLSGAAPLKI QAYFNETADLPCQFANSQNSL SELVVWFQDQENLVLNEVYLGKEKFDVSVH SKYMGRTS FDSDSWTLRLHNL QIKDKGLYQCI IHHKKTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPEI VPI SNITEN VYINLTCSSIHGYPEPKMSVLLRTKNSTIEYDGMQKSQDNVTELYDVS ISLSVSPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPPDHI PWIT AVLPTVII CVMVFCLILWKWKKKRPRNSYKCGTNTMERESEQTKKREK IHIPERSDEAQRVFKSSKTSSCDKSDTCF

10

20

30

40

【0186】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、及び配列番号80からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号74、配列番号75、配列番号76、及び配列番号78からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0187】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合

50

性断片であって、免疫療法剤が、前記抗体の重鎖定常ドメインまたはその断片のC末端に連結されている、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、及び配列番号80からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号74、配列番号75、配列番号76、及び配列番号78からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0188】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、前記抗体の軽鎖定常ドメインまたはその断片のC末端に連結されている、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、及び配列番号80からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号74、配列番号75、配列番号76、及び配列番号78からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

10

【0189】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、PD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、CD80、CD86、CD28、4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、ICOS、ICOS-L、OX40L、GITR、HVEM、BTLA、CD160、LIGHT、TNFRSF25、2B4、CD48、Tim1、Tim3、Tim4、Gal9、LAG-3、CD40、CD40L、CD70、CD27、VISTA、B7H3、B7H4 (B7x)、TIGIT、CD112、HLA2 (B7-H7)、TMIGD2 (CD28H)、プチロフィリン様分子2 (BTN2L2)、そのバリエーション及び断片、好ましくはその細胞外ドメイン (またはECD) 断片からなる群から選択されるタンパク質、特に、PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、そのバリエーション及び断片、好ましくはその細胞外ドメイン、またはその細胞外ドメインからなるポリペプチドからなる群から選択されるタンパク質、より詳しくは、PD1、PDL1、CD80、4-1BBL、そのバリエーション及び断片、好ましくはその細胞外ドメイン、またはその細胞外ドメインからなるポリペプチドからなる群から選択されるタンパク質を含むかまたはそれからなる、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

20

30

【0190】

特に、本発明に従う免疫療法剤の断片は、500、400、300、200、100、もしくは50アミノ酸より小さいもしくはそれに等しいサイズを有し (または500、400、300、200、100もしくは50アミノ酸未満もしくはそれに等しいアミノ酸からなる)、ならびに/または好ましくは少なくともそのリガンド結合能を有する。

【0191】

特に、本発明に従う免疫療法剤の断片は、80~500、特に100~500、特に100~300、特に80~160、より詳しくは100~200アミノ酸のサイズを有し (または80~500アミノ酸、特に100~500、特に100~300、特に80~160、より詳しくは100~200アミノ酸からなる)、少なくともそのリガンド結合能を有する。

40

【0192】

特に、本発明に従う免疫療法剤、すなわちPD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86の断片はそれぞれ、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、ならびに配列番号80に記載されるアミノ酸配列の少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、ならびに最も好ましくは少なくとも50%の断片に対応する。

【0193】

50

特に、本発明に従う免疫療法剤の断片、すなわち細胞外ドメインPD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86の断片はそれぞれ、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88に記載されるアミノ酸配列の少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、ならびに最も好ましくは少なくとも70%の断片に対応する。

【0194】

ある特定の実施形態では、免疫療法剤CD80、PD1、PDL1、ならびに4-1BBLの断片は、以下の表に例証される断片を含み得るかまたはそれからなり得る。

【0195】

【表8】

本発明の免疫療法剤のいくつかの活性な断片、ならびに本明細書に記載のCD80、PD1、PDL1、ならびに4-1BBLにおける配列でのその位置の説明

免疫療法剤	ECD サイズ	活性な断片のサイズ (アミノ酸ならびに配列での位置)	参考文献
CD80	208	101 (配列番号76の35~135) Ig様V型 86 (配列番号76の142~230) Ig様C2型	Girard et al, immunology letters 2014 Peach R.J. et al, J. Biol. Chem 1995
PD1	147 または 153	111 (配列番号74の35~145) (Ig様V型)	Ishida Y. et al, EMBO J. 1992 Zak et al, Structure. 2015
PDL1	219	109 (配列番号75の19~127) (Ig様V型) 93 (配列番号75の133~225) (Ig様C2型)	Lin D.Y. et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008
4-1BBL	205	154 (配列番号78の93~254) (TNF相同性ドメイン)	Gilbreth R.N. et al, J. of Biol. Chem., 2018

【0196】

特に、本発明に従う免疫療法剤、すなわちPD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86のバリエーションはそれぞれ、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、ならびに配列番号80の置換バリエーションであり、少なくともそのリガンド結合能を有する。

【0197】

特に、本発明に従う免疫療法剤、すなわちPD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86のバリエーションはそれぞれ、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、ならびに配列番号80と、その全長にわたって少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、なおより好ましくは少なくとも90%、ならびに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する。

10

【0198】

特に、本発明に従う免疫療法剤のバリエーション、すなわちPD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86の細胞外ドメインのバリエーションはそれぞれ、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88と、その全長にわたって少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、なおより好ましくは少なくとも90%、ならびに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有する。

【0199】

特に、本発明の免疫療法剤のバリエーションは、ネイティブ免疫療法剤の配列と、その全長にわたって少なくとも80%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる配列を有し、ならびにネイティブ免疫療法剤の少なくとも1つの生物活性を有し、ネイティブ免疫療法剤の配列は、特に配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、ならびに配列番号80のアミノ酸配列である。代替の実施形態では、ネイティブ免疫療法剤の配列は、免疫療法剤の公知の様々な形態のアライメントによって得られたコンセンサス配列であり得る。

20

【0200】

特に、本発明の免疫療法剤のバリエーションは、ネイティブ免疫療法剤の配列とその全長にわたって少なくとも80%、より詳しくは少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、ならびにさらにより詳しくは少なくとも99%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる配列を有する。

30

【0201】

本発明の説明において参照される同一性のパーセンテージは、例えばNeedleman and Wunsch 1970のアルゴリズムを使用して、比較される配列のグローバルアライメントに基づいて、すなわちその全長にわたる配列のアライメントに基づいて決定される。この配列比較は、例えばneedleのソフトウェアを使用して、パラメータ「ギャップ開始」= 10.0、パラメータ「ギャップ伸長」= 0.5、ならびに「BLOSUM 62」行列を使用して行うことができる。needleなどのソフトウェアは、ワールドワイドウェブサイトebi.ac.ukで「needle」の名称で入手可能である。

40

【0202】

本出願の実施例で使用するヒトPD1の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号81に関連する配列に対応する。

【0203】

本出願の実施例で使用するヒトPDL1の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号82に関連する配列に対応する。

【0204】

本出願の実施例で使用するヒトCD80の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号83

50

に関連する配列に対応する。

【 0 2 0 5 】

本出願の実施例で使用するヒト O X 4 0 L の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号 8 4 に関連する配列に対応する。

【 0 2 0 6 】

本出願の実施例で使用するヒト 4 - 1 B B L の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号 8 5 に関連する配列に対応する。

【 0 2 0 7 】

本出願の実施例で使用するヒト I C O S L の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号 8 6 に関連する配列に対応する。

10

【 0 2 0 8 】

本出願の実施例で使用するヒト C D 8 6 の細胞外ドメインの基準配列は、配列番号 8 7 に関連する配列に対応する。

【 0 2 0 9 】

20

30

40

50

【表 9】

PD1、PDL1、CD80、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにCD86のECDの基準配列：表6に記載した機能的な活性ドメインを太字または下線で示す。

PD1のECD 配列番号81	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSGYLTCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTEERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQ	
PDL1のECD 配列番号82	FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDK NIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKL QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNA PYNKINQRILVVDVPTSE HELTCQAEQYKAEVINTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVT STLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHFPNER	10
CD80のECD 配列番号83	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIIYWQKEKKMVLTMMS GDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYE KDAFKREHLAEVTLVSKADFPPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSG GFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTT NHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN	
OX40LのECD 配列番号84	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVI INCDGFYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLVNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCV L	20
4-1BBLのECD 配列番号85	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVVLGLFRVTFEIPA GLPSRSE	
ICOSLのECD 配列番号86	DTQEKEVRAMVGSDELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSKTV VTYHQPQNSSENVDSRYRNRAIMSPAGMLRGDFSLRFLFNVTPO DEQKPFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPS QDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTONSLDQALQNDTVFLNMR GLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIEENVLLQQNLTVGSQGTGNDIGE RDKITENPVSTGEKNAAT	30
CD86のECD 配列番号87	APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSSELVVFWDQENLVNE VYLGKEKFDVHSHKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANFSQPEIVPISNITENVYINL TCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGVMQKSQDNVTELYDV SISLSVSPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPPSIELEDPQPPP DH	40

【0210】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、ならびに配列番号87からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、及び配列番号85からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0211】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合

10

20

30

40

50

性断片であって、免疫療法剤が、配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 1 2 】

【表 1 0】

PD1のECDのロングバージョン：I g Vドメインを太字で示す。

配列番号 8 8	LQLGWRPGWFLDSPDRPWN PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSF
PD1のECDのロングバージョン (L v PD1)	SNTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPPEDRSQPGQDCRFRV TQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLTCGAIISLAPKAQIKESL RAELRVTEERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQ

10

【 0 2 1 3 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、前記抗体の重鎖定常ドメインまたはその断片の C 末端に連結されている、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、及び配列番号 8 8 からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、及び配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 1 4 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤が、前記抗体の軽鎖定常ドメインの C 末端に連結されている、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、及び配列番号 8 8 からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 5、及び配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかまたはそれからなるタンパク質である、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

20

【 0 2 1 5 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、

30

- 配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、ならびに配列番号 3 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、及び

- 配列番号 3 1、配列番号 3 2、ならびに配列番号 3 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、

特に

- 配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに

- 配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または

40

- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または

- 配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに

- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または

- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに

50

- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン、または
- 配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変ドメイン、ならびに
- 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変ドメイン

10

20

30

重鎖定常ドメインまたはその断片が、PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、そのバリエーションならびに断片、好ましくはその細胞外ドメイン（ECD）からなる群から選択されるタンパク質、

40

より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、そのバリエーションならびに断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質、を含むかまたはそれからなる免疫療法剤にそのC末端で連結されている、改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0216】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPα抗体であって、

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、

ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤

50

の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号56のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号57のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号36のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

10

- 配列番号43のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号37のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

20

- 配列番号44のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号37のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号45のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号38のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

30

- 配列番号44のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号38のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

40

- 配列番号45のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号39のアミノ酸配列を含むかもしくはそ

50

れからなる重鎖、及び

- 配列番号 44 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号39のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 45 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

10

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号40のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 44 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号40のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

20

- 配列番号 45 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号41のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

30

- 配列番号 44 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号41のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

40

- 配列番号 45 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号42のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 44 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

50

または

- PDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、
ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションからなる群から選択される、免疫療法剤の断片、好ましくは細胞外ドメイン（またはECD）を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号42のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号45のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖を含む、改変抗SIRPα抗体に関する。

【0217】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPα抗体であって、

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、ならびに配列番号85、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号56のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号57のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号36のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号43のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列を含むかしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号37のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号44のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列を含むかしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号37のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号45のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列を含むかしくはそれからなるタンパク質にそのC末端で連結されている、配列番号38のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号44のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、ならびに配列番号88からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号85、ならびに配列番号88か

10

20

30

40

50

結されている、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 5、配列番号 8 5、ならびに配列番号 8 8 からなる群から選択される配列を含むかもしくはそれからなるタンパク質にその C 末端で連結されている、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖

を含む、可変抗 S I R P a 抗体に関する。

10

【0218】

特に本発明において、改変抗体は、リンカーによって免疫療法剤に連結されている。言い換えれば、本発明は、その鎖またはその断片、好ましくはその重鎖またはその断片、より好ましくはその重鎖定常ドメインまたはその断片が、特にリンカーによって免疫療法剤に連結されている改変抗体に関する。本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、免疫療法剤と抗 S I R P a 免疫グロブリン配列部分とを連結する少なくとも 1 つのアミノ酸の配列を指す。そのようなリンカーは、立体妨害を防止するために有用であり得る。一部の実施形態では、リンカーは、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 または 30 アミノ酸残基を有する。しかし、上限は重要ではなく、例えばそのようなポリペプチドの生物薬剤の産生に関する利便性の理由から選択される。リンカー配列は、天然に存在する配列または天然に存在しない配列であり得る。治療目的のために使用する場合、リンカーは、好ましくはイムノアドヘシンが投与される対象に対して非免疫原性である。1 つの有用な群のリンカー配列は、国際公開第 9 6 / 3 4 1 0 3 号、ならびに国際公開第 9 4 / 0 4 6 7 8 号に記載される重鎖抗体のヒンジ領域に由来するリンカーである。他の例は、ポリアラニンリンカー配列である。リンカー配列のさらに好ましい例は、(g l y 4 s e r)₃ (配列番号 8 9、G G G G S G G G G S G G G G S)、(g l y 4 s e r)₄ (配列番号 9 0、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S)、(g l y 4 s e r) (配列番号 9 1、G G G G S)、(g l y 3 s e r) (配列番号 9 2、G G G S)、(g l y 3) (G G G)、(g l y 2 s e r) (G G S)、ならびに (g l y 3 s e r 2)₃ (配列番号 9 3、G G G S S G G G S S G G G S S)、特に (g l y 4 s e r)₃ を含む、異なる長さの G l y / S e r リンカーである。

20

30

【0219】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体 (またはその断片) であって、好ましくは配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、G G G、G G S、ならびに配列番号 9 3、特に配列番号 8 9 からなる群から選択されるリンカー配列によって免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体 (またはその断片) に関する。

【0220】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその断片であって、抗体 (またはその断片) の重鎖、特に重鎖定常ドメインまたはその断片が、好ましくは配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、G G G、G G S、ならびに配列番号 9 3、特に配列番号 8 9 からなる群から選択されるリンカー配列によって免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体またはその断片に関する。

40

【0221】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体またはその断片であって、抗体 (またはその断片) の軽鎖が、好ましくは配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、G G G、G G S、ならびに配列番号 9 3、特に配列番号 8 9 からなる群から選択されるリンカー配列によって免疫療法剤に連結されている、改変抗 S I R P a 抗体またはその断片に関する。

50

【 0 2 2 2 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体であって、

- 配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、ならびに配列番号 1 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 8、ならびに配列番号 1 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、ならびに配列番号 1 7 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 5、ならびに配列番号 1 7 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 2、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 2、ならびに配列番号 1 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 9、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 9、ならびに配列番号 1 8 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、
または

- 配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 5、配列番号 1 2 6、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 8、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

10

20

30

40

50

または

- 配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 5、配列番号 1 2 6、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 8、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、ならびに配列番号 1 8 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 3、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 5、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 3、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

10

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 3、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 5、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 3、ならびに配列番号 1 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

20

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、ならびに配列番号 1 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

30

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 7、配列番号 1 4 8、配列番号 1 4 9、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 7、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

40

- 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 7、配列番号 1 4 8、配列番号 1 4 9、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 7、ならびに配列番号 1 8 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる重鎖、及び

- 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むかしくはそれからなる軽鎖、

を含む改変抗 S I R P a 抗体に関する。

50

【 0 2 2 3 】

【 表 1 1 】

本発明の改変抗体の特定の重鎖。改変重鎖は、N末端からC末端に、リンカー
(gly4ser)₃によって免疫療法剤の細胞外ドメインに連結された重鎖からなる。

重鎖	リンカー	免疫療法剤のECD	免疫療法剤に連結された重鎖
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 94 (18D5-PD1)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 95 (18D5-PDL1)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 96 (18D5-CD80)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 97 (18D5-OX40L)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 98 (18D5-4-1BBL)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 99 (18D5-ICOSL)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 100 (18D5-CD86)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 101 (18D5c-PD1)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 102 (18D5c-PDL1)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 103 (18D5c-CD80)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 104 (18D5c-OX40L)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 105 (18D5c-4-1BBL)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 106 (18D5c-ICOSL)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 107 (18D5c-CD86)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 108 (HA-PD1)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 109 (HA-PDL1)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 110 (HA-CD80)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 111 (HA-OX40L)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 112 (HA-4-1BBL)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 113 (HA-ICOSL)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 114 (HA-CD86)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 115 (HB-PD1)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 116 (HB-PDL1)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 117 (HB-CD80)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 118 (HB-OX40L)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 119 (HB-4-1BBL)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 120 (HB-ICOSL)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 121 (HB-CD86)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 122 (HC-PD1)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 123 (HC-PDL1)

【 0 2 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

配列番号 39	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 124 (HC-CD80)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 125 (HC-OX40L)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 126 (HC-4-1BBL)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 127 (HC-ICOSL)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 128 (HC-CD86)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 129 (HE-PD1)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 130 (HE-PDL1)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 131 (HE-CD80)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 132 (HE-OX40L)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 133 (HE-4-1BBL)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 134 (HE-ICOSL)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 135 (HE-CD86)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 136 (HF-PD1)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 137 (HF-PDL1)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 138 (HF-CD80)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 139 (HF-OX40L)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 140 (HF-4-1BBL)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 141 (HF-ICOSL)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 142 (HF-CD86)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 143 (HEF-PD1)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 144 (HEF-PDL1)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 145 (HEF-CD80)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 146 (HEF-OX40L)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 147 (HEF-4-1BBL)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 148 (HEF-ICOSL)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 149 (HEF-CD86)
配列番号 56	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 178 (18D5-LvPD1)
配列番号 36	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 179 (18D5c-LvPD1)
配列番号 37	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 180 (HA-LvPD1)
配列番号 38	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 181 (HB-LvPD1)
配列番号 39	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 182 (HC-LvPD1)
配列番号 40	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 183 (HE-LvPD1)
配列番号 41	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 184 (HF-LvPD1)
配列番号 42	配列番号 89	配列番号 88	配列番号 185 (HEF-LvPD1)

10

20

30

40

【0 2 2 5】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRP α 抗体であって、

- 配列番号56のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、ならびに配列番号156からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号150、配列番号151、配列番号152、ならびに配列番号154からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、または
- 配列番号36のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び

50

好ましくは配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、ならびに配列番号 175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 41 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 164、配列番号 165、配列番号 166、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169、ならびに配列番号 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 164、配列番号 165、配列番号 166、ならびに配列番号 168 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 41 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174、配列番号 175、配列番号 176、ならびに配列番号 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、ならびに配列番号 175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 42 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 164、配列番号 165、配列番号 166、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169、ならびに配列番号 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 164、配列番号 165、配列番号 166、ならびに配列番号 168 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 42 のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174、配列番号 175、配列番号 176、ならびに配列番号 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、ならびに配列番号 175 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、を含む、改変抗 S I R P a 抗体に関する。

【 0 2 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

本発明の改変抗体の特定の軽鎖。改変軽鎖は、N末端からC末端に、リンカー（ $g_1 y_4 s e r$ ）₃によって免疫療法剤の細胞外ドメインに連結された軽鎖からなる。

軽鎖	リンカー	免疫療法剤のECD	免疫療法剤に連結された軽鎖
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 150 (18D5-PD1)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 151 (18D5-PDL1)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 152 (18D5-CD80)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 153 (18D5-OX40L)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 154 (18D5-4-1BBL)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 155 (18D5-ICOSL)
配列番号 57	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 156 (18D5-CD86)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 157 (18D5c-PD1)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 158 (18D5c-PDL1)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 159 (18D5c-CD80)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 160 (18D5cc-OX40L)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 161 (18D5-4-1BBL)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 162 (18D5c-ICOSL)
配列番号 43	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 163 (18D5c-CD86)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 81	配列番号 164 (LA-PD1)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 82	配列番号 165 (LA-PDL1)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 83	配列番号 166 (LA-CD80)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 84	配列番号 167 (LA-OX40L)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 85	配列番号 168 (LA-4-1BBL)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 86	配列番号 169 (LA-ICOSL)
配列番号 44	配列番号 89	配列番号 87	配列番号 170 (LA-CD86)

【 0 2 2 7】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片であって、

- 配列番号 1 4 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 4 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

10

20

30

40

50

- 配列番号 1 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 6 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 4 8 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

10

または

- 配列番号 1 4 9 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 1 8 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 1 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

20

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 3 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 4 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

30

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 5 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 6 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

または

- 配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる重鎖、及び
- 配列番号 1 7 7 に記載のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる軽鎖、

を含む、改変抗 S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 2 8 】

40

【表 1 4】

改変抗体HEFLBの特定の配列であり、可変領域を太字で示し、定常領域を下線で示し、リンカーをイタリック体で示し、免疫療法剤を通常の文字で示す。

重鎖 HEF-PD1 (配列番号 1 43)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPS DSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDTAMYICVRGGTGLAYFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV <i>TVSWNSGALTS</i> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN <i>VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP</i> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL <i>MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</i> <i>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI</i> SKAKGQPRE <i>PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</i> <i>TTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH</i> EALHNHYTQK <i>SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSDPRF</i> FWNPPTFSPALLLVV <i>TEGDNATFTCSFNTSSEFVLNWRMSPSNQTDKLA</i> AFPEDRSQPGQ <i>DCRFRTVQLPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCG</i> AISLAFKAQIKESL <i>RAELRV</i> TERRAEVPTAHPS <i>SPSRPAGQPQ</i>	10
重鎖 HEF-PD1.1 (配列番号 1 44)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPS DSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDTAMYICVRGGTGLAYFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV <i>TVSWNSGALTS</i> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN <i>VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP</i> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL <i>MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</i> <i>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI</i> SKAKGQPRE <i>PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</i> <i>TTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH</i> EALHNHYTQK <i>SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSDPRF</i> FWNPPTFSPALLLVV <i>TEGDNATFTCSFNTSSEFVLNWRMSPSNQTDKLA</i> AFPEDRSQPGQ <i>DCRFRTVQLPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCG</i> AISLAFKAQIKESL <i>RAELRV</i> TERRAEVPTAHPS <i>SPSRPAGQPQ</i>	20
重鎖 HEF-CD80 (配列番号 1 45)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPS DSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDTAMYICVRGGTGLAYFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV <i>TVSWNSGALTS</i> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN <i>VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP</i> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL <i>MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</i> <i>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI</i> SKAKGQPRE <i>PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</i> <i>TTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH</i> EALHNHYTQK <i>SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSDPRF</i> FWNPPTFSPALLLVV <i>TEGDNATFTCSFNTSSEFVLNWRMSPSNQTDKLA</i> AFPEDRSQPGQ <i>DCRFRTVQLPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCG</i> AISLAFKAQIKESL <i>RAELRV</i> TERRAEVPTAHPS <i>SPSRPAGQPQ</i>	30
重鎖 HEF-OX40L (配列番号 1 46)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWMGNIDPS DSDTHYSPSFQGHVTLSDVKSISTAYLQLSSLKASDTAMYICVRGGTGLAYFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV <i>TVSWNSGALTS</i> SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN <i>VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP</i> PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL <i>MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS</i> <i>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI</i> SKAKGQPRE <i>PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</i> <i>TTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH</i> EALHNHYTQK <i>SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSDPRF</i> FWNPPTFSPALLLVV <i>TEGDNATFTCSFNTSSEFVLNWRMSPSNQTDKLA</i> AFPEDRSQPGQ <i>DCRFRTVQLPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCG</i> AISLAFKAQIKESL <i>RAELRV</i> TERRAEVPTAHPS <i>SPSRPAGQPQ</i>	40

