

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519089

(P2021-519089A)

(43) 公表日 令和3年8月10日 (2021.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 333 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-551924 (P2020-551924)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月28日 (2019. 3. 28)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月25日 (2020. 11. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/024714
 (87) 国際公開番号 W02019/191519
 (87) 国際公開日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 62/649, 238
 (32) 優先日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/649, 264
 (32) 優先日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 520292534
 オリオニス バイオサイエンス、イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
 2 4 6 6, ニュートン, 2 7 5 グローブ
 ストリート
 (71) 出願人 518268352
 オリオニス バイオサイエンス ビーブ
 イ
 ベルギー国、ビー9052 ヘント、テク
 ノロジーパーク 94
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直

最終頁に続く

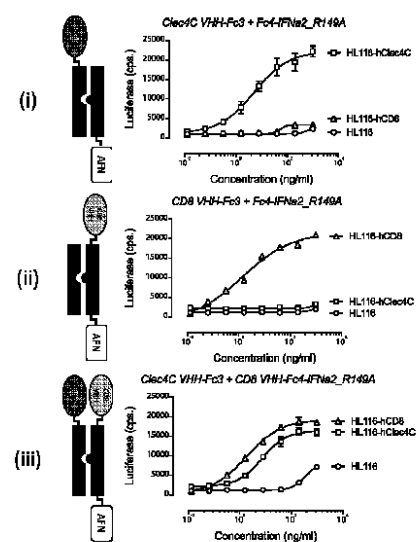
(54) 【発明の名称】 二官能性タンパク質およびその作製

(57) 【要約】

本発明は、一部は、Fcベースキメラタンパク質複合体およびそれらの治療薬としての使用に関する。本発明は、Fcベースキメラタンパク質複合体を含む医薬組成物および種々の疾患の治療でのそれらの使用にさらに関する。

【選択図】 図49

FIG. 49



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 標的を認識しおよび／またはそれに結合する認識ドメインを含むターゲティング部分、

(b) シグナル伝達物質であって、

i) 野生型シグナル伝達物質、または

i i) 前記野生型シグナル伝達物質に比べて改善された安全性を付与する 1 個または複数の変異を有する改変型シグナル伝達物質である、シグナル伝達物質、および

(c) F c ドメインであって、F c 鎖および任意選択で前記 F c ドメインの 1 種または複数のエフェクター機能を低減または除去する、前記 F c ドメインの F c 鎖対形成を促進する、および／または前記 F c ドメイン中のヒンジ領域を安定化する 1 個または複数の変異を有する F c 鎖を含む、F c ドメイン、を含む、F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 2】

1 個または複数のリンカーをさらに含む、請求項 1 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3】

前記 F c ドメインが、I g G、I g A、I g D、I g M、または I g E から選択される、請求項 1 または 2 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4】

前記 I g G が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 から選択される、請求項 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 5】

前記 F c ドメインが、ヒト I g G、I g A、I g D、I g M、または I g E から選択される、請求項 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 6】

前記ヒト I g G が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 から選択される、請求項 5 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 7】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ野生型シグナル伝達物質に比べて前記シグナル伝達物質の受容体で低減された親和性または活性を有する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 8】

前記シグナル伝達物質が、改変シグナル伝達物質でありかつ前記ターゲティング部分が前記シグナル伝達物質の受容体で前記改変型シグナル伝達物質の親和性または活性を回復する、請求項 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9】

前記 F c 鎖対形成が、イオン対形成および／またはノブインホール対形成により促進される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 10】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、F c ドメイン中の F c 鎖間のイオン対形成をもたらす、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 11】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、前記 F c ドメインのノブインホール対形成をもたらす、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 12】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、前記 F c ドメインのエフェクター機能の低減または除去をもたらす、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の F c ベー

10

20

30

40

50

スキメラタンパク質複合体。

【請求項 13】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞、および／または腫瘍間質、および／またはECM、および／または免疫細胞上の抗原または受容体を認識しおよび／または結合する認識ドメインを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 14】

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、およびNK細胞から選択される、請求項13に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 15】

前記ターゲティング部分が、単一ドメイン抗体、組換え重鎖のみで構成される抗体(VHH)、単鎖抗体(scFv)、サメ重鎖のみで構成される抗体(VNAR)、マイクロタンパク質、darpin、アンチカリン、アドネクチン、アプタマー、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、受容体に対する天然リガンド、または合成分子を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 16】

前記ターゲティング部分が、VHHを含む、請求項1～15のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 17】

前記ターゲティング部分が、前記標的の活性を実質的に中和することなくその標的を認識するおよび／またはそれに結合するまたは前記ターゲティング部分が、その標的を認識するおよび／またはそれに結合しかつ前記標的の活性を実質的に中和する、請求項1～16のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 18】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に免疫細胞を直接的または間接的に動員する、請求項1～17のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 19】

前記ターゲティング部分が、抗原提示を強化する、請求項1～18のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 20】

前記ターゲティング部分が、任意選択で樹状細胞により、腫瘍抗原提示を強化する、請求項1～19のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 21】