【 0 2 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 15】

重鎖 HEF-4-1-BBL (配列番号 1 47)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWGMGNIDPS DSDTHYSPFQGHVTLSDKSI STAYLQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNNHTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSGGGGREGPELSRDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGFLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFPQLELRRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLLHLISAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQCATVL GLFRVTPPEIPAGLPSRSE
重鎖 HEF-IC0SL (配列番号 1 48)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWGMGNIDPS DSDTHYSPFQGHVTLSDKSI STAYLQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNNHTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSDTQEKVVRAMVGSDELSCACPEG SRFDLNDVYVYVWQTSSEKTVVYTHIPQNSSLENDVSRYRNALMSPA GMLRGDFSLRLENVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVA NFSVPVVSAPHSPSQDELFTCTTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQA LQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNI GCCIENVLLQQNLTVGS QTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT
重鎖 HEF-CD86 (配列番号 1 49)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWGMGNIDPS DSDTHYSPFQGHVTLSDKSI STAYLQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNNHTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGGAPLKI QAYFNETADLPCQFANSQN QSLSELVVFWDQDENLVLNEVYLGKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWT LRLHNLQIKDKGLYQCI IHHKKPTGMIRIHQMNSSELSVLANFSQPEI VPI SNITENVYINLTCSSIHGYPEPKMVSLLRRTKNSTIEYDGVMOQ SQDNVTELYDVSISLSVSPFDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIE LEDPQPPPDH
HEF-LvPD1 (配列番号 1 85)	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTSYVHWVRQMPGKGLEWGMGNIDPS DSDTHYSPFQGHVTLSDKSI STAYLQLSSLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNNHTQK SLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSLQGWKRWFLDSPDRPWNPTTFSPALLY VTEGDNATFTCSFNTSESVFLNWRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQGCDCRFRVI QLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRYTERRAEVPT AHPSPSPRPAGQFQ

10

20

30

40

【0230】

【表 1 6】

軽鎖 LB-PD1 (配列番号 1 71)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSPGWFLDSPDRFVWPF TFSPALLVVTEDNATFTCSFSNTSEFVLNWRMSPSNQTDKLAAP PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGROFHMSVVRARRNDSGYLCCGAISLA PKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ
軽鎖 LB-PDL1 (配列番号 1 72)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSPVTVTPKDLYVVEYG SNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNI IQFVHGEE DLKVQHS YRQRARLLKQQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRT VKVNAPYKINQRILVVDVPTSEHELTCAEGYPKAEVIWNTSSDHQV LSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHT AELVIPELPLAHPNER
軽鎖LB-CD80 (配列番号 1 73)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSIHVTEKVEKAVTLS CGHNVSVEELAQTRIYWKKEKMMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDIT NNLSIVILALRPSDEGTIECVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFP TPSISDFEIP TSNIRRI ICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVS QDPTELYAVSSKLD FNMTNHS FMCLIKYGH LRVNQT FNWNTTKQE HFPDN
軽鎖 LB-0X40L (配列番号 1 74)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSSQVSHRYPRIQSIKIQV FTEYKKEKGFILTSQKED EIMKVQNN SVI INC DGFY LISLKG YFSQE VNI SLHYQKDEEPLFQLK KVR SVNSLMVASLTYKDKVYLNVT TDNTS LDDFHVNGGELILIHQNFGEFCVL
軽鎖 LB-4-1-BBL (配列番号 1 75)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSRGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVGLFRVTPEI PAGLPSRSE
軽鎖 LB-ICOSL (配列番号 1 76)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQRPGQSPRLLIY RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCFQGGTHVPYTFGGGK VEIK RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSDTQEKEVRAMVGS DV ELSCACPEGSRFDLNDVYVYWTSESKTVVYHI PQNSSLENDVDSRY RNRALMSPAGMLRGDFSLRLFVNT PQDEQKFKHCLVLSQS LGFQEVLS VEVTLHVAANFVSPVVSAPHSPSQDELFTCT SINGYPRPNVY WINK TDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNI GCCIENVL LQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT

10

20

30

40

【 0 2 3 1】

【表 1 7】

軽鎖	DVVMTQSPSLSLPVTILGQPASISCRSSQSLVHSYGNNTYLYWFQORPGQSPRLLIY
LB-CD86	RVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGTHTVPTFFGGGTK
(配列番号 1	VEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
77)	DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
	HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSAPLKIQAQYFNETADL
	PCQFANSQNSLSLSELVVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVHVKYMGK
	TSPFSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHHKKPTGMIRIHQMNSELSV
	LANFSQPEIVFISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRRTKNST
	IEYDGMQKSQDNVTELYDVSISLSVSPDVTSNMTIFCILETDKTR
	LLSSPFSIELEDPPPPDH

10

【 0 2 3 2】

改変SIRPa抗体

上記で定義した改変抗体に関して列挙した実施形態は、本発明の他の態様において列挙された改変抗体に、必要な変更を加えて繰り返される。

【 0 2 3 3】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70(ELIYNQKEGHFPR)、配列番号71(RNNMDFSI R I G N)、及び配列番号72(SPRDITLKW)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

20

【 0 2 3 4】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70(ELIYNQKEGHFPR)、配列番号71(RNNMDFSI R I G N)、及び配列番号72(SPRDITLKW)のペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 3 5】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号70(ELIYNQKEGHFPR)及び配列番号71(RNNMDFSI R I G N)からなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

30

【 0 2 3 6】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号70(ELIYNQKEGHFPR)及び配列番号71(RNNMDFSI R I G N)のペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 3 7】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号73(YNQK)及びSIRからなる群から選択される少なくとも1つのペプチドを含むコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

40

【 0 2 3 8】

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、SIRPa内の配列番号73(YNQK)及びSIRのペプチドを含むかまたはそれからなるコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合し、免疫療法剤に連結されている、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【 0 2 3 9】

50

別の態様では、本発明は、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、
 a) HCDR1、HCDR2、ならびにHCDR3を含む重鎖、及び/または
 b) LCDR1、LCDR2、ならびにLCDR3を含む軽鎖
 を含み、
 前記CDRが、

- 配列番号14 (SYWVH) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるHCDR1、
 - 配列番号15 (NIDPSDSDTHYNQKFKD) または配列番号16 (NIDPSDSDTHYSPSFQG) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるHCDR2、
 - 配列番号17 (GGTGTMAWFAY)、配列番号18 (GGTGTLAWFAY)、配列番号19 (GGTGTMAWFAY) または配列番号20 (GGTGTLAYFAY) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるHCDR3、
 - 配列番号21 (RSSQSLVHSYGNTYLY) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるLCDR1、
 - 配列番号22 (RVSNRFS) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるLCDR2、及び
 - 配列番号23 (FQGTTHVPYT) のアミノ酸配列のペプチドを含むかまたはそれからなるLCDR3
- として定義され、

前記改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片が重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記重鎖定常ドメインまたはその断片が、免疫療法剤に連結されている、
 改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0240】

- 本発明はまた、
- ヒトCD47のヒトSIRPaに対する結合を阻害し、ヒトSIRPgに特異的に結合せず、及び/または
 - 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、及び/または
 - ヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/または
 - ヒトCD47のヒトSIRPgに対する結合を阻害せず、及び/または
 - ヒトPBMCならびに/もしくはT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/または
 - ヒトPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/または
 - ヒトマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/または
 - ヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、ヒトCD47のヒトSIRPaに対する結合を阻害し、ヒトSIRPgに特異的に結合せず、及びヒトT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、ヒトCD47のヒトSIRPgに対する結合を阻害せず、ヒトPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、ヒトPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、ヒトマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させ、

前記改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片が、免疫療法剤に連結されており、特に前記改変抗SIRPa抗体または抗原結合性断片が、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインまたはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなる、改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片に関する。

【0241】

10

20

30

40

50

応用

上記で定義した本発明の改変抗体に関して列挙された応用は、本発明の単離された核酸分子ならびに単離された核酸分子の群、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の医薬組成物、及び本発明に従う産物の組合せに関して必要な変更を加えて繰り返される。

【0242】

別の態様では、本発明は、医薬として使用するための、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及びヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片に関する。

【0243】

本発明はまた、それを必要とする対象における処置の方法であって、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片であって、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片

の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法にも関する。

【0244】

10

20

30

40

50

本発明はまた、医薬の製造における

- 上記で定義した改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片、または
 - 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

10

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片の使用にも関する。

20

【0245】

別の態様では、本発明は、骨髓系由来サプレッサー細胞(MDSC)の分化MDSCへの分化、特にCD80、CD86、ならびにCD103からなる群から選択される少なくとも1つのヒトマーカー、特にCD80、CD86、ならびにCD103からなる群から選択される少なくとも2つのヒトマーカーを発現する分化MDSCへの分化、及びより詳しくはヒトマーカーCD80、CD86、ならびにCD103を発現する細胞；及び/またはCD11bを発現する分化MDSCへの分化によって改善または防止することができる任意の状態の処置における使用のための、

- 上記で定義した改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片、または
 - 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

30

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片に関する。

40

【0246】

50

本明細書で定義される場合、「骨髄系由来サブレッサー細胞(MDSC)を分化MDSCに分化させることによって改善または防止することができる状態」は、炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有するがん(特に浸潤性のMDSCならびに/またはTAM細胞を有するがん)を含むがん、感染性疾患、外傷、自己免疫疾患(例えば、リウマチ性関節炎、1型糖尿病、狼瘡、乾癬)、ワクチン接種、慢性炎症性疾患(例えば、クローン病ならびに潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患)、敗血症ショック、慢性感染性疾患(例えば、シュドモナスまたはCMVによる)、線維症、アテローム性動脈硬化症、または移植機能障害に対応する。

【0247】

本発明はまた、それを必要とする対象における骨髄系由来サブレッサー細胞(MDSC)を分化MDSCに分化させることによって改善または防止することができる任意の状態を処置する方法であって

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片

の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法にも関する。

【0248】

本発明はまた、単球性骨髄系由来サブレッサー細胞(Mo-MDSC)を非抑制性細胞に分化させることによって改善または防止することができる任意の状態を処置するための医薬の製造における

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結

10

20

30

40

50

合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、P B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、P B M CによるI F N gの分泌を増加させ、マクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗S I R P a抗体もしくはその抗原結合性断片の使用にも関する。

【0249】

一実施形態では、本発明は、炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性を改変することによって改善または防止することができる任意の状態の処置における使用のための、

- 上記で定義した改変抗S I R P a抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P aに対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはC D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくはP B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、及び/もしくはP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P aに対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、P B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、P B M CによるI F N gの分泌を増加させ、マクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗S I R P a抗体もしくはその抗原結合性断片に関する。

【0250】

実際に、S I R P aは、チェックポイント阻害剤として作用し、ならびにマクロファージの極性化に関与する。特に、マクロファージの炎症促進性プロファイルは、2型マクロファージ(M2型の高い食作用活性 = M (I L 4))を犠牲にして得られることから、S I R P aの遮断は、1型マクロファージ(M1炎症促進性 = M (I F N g))に関連するマクロファージの炎症促進性の機能を誘導し、ならびに腫瘍におけるマクロファージの抑制活性を阻害する。このように、S I R P aのアンタゴニストは、マクロファージのM2表現型の極性化を阻害することができ、ならびに/または炎症促進性M1型マクロファージ機能にとって好都合であり、治療薬において使用することができる。

【0251】

本明細書で定義される場合、「炎症促進性マクロファージに好都合となるようにマクロファージの極性化を改変することによって改善または防止することができる状態」は、例えば、固形がん、血液のがん、感染性疾患、外傷、自己免疫疾患、ワクチン接種、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、または慢性炎症性疾患に対応する。

【0252】

本発明はまた、それを必要とする対象における炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性化を改変することによって改善または防止することができる任意の状態を処置する方法であって、

- 上記で定義した改変抗S I R P a抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤

10

20

30

40

50

が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、
抗体もしくはその抗原結合性断片

の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0253】

一実施形態では、本発明は、炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性を改変することによって改善または防止することができる任意の状態を処置するための医薬の製造における、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、
抗体もしくはその抗原結合性断片

の使用にも関する。

【0254】

炎症促進性細胞に好都合となるようにマクロファージの極性を改変することは、複数の病態または状況において有用であり得る。上記で記載したように、この改変は、がんの状況において、マクロファージの抗腫瘍活性を回復するために、ならびに/またはM2型マクロファージの腫瘍促進活性を防止するために特に有用である。過剰なM2型マクロファージの極性化による不適切な免疫応答もまた、感染性疾患、線維症、ワクチン接種、外傷、ならびに慢性炎症性疾患において起こる。

【0255】

10

20

30

40

50

このように、特定の実施形態に従って、本発明の改変抗SIRPa抗体は、肺がん、中皮腫がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肉腫、膵臓がん、頭頸部がん、腎臓がん、胸腺腫、神経膠腫、黒色腫、ならびに血液のがん、例えばリンパ腫（ホジキンリンパ腫ならびに非ホジキンリンパ腫）、白血病、例えばT細胞ならびにB細胞の急性もしくは慢性のリンパ芽球性白血病（ALLまたはCLL）または急性もしくは慢性の骨髄性白血病（AMLまたはCML）、ならびに骨髄腫からなる群から選択されるがんを有する個体を処置するために使用することができる。

【0256】

一実施形態では、本発明は、がん（特に炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有する、特に浸潤性のMDS Cならびに/またはTAM細胞を有するがん）、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患（例えば、シュードモナスまたはCMVによる）、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、及び移植機能障害からなる群から選択される病態の処置に使用するための、

- 上記で定義した改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BB L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BB L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片

に関する。

【0257】

一実施形態では、本発明は、それを必要とする対象におけるがん（特に炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有するがん、特に浸潤性のMDS Cならびに/またはTAM細胞を有するがん）、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患（例えば、シュードモナスまたはCMVによる）、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、及び移植機能障害からなる群から選択される病態を処置する方法であって、

- 上記で定義した改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BB L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはP

B M C による I F N g の分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによる M I P 1 a の分泌を増加させ、及び/もしくはヒト T 細胞の活性化を増加させ、
 特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7 の S I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T 細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7 の S I R P g に対する結合を阻害せず、P B M C ならびに T 細胞による T N F a の分泌を増加させ、P B M C による I F N g の分泌を増加させ、マクロファージによる M I P 1 a の分泌を増加させ、ヒト T 細胞の活性化を増加させる、
 抗体もしくはその抗原結合性断片の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法に関する。

10

【 0 2 5 8 】

一実施形態では、本発明は、がん（特に炎症性のがん、ならびに浸潤性の骨髄系細胞を有するがん、特に浸潤性の M D S C ならびに/または T A M 細胞を有するがん）、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患（例えば、シュドモナスまたは C M V による）、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、I I 型糖尿病、及び移植機能障害からなる群から選択される病態を処置するための医薬の製造における、

- 上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片、または

20

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7 の S I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、及び/もしくは T 細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくは C D 4 7 の S I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくは P B M C ならびに T 細胞による T N F a の分泌を増加させ、及び/もしくは P B M C による I F N g の分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによる M I P 1 a の分泌を増加させ、及び/もしくはヒト T 細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7 の S I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T 細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7 の S I R P g に対する結合を阻害せず、P B M C ならびに T 細胞による T N F a の分泌を増加させ、P B M C による I F N g の分泌を増加させ、マクロファージによる M I P 1 a の分泌を増加させ、ヒト T 細胞の活性化を増加させる、
 抗体もしくはその抗原結合性断片の使用に関する。

30

【 0 2 5 9 】

一実施形態では、本発明は、上記で定義したその使用のための、上記で定義した改変抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片であって、S I R P a 陽性腫瘍を呈する患者に投与される、改変抗ヒト S I R P a 抗体またはその抗原結合性断片に関する。

40

【 0 2 6 0 】

一実施形態では、本発明は、ワクチン接種に使用するための、

- 上記で定義した改変抗 S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒト P D 1、ヒト P D L 1、ヒト C D 8 0、ヒト 4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7 の S I R P a に対する結合

50

を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはC D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくはP B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、及び/もしくはP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、P B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、P B M CによるI F N gの分泌を増加させ、マクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片に関する。

10

【0261】

一実施形態では、本発明は、対象のワクチン接種の方法であって、

- 上記で定義した改変抗S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはC D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくはP B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、及び/もしくはP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

20

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、C D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、P B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、P B M CによるI F N gの分泌を増加させ、マクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片

30

の有効量を前記対象に投与するステップを含む、方法に関する。

【0262】

一実施形態では、本発明はワクチンの製造における、

- 上記で定義した改変抗S I R P a 抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトP D 1、ヒトP D L 1、ヒトC D 8 0、ヒト4 - 1 B B L、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、C D 4 7のS I R P a に対する結合を阻害し、S I R P g に特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはC D 4 7のS I R P g に対する結合を阻害せず、及び/もしくはP B M CならびにT細胞によるT N F aの分泌を増加させ、及び/もしくはP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるM I P 1 aの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

40

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法

50

剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPaに対する結合を阻害し、SIRPgに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPgに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPa抗体もしくはその抗原結合性断片の使用に関する。

【0263】

抑制性骨髄系細胞は、特に幼い子供におけるワクチン接種の有効性を制限する。このため、抗SIRPa/gは、ワクチン応答において抗SIRPaによって提供される利益を制限し、Tリンパ球がワクチン接種に応答するのを防止する。

【0264】

本発明の改変抗体またはその抗原結合性断片は、対象に、多様な適した経路で、例えば静脈内(IV)、皮下(SC)、または筋肉内(IM)に投与することができる。

【0265】

改変抗体またはその抗原結合性断片は、単独または別の治療剤、例えば第2のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片と組み合わせて投与することができる。別の例では、抗体は、治療的細胞組成物等と組み合わせて、別の作用剤、例えば免疫抑制剤、赤血球生成刺激剤(ESA)と共に投与される。

【0266】

一実施形態では、本発明は、上記で定義したその使用のための改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片であって、第2の治療剤と組み合わせられる、改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片に関する。

【0267】

特に、本発明の抗SIRPa抗体は、臨床開発中のまたは既に販売されている作用剤による、腫瘍の免疫回避機構を克服するための一部の他の潜在的戦略と組み合わせることができる(Antonia et al. Immunology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258~6268頁、2014の表1を参照されたい)：

1 - 例えば抗CTLA4、抗PD1、または抗PD-L1分子を使用することによって、適応免疫の阻害を逆転させる(T細胞チェックポイント経路を遮断する)；

2 - 例えばアゴニスト抗CD137(抗4-1BB)抗体またはCD137(4-1BB)リガンドを含むアゴニスト分子を使用してCD137(4-1BB)を標的化することによって、適応免疫を切り替える(アゴニスト分子、特に抗体を使用してT細胞同時刺激受容体シグナル伝達を促進する)；

3 - 自然免疫細胞の機能を改善する；

4 - 例えばワクチンに基づく戦略を通して免疫系を活性化する(免疫細胞エフェクター機能を強化する)。

【0268】

第2の治療剤の投与は、抗SIRPa抗体の投与と同時にあり得るか、または同時になくてもよい。第2の作用剤の性質に応じて、同時投与を、「コンボ」としても知られる組合せ薬(産物)の形態で調製することができる。コンボは、固定用量で製造ならびに供給される単一の投与剤形で組み合わせた2つまたはそれより多くの活性な医薬成分を含む固定用量の組合せである。しかし、投与レジメンならびに/または投与経路は異なり得る。

【0269】

好ましい実施形態では、この第2の治療剤は、化学療法剤、放射線療法剤、免疫療法剤

10

20

30

40

50

、細胞治療剤（例えば、CAR-T細胞）、抗生物質、ならびにプロバイオティクスからなる群から選択される。前記免疫療法剤はまた、腫瘍抗原を標的とする抗体、特に抗Her2、抗EGFR、抗CD20、抗CD19、抗CD52からなる群から選択される抗体であり得る。

【0270】

改変抗体は、約1 ng/kg体重から約30 mg/kg体重またはそれより多くまでの有効用量として提供され得る。特定の実施形態では、投薬量は、1 μg/kgから約20 mg/kg、任意選択で10 μg/kgから10 mg/kgまで、または100 μg/kgから5 mg/kgまでの範囲であり得る。

【0271】

用語「有効用量」または「有効投薬量」または「有効量」は、所望の効果を達成するかまたは少なくとも部分的に達成するために十分な量として定義される。用語「有効用量」は、既に疾患に罹患している患者における疾患ならびにその合併症を治癒するかまたは少なくとも部分的に停止させるために十分な量を包含することを意味する。この使用のために有効な量または用量は、処置される状態、送達される抗体構築物、治療状況ならびに目的、疾患の重症度、以前の治療、患者の病歴ならびに治療剤に対する応答、投与経路、体格（体重、体表面または臓器サイズ）、ならびに/または患者の状態（年齢ならびに全身健康）、及び患者自身の免疫系の全般的状態に依存する。患者に1回または一連の投与によって投与することができるように、最適な治療効果を得るために適切な用量を調節することができる。

【0272】

そのような目的のための投与は、必要に応じて、例えば、毎日、週に2回、毎週、月に2回、毎月、または再発時に必要に応じて繰り返され得る。

【0273】

一態様では、本発明はまた、特に個別化医療、より詳しくはコンパニオン診断試験における診断試験において使用するための、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または
- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片にも関する。

【0274】

一実施形態では、本発明は、特に個別化医療、より詳しくはコンパニオン診断試験における診断方法であって、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片を使用する方法に関する。

10

【0275】

一実施形態では、本発明は、特に個別化医療、より詳しくはコンパニオン診断試験における診断試験のための医薬の製造における、

- 上記で定義した改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片、または

- 免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、及び/もしくはT細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、及び/もしくはCD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、及び/もしくはPBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、及び/もしくはPBMCによるIFNγの分泌を増加させ、及び/もしくはマクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、及び/もしくはヒトT細胞の活性化を増加させ、

20

30

特に、免疫療法剤に連結された重鎖定常ドメインもしくはその断片を含み、前記免疫療法剤が、ヒトPD1、ヒトPDL1、ヒトCD80、ヒト4-1BBL、その免疫療法剤バリエーション、ならびにその免疫療法剤断片、好ましくはその細胞外ドメインからなる群から選択されるタンパク質を含むかもしくはそれからなり、CD47のSIRPαに対する結合を阻害し、SIRPβに特異的に結合せず、T細胞の増殖を阻害せず、好ましくは増加させ、CD47のSIRPβに対する結合を阻害せず、PBMCならびにT細胞によるTNFαの分泌を増加させ、PBMCによるIFNγの分泌を増加させ、マクロファージによるMIP1αの分泌を増加させ、ヒトT細胞の活性化を増加させる、改変抗SIRPα抗体もしくはその抗原結合性断片の使用に関する。

40

【0276】

一態様では、本発明はまた、*in vitro*または*ex vivo*診断方法、特に個別化医療、より詳しくはコンパニオン診断において使用するために適した診断方法であって、本発明の改変抗SIRPα抗体またはその抗原結合性断片が、対象から以前に得た試料においてSIRPα+細胞を検出するために、ならびに任意選択でSIRPαの発現を定量するために使用される、診断方法にも関する。

【0277】

一態様では、本発明はまた、診断試験、特に個別化医療またはコンパニオン診断試験に

50

において使用するために適した医薬の製造における本発明の改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片の使用にも関する。

【0278】

一態様では、本発明はまた、個体から以前に得た生物試料中のSIRPaの発現ならびに/または発現レベルを決定する手段としての、本発明の少なくとも1つの改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片の使用にも関する。

【0279】

一態様では、本発明はまた、対象におけるSIRPa陽性細胞を前記対象から以前に得た生物試料から決定するための*in vitro*または*ex vivo*方法であって、
i) 本発明の改変抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片を使用して、前記対象から以前に得た生物試料中のSIRPaの発現ならびに/または発現レベルを*in vitro*で決定するステップを含む方法にも関する。

10

【0280】

一態様では、本発明はまた、SIRPaが対象、特にがんの対象における処置に対する応答を予測するバイオマーカーとして使用される方法における、本発明の少なくとも1つの改変抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片の使用、特に*in vitro*または*ex vivo*での使用にも関する。

【0281】

一態様では、本発明はまた、特に本発明の改変抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片による処置に対するがんの対象の応答を予測する*in vitro*または*ex vivo*での方法であって、

20

- 対象から以前に得た腫瘍試料中のSIRPaの発現レベルを、特に本発明の改変抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片によって決定するステップ、及び
 - SIRPaの発現レベルを、非応答対象集団におけるSIRPaの発現レベルを代表する値と比較するステップ
- を含み、

対象の腫瘍試料中のSIRPaの発現レベルが高ければ、対象が処置に応答することを示している方法にも関する。

30

【0282】

一態様では、本発明はまた、処置に対する対象の応答、特にがんと診断された対象の応答を予測するバイオマーカーとしてのSIRPaの存在を決定するステップを含む、対象から以前に得た試料におけるSIRP+細胞の存在を*in vitro*または*ex vivo*で決定する方法であって、

- 対象から以前に得た腫瘍試料中のSIRPaの発現レベルを、特に上記で定義した任意の改変抗ヒトSIRPa抗体またはその抗原結合性断片によって決定するステップ、及び
 - SIRPaの発現レベルを、非応答対象集団におけるSIRPaの発現レベルを代表する値と比較するステップ
- を含み、

40

対象の腫瘍試料中のSIRPaの発現レベルが高ければ、対象が処置に応答することを示している、方法にも関する。

【0283】

組成物

別の態様では、本発明は、上記の改変抗体またはその抗原結合性断片、ならびに/または本発明の単離された核酸分子または本発明の単離された核酸分子の群、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0284】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、対象または患者、例えば哺乳動物、特にヒトに投与するために適した組成物を包含することを意味する。一般的に、「医薬組成

50

物」は無菌的であり、通常、対象内で不適当な応答を誘発することが可能である混入物質を含まない（例えば、医薬組成物中の化合物は薬学等級である）。医薬組成物は、経口、口腔内、直腸、非経口、腹腔内、皮内、気管内等を含む複数の異なる投与経路を介して、それを必要とする対象または患者に投与するために設計することができる。

【0285】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、一般的に安全で、非毒性であり、生物学的にもその他でも不適当でない、医薬組成物を調製するために有用である賦形剤、希釈剤、担体、ならびに補助剤を包含することを意味し、獣医学での使用ならびにヒトの医薬での使用のために許容される賦形剤、希釈剤、担体、ならびに補助剤を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、そのような賦形剤、希釈剤、担体、及び補助剤の1つならびに1つより多くの両方を含む。

10

【0286】

特に、本発明は、活性成分として上記で定義した改変抗体またはその抗原結合性断片ならびに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【0287】

組合せ産物

別の態様では、本発明は、活性成分として上記の改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片ならびに/または本発明の単離された核酸分子もしくは単離された核酸分子の群、及び第2の治療剤を含む治療手段、特に組合せ産物手段であって、前記活性成分が、個別、連続的、または組合せ治療のために、特に組み合わせたまたは連続的使用のために製剤化される治療手段に関する。

20

【0288】

特に、本発明は、医薬の同時、個別、または連続的使用のための、上記で定義した改変抗SIRPa抗体またはその抗原結合性断片ならびに/または本発明の単離された核酸分子もしくは単離された核酸分子の群及び第2の治療剤を含む組合せ産物に関する。

【0289】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した組合せ産物であって、第2の治療剤が、化学療法剤、放射線療法剤、細胞療法剤、免疫療法剤、抗生物質、ならびにプロバイオティクスからなる群から選択される組合せ産物に関する。

【0290】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した組合せ産物であって、前記免疫療法剤が、治療ワクチン、特に適応免疫細胞（TならびにBリンパ球）の免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤、ならびに抗体-薬物コンジュゲートからなる群から選択される、組合せ産物に関する。

30

【0291】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した組合せ産物であって、適応免疫細胞（TならびにBリンパ球）の前記免疫チェックポイント遮断剤または活性化剤が、抗PD1、抗PD1、抗CTLA4、抗CD137、抗CD2、抗CD28、抗CD40、抗HVE M、抗BTLA、抗CD160、抗TIGIT、抗TIM-1/3、抗LAG-3、抗2B4ならびに抗OX40、抗CD40アゴニスト、CD40-L、TLRアゴニスト、抗ICOS、ICOS-L、ならびにB細胞受容体アゴニストからなる群から選択され、特に抗PD1、抗PD1、ならびに抗CD137からなる群から選択される、組合せ産物に関する。

40

【0292】

一実施形態では、前記免疫療法剤は、腫瘍抗原を標的とする抗体、特に抗Her2、抗EGFR、抗CD20、抗CD19、抗CD52からなる群から選択される抗体である。

【0293】

一態様では、本発明は、上記で定義した組合せ産物であって、骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）を分化MDSCに、特にCD80、CD86、ならびにCD103からなる群から選択される少なくとも1つのヒトマーカー、特にCD80、CD86、ならび

50

にCD103からなる群から選択される少なくとも2つのヒトマーカーを発現する分化MDS Cに、及びより詳しくはヒトマーカーCD80、CD86、ならびにCD103を発現する細胞に、及び/またはCD11bを発現する分化MDS Cに分化させることによって改善または防止することができる任意の状態の処置において同時、個別、または連続的に使用するための上記で定義した組合せ産物に関する。

【0294】

一実施形態では、本発明は、それを必要とする対象における骨髄系由来サプレッサー細胞(MDS C)を分化MDS Cに分化させることによって改善または防止することができる任意の状態を処置する方法であって、上記で定義した組合せ産物の有効量を前記対象に同時、個別、または連続的に投与するステップを含む方法に関する。

10

【0295】

一実施形態では、本発明は、骨髄系由来サプレッサー細胞(MDS C)を分化MDS Cに分化させることによって改善または防止することができる任意の状態を処置するための医薬の製造における上記で定義した組合せ産物の使用に関する。

【0296】

一態様では、本発明は、炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性を改変することによって改善または防止することができる任意の状態の処置において同時、個別、または連続的に使用するための上記で定義した組合せ産物に関する。

【0297】

一実施形態では、本発明は、それを必要とする対象における炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性を改変することによって改善または防止することができる任意の状態を処置する方法であって、上記で定義した組合せ産物の有効量を前記対象に同時、個別、または連続的に投与するステップを含む方法に関する。

20

【0298】

一実施形態では、本発明は、炎症促進性マクロファージへのマクロファージの極性を改変することによって改善または防止することができる任意の状態を処置するための医薬の製造における上記で定義した組合せ産物の使用に関する。

【0299】

一態様では、本発明は、がん、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患(例えば、シュドモナスまたはCMVによる)、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、ならびに移植機能障害からなる群から選択される病態の処置において、またはワクチン接種において同時、個別、もしくは連続的に使用するための上記で定義した組合せ産物に関する。

30

【0300】

一実施形態では、本発明は、それを必要とする対象のがん、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患(例えば、シュドモナスまたはCMVによる)、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、ならびに移植機能障害からなる群から選択される病態を処置する方法であって、上記で定義した組合せ産物の有効量を前記対象に同時、個別、または連続的に投与するステップを含む方法に関する。

40

【0301】

一実施形態では、本発明は、がん、感染性疾患、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、脳の損傷、神経損傷、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血症ショック、慢性感染性疾患(例えば、シュドモナスまたはCMVによる)、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、ならびに移植機能障害からなる群から選択される病態を処置するための、またはワクチン接種において使用するための医薬の製造における上記で定義された組合せ産物の使用に関する。

【0302】

核酸

50

別の態様では、本発明は、上記で定義された改変抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸分子または単離された核酸分子の群に関する。

【0303】

本明細書で使用される場合、核酸分子は、二本鎖ならびに一本鎖、直線状ならびに環状であり得る。好ましくは、核酸分子は、好ましくは宿主細胞に含まれるベクターに含まれる。

【0304】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した改変抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸分子または単離された核酸分子の群であって、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、ならびに配列番号69から選択される少なくとも1つの配列、及び免疫療法剤、特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにそのバリエーションならびにその断片、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションならびにその断片をコードする少なくとも1つの配列を含むかまたはそれからなる、単離された核酸分子または単離された核酸分子の群に関する。

10

【0305】

一実施形態では、本発明は、上記で定義した抗体またはその抗原結合性断片をコードする単離された核酸分子または単離された核酸分子の群であって、

- 前記抗体の重鎖可変ドメインをコードする配列であって、好ましくは、
 - 配列番号58、配列番号59、もしくは配列番号60、
 - 配列番号61もしくは配列番号62、ならびに
 - 配列番号63、配列番号64、配列番号65、もしくは配列番号66

20

を含む配列、及び/または

- 前記抗体の軽鎖可変ドメインをコードする配列であって、好ましくは、
 - 配列番号67、
 - 配列番号68、ならびに
 - 配列番号69

を含む配列、及び

免疫療法剤、特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、ならびにそのバリエーション、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、ならびにそのバリエーションをコードする少なくとも1つの配列を含む、前記核酸分子に関する。

30

【0306】

40

50

【表 18】

本発明に従う抗体の重鎖可変ドメインのCDR、ならびに軽鎖可変ドメインのCDRをコードする配列

HCDR1をコードする核酸配列 (配列番号14のアミノ酸配列に対応する)	AGCTATTGGGTGCAC	配列番号 58
	TCTTATTGGGTGCAC	配列番号 59
	TCCTATTGGGTGCAC	配列番号 60
HCDR2をコードする核酸配列 (配列番号15のアミノ酸配列に対応する)	AACATCGACCCCAGCGACTCTGATACCCA	配列番号 61
	TTACAATCAGAAGTTTAAGGAC	
HCDR2をコードする核酸配列 (配列番号16のアミノ酸配列に対応する)	AACATCGACCCCAGCGACTCTGATACACA	配列番号 62
	CTACTCCCTAGCTTTCAGGGC	
HCDR3をコードする核酸配列 (配列番号17のアミノ酸配列に対応する)	GGAGGAACCGGAACAATGGCTTGGTTTGC	配列番号 63
	TTAC	
HCDR3をコードする核酸配列 (配列番号18のアミノ酸配列に対応する)	GGAGGAACCGGCACACTGGCTTGGTTCGC	配列番号 64
	TTAC	
HCDR3をコードする核酸配列 (配列番号19のアミノ酸配列に対応する)	GGAGGAACCGGAACAATGGCTTACTTCGC	配列番号 65
	TTAT	
HCDR3をコードする核酸配列 (配列番号20のアミノ酸配列に対応する)	GGAGGAACCGGCACACTGGCTTACTTCGC	配列番号 66
	TTAT	
LCDR1をコードする核酸配列 (配列番号21のアミノ酸配列に対応する)	AGGTCCAGCCAGTCCCTGGTGCACAGCTA	配列番号 67
	TGGCAACACATACCTGTAT	
LCDR2をコードする核酸配列 (配列番号22のアミノ酸配列に対応する)	AGGTTGTCTAATCGGTTCTCC	配列番号 68
LCDR3をコードする核酸配列 (配列番号23のアミノ酸配列に対応する)	TTTCAGGGCACCCATGTGCCATACACA	配列番号 69

【0307】

特に、本発明は、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、ならびに配列番号55から選択される配列、及び特にPDL1、PD1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBL、ICOSL、そのバリエーションならびにその断片、より詳しくはPD1、PDL1、CD80、4-1BBL、そのバリエーションならびにその断片から選択される免疫療法剤をコードする少なくとも1つの配列を含むかまたはそれからなる核酸分子に関する。

【0308】

10

20

30

40

50

【表 19】

本発明に従う抗体の重鎖可変ドメインならびに軽鎖可変ドメインをコードする配列。

野生型抗体（キメラならびにマウス 18D5）の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTG GCTCCAGCGTGAAGCTGCTCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTT CACAAGCTATTGGGTGCACTGGGTGAAGCAGCGGCAATCCAG GGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCGACCCAGCGACTCTGATA CCCATTACAATCAGAAGTTTAAGGACAAGGCCCTCTCTGACCGT GGATAAGTCTTCCAGCACAGCTTATATGCAGCTGTCTTCCCTG ACATTCCAGGATTCCGCCGTGACTATTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGAACAATGGCTTGGTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 46
ヒト化バリエーション（HA）の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCCGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGTCTCTGAGGATCTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTT CACATCTTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCGACCCTAGCGACTCTGATA CCCACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTGACCCTGTCTGT GGATAAGTCCATCAGCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCCTCCGATACAGCTATGFACTATTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGAACAATGGCTTGGTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 47
ヒト化バリエーション（HB）の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGTCTCTGAGGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTT CACCAGCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCGACCCTAGCGACTCTGATA CACACTACAATCAGAAGTTTAAGGACCATGTGACCCTGAGCGT GGATAAGTCCATCAGCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCCTCTGATACCCTATGFACTATTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGAACAATGGCTTGGTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 48
ヒト化バリエーション（HC）の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAGGCTAGCGGCTACTCTTT CACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCGACCCAGCGACTCTGATA CACACTACTCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGT GGACAAGTCTATCTCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCAGCCATACCCTATGFACTATTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGAACAATGGCTTGGTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 49
ヒト化バリエーション（HE）の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCCCGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGCAGGCTAGCGGCTACTCTTY CACCTCCTATTGGGTGCACTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCGACCCAGCGACTCTGATA CACACTACTCCCTAGCTTTCAGGGCCATGTGACCCTGTCCGT GGACAAGTCTATCTCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCAGCCATACCCTATGFACTATTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGCACACTGGCTTGGTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 50

10

20

30

40

【0309】

50

【表 2 0】

ヒト化バリエーション (HF)の重鎖可変 ドメインをコードす る核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGAAGGCTAGCGGCTACTCTTT CACCTCCTATTGGGTGCAGTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCGACCCAGCGACTCTGATA CACACTACTCCCCTAGCTTTAGGGCCATGTGACCCTGTCCGT GGACAAGTCTATCTCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCAGCGATAACCGCTATGTAATTTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGAACAATGGCTTACTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 51
ヒト化バリエーション (HEF)の重鎖可 変ドメインをコード する核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAG GCGAGAGCCTGAGGATCTCTTGAAGGCTAGCGGCTACTCTTT CACCTCCTATTGGGTGCAGTGGGTGCGGCAGATGCCAGGCAAG GGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCGACCCAGCGACTCTGATA CACACTACTCCCCTAGCTTTAGGGCCATGTGACCCTGTCCGT GGACAAGTCTATCTCCACAGCCTATCTGCAGCTGTCCAGCCTG AAGGCCAGCGATAACCGCTATGTAATTTGCGTGAGGGGAGGAA CCGGCACACTGGCTTACTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTGACAGTGTCTTCC	配列番号 52
野生型抗体(キメラ ならびにマウス18 D5)の軽鎖をコー ドする核酸配列	GACGTGGTCATGACCCAGACACCACTGAGCCTGCCCGTGTCCC TGGGCGATCAGGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCT GGTGCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATTGGTACCTGCAG AAGCCAGGCCAGTCCOCCAAGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTA ATCGGTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTCTCCGGCTCTGGCTC CGGCACCGATTTACACTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCTGAG GACCTGGGCGTGTATTTCTGTTTTAGGGCACCCATGTGCCAT ACACATTTGGCTCTGGCACCAGCTGGAGATCAAG	配列番号 53
ヒト化バリエーションA (LA)の軽鎖可変 ドメインをコードす る核酸配列	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTCTCTGCCTGTGACCC TGGGACAGCCAGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCT GGTGCACAGCTATGGCAACACATACCTGTATTGGTACCAGCAG AGGCCCGGACAGAGCCCAAGGCTGCTGATCTACAGGGTGTCTA ATCGGTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGGCTCTGGCTC CGGCACCGATTTACACTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAG GATGTGGGCGTGTATTTCTGTTTTAGGGCACCCATGTGCCAT ACACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	配列番号 54
ヒト化バリエーション (LB)の軽鎖可変 ドメインをコードす る核酸配列	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCACTGTCTCTGCCTGTGACCC TGGGACAGCCAGCCTCTATCTCCTGCAGGTCCAGCCAGTCCCT GGTGCACAGCTACGGCAACACATACCTGTATTGGTTCCAGCAG AGGCCCGGACAGAGCCCAAGGCTGCTGATCTATAGGGTGTCTA ATCGGTTCTCCGGCGTGCCTGACAGGTTTAGCGGATCTGGATC CGGAACCGACTTACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAG GATGTGGGCGTGTACTATTGTTTTAGGGCACCCATGTGCCAT ACACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	配列番号 55

10

20

30

40

【0310】

特に、本発明は、以下の配列番号：配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132

50

2、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、ならびに配列番号185からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする配列を含むかまたはそれからなる核酸分子に関する。

10

【0311】

特に、本発明は、

- 配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、ならびに配列番号185からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする配列、及び

- 配列番号55の配列

を含むかまたはそれからなる核酸分子に関する。

【0312】

特に、本発明は、

- 配列番号52の配列、及び

- 配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、ならびに配列番号177からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする配列

を含むかまたはそれからなる核酸分子に関する。

20

【0313】

ベクター

別の態様では、本発明は、上記で定義した核酸分子を含むベクターに関する。

【0314】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、遺伝子材料を細胞に移入するための媒体として使用される核酸分子である。用語「ベクター」は、プラスミド、ウイルス、コスミド、ならびに人工染色体を包含する。一般的に、操作されたベクターは、複製開始点、マルチクローニングサイト、ならびに選択可能マーカーを含む。ベクターそのものは、一般的に、挿入物（導入遺伝子）ならびにベクターの「骨格」として作用するより大きい配列を含むヌクレオチド配列、一般的にDNA配列である。現代のベクターは、導入遺伝子挿入物及び骨格の他にさらなる特色：プロモーター、遺伝子マーカー、抗生物質抵抗性、レポーター遺伝子、標的化配列、タンパク質精製タグを包含し得る。発現ベクター（発現構築物）と呼ばれるベクターは、詳しくは、標的細胞において導入遺伝子を発現させるためのベクターであり、一般的に制御配列を有する。

30

【0315】

宿主細胞

別の態様では、本発明は、上記で定義したベクターならびに/または本発明の単離された核酸分子もしくは単離された核酸分子群を含む単離された宿主細胞に関する。

40

【0316】

本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」は、ベクター、外因性の核酸分子、ならびに本発明の抗体構築物をコードするポリヌクレオチドの受容物、及び/または抗体構築物そのものの受容物であり得るか、または受容物である任意の個々の細胞または細胞培養物を含むと意図される。それぞれの材料の細胞への導入は、形質転換、トランスフェクション等によって実行することができる。用語「宿主細胞」はまた、単一の細胞の子孫また

50

は可能性のある子孫を含むと意図される。適した宿主細胞は、原核細胞または真核細胞を含み、同様に細菌、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、ならびに動物細胞、例えば昆虫細胞ならびに哺乳動物細胞、例えばマウス、ラット、ウサギ、マカク、またはヒトの細胞を含むがこれらに限定されない。

【0317】

キット

別の態様では、本発明は、

- 上記で定義した改変抗体またはその抗原結合性断片、
- 前記改変抗体またはその抗原結合性断片をコードする核酸分子
- 前記核酸分子を含むベクター、及び/または
- 前記ベクターを含む細胞

を含むキットに関する。

【0318】

便宜上、本発明の改変抗体は、キットで、すなわち包装された試薬の組合せで提供され得る。

【0319】

本発明の文脈において、用語「キット」は、容器、受容物、またはその他において共に包装された2つまたはそれより多くの構成要素（そのうち1つは、本発明の抗体またはその抗原結合性断片、核酸分子、ベクターまたは細胞に対応する）を意味する。したがって、キットは、単一の単位として販売することができる、ある特定の目標を達成するために十分である産物ならびに/または器具の組として記述することができる。

【0320】

キットは、投与のための適した投薬量で本発明の改変抗体構築物を含有する、任意の適切な形状、サイズ、ならびに材料の1つまたは複数の受容物（例えば、バイアル、アンプル、容器、シリンジ、ボトル、バッグ）を含み得る。キットはさらに、使用説明書（例えば、リーフレットまたは説明マニュアルの形態）、本発明の改変抗体構築物を投与する手段、例えばシリンジ、ポンプ、注入器等、本発明の抗体構築物を再構成する手段、ならびに/または本発明の抗体構築物を希釈する手段を含有し得る。

【0321】

一実施形態では、本発明は、単一用量の投与単位のための上記で定義したキットに関する。本発明のキットはまた、乾燥/凍結乾燥改変抗体構築物を含む第1の受容物ならびに水性製剤を含む第2の受容物を含有し得る。本発明のある特定の実施形態では、シングルチャンバーならびにマルチチャンバーの充填済シリンジ（例えば、液体シリンジならびにリソシリンジ）を含有するキットが提供される。

【0322】

抗体を製造する方法

ある態様では、本発明は、抗体、特に本発明の抗体を製造する方法であって、非ヒト動物、特に非ヒト哺乳動物を、上記で定義した少なくとも1つの抗原に対して免疫するステップ、及び特に前記免疫した非ヒト動物から得られた血清を収集して、前記抗原に対する抗体を得るステップを含む方法にも関する。

【0323】

特に、本発明はまた、抗体を製造する方法であって、配列番号3（KFRKGSPD [DV] / [T] E）からなるヒトSIRPaのエピトープ配列を含むかまたはそれからなる抗原に対して非ヒト動物を免疫するステップ、及び特に前記免疫した非ヒト動物から得られた血清を収集して、前記抗原に対する抗体を得るステップを含む方法にも関する。

【0324】

特に、本発明はまた、抗体を製造する方法であって、配列番号3（KFRKGSPD [DV] / [T] E）からなるヒトSIRPaのエピトープ配列、ならびに配列番号1（SLIPVGP）、配列番号2（G / ARELIYNQKEGH）、配列番号4（QHTV SFTCESHGFSPRDITLKW F）、配列番号5（ICEVAHVTLQG）ま

10

20

30

40

50

たは配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなる群から選択されるヒト S I R P a の少なくとも1つのエピトープ配列を含むかまたはそれからなる抗原に対して非ヒト動物を免疫するステップ、及び特に前記免疫した非ヒト動物から得られた血清を収集して、前記抗原に対する抗体を得るステップを含む方法にも関する。

【0325】

特に、本発明はまた、抗体を製造する方法であって、配列番号1 (S L I P V G P)、配列番号2 (G / A R E L I Y N Q K E G H)、配列番号3 (K F R K G S P D [D V] / [T] E)、配列番号4 (Q H T V S F T C E S H G F S P R D I T L K W F)、配列番号5 (I C E V A H V T L Q G)、ならびに配列番号6 (Y P Q R L Q L T W L E) からなるヒト S I R P a のエピトープ配列を含むかまたはそれからなる抗原に対して非ヒト動物を免疫するステップ、及び特に前記免疫した非ヒト動物から得られた血清を収集して、前記抗原に対する抗体を得るステップを含む方法にも関する。

10

【0326】

特に、本発明はまた、上記で定義した抗体を製造する方法であって、抗体を既に定義した免疫療法剤に連結させるステップを含む方法にも関する。

【0327】

改変抗体を選択する方法

一態様では、本発明は、本発明の改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片を選択する方法であって、以下のステップ：

a . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片が S I R P a、特に上記で定義した抗原に結合する能力を試験するステップ (例えば、実施例1、2、ならびに3に記載する方法に従って)、

20

b . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片が S I R P b に結合する能力を試験するステップ (例えば、実施例7ならびに8に記載する方法に従って)、

c . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片が S I R P g に結合する能力を試験するステップ (例えば、実施例9ならびに10に記載する方法に従って)、

d . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片がヒト C D 4 7 のヒト S I R P a に対する結合を阻害する能力を試験するステップ (例えば、実施例4ならびに5に記載する方法に従って) ;

e . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片が T 細胞に結合する能力を試験するステップ (例えば、実施例12に記載する方法に従って) ;

30

f . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片が T 細胞の増殖を阻害しない能力、好ましくは T 細胞の増殖を増加させる能力を試験するステップ (例えば、実施例13に記載する方法に従って) ;

g . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片がヒト C D 4 7 のヒト S I R P g に対する結合を阻害する能力を試験するステップ (例えば、実施例11に記載する方法に従って) ;

h . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片がヒト P B M C ならびに / またはヒト T リンパ球による T N F a の分泌を増加させる能力を試験するステップ (例えば、実施例28または31に記載する方法に従って) ;

40

i . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片がヒト P B M C による I F N g の分泌を増加させる能力を試験するステップ (例えば、実施例29に記載する方法に従って) ;

j . 改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片がヒト T 細胞の活性化を増加させる能力を試験するステップ (例えば、実施例35に記載する方法に従って)

の少なくとも1つ ;

及び任意選択で以下のステップ :

- S I R P a、特に上記で定義した抗原に特異的に結合し、ならびに C D 4 7 の S I R P a に対する結合を有意に阻害し、ならびにヒト S I R P g に特異的に結合せず、ならびに / またはヒト T 細胞に特異的に結合せず、ならびに / またはヒト T 細胞の増殖を有意に阻害せず、好ましくは増加させ、ならびに / またはヒト C D 4 7 のヒト S I R P g に対す

50

る結合を有意に阻害せず、ならびに/またはヒトP B M Cならびに/もしくはヒトTリンパ球によるT N F aの分泌を増加させ、ならびに/またはヒトP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、ならびに/またはヒトT細胞の活性化を増加させる、より詳しくは、S I R P a、特に上記で定義した抗原に特異的に結合し、ならびにC D 4 7のS I R P aに対する結合を有意に阻害し、ならびにヒトS I R P gに特異的に結合せず、ならびにヒトT細胞に特異的に結合せず、ならびにヒトT細胞の増殖を有意に阻害せず、好ましくは増加させ、ならびにヒトC D 4 7のヒトS I R P gに対する結合を有意に阻害せず、ならびにヒトP B M Cならびに/またはヒトTリンパ球によるT N F aの分泌を増加させ、ならびにヒトP B M CによるI F N gの分泌を増加させ、ならびにヒトT細胞、特にヒトTリンパ球の活性化を増加させる、改変抗体またはそのような抗体の抗原結合性断片を選択するステップを含むかまたはそれからなる方法に関する。

10

【0328】

本発明の改変抗体を選択する方法は、有利には、本発明に従う抗体を製造する方法においてさらに実施することができる。

【0329】

以下の図面及び実施例は、当業者に、本発明を作製及び使用方法に関する完全な開示及び説明を提供するために述べられ、本発明者らが本発明として見なす範囲を制限することを意図せず、以下の実験が、実施された全てまたは唯一の実験であることを表すと意図しない。本発明は、その特定の形態を参照して記載されているが、様々な変更を行ってもよく、本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく均等物を置換してもよいことは当業者によって理解されるはずである。さらに、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、プロセスのステップまたは複数のステップ、本発明の目的、精神、ならびに範囲に適合するように多くの修飾が行われ得る。そのような改変は全て、添付の特許請求の範囲内であると意図される。

20

【0330】

実施例

以下の実施例では、抗体「18D5」（または「m18D5」）はマウス抗体18D5に対応し、「キメラ」抗体はキメラマウス/ヒト18D5抗体に対応し、抗体「HALA、HALB、HBLA、HBLB、HCLA、HCLB、HELA、HELB、HFLA、HFLB、HEFLA及びHEFLB」は特異的ヒト化18D5バリエーションに対応する。抗体6G10及び12D7は出願人に帰属する；これらの抗体はm18D5と同じ方法によって得られ、対照として使用される。これらの対照抗体はI g G 2 aマウスモノクローナル抗ヒトS I R P a抗体である。

30

さらに、市販の抗体が比較のために使用された。第1のものは、S E 7 C 2 (S a n t a C r u z s c - 2 3 8 6 3) と名付けられた抗S I R P a抗体；第2の抗体は、S I R P / 両方を認識することができ、S E 5 A 5 (B i o L e g e n d B L E 3 2 3 8 0 2) と名付けられた抗体；及び第3のものは、K w a r 2 3 (C r e a t i v e B i o l a b s) と名付けられた抗ヒトS I R P a抗体である。P C T出願国際公開第2013056352号に記載のトロント大学からのS I R P 2 9 と名付けられた抗ヒトS I R P a抗体も、比較のために使用された。

40

【0331】

改変抗S I R P a抗体を作出するため、ヒト化抗S I R P a抗体I g G 4 m (H E F L B)、重鎖または軽鎖の配列が抗体の重鎖または軽鎖のC末端に共刺激または共阻害免疫チェックポイントタンパク質の細胞外ドメイン(E C D)に結合された。H E F L B重鎖上の各異なるタンパク質の融合のため、P D 1、P D L 1、C D 8 0、C D 8 6、O X 4 0 L、4 - 1 B B LまたはI C O S Lの細胞外ドメインが合成され、H E F L Bのヒト化重鎖及びヒンジ領域を安定化する変異したヒトI g G 4のF c (S 2 2 8 P)を含有するV H - p F u s e C H I g - h G 4 m発現プラスミドにN s i Iによってクローニングされた(I n v i v o g e nのp F u s e C H I g - h G 4 mベクター、T o u l o u s e

50

)。HEFLBの軽鎖上の各異なるタンパク質の融合のため、PD1、PDL1、CD80、CD86、OX40L、4-1BBLまたはICOSLの細胞外ドメインが合成され、HEFLBのヒト化軽鎖及びヒトCLカッパを含有するVL-pFuse2CL Ig-hk発現プラスミドにAccI/NheIによってクローニングされた(InvivoGenのpFuse2CL Ig-hk、Toulouse)。

【0332】

HEK293Freestyle細胞において、野生型またはタンパク質と融合したVHhFcG4を含有するプラスミドは、リポフェクタミン法により、VL-CLk wtを含有するプラスミドとコトランスフェクトされ(VHprot+VL)；野生型VHhFcG4は、野生型またはタンパク質の1つと融合したVL-CLkを含有するプラスミドとコトランスフェクトされた(VH+VLprot)。48~72時間のインキュベーション後、上清が回収され、クエン酸0.1M pH3溶出緩衝液によるプロテインAクロマトグラフィー(HiTrap、GeHealthcare)での親和性によって精製された。精製された抗体は、PBS中で透析され、濃縮された。各抗体は、サンドウィッチELISAによって定量され、SIRPaまたはリガンド様抗原に対する活性アッセイで試験された。

10

【0333】

実施例1~23は、未改変抗SIRPa 18D5パリアントによって得られた実験結果を示す(図1~21)。

【0334】

実施例24~32は、異なる免疫療法剤に、その重鎖またはその軽鎖上で、C末端に連結した改変HEFLBパリアントによって得られた実験結果を示す(図22~30)。

20

【実施例1】

【0335】

ELISAによるSIRPaへの抗SIRPa抗体の結合分析

方法：抗SIRPa抗体の結合活性は、ELISAによって評価された。キメラ抗体、ヒト化抗体、SIRP29及びKwar23によるELISAアッセイのため、組換えhSIRPa(Sino Biologicals、Beijing、China；reference 11612-H08H)は、炭酸緩衝液(pH9.2)中、0.5µg/mlでプラスチック上に固定化され、精製された抗体が添加され、結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒトIgG(Jackson Immunoresearch；USA；reference 709-035-149)が添加され、従来の方法によって曝露された。

30

【0336】

マウス抗体によるELISAアッセイのため、組換えhSIRPa(Sino Biologicals、Beijing、China；reference 10975-H08H)は、炭酸緩衝液(pH9.2)中、0.5µg/mlでプラスチック上に固定化され、精製された抗体が添加され、結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスFc鎖(Jackson Immunoresearch；reference 115-036-071)が添加され、従来の方法によって曝露された。

40

【0337】

結果：図1A、1B、及び1Cに示すように、ELISAによって測定されたSIRPaへの異なる抗SIRPa抗体の結合活性は、第1の実験において、キメラ抗体では2.9ng/ml、HALAでは3.9ng/ml、HFLAでは5.1ng/ml、HFLBでは4.0ng/ml、HEFLAでは7.1ng/ml、HEFLBでは4.4ng/ml、第2の実験において、キメラ抗体では4.06ng/ml、HCLAでは5.60ng/ml、HCLBでは5.59ng/ml、HELAでは4.61ng/ml、HELBでは4.13ng/ml、及び第3の実験において、キメラ抗体では2.74ng/ml、HALBでは2.53ng/ml、HBLAでは2.68ng/ml、HBLB

50

では 2.95 ng/ml の有効濃度 (EC50) を示した。これらの結果は、試験した本発明の抗体が、他の公知の抗SIRPa抗体SIRP29 (3.7 ng/ml) 及びKwar23 (3.3 ng/ml) と比較してELISAによって良好なSIRPa結合剤であることを示す。これらの結果は、本発明の全ての抗体によって認識されるエピトープは、SIRPaがプラスチックウェル上にコートされる場合に接触できることを示す。

【0338】

図1Dに示すように、ELISAによって測定されたSIRPaへの異なる抗SIRPa抗体の結合活性は、SE5A5では 0.16 nM (24 ng/ml) 及びクローンm18D5では 0.06 nM (9 ng/ml) の有効用量 (ED50) を示した。クローン6G10及び12D7は、ELISAアッセイによってSIRPaを結合しないようであった。これらの結果は、クローンm18D5が、ELISAにより市販の抗体と比較して良好なSIRPa結合剤であることを示し、このクローンによって認識されるエピトープは、クローン6G10及び12D7と比較してSIRPaがプラスチックウェル上にコートされる場合に接触できることを示す。

10

【実施例2】

【0339】

SIRPaへの抗SIRPa抗体のバイオセンサー親和性測定

方法：組換えhSIRPa (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H) は、 $5 \mu\text{g/ml}$ (500 RU) でCM5センサーチップ (GeHealthcare; France) に固定化され、流速 $40 \mu\text{l}/\text{分}$ で異なる濃度で適用された。分析は、BIAcore 3000 (Biacore, GeHealthcare) によって実施された。値は、3分間の会合期間 (k_a) に続く10分間の解離期間 (k_d) 後に測定され、親和定数 (K_D) が決定された。

20

結果：図2に示すように、本発明の抗体はSIRPaに強い親和性 (K_D) を有し ($1.93 \times 10^{-10} \text{ M} \sim 3.67 \times 10^{-10} \text{ M}$)、公知の抗SIRPa抗体SIRP29及びKwar23の親和性と同等であり、市販の抗SIRPa抗体SE7C2及びSE5A5の親和性よりも良い。

【実施例3】

【0340】

細胞蛍光測定によるヒト単球でのSIRPa結合アッセイ

方法：ヒト単球での抗SIRPa抗体の結合を測定するため、ヒトFc受容体結合阻害剤 (BD pharmingen; USA; reference 564220) がまず、室温で30分間添加され、ヒト単球のヒトFc受容体を遮断し、バックグラウンドを低減した。次いで、抗体は4で30分間インキュベートされ、PE-標識抗ヒトIgG Fc (Biolegend; USA; reference 409303) によって4で30分間染色される前に洗浄された。マウス抗体では、PE標識抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch; reference 715-116-151) が使用された。試料は、BD LSRIIまたはCanto II細胞蛍光測定器で分析された。

40

結果：図3に示すように、結果は、ヒト単球での本発明の抗SIRPa抗体の強い結合及び結合剤の公知の抗SIRPa抗体Kwar23、SE7C2、及びSE5A5結合 (MFI (平均蛍光強度) によって測定された) を示す。

【実施例4】

【0341】

アンタゴニストELISAアッセイによるCD47と抗SIRPa抗体との間の競合分析

方法：競合ELISAアッセイのため、組換えhSIRPa (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H) は、炭酸緩衝液 (pH 9.2) 中、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ でプラスチック上に固定化された。キメラ抗体、ヒト化抗体、SIRP29及びKwar23のため、精製された抗体 (異な

50

る濃度)は最終 $6\mu\text{g}/\text{ml}$ (固定濃度)のビオチン化ヒトCD47Fc(AcroBiosystems interchim; France; reference: #CD7-H82F6)と混合され、 37°C で2時間競合結合を測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Vector Laboratories; USA; reference SA-5004)が添加され、ビオチン-CD47Fc結合が検出され、従来の方法によって曝露された。マウス抗体では、精製された抗体(異なる濃度)は $0.04\mu\text{g}/\text{ml}$ のCD47Fc(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H)と混合され、 37°C で2時間競合結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒトFc鎖(Jackson ImmunoResearch; reference 709-035-149)が添加され、CD47Fc結合が検出され、従来の方法によって曝露された。

10

結果:図4に示すように、本発明の抗体は、SIRPa-CD47相互作用へのアンタゴニスト活性を有する。特に、キメラ抗体、HFLA、HFLB、HEFLA及びHEFLBは、SIRP29及び市販の抗SIRPa抗体SE5A5のアンタゴニスト活性と比較してよりアンタゴニスト活性を有することが観察される。

【実施例5】

【0342】

アンタゴニスト細胞蛍光測定アッセイによるヒト単球でのCD47とヒト化抗SIRPa抗体との間の競合分析

20

方法:ヒト単球でのCD47とヒト化抗SIRPa抗体との間の競合を測定するため、精製された抗体が 4°C で15分間単球に添加され、次いで最終 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化ヒトCD47Fc(AcroBiosystems interchim; France; reference: #CD7-H82F6)と混合され、 4°C で30分間インキュベートされ、競合結合抗体が測定された。インキュベーション及び洗浄後、PE標識ストレプトアビジン(BDBiosciences; USA; reference 554061)が 4°C で15分間添加され、ビオチン-CD47Fc結合が検出され、BD LSR IIまたはCanto II細胞蛍光測定器で分析された。

ヒト単球でのCD47とマウス抗hSIRPa抗体との間の競合を測定するため、精製された抗体が 4°C で15分間単球に添加され、次いで最終 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のCD47Fc(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H)と混合され、 4°C で15分間インキュベートされ、競合結合抗体が測定された。インキュベーション及び洗浄後、FITC標識抗ヒトFc(Beckman Coulter; reference IM1627)が 4°C で15分間添加され、CD47Fc結合が検出され、BD LSR IIまたはCanto II細胞蛍光測定器で分析された。

30

結果:図5に示すように、本発明の抗体は、ヒト単球でのSIRPa-CD47相互作用へのアンタゴニスト活性を有する。

【実施例6】

【0343】

SP-DとのBlitz法競合

40

方法:この方法は、Blitz(Forte Bio; USA; reference C22-2 No61010-1)によって実施された。

状態A: SIRPa+抗SIRPa抗体+界面活性剤タンパク質D(SP-D)。第1のステップでは、SIRPa(His)組換えタンパク質(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H)は、ヒスチジンテイルによって30秒間Ni-NTAバイオセンサー(Forte Bio; USA; reference 18-0029)に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で固定化された。第2のステップでは、抗SIRPa抗体は120秒間 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ (飽和濃度)で添加された。次いで、ヒトSP-D(RetD Systems; USA; reference

50

1920-SP-050)は、120秒間抗SIRPa抗体と競合して100 μ g/mlで会合された。SP-Dの解離は、120秒間動態緩衝液中で行われた。データの分析は、Blitz pro 1.2ソフトウェアによって行われ、これは会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)を算出し、親和定数KD(k_a/k_d)を決定した。

状態B: SIRPa+界面活性剤タンパク質D(SP-D)+抗SIRPa抗体。第1のステップでは、Sirp-a(His)組換えタンパク質(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H)は、ヒスチジンテイルによって30秒間Ni-NTAバイオセンサー(Forte Bio; USA; reference 18-0029)に10 μ g/mlで固定化された。第2のステップでは、ヒトSP-D(Ret D Systems; USA; reference 1920-SP-050)は、120秒間100 μ g/mlで添加された。次いで、抗SIRPa抗体は120秒間20 μ g/ml(飽和濃度)で会合された。抗SIRPa抗体の解離は、120秒間動態緩衝液中で行われた。分析データは、Blitz pro 1.2ソフトウェアによって作成され、これは会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)を算出し、親和定数KD(k_a/k_d)を決定した。

結果: 図6に示すように、抗SIRPa抗体18D5の結合は、SP-DのSIRPaへの結合を遮断せず、SP-Dの結合は、18D5のSIRPaへの結合を遮断しない。したがって、本発明の抗体は、SIRPaとSP-Dとの間の相互作用を阻害しない。

【実施例7】

【0344】

Blitz法によるSIRPbへの抗SIRPa抗体の親和性

方法: この方法は、Blitz(Forte Bio; USA; reference C22-2 No61010-1)によって実施された。組換えhSIRPb-His(Antibodies-online; USA; reference ABIN3077231)は、ヒスチジンテイルによって30秒間Ni-NTAバイオセンサー(Forte Bio; USA; reference 18-0029)に10 μ g/mlで固定化された。次いで、抗SIRPa抗体は120秒間20 μ g/mlで会合された。抗SIRPaの解離は、120秒間動態緩衝液中で行われた。データの分析は、Blitz pro 1.2ソフトウェアによって行われ、これは会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)を算出し、親和定数KD(k_a/k_d)を決定した。

結果: 図7Aに示すように、本発明の抗体は、SIRPaと比較してSIRPbに低い親和性を有する。特に、キメラ抗体、HFLA、HFLB、HEFLA、HEFLBは、SIRP29及びKwar23と比較してSIRPbに低減した親和性を有する。

【実施例8】

【0345】

SIRPbでの抗SIRP抗体のELISA結合

方法: 活性ELISAアッセイのため、組換えhSIRPb-His(Antibodies-online; USA; reference ABIN1466557)は、炭酸緩衝液(pH9.2)中、1 μ g/mlでプラスチック上に固定化され、精製された抗体が添加され、結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識口バ抗ヒトIgG(Jackson Immunoresearch; USA; reference 709-035-149)が添加され、従来の方法によって曝露された。

結果: 図7Bに示すように、抗SIRPa抗体はSIRPbに低い親和性を有する。顕色は、(マウス抗体によって曝露された)B4B6を除く全ての抗体に対して口バ抗ヒト抗体により実施されたことを示し、抗SIRPb抗体B4B6で得られたシグナルが抗SIRPa抗体で得られたシグナルより低いことを説明し得る。

【実施例9】

【0346】

Blitz法によるSIRPgへの抗SIRPa抗体の親和性分析

方法: この方法は、Blitz(Forte Bio; USA; reference C

10

20

30

40

50

22-2 No61010-1)によって実施された。組換えhSIRP_g-His (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11828-H08H)は、ヒスチジンテイルによって30秒間Ni-NTAバイオセンサー (Forte Bio; USA; reference 18-0029)に10μg/mlで固定化された。次いで、抗SIRP_a抗体は120秒間20μg/mlで会合された。抗SIRP_a抗体の解離は、120秒間動態緩衝液中で行われた。データの分析は、Blitz pro 1.2ソフトウェアによって行われ、これは会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)を算出し、親和定数KD(k_a/k_d)を決定した。

結果：図8Aに示すように、本発明の抗SIRP_a抗体は、SIRP_gに低い親和性を有する。この親和性は、公知の抗SIRP_a抗体SIRP29及びKwar23の親和性よりもわずかに弱い。しかしながら、SIRP29及びKwar23と比較して抗SIRP_a抗体の高い解離速度定数(K_d)により、動的特性は抗SIRP_a抗体、SIRP29とKwar23との間で異なる。特に、HFLBは、SIRP29及びKwar23のKD値と比較して2log差に等しい1.036×10⁻⁷MのKD値によりSIRP_gに最も低い親和性を有する。

【実施例10】

【0347】

SIRP_gへの抗SIRP抗体のELISA結合

方法：活性ELISAアッセイのため、hSIRP_g-His (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11828-H08H)は、炭酸緩衝液(pH9.2)中、1μg/mlでプラスチック上に固定化され、精製された抗体が添加され、結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヒトIgG (Jackson Immunoresearch; USA; reference 709-035-149)が添加され、従来の方法によって曝露された。

結果：図8Bに示すように、抗SIRP_a抗体HEFLBはSIRP_gに結合しないが、公知の抗SIRP_a抗体SIRP29及びKwar23はSIRP_gに顕著な結合を示す。

【実施例11】

【0348】

SIRP_g : SIRP_g + 抗SIRP_a抗体 + CD47に対するCD47によるBlitz法競合

方法：この方法は、Blitz (Forte Bio; USA; reference C22-2 No61010-1)によって実施された。第1のステップでは、hSIRP_g-His (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11828-H08H)は、ヒスチジンテイルによって30秒間Ni-NTAバイオセンサー (Forte Bio; USA; reference 18-0029)に10μg/mlで固定化された。第2のステップでは、抗SIRP_a抗体は120秒間20μg/ml (飽和濃度)で添加された。次いで、ヒトCD47Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H)は、120秒間抗SIRP_a抗体と競合して100μg/mlで会合された。CD47Fcの解離は、120秒間動態緩衝液中で行われた。分析データは、Blitz pro 1.2ソフトウェアによって行われ、これは会合定数(k_a)及び解離定数(k_d)を算出し、親和定数KD(k_a/k_d)を決定した。

結果：図9に示すように、本発明の抗SIRP_a HEFLBはCD47のSIRP_gへの結合と競合しない。反対に、他の公知の抗体SIRP29、特にkwar23はCD47のSIRP_gへの結合と競合する。

【実施例12】

【0349】

フローサイトメトリーによる血液細胞への結合

10

20

30

40

50

方法：実験は、ヒト血液細胞での抗SIRPa抗体の結合を分析するために曝露された。CD3陽性Tリンパ球、赤血球及び血小板は、健康なボランティアからの精製された血液から抽出された。細胞は、次いで10 µg/mlの各試験抗体によって4で30分間染色され、洗浄され、次いで二次蛍光抗IgG抗体によって4でさらに30分間染色された。洗浄後、細胞はCANTO II (BD Bioscience) フローサイトメーターで分析された。

結果：図10に示すように、T細胞、赤血球及び血小板はCD47陽性であり、偏在的に発現され、それらはB6H12抗体によって染色された。SIRP29及びKwar23抗体は、LSB2.20(特異的抗SIRP抗体)のように、SIRPを発現することが公知のT細胞に結合する。しかしながら、抗SIRPaヒト化18D5抗体は、T細胞に結合しない(同じ結果が試験した4つの異なる18D5ヒト化バリエーションによって得られた)。赤血球及び血小板はSIRPaを発現せず、したがって、それらはヒト化18D5抗体及び他の抗SIRPa抗体によって曝露されなかった。この結果は、公知のSIRPa抗体と比較して、生細胞上のSIRPaに対するヒト化18D5抗体の特異性を示す。

10

図11に示すように、T細胞は、ヒト化18D5抗体(同じ結果が試験した5つの異なる18D5ヒト化バリエーションによって得られた)及びキメラ18D5(データは示さない)によって染色されないが、SIRP29及びKwar23によって70%より多くのT細胞が染色される。

【実施例13】

20

【0350】

ヒトCD3 + T細胞増殖

方法：hPBMCは、健康なボランティアのパフィーコートから単離された。CD4またはCD8T細胞は、AutoMACS(Miltenyi)を使用する陽性選択によって選択され、96丸底ウェルプレートに播種された(50000個の細胞/ウェル)。増殖シグナルは、3日間1 T細胞に対して1ビーズの比で抗CD3/抗CD28コートしたマイクロビーズ(Life Technologies)、または5日間1 mDCに対して5 T細胞で*in vitro*で生成された同種成熟樹状細胞のいずれかによって、または5日間異なる濃度のツベルクリン未精製タンパク質誘導体(PPD)によって提供された。SIRPa/CD47経路を標的化する抗体は、飽和濃度(10 µg/mL)で、増殖試験の開始時から添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

30

結果：図12に示すように、抗SIRPa抗体HALA及びHEFLBバリエーションは、T細胞が抗CD3 + 抗CD28ビーズによって(A)(C)、または同種樹状細胞によって(B)(D)、またはPPD(E)によって刺激される場合、T細胞増殖を阻害しないが、抗SIRPa Kwar23は、T細胞が同種樹状細胞によって刺激される場合、T細胞増殖を阻害する。予想した通り、抗CD47抗体及び抗SIRPg抗体は、T細胞増殖の阻害剤である。

【実施例14】

【0351】

40

マウスCD8 + T細胞増殖

方法：脾細胞は、ナイーブマウスから単離された。CD8T細胞は、AutoMACS(Miltenyi)を使用する陽性選択によって選択され、96丸底ウェルプレートに播種された(50000個の細胞/ウェル)。増殖シグナルは、3日間、1 T細胞に対して1ビーズの比で抗CD3/抗CD28コートしたマイクロビーズ(Life Technologies)によって提供された。SIRPa/CD47経路を標的化するマウス抗SIRPa抗体(P84)及び抗CD47抗体(MIAP310)は、飽和濃度(10 µg/mL)で、増殖試験の開始時から添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

結果：図13に示すように、抗SIRPa抗体または抗CD47抗体の、マウスT細胞

50

の増殖への阻害はない。この結果は、マウスがSIRP g 遺伝子を発現しないという事実によって説明される。したがって、マウスは、SIRP g に結合しない特異的な抗SIRP a抗体の*in vivo*での効果を予測するモデルとして使用され得る。対照的に、抗CD47または非選択的抗SIRP a抗体の*in vivo*での前臨床の有効性は、特に獲得免疫及びメモリーTリンパ球の生成に関して、ヒトの場合を予測できない。

【実施例15】

【0352】

ヒトT細胞増殖

方法：hPBM Cは、健康なボランティアのバフィーコートから単離された。CD4またはCD8T細胞は、AutoMACS (Miltenyi)を使用する陽性選択によって選択され、96丸底ウェルプレートに播種された(50000個の細胞/ウェル)。増殖シグナルは、3日間、1 T細胞に対して1ピースの比で抗CD3/抗CD28コートしたマイクロピース、または5日間、1 mDCに対して5 T細胞で*in vitro*で生成された同種成熟樹状細胞のいずれかによって提供された。抗体は、飽和濃度(抗CD47と抗SIRP a抗体では5 µg/ml、抗PD-1/PD-L1抗体、及び組換え4-1BB Lでは2.5 µg/ml)で、増殖試験の開始時から添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

結果：図14に示すように、抗PD-1/PD-L1抗体、及び組換え4-1BB Lは、ヒトT細胞の増殖にブースト効果を有するが、抗CD47は、ヒトT細胞の増殖に負の効果をもつ。特に、抗CD47抗体は、抗PD-1/PD-L1、または4-1BB アゴニスト剤のヒトT細胞免疫刺激の有効性を防止する。抗SIRP a HEFLBは、T細胞の増殖に顕著な効果を持たない。

【実施例16】

【0353】

マウスにおける抗腫瘍効果

方法：マウスは、キシラジン/ケタミンのカクテルで麻酔された。開腹後、腫瘍性Hepa1.6細胞がPBS中(2.5 × 10⁶個の細胞/100 µl)で門脈から注射された。処置は、腫瘍注射の4日後に開始された。アゴニスト抗4-1BBモノクローナル抗体(3H3)は、PBS中(100 µg/注射)で腹腔内にHepa1.6細胞(肝臓癌細胞、HCC)注射後d4及びd8で2回注射された。抗PD-L1モノクローナル抗体は、PBS中(200 µg/注射)で腹腔内に4週間の間、週2回注射された。アンタゴニスト抗SIRP a抗体(P84)は、PBS中(300 µg/注射)で腹腔内に4週間の間、週3回注射された。

抗腫瘍応答は、腫瘍接種の13日後に、HCCの同所性モデルで評価された。この時、腫瘍及び脾臓は、腫瘍または全身に浸潤する免疫細胞を表現型決定するために採取された。免疫細胞が浸潤する脾細胞及び肝臓の非実質細胞(NPC)は、フローサイトメトリー取得のため、4つの異なるミックスによって染色された。

結果：図15Aに示すように、抗SIRP a抗体単独は、マウスの画分の生存を著しく延長した(28%)。抗4-1BBまたはPD-L1抗体との組合せでは、抗SIRP a抗体は、処置の中止後でさえもマウス生存の非常に高い応答率を可能にした。

図15Bに示すように、共刺激剤(例えば、抗4-1BB)またはT細胞チェックポイント阻害剤(例えば、抗PD-L1)との抗SIRP aの組合せは、調節性及び免疫抑制免疫細胞(Treg、Mo-MDSC)を減少させるが、抗4-1BBと組み合わせてエフェクターメモリーCD8+T細胞の蓄積を増加することによって、腫瘍微小環境を改変する。Mo-MDSCは、CD11b陽性及びMHC class II陰性集団の中でLy6Cの高発現またはLy6Gの発現無しによって特徴付けられる。

図15Cに示すように、共刺激剤(例えば、抗4-1BB)またはT細胞チェックポイント阻害剤(例えば、抗PD-L1)との抗SIRP aの組合せは、未熟及びナイーブB細胞の頻度を減少させるが、メモリー及び形質芽細胞の蓄積を増加することによって、腫瘍微小環境及び脾臓の周辺部の細胞組成を改変する。同様に、細胞溶解性(CD27陰性)

NK細胞の蓄積は、抗4-1BBまたは抗PD-L1との抗SIRPαの組合せによって腫瘍及び末梢に誘導される。

合わせると、抗SIRPαは、腫瘍除去及び長期保護に貢献する、特定の獲得（T細胞、Treg、B細胞）及び自然（MDS-C、マクロファージ、NK細胞）免疫細胞において腫瘍及び末梢免疫を改変する。

【実施例17】

【0354】

事前に治癒したマウスでの抗腫瘍効果

方法：抗SIRPα+抗4-1BB注射によって肝細胞癌モデルの事前に治癒したマウスまたは抗4-1BBによって処置されたSIRPα変異マウスは、脾臓へのHepa1.6細胞注射（ 2.5×10^6 個の細胞/マウス）によって再負荷された。マウスは空气中3%のイソフルランによって麻酔された。マウスの脇腹の切開及び脾臓の単離後、腫瘍性Hepa1.6細胞はPBS中で脾臓に注射された（ 2.5×10^6 個の細胞/50μL）。ナীবマウスは、再負荷したマウスと腫瘍発生を比較するため、同じ経路で並行して注射された。

10

結果：図15Dに示すように、再負荷された場合、全ての治癒したマウスは生存し、反対に全てのナীবマウスは死滅した。この結果は、抗SIRPα治療下またはSIRPαシグナルの不在下（SIRPα変異マウス）でメモリーT細胞が誘導され、治癒したマウスでもなお長期間持続することを実証する。

【実施例18】

20

【0355】

事前に治癒したマウスから採取されたT細胞脾細胞または全脾細胞の抗腫瘍効果

方法：治癒した抗SIRPα+抗4-1BB再負荷マウスは安楽死させ、脾臓が採取された。赤血球溶解後、脾細胞が抽出され、AutoMACSによって脾細胞の一部からCD3陽性T細胞が単離された。麻酔後、マウスはT細胞脾細胞（ 2.5×10^6 個の細胞/100μL）または全脾細胞（ 10×10^6 個の細胞/100μL）または賦形剤単独（PBS）のいずれかを静脈内に注射された。全てのマウスは、先に記載したように門脈によってHepa1.6細胞を受けた（ 2.5×10^6 個の細胞/100μL）。

結果：図15Eに示すように、治癒したマウスから採取された脾細胞及び単離されたTリンパ球は、マウスの生存に高い正の効果を有する。この結果は、肝細胞癌の処置後に治癒したマウスの脾細胞にメモリーT細胞が存在し、長期の獲得免疫記憶を担うことを示す。

30

【実施例19】

【0356】

事前に治癒したマウスでの抗腫瘍効果

方法：抗SIRPα+抗PD-L1注射によって肝細胞癌モデルの事前に治癒したマウスは、脾臓へのHepa1.6細胞注射（ 2.5×10^6 個の細胞/マウス）によって再負荷された。マウスは空气中3%のイソフルランによって麻酔された。マウスの脇腹の切開及び脾臓の単離後、腫瘍性Hepa1.6細胞はPBS中で脾臓に注射された（ 2.5×10^6 個の細胞/50μL）。ナীবマウスは、再負荷したマウスと腫瘍発生を比較するため、同じ経路で並行して注射された。

40

結果：図16に示すように、再負荷された場合、全ての治癒したマウスは生存し、反対に全てのナীবマウスは死滅した。この結果は、治癒したマウスにメモリーT細胞がまだ存在することを示す。この結果は、抗SIRPα治療下でメモリーT細胞が誘導され、治癒したマウスでもなお長期間持続することを実証する。

【実施例20】

【0357】

乳癌モデルにおける腫瘍の増殖の効果

方法：マウスは、空气中3%のイソフルランによって麻酔された。マウスは腹部の毛を剃られ、4T1細胞が50μLのPBS中、インシュリン用シリンジ（30ゲージ）によって乳腺に注射された。アンタゴニスト抗SIRPα抗体（P84）または対照抗体は、

50

PBS中で腹腔内に4週間の間、週3回注射された(200 µg/注射)。

結果：図17に示すように、抗SIRPa抗体は、対照抗体と比較して乳癌モデルの腫瘍の増殖を著しく低減した($p < 0.01$)。

図18は、接種後2週間の免疫細胞分析を示す。抗SIRPaは、Tregが劇的に減少し、メモリーT細胞が蓄積した腫瘍及び末梢(脾臓)の両方において骨髄性及び非骨髄性細胞(T及びNK細胞)に正の効果を有する。

【実施例21】

【0358】

ヘモグロビン及びヘマトクリットの濃度へのSIRPa抗体の効果

方法：抗SIRPa(P84クローン)、抗CD47(MIAP410クローン)及び関連アイソタイプ対照は、C57Bl/6マウスに12mg/kgで0日目と2日目に腹腔内に投与された。血液試料は、0日目と3日目にEDTA含有チューブに採取され、血球数はXS-800i血液分析機(Sysmex)によって実施された。ヘモグロビンのレベル(左)及びヘマトクリットのパーセンテージ(右)は3日目に評価された。

10

結果：図19に示すように、抗SIRPa抗体はヘモグロビンの濃度及びヘマトクリットに毒性効果を示さない。反対に、ヒトのフェーズ1で観察された貧血症により、抗CD47抗体は、ヘモグロビン及びヘマトクリットの濃度の減少を誘導する。

【実施例22】

【0359】

血小板凝集

20

方法：血液は健康なドナーボランティアから、クエン酸ナトリウムによって緩衝されたVacuette採取チューブ(Greiner Bio-One)に採取された。多血小板血漿(PRP)及び乏血小板血漿(PPP)は、それぞれ200gで10分間、及び3500gで15分間の遠心分離によって得られた。使用するPRPは、 3×10^8 個の血小板/Lに合わせた。阻害アッセイ：mAbは、PRPと最終濃度40または50 µg/mLの試験抗体でプレインキュベートされた。攪拌せずに3分後、血小板凝集はADP 5 µM添加によって開始された。凝集は、標準的な光学血小板凝集計(TA-8V Thrombo-Aggregometer, SD Innovation SAS, Frouard, France)を使用して連続的に攪拌しながら37°Cで試料を通る光の伝達を測定することによって決定された。PPPの伝達は100%に設定された。凝集は、全部で5分間、攪拌下で記録された。誘導アッセイ：血小板凝集は、mAb添加(50 µg/mL)によって直接開始された。凝集は、全部で最大10分間攪拌下で記録された。

30

結果：図20に示すように、抗CD47抗体とは対照的に、抗SIRPa抗体はヒト赤血球または血小板に結合しない。その結果、抗CD47は、*in vitro*でヒト血小板凝集を誘導するが、抗SIRPa抗体はしない。同様に、抗SIRPa抗体は、可逆的なADP誘導ヒト血小板凝集を妨げないが、抗インテグリンアルファ2bは完全にそれを抑制する。

【実施例23】

【0360】

卵巣がん性腹水由来のSIRPa遮断CD14+細胞による同種T細胞の増殖

40

方法：同種CD4+T細胞は、健康なボランティアのパフィーコート(hPBMC)からAutoMACS(Miltenyi)を使用する陽性選択によって単離された。CD4は、96丸底ウェルプレートに播種された(50000個の細胞/ウェル)。CD14+細胞は、卵巣がん患者の腹水から同じ方法によって単離された。CD14+細胞は、5日間、1:1比で同種CD4+T細胞と播種された。いくつかの条件で、ヒトLPS変異同種単球由来樹状細胞(moDC)が、1:5比で添加され、T細胞を刺激し、腹水から精製された異なる比のCD14+MDSの免疫抑制作用を分析した。SIRPa/CD47経路を標的化する抗体は、飽和濃度(10 µg/mL)で、増殖試験の開始時から添加された。増殖は、培養の最後12時間の³H-チミジンの取り込みによって測定された。

結果：図21A及び図21Bに示すように、卵巣がん性腹水から精製された新しいまた

50

は凍結ヒト骨髄性細胞 (TAM) は、低刺激同種ヒトTリンパ球である。抗CD47抗体とは対照的に、抗SIRPα抗体は、骨髄性細胞特性を改変し、ヒトT細胞活性化及び増殖を可能にする。

図21Cに示すように、卵巣がん性腹水から精製されたヒト骨髄性細胞 (MDS C) は、1:1及び2:1の骨髄性細胞対T細胞比で同種mODCによって誘導されるヒトT細胞増殖を抑制できる。抗CD47抗体とは対照的に、抗SIRPα抗体は、ヒトMDS Cによって誘導される免疫抑制を増強しない。

【実施例24】

【0361】

ELISAによる改変抗体でのSIRPα ELISA結合アッセイ

10

方法：ELISAアッセイのため、組換えhSIRPα (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H) は、炭酸緩衝液 (pH 9.2) 中、0.5 µg/ml でプラスチック上に固定化され、異なる改変抗SIRPα抗体が添加され、SIRPαへの結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識口バ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch; USA; reference 709-035-149) が添加され、従来の方法によって曝露された。顕色はペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG-Fcによって実施され、TMB基質を使用して450 nmでの比色分析により曝露された。ED50は、次いで、このアッセイにおいてシグナルの50%に達する示した抗体の濃度として測定された。

20

結果：図22は、免疫療法剤を含む全ての改変抗SIRPα抗体が、陽性対照として使用した親抗体 (HEFLB) と比較して良好な濃度でSIRPαに機能的に結合することを示す。

【実施例25】

【0362】

ELISAによる改変抗体上の融合タンパク質のECDの検出

方法：組換えhSIRPα (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11612-H08H) は、炭酸緩衝液 (pH 9.2) 中、0.5 µg/ml でプラスチック上に固定化され、改変抗体が添加された。改変抗SIRPα抗体上の融合タンパク質の検出は、マウス抗ヒトPD1 (eBiosciences; reference 12-2799-41)、マウス抗ヒトPDL1 (BD biosciences; reference 558065)、マウス抗ヒトCD80 (BD biosciences; reference 557226)、マウス抗ヒトCD86 (BD biosciences; reference 555658)、マウス抗ヒトOX40L (R&D systems; reference MAB10541)、マウス抗ヒト4-1BBL (BD biosciences; reference 559446)、またはマウス抗ヒトICOSL (BD biosciences; reference 552502) によって実施された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch; USA; reference 715-036-151) が添加され、従来の方法によって曝露された。

30

40

結果：図23は、改変抗SIRPα抗体の融合タンパク質の全てのECDが、重鎖または軽鎖に連結した場合、特異的なモノクローナル抗体によってよく認識されることを示す。

【実施例26】

【0363】

異なる改変抗SIRPα抗体でのリガンド結合アッセイ

方法：重鎖に連結した (VH prot + VL ()) または軽鎖に連結した (VH + VL prot ()) 融合タンパク質を有する異なる改変抗SIRPα抗体の固定化SIRPα-HisでのELISAによる評価。検出は、異なる融合コンジュゲートの特異的リガンド：PDL1Fc (PD1のため)、PD1His (PDL1のため)、CTLA4-Fc (CD80及びCD86のため)、図B-OX40Fc (OX40Lのため)、4

50

- 1 B B F c H i s (4 - 1 B B L のため)、 C D 2 8 F c (I C O S L のため) で実施され、それぞれマウス抗ヒト P D L 1、マウス抗 H i s、マウス抗ヒト C T L A 4 F c、マウス抗ヒト O X 4 0、マウス抗ヒト H i s、マウス抗ヒト C D 2 8、次いでペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G、次いで T M B 基質を使用する 4 5 0 n m での比色分析により曝露された。

結果：図 2 4 は、P D 1、P D L 1、C D 8 0、C D 8 6、O X 4 0 L、4 - 1 B B L、及び I C O S L を含む改変抗 S I R P a 抗体が、抗体の重鎖または軽鎖に連結される融合タンパク質の特異的リガンドに独立して結合できることを示す。

【実施例 2 7】

【0364】

E L I S A による S I R P a - C D 4 7 の異なる改変抗 S I R P a 抗体との相互作用の競合アッセイ

方法：競合 E L I S A アッセイのため、組換え h S I R P a (S i n o B i o l o g i c a l s , B e i j i n g , C h i n a ; r e f e r e n c e 1 1 6 1 2 - H 0 8 H) は、炭酸緩衝液 (p H 9 . 2) 中、0 . 5 μ g / m l でプラスチック上に固定化された。各精製された抗体 (異なる濃度) は最終 6 μ g / m l (固定濃度) のビオチン化ヒト C D 4 7 F c (A c r o B i o s y s t e m s i n t e r c h i m ; F r a n c e ; r e f e r e n c e : # C D 7 - H 8 2 F 6) と混合され、3 7 ° C で 2 時間競合結合を測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (V e c t o r l a b o r a t o r i n g ; U S A ; r e f e r e n c e S A - 5 0 0 4) が

添加され、ビオチン - C D 4 7 F c 結合が検出され、従来の方法によって曝露された。結果：図 2 5 は、免疫療法剤を含む全ての改変抗 S I R P a 抗体が、S I R P a への結合を C D 4 7 と競合することができることを示す。重鎖または軽鎖に融合したタンパク質を含む改変抗体と親抗 S I R P a 抗体単独 (H E F L B) との間で顕著な差は観察されない。全ての構築物は、陽性対照として使用した抗 S I R P a 単独 (H E F L B) と比較して、C D 4 7 - S I R P a 相互作用に対するそれらのアンタゴニスト活性を保存した。

【実施例 2 8】

【0365】

ヒト P B M C での E L I S A による T N F α 分泌アッセイ

方法：ポリプロピレン P 9 6 プレートは、1 μ g / m l の O K T 3 でコートされた (抗 C D 3 抗体)。P B S による洗浄後、ヒト P B M C (1 0 0 0 0 0 個の細胞 / w) は、3 7 ° C、5 % C O 2 で 3 日間、完全培地 (2 % ヒト S A B を含む) 中、1 0 μ g / m l の可溶性 H E F L B 抗体、抗 P D 1 K e y t r u d a m A b、組換えタンパク質、各融合タンパク質 (比 1 : 1) の対照として O S E 1 7 2 + 組換えタンパク質 (P D 1 - H i s ; P D L 1 - F c ; C D 8 0 - F c ; C D 8 6 - F c ; 4 - 1 B B L - F c または I C O S L - h i s)、改変抗 S I R P a 抗体、または陽性対照として P h a - L が添加された。³H チミジンは、測定の 8 時間前に取り込まれ、結果は c p m で表され、増殖のレベルが決定された。刺激の 4 8 時間後 (³H 取り込みの 2 4 時間前)、2 5 μ l / ウェルの上清が回収され、サイトカイン分泌の濃度が測定された。T N F α は、ヒト T N F α キット (B D b i o s c i e n c e s ; r e f e r e n c e 5 5 5 2 1 2) により E L I S A によって測定された。結果は、上清中のサイトカインの p g / m l で表された。

結果：図 2 6 は、T N F α の過剰な分泌を誘導する P D 1 H i s または C D 8 6 - F c 単独を除き、細胞が抗 S I R P a 抗体 (H E F L B) または抗 P D 1 K e y t r u d a または非融合免疫療法剤とインキュベートされる場合、T N F α 分泌の差を示さない。これらの過剰発現は、細胞が抗 S I R P a (H E F L B) 及び組換えタンパク質 P D 1 H i s または C D 8 6 - F c と組み合わせてインキュベートされた場合、改変されなかった。同様に、抗 S I R P a H E F L B と非融合組換えタンパク質の他の組合せは、T N F α 分泌を増加しない。

興味深いことに、P D 1、P D L 1、C D 8 0、または 4 - 1 B B L を含む改変抗 S I R P a 抗体は、免疫療法剤が重鎖の C 末端ドメイン上にある場合、T N F α の重要な分泌

10

20

30

40

50

を誘導する。合わせると、これらの結果は、重鎖にPD1、PDL1、CD80、または4-1BBLを含む改変抗SIRPa抗体の炎症促進性サイトカインTNF α 分泌への可能な正の効果を示す。

【実施例29】

【0366】

ヒトPBMCでのELISAによるIFN γ 分泌アッセイ

方法：ポリプロピレンP96プレートは、1 μ g/mlのOKT3でコートされた（抗CD3抗体）。PBSによる洗浄後、ヒトPBMC（100000個の細胞/w）は、37、5%CO₂で3日間、完全培地（2%ヒトSABを含む）中、10 μ g/mlの可溶性HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、組換えタンパク質、各融合タンパク質（比1：1）の対照としてOSE172+組換えタンパク質（PD1-His；PDL1-Fc；CD80-Fc；CD86-Fc；4-1BBL-FcまたはICOSL-his）、改変抗SIRPa抗体、または陽性対照としてPha-Lが添加された。³Hチミジンは、測定の8時間前に取り込まれ、結果はcpmで表され、増殖のレベルが決定された。刺激の48時間後（³H取り込みの24時間前）、25 μ l/ウェルの上清が回収され、サイトカイン分泌の濃度が測定された。IFN γ は、ヒトIFN γ キット（BD biosciences；reference 555142）によりELISAによって測定された。結果は、上清中のサイトカインのpg/mlで表された。

結果：図27は、炎症促進性IFN γ サイトカイン分泌（T細胞特異的サイトカイン）が、重鎖のC末端ドメイン上のPD1、PDL1、CD80、または4-1BBLを含む抗SIRPa抗体によって強く増加されるため、TNF α 分泌で観察された上記の結果を確認する。

【実施例30】

【0367】

ヒトTリンパ球による増殖アッセイ

方法：ヒトTリンパ球（LT）は、ヒトPBMCからPan T細胞単離キット（Miltenyi Biotec；reference 130-096-535）によってソートされ、TexMaCS培地（Miltenyi Biotec；reference 130-097-196）中、37、5%CO₂で終夜インキュベートされた。次の日、ポリプロピレンP96プレートは、1 μ g/mlのOKT3でコートされた（プレ活性化シグナル）。PBSによる洗浄後、ヒトLT（100000個の細胞/w）は、37、5%CO₂で3日間、完全培地（2%ヒトSABを含む）中、10 μ g/mlの可溶性HEFLB、抗PD1 Keytruda mAb、各融合タンパク質の対照として組換えタンパク質（PD1-His；PDL1-Fc；CD80-Fc；CD86-Fc；4-1BBL-FcまたはICOSL-his）、HEFLB+組換えタンパク質（比1：1）、各異なる改変抗SIRPa抗体、または陽性対照としてPha-Lが添加された。³Hチミジンは、測定の8時間前に取り込まれ、結果はcpmで表され、増殖のレベルを決定した。

結果：図28は、抗CD3によって誘導されたヒトT細胞増殖は、抗SIRPa抗体単独（HEFLB）によって著しく改変されないことを示す。重鎖上にPD1、PDL1、CD80、CD86または4-1BBLを含む改変抗SIRPa抗体は、ヒトの単離されたT細胞の増殖を増加する。タンパク質が軽鎖に融合される場合、またはOX40LまたはICOSL（重鎖または軽鎖）に融合される場合、同じ二機能性抗SIRPa抗体による効果が観察されない。

【実施例31】

【0368】

ヒトの単離されたTリンパ球でのELISAによるTNF α 分泌アッセイ

方法：ヒトTリンパ球（LT）は、ヒトPBMCからPan T細胞単離キット（Miltenyi Biotec；reference 130-096-535）によってソートされ、TexMaCS培地（Miltenyi Biotec；reference

130-097-196)中、37、5%CO₂で終夜インキュベートされた。次の日、ポリプロピレンP96プレートは、1μg/mlのOKT3でコートされた(プレ活性化シグナル)。PBSによる洗浄後、ヒトLT(100000個の細胞/w)は、37、5%CO₂で3日間、完全培地(2%ヒトSABを含む)中、10μg/mlの可溶性HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、各融合タンパク質の対照として組換えタンパク質(PD1-His; PDL1-Fc; CD80-Fc; CD86-Fc; 4-1BBL-FcまたはICOSL-his)、HEFLB+組換えタンパク質(比1:1)、各異なる改変抗SIRPa抗体、または陽性対照としてPha-Lが添加された。³Hチミジンは、測定の前8時間前に取り込まれ、結果はcpmで表され、増殖のレベルが決定された。刺激の48時間後(³H取り込みの24時間前)、25μl/ウェルの上清が回収され、サイトカイン分泌の濃度が測定された。TNFαは、ヒトTNFαキット(BD biosciences; reference 555212)によりELISAによって測定され、IFNγは、ヒトIFNγキット(BD biosciences; reference 555142)によりELISAによって測定された。結果は、上清中のサイトカインのpg/mlで表された。

10

結果：T細胞増殖試験と同様に、図29に記載のTNFα分泌は、T細胞が、抗CD3(OKT3)によって刺激された場合、抗SIRPa HEFLB mAbを添加する場合でさえも、顕著な量のTNFαを分泌しないことを示す。対照的に、TNFα分泌は、重鎖にPD1、PDL1、CD80、または4-1BBLを含む改変抗SIRPa抗体によって誘導される。これらの結果は、PBMCによって分泌されたTNFαで表された結果に匹敵し(実施例28参照)、それらの特異的T細胞経路への融合タンパク質の機能活性を確認した。

20

【実施例32】

【0369】

ヒトマクロファージでのELISAによるMIP1α分泌アッセイ

方法：ヒト未熟マクロファージは、PBMCから分離されたヒト単球を使用して生成され(UTC G plateform, Nantes)、37、5%CO₂で、完全培地(10%SVFを含む)中10ng/mlでGM-CSF(Cell Genix; reference 1412-050)と2日間インキュベートされた。ポリプロピレンP96プレートは、PBS中10μg/mlのCD47Fc(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H)でコートされた。PBSによる洗浄後、ヒト未熟マクロファージ(搔爬及び洗浄した)(100000個の細胞/w)は、37、5%CO₂で24時間、10μg/mlの可溶性HEFLB抗体、抗PD1 Keytruda mAb、または改変抗SIRPa抗体が添加された。上清が回収され、MIP1α(CCL3)分泌の濃度が測定された。MIP1αは、ヒトMIP1α/CCL3キット(R&D systems; reference DY270)によりELISAによって測定された。結果は、上清中のサイトカインのpg/mlで表された。

30

結果：免疫療法剤を含む異なる改変抗体の機能性SIRPaアンタゴニスト活性を確認するため、MIP1α、CD47-Sirpa相互作用によって阻害される可能性のある標的でのテストが実施された。図30に示すように、マクロファージは基底状態(CD47なし)でMIP1αを分泌する。マクロファージがCD47Fcとインキュベートされる場合、分泌は強く阻害され、CD47によるSIRPa阻害シグナルの活性化が免疫抑制を誘導し、MIP1α分泌を阻害することを実証する。抗SIRPa HEFLB抗体による相互作用の遮断は、この分泌を基底のMIP1α分泌レベルに回復する。これは、CD47-SIRPa相互作用への抗SIRPa抗体の良好なアンタゴニスト活性を確認する。図30に示すように、PD1、PDL1、CD80または4-1BBLを含む改変抗SIRPa抗体は、抗SIRPa抗体単独よりもヒトマクロファージによるMIP1αの高い分泌を誘導する。これらの結果は、改変抗体が、タンパク質に融合していない抗SIRPa HEFLB抗体よりも高いレベルのMIP1α分泌を生成することができるた

40

50

め、増加したSIRPaアンタゴニスト特性を有することを示す。また、CD86を含む改変抗体は、抗SIRPa抗体単独と同じ結果を示す。

本発明者らは、改変抗SIRPa抗体として実施例に記載された二機能性抗SIRPa抗体は、SIRPaと融合タンパク質として記載された免疫療法剤のリガンド（融合タンパク質のリガンドは、PD1、PDL1、PDL2、CD28、CTLA4、4-1BB、ICOSまたはOX40）の両方に結合することができたことを示す。二機能性抗SIRPa抗体上の免疫療法剤は特異的な抗体によってよく認識され、二機能性抗SIRPa抗体の各免疫療法剤のECDの良好な発現を示す。

驚くべき方法により、重鎖上に免疫療法剤としてPD1、PDL1、CD80、または4-1BBLのECDを含む二機能性抗SIRPa抗体は、MIP1aの過剰な分泌を誘導するCD47に対するSIRPaの相互作用を阻害するそれらの能力に関して機能的であり、T細胞活性化及び増殖を誘導するまたは阻害しないそれらの能力に関して機能的であった。重鎖上にPD1、PDL1、CD80、または4-1BBLのECDを含む二機能性抗SIRPa抗体は、PBMCによるTNFα及びIFNγ分泌（炎症促進性サイトカイン）への相乗的な有効性を示し、単独または抗SIRPa抗体と組み合わせられた免疫療法剤と比較して、炎症促進性腫瘍環境を誘導する能力がある。

【実施例33】

【0370】

ELISAによるSIRPgへの改変抗SIRPa抗体の結合分析

方法：活性ELISAアッセイのため、hSIRPg-His (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 11828-H08H) は、炭酸緩衝液 (pH 9.2) 中、1 μg/ml でプラスチック上に固定化され、精製された抗体が添加され、ヒト化抗SIRPa抗体HEFLB、抗SIRPa Kwar抗体、及びPDL1、CD80、CD86または4-1BBLのECDに融合した改変抗SIRPa抗体の結合が測定された。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ標識口バ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch; USA; reference 709-035-149) が添加され、従来の方法によって曝露された。

結果：図31に示すように、Kwar抗体はSIRPgに結合できる。しかしながら、任意の免疫療法剤と融合した本発明の抗SIRPa抗体の二機能性形態は、HEFLB親抗体のようなSIRPgに結合せず、SIRPa-CD47相互作用に対する二機能性抗SIRPa抗体の特異性がある。

【実施例34】

【0371】

ヒトTリンパ球とのヒトマクロファージの共培養でのELISAによるMIP1a、TNFα、及びIFNγ分泌アッセイ

方法：ヒト未熟マクロファージは、PBMCから分離されたヒト単球を使用して生成され (UTC G plateform, Nantes)、37 °C、5% CO₂ で、完全培地 (10% SVFを含む) 中10 ng/ml でGM-CSF (Cell Genix; reference 1412-050) と2日間インキュベートされた。ポリプロピレンP96プレートは、PBS中10 μg/ml のCD47Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H) でコートされた。PBSによる洗浄後、ヒト未熟マクロファージ (搔爬及び洗浄した) (100000個の細胞/w) は、37 °C、5% CO₂ で24時間、10 μg/ml の可溶性HEFLB抗体または改変抗SIRPa抗体 (VH-PDL1、VH-4-1BBL、VH-CD80、またはVH-CD86) が添加された。次いで、本発明者らは、OKT3によってプレ活性化されたヒトTリンパ球を添加した (Tリンパ球は、実施例31に記載の方法に従って単離された)。上清が回収され、MIP1a (CCL3) (キットR&D systems; reference DY270)、TNFα (キットBD biosciences; reference 555212)、またはIFNγ分泌 (キットBD biosciences; reference 555142) が測定された。

結果：同じアッセイでSIRPa - CD47相互作用及びT細胞活性化の阻害の測定を可能にする共培養系において、本発明者らは、PDL1、CD80または4-1BBLに融合した二機能性抗SIRPa抗体が、単独または組換えPDL1またはCD80または4-1BBLと別々に組み合わせた抗SIRPa抗体と比較して、MIP1a(A)、TNFa(B)及びIFNg(C)の高い分泌を誘導できる興味深いが、予期しない方法を観察した(図32)。さらに、二機能性抗SIRPaの機能的有効性は、免疫療法剤が抗SIRPa抗体のVH鎖のC末端部分に融合される場合に観察される(図26及び27に示す)。この機能的効果は、軽鎖に融合された場合、または免疫療法剤がCD86、ICOS-LまたはOX40Lである場合、二機能性抗SIRPaに観察されない(データは示さない)。これらの結果は、PDL1、CD80、及び4-1BBLと結合した改変抗SIRPa抗体が、抗SIRPa抗体単独または組換え免疫療法剤との別々の組合せより、またはB12-PDL1、またはB12-CD80、またはB12-4-1BBLのような関連二機能性抗体よりも、SIRPa-CD47相互作用により強い阻害効果を有し、T細胞活性化により有効性を有することを示す。本明細書に示した二機能性分子は、PD1/PDL1またはCTLA-4/80またはCD80/PDL1軸の阻害、ならびに4-1BB/4-1BBLまたはCD80/CD28シグナルの強化を通してT細胞活性化を誘導することができる(可能な獲得免疫応答、特に抗腫瘍応答及び/または長命メモリーT細胞の誘導を誘導する)。

10

【実施例35】

【0372】

20

タイムラプスT細胞活性化

方法：ヒト未熟マクロファージは、PBMCから分離されたヒト単球を使用して生成され(UTCG plateform, Nantes)、37、5%CO₂で24時間、完全培地(10%SVFを含む)中10ng/mlでGM-CSF(CellGenix; reference 1412-050)とインキュベートされた。IBIDIチャンパー8ウェル(IBIDI; Germany; reference 80826)は、PBS中10µg/mlのCD47Fc(Sino Biologicals, Beijing, China; reference 12283-H02H)でコートされた。PBSによる洗浄後、ヒト未熟マクロファージ(搔爬及び洗浄した)(300000個の細胞/w)は、37、5%CO₂で24時間、IBIDIチャンパー中、10µg/mlの可溶性HEFLB及び二機能性抗SIRPa-PDL1が添加された。上清が回収され、MIP1a(CCL3)分泌の濃度が測定された。次いで、別の健康なドナーからのTリンパ球は、Pan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec; reference 130-096-535)によるFicoll後に分離され、FURA-2カルシウム指示薬(Invitrogen; reference F1221)によって染色された。Fura-2標識T細胞(300000個の細胞/ウェル)が未熟マクロファージ及び抗体を含有するウェルに添加され、最終3µg/mlでアゴニスト抗CD3の添加によって刺激された(Insert U1064; Nantes, clone OKT3)。各ウェルのタイムラプスがNikon顕微鏡によって実施された。Fura-2指示薬は、未刺激T細胞では青を示し、T細胞活性化により、より赤くなった。

30

40

結果：図33に示すように、二機能性抗SIRPa-PDL1抗体は、SIRPaとCD47との間の相互作用の阻害及び共培養アッセイでの内在性PDL1-PD1相互作用の阻害により、強いT細胞活性化を誘発した。そのような内在性PD1/PDL1相互作用の遮断は、図33の右側の対照と比較してより多量のカルシウムの細胞での存在によって反映される(オレンジ/赤い細胞)。このアッセイは、二機能性抗SIRPa-PDL1がT細胞を活性化できることを確認する。

50

【 図面 】

【 図 1 】

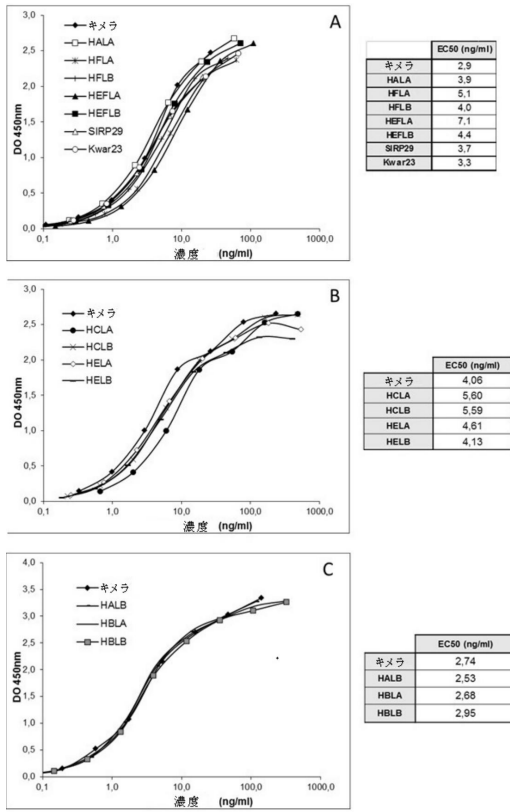


FIGURE 1 (スタート)

【 図 1 D 】

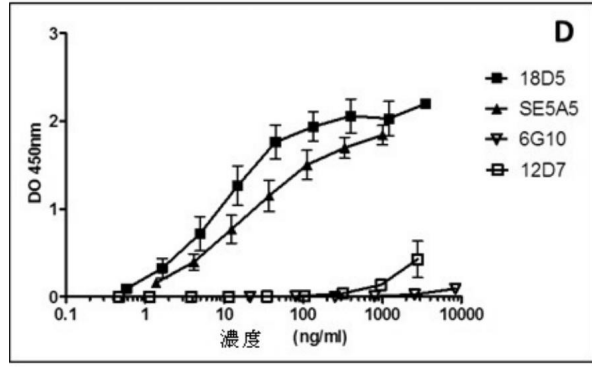


FIGURE 1 (エンド)

10

20

【 図 2 】

	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
マウス 18D5	6,23e4	1,20e-5	1,93e-10
キメラ	1,49e5	5,14e-5	3,44e-10
HFLA	8,57e5	1,86e-4	2,17e-10
HFLB	7,91e5	2,49e-4	3,15e-10
HEFLA	5,59e5	1,48e-4	2,64e-10
HEFLB	6,54e5	1,89e-4	2,89e-10
SIRP29	4,15e4	1,01e-5	2,43e-10
Kwar23	2,44e5	8,95e-5	3,67e-10
SE7C2	5,98e3	0,01	1,67e-6
SE5A5	2,45e4	9,49e-4	3,87e-8

FIGURE 2

【 図 3 】

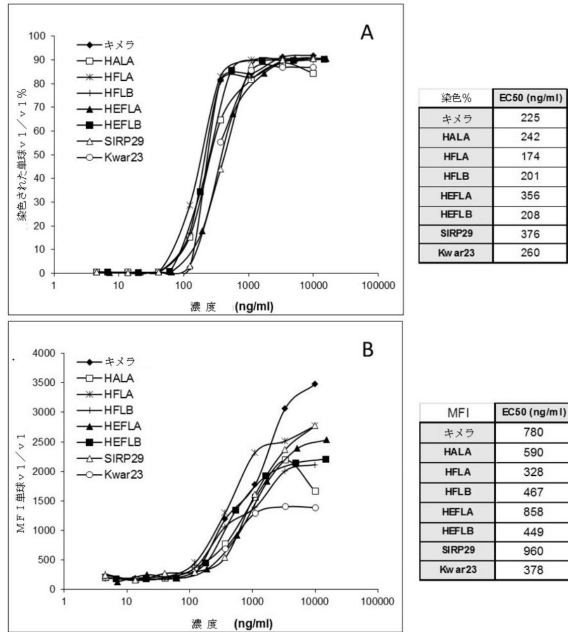


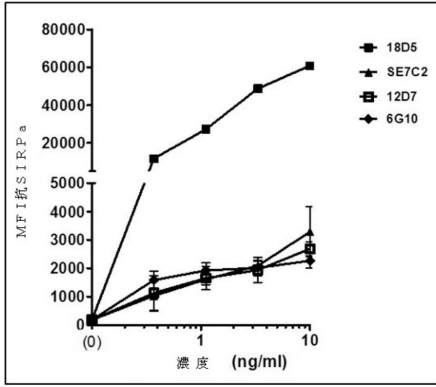
FIGURE 3 (スタート)

30

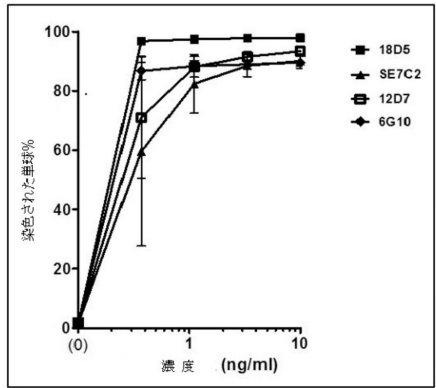
40

50

【図 3 C】



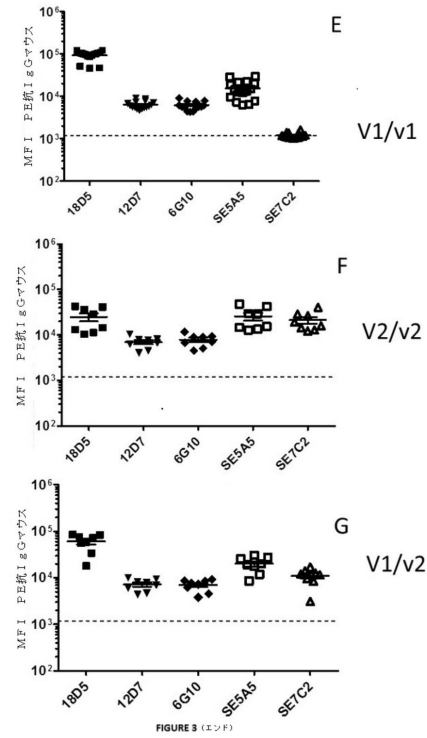
C



D

FIGURE 3 (ミドル)

【図 3 E】



E

V1/v1

F

V2/v2

G

V1/v2

FIGURE 3 (エンフ)

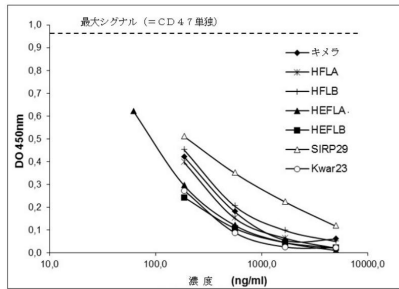
10

20

【図 4 A】

A

第1の実験



第2の実験

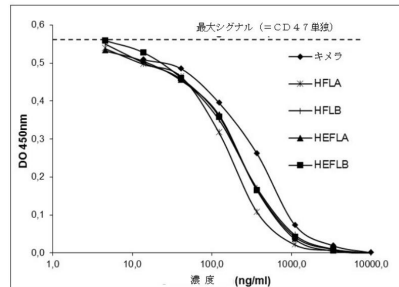


FIGURE 4 (スタート)

	IC50 (ng/ml)
キメラ	303.8
HFLA	146.2
HFLB	182.7
HEFLA	190.6
HEFLB	186.3

【図 4 B】

B

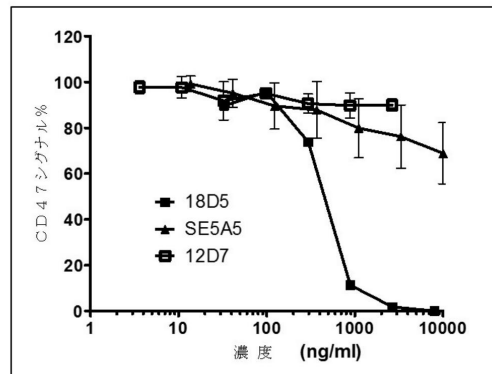


FIGURE 4 (エンフ)

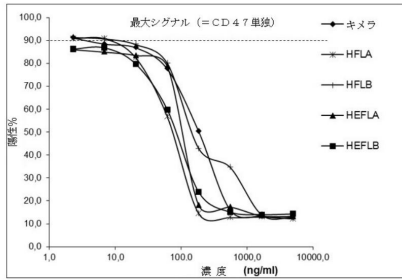
30

40

50

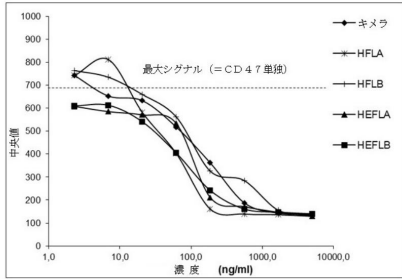
【 図 5 】

A



	IC50 (ng/ml)
キメラ	171.83
HFLA	64.09
HFLB	149.73
HEFLA	104.56
HEFLB	73.49

B



	IC50 (ng/ml)
キメラ	199.9
HFLA	75.1
HFLB	169.9
HEFLA	117.6
HEFLB	90.1

FIGURE 5 (スタート)

【 図 5 C 】

C

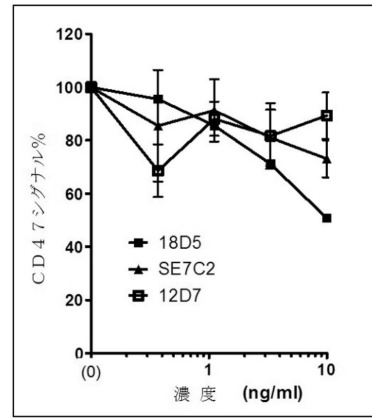


FIGURE 5 (エンド)

10

20

【 図 6 】

A

	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
マウス 18D5	1,58e4	1,76e-3	1,11e-7
マウス 18D5、 SP-Dとの組合せ	3,797e5	1,088e-2	2,865e-8

B

	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
SP-D	2,465e3	1,078e-2	4,372e-6
SP-D、マウス 18D5との組合せ	3,272e3	2,405e-3	7,35e-7

FIGURE 6

【 図 7 】

A

	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
キメラ	8,837e4	1,385e-3	1,568e-8
HALA	1,328e5	8,504e-4	6,403e-9
HFLA	7,447e4	1,919e-3	2,576e-8
HFLB	6,694e4	1,738e-3	2,596e-8
HEFLA	9,827e4	1,221e-3	1,243e-8
HEFLB	1,939e4	1,711e-3	8,69e-8
SIRP29	1,078e5	8,114e-4	7,531e-9
kwar23	2,863e5	7,935e-4	2,772e-9

B

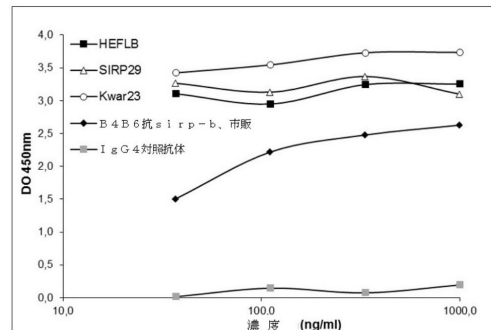


FIGURE 7

30

40

50

【 図 8 】

A

	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
キメラ	4,93e4	3,194e-3	6,479e-8
HALA	1,539e5	7,093e-3	4,609e-8
HFLA	2,477e5	1,18e-2	4,764e-8
HFLB	1,191e5	1,234e-2	1,036e-7
HEFLA	2,173e5	1,14e-2	5,244e-8
HEFLB	1,92e5	1,193e-2	6,215e-8
SIRP29	1,36e5	7,2e-4	5,296e-9
kwar23	3,57e5	7,648e-4	2,142e-9

B

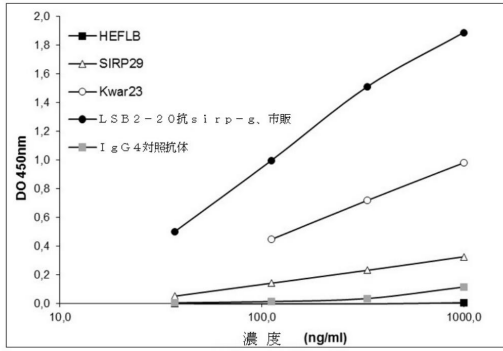


FIGURE 8

【 図 9 】

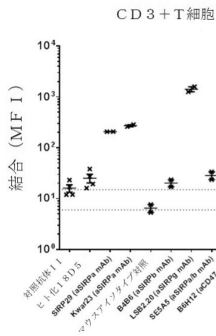
	結合 (ka) (1/Ms)	解離 (kd) (1/s)	親和性 (KD) (M)
CD47単独	2,193e4	1,309e-2	5,969e-7
HEFLB +CD47	5,372e4	5,334e-2	9,928e-7
SIRP29 +CD47	2,118e4	5,525e-2	2,572e-6
Kwar23 +CD47	4,369e2	1,259e-1	2,88e-4

FIGURE 9

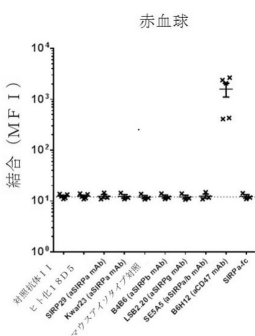
10

【 図 10 】

A



B



C

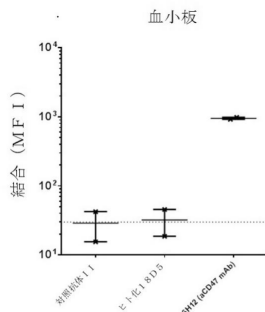
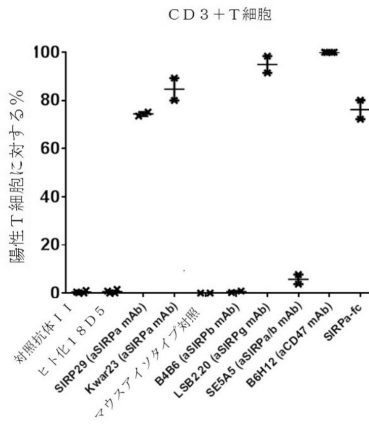


FIGURE 10

【 図 11 】



	対照抗体 I 1	ヒト化 18D5	SIRP29 (aSIRPa mAb)	Kwar23 (aSIRPa mAb)	マウスアインタイプ対照	B4B6 (aSIRPb mAb)	LSB2.20 (aSIRPg mAb)	SE5A5 (aSIRPa/b mAb)	B6H12 (aCD47 mAb)	SIRPa-fc
実験 1 HV 1	0.45	1.54	73.5	80	0	0.87	91.4	3.72	100	72.2
実験 1 HV 2	1.12	0.84	75.2	89.3	0.016	0.25	98.4	7.69	100	80.1
実験 2 HV 1	0.057	0.016								99.9
実験 2 HV 2	0.076	0.058								99.9

FIGURE 11

20

30

40

50

【 図 1 2 】

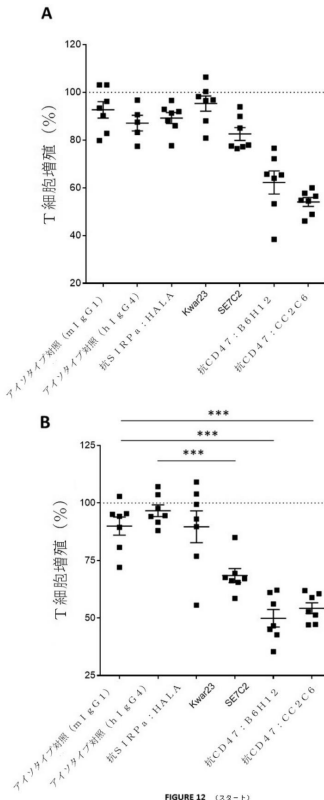


FIGURE 12 (スタート)

【 図 1 2 C 】

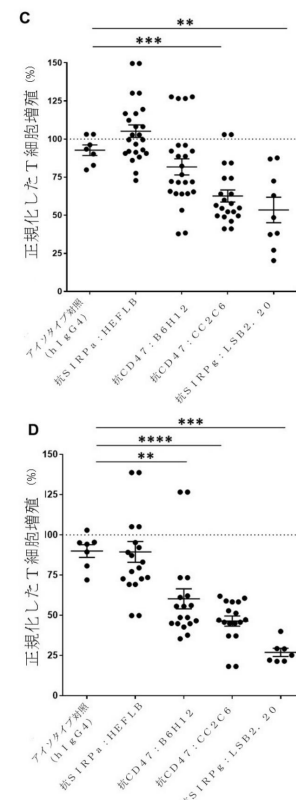


FIGURE 12 (ストップ)

【 図 1 2 E 】

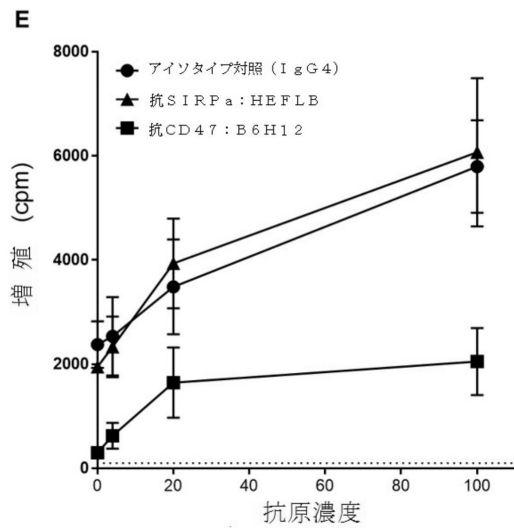


FIGURE 12 (エンド)

【 図 1 3 】

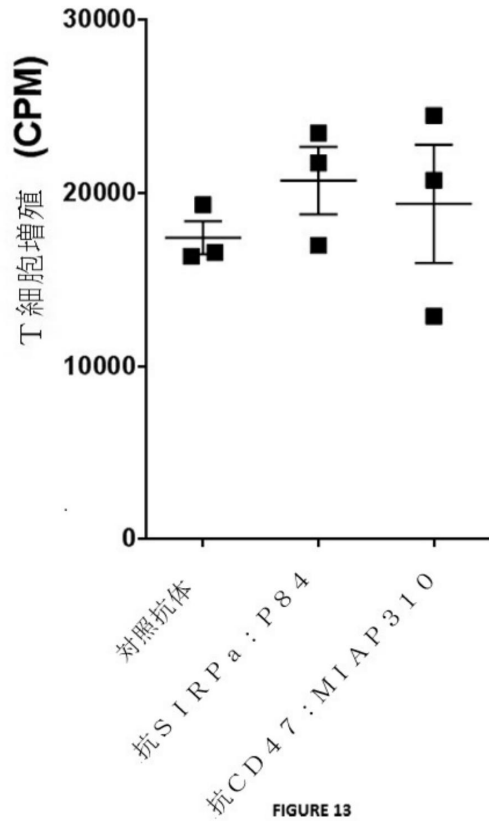


FIGURE 13

10

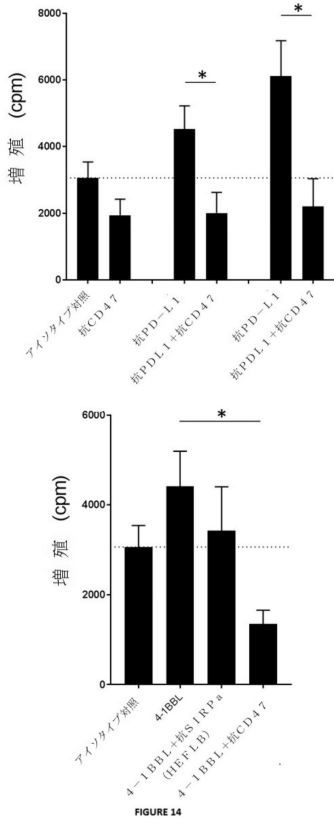
20

30

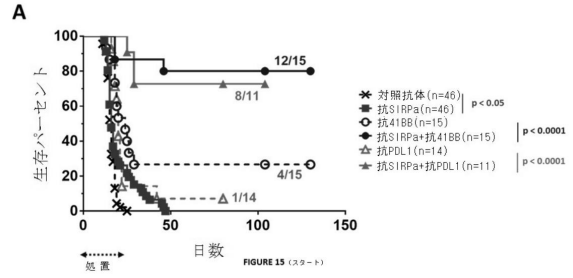
40

50

【図 14】



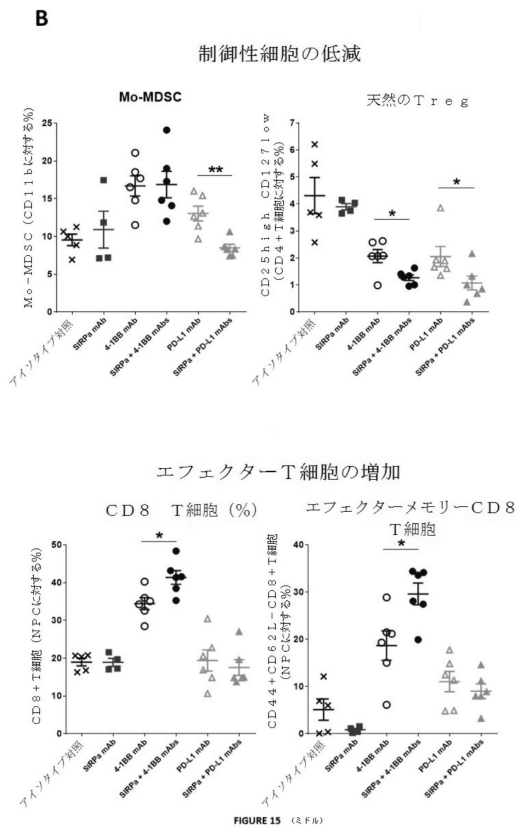
【図 15 A】



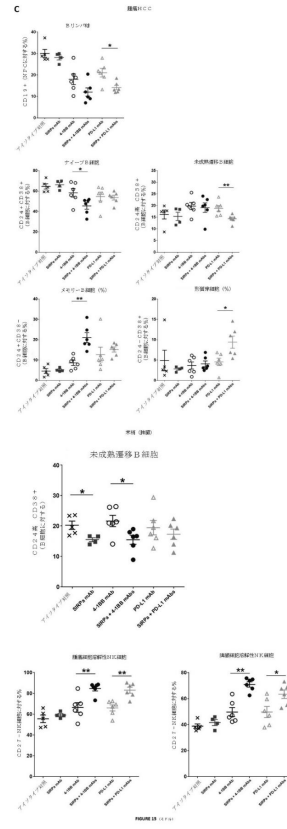
10

20

【図 15 B】



【図 15 C】



30

40

50

【 図 1 5 D 】

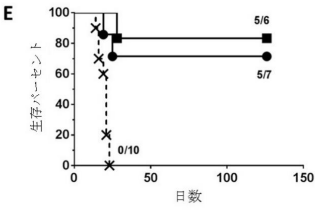
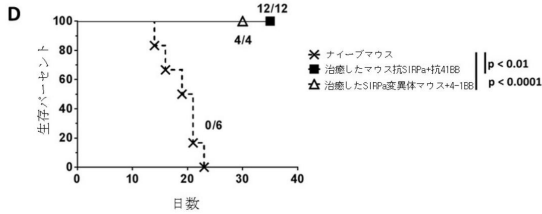


FIGURE 15 (エンド)

【 図 1 6 】

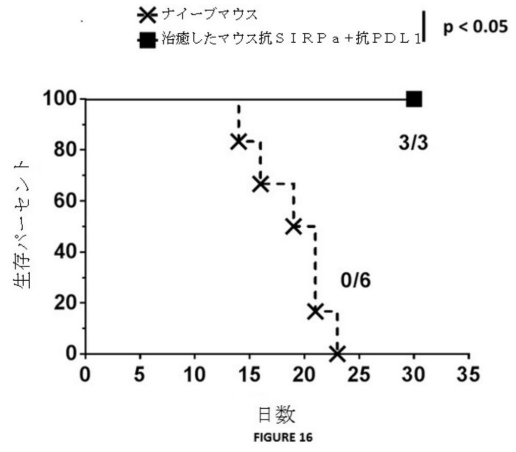


FIGURE 16

【 図 1 7 】

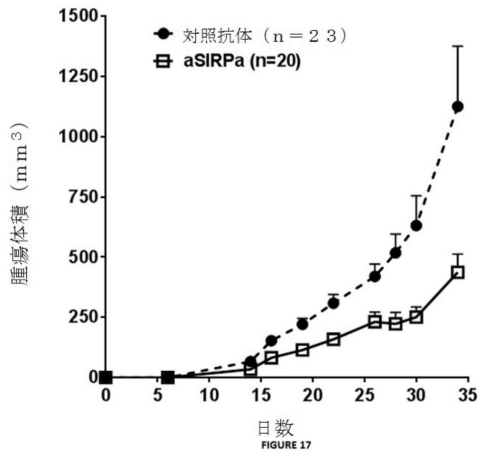


FIGURE 17

【 図 1 8 】

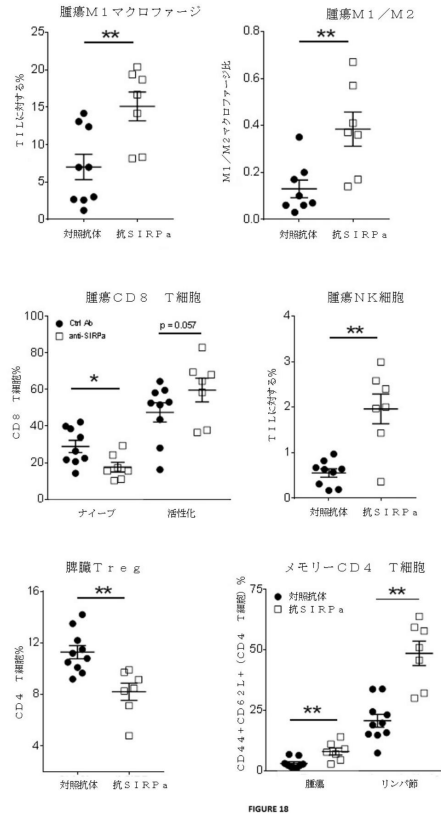


FIGURE 18

10

20

30

40

50

【図 19】

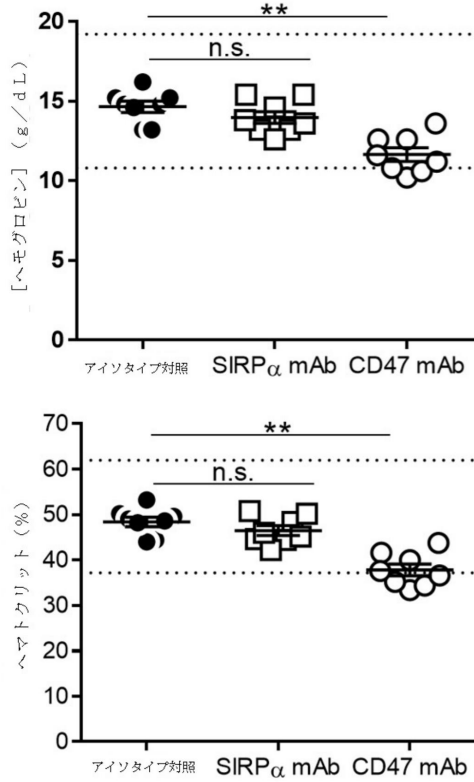


FIGURE 19

【図 20】

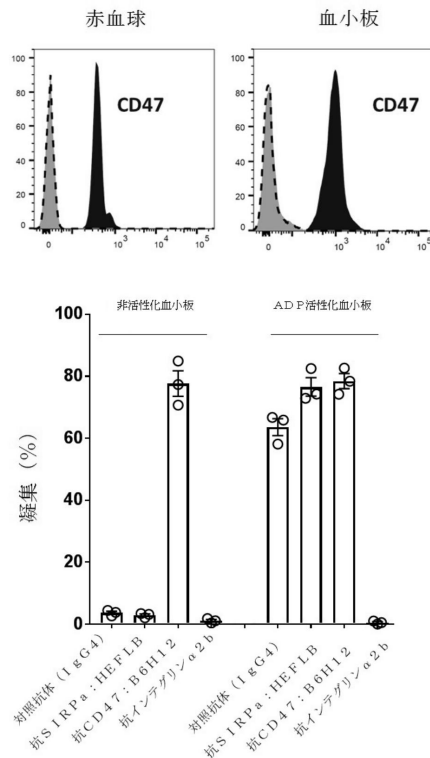


FIGURE 20

【図 21】

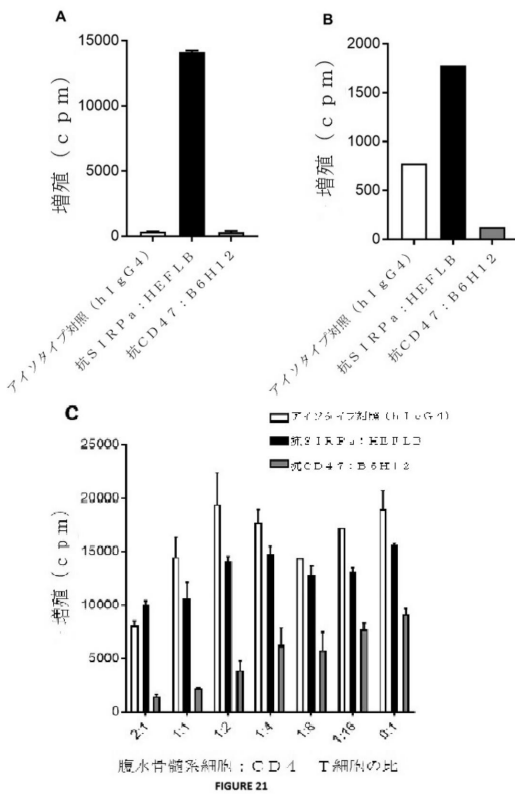


FIGURE 21

【図 22】

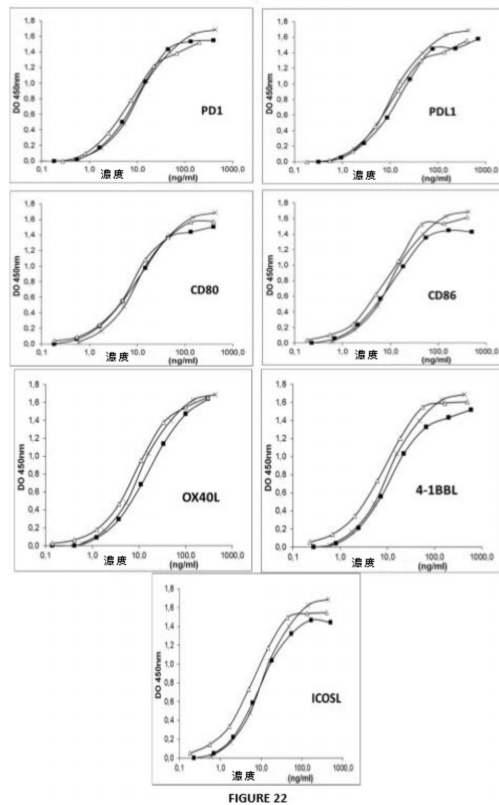


FIGURE 22

10

20

30

40

50

【 図 2 3 】

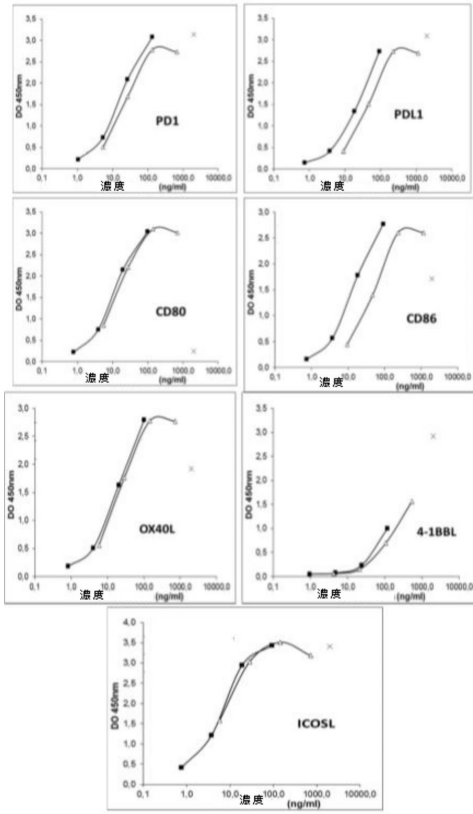


FIGURE 23

【 図 2 4 】

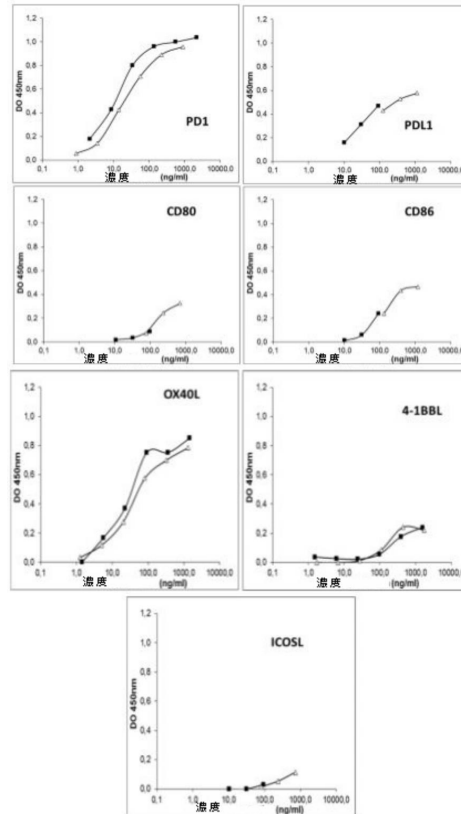


FIGURE 24

【 図 2 5 】

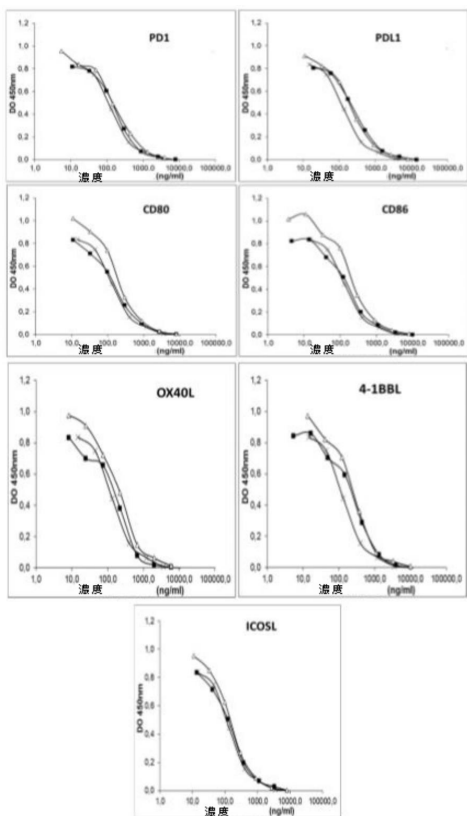


FIGURE 25

【 図 2 6 A 】

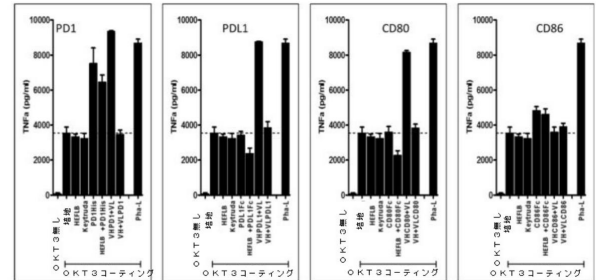


FIGURE 26 - スタート

【図 26 B】

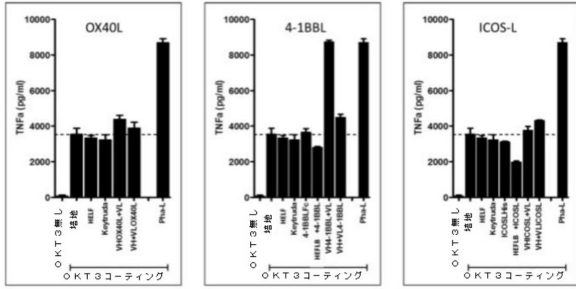


FIGURE 26 - エンド

【図 27】

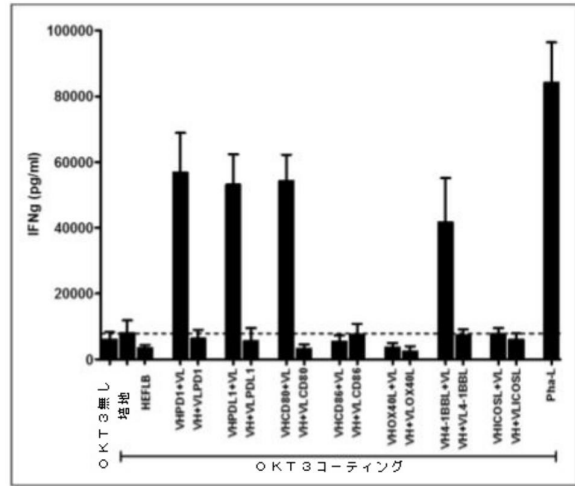


FIGURE 27

【図 28 A】

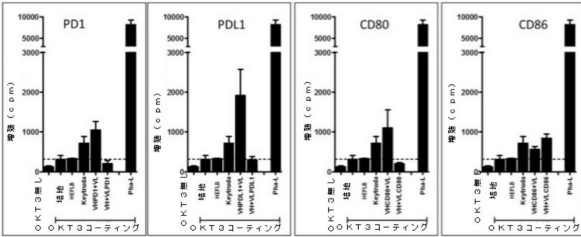


FIGURE 28 - スタート

【図 28 B】

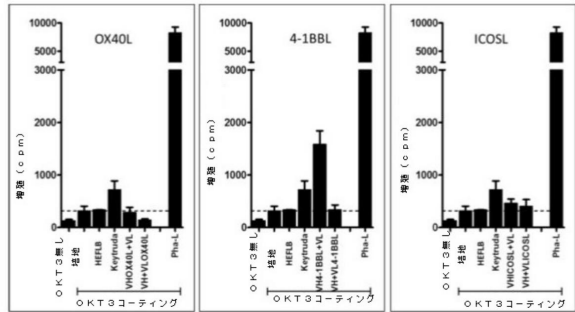


FIGURE 28 - エンド

10

20

30

40

50

【図 29 A】

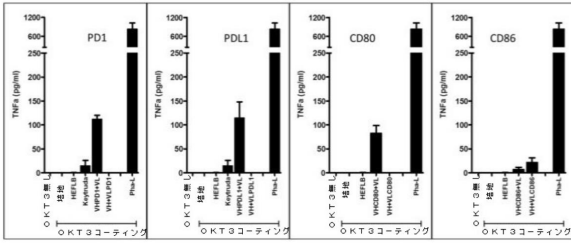


FIGURE 29 - スタート

【図 29 B】

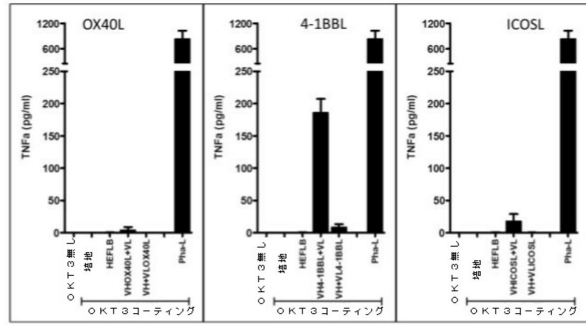


FIGURE 29 - エンド

10

【図 30】

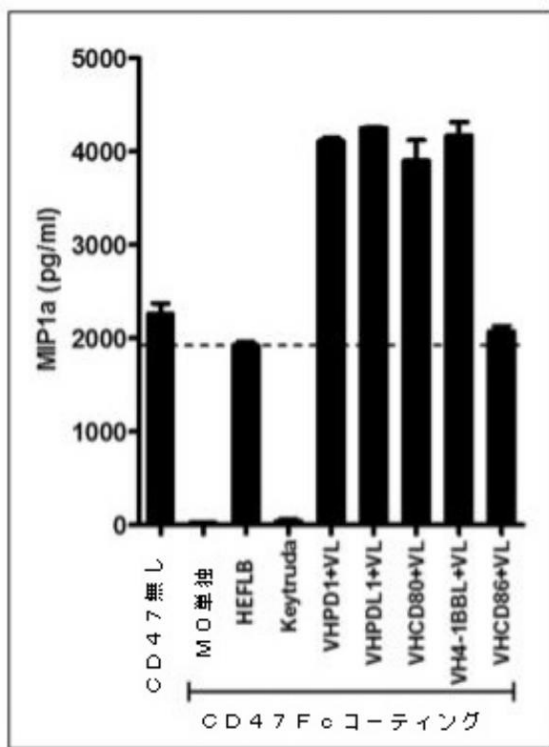


FIGURE 30

【図 31】

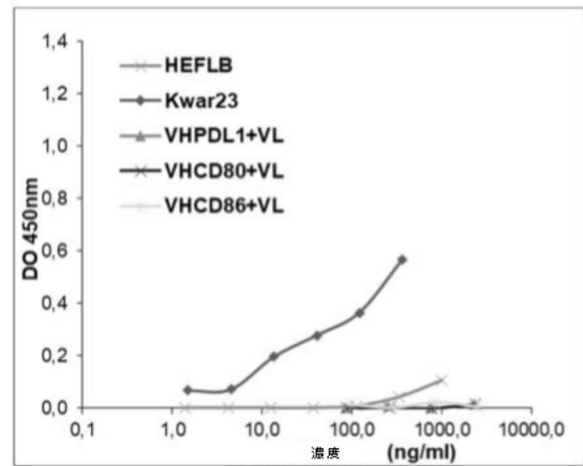


FIGURE 31

20

30

40

50

【図 3 2 A】

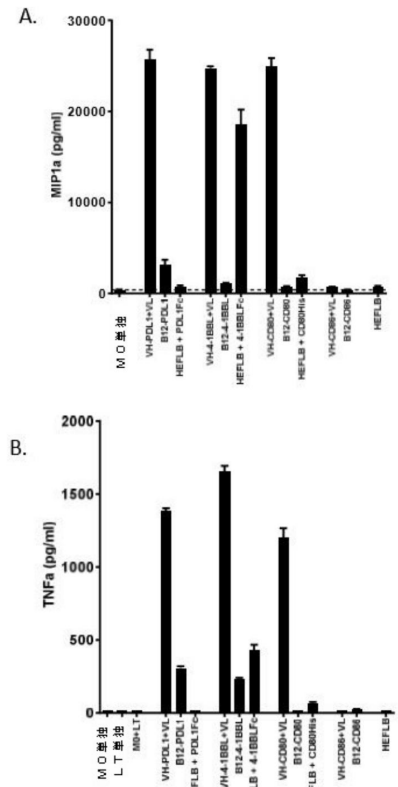


FIGURE 32 - スタート

【図 3 2 C】

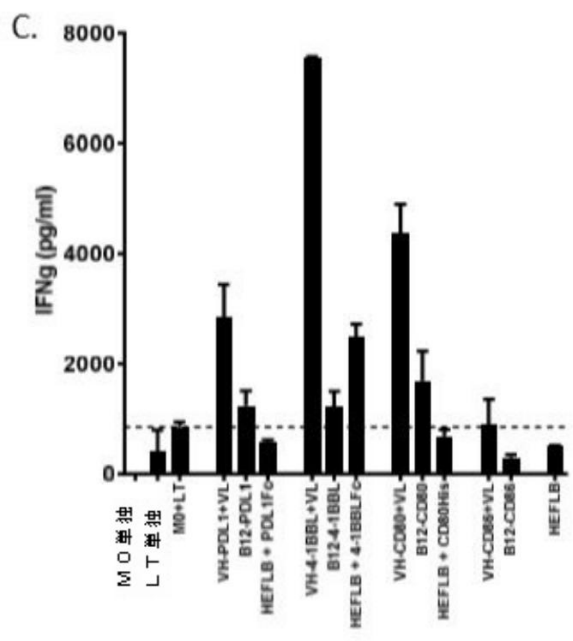


FIGURE 32 - エンド

【図 3 3】

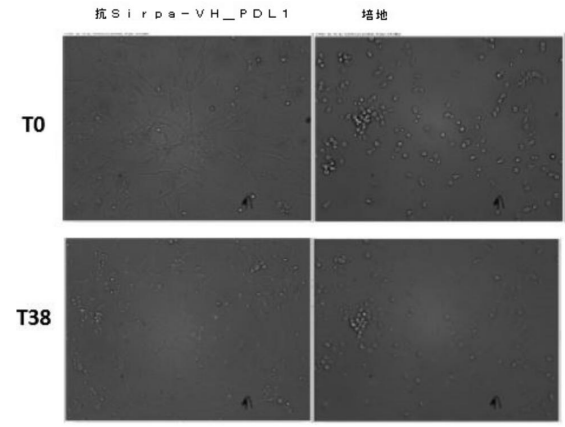


FIGURE 33

【配列表】

0007395471000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 35/00

, パス - タン通り 1

(72)発明者

マリー, キャロライン

フランス国 4 4 6 8 0 サント - パザンヌ, ビュイッソン通り 7

(72)発明者

ファンホーフ, バーナード

フランス国 4 4 4 0 0 ルゼ, アンリ バルビュッス通り 3

審査官

福澤 洋光

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 1 0 2 5 1 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 8 1 6 4 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 6 3 5 2 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 9 1 1 7 (W O , A 1)

Immunity, 2003年, Vol.18, pp.849-861

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

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

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

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

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

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

P u b M e d