前記ターゲティング部分が、次の標的：CD8、CD13、CD20、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、テネシシンCA1、Flt3、またはECMタンパク質の1つに結合する、請求項1～20のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 22】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質中の前記変異が、活性の減弱化を可能にする、請求項1～21のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 23】

アゴニストまたはアンタゴニスト活性が、減弱化される、請求項22に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

【請求項 24】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子から選択される、請求項1～23のいずれか1項に記載のFcベーススキメラタンパク質複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質が、ヒト：IFN α 2、IFN α 1、IFN β 、IFN γ 、コンセンサスインターフェロン、TNF、TNFR、TGF- α 、TGF- β 、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1、またはEPOから選択される、請求項1～24のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 26】

前記ヒトIFN α 2が、配列番号1または2のアミノ酸配列を基準にしてR33A、T106X₃、R120E、R144X₁、A145X₂、M148A、R149A、およびL153Aから選択される1個または複数の変異を含み、X₁が、A、S、T、Y、L、およびIから選択され、X₂が、G、H、Y、K、およびDから選択され、かつX₃が、AおよびEから選択される、請求項25に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

10

【請求項 27】

前記ヒトIFN β が、配列番号3のアミノ酸配列を基準にしてW22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、およびR152Gから選択される1個または複数の変異を含む、請求項25に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 28】

前記ヒトIL-1 β が、配列番号17のアミノ酸配列を基準にしてA117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K、およびN245Qから選択される1個または複数の変異を含む、請求項25に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

20

30

【請求項 29】

前記ヒトIL-2が、配列番号18のアミノ酸配列を基準にしてR38A、F42A、Y45A、E62A、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、Q126F、D109、およびC125から選択される1個または複数の変異を含む、請求項25に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 30】

前記ヒトTNF α が、配列番号14のアミノ酸配列を基準にしてR32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87O、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T、およびY87Q/I97Aから選択される1個または複数の変異を含む、請求項25に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

40

【請求項 31】

前記Fcドメインが、ホモダイマーである、請求項1～30のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 32】

前記Fcドメインが、ヘテロダイマーである、請求項1、2、および7～30のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 33】

50

前記シグナル伝達物質が、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を基準にして任意選択で R 1 4 9 A 変異を有する、改変型 I F N α 2 である、請求項 2 5 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 4】

前記ターゲティング部分が C l e c 9 A に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、任意選択で次の変異：R 3 3 A、R 1 4 4 A、R 1 4 4 I、R 1 4 4 L、R 1 4 4 S、R 1 4 4 T、R 1 4 4 Y、A 1 4 5 D、A 1 4 5 G、A 1 4 5 H、A 1 4 5 K、A 1 4 5 Y、M 1 4 8 A、および L 1 5 3 A の 1 個または複数有する、改変型 I F N α 2 である、請求項 2 6 または 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 5】

前記ターゲティング部分が、P D - L 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 6】

前記ターゲティング部分が、P D - 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 7】

(i) 前記ターゲティング部分が、C l e c 4 C に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、または

(i i) 前記ターゲティング部分が、X c r 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 8】

前記ターゲティング部分が、C D 2 0 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 3 9】

前記ターゲティング部分が、C D 1 3 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 0】

前記ターゲティング部分が、F A P に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 1】

前記ターゲティング部分が、C D 8 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 2】

前記ターゲティング部分が、F l t 3 に結合しかつ任意選択で F l t 3 L の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含みかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 3】

前記ターゲティング部分が、P D - L 1 に対する s c F v でありかつ前記シグナル伝達物質が、野生型 I F N α 2 である、請求項 2 1 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 4】

前記ターゲティング部分が、P D - L 1 の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 5】

前記ターゲティング部分が、P D - 1 の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 3 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 4 6】

前記ターゲティング部分が、N G R ペプチドを含みかつ前記シグナル伝達物質が、改変

10

20

30

40

50

型 I F N α 2 である、請求項 33 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 47】

前記シグナル伝達物質が、野生型 I F N β または改変型 I F N β である、請求項 25 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 48】

前記ターゲティング部分が、C l e c 9 A に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N β である、請求項 47 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 49】

前記シグナル伝達物質が、野生型 IL-1 β または改変型 IL-1 β である、請求項 25 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

10

【請求項 50】

前記ターゲティング部分が、C D 8 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 IL-1 β である、請求項 49 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 51】

前記シグナル伝達物質が、野生型 T N F または改変型 T N F である、請求項 25 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 52】

前記ターゲティング部分が、C D 20 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 T N F である、請求項 51 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 53】

前記キメラタンパク質複合体が、第 2 のターゲティング部分をさらに含む、請求項 1 ～ 52 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

20

【請求項 54】

前記第 2 のターゲティング部分が、次の標的：C D 8、C D 13、C D 20、C l e c 9 A、C l e c 4 c、P D-1、P D-L1、P D-L2、S I R P 1 α 、F A P、X C R 1、テネイシン C A 1、F l t 3、または E C M タンパク質の 1 つに結合する、請求項 53 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 55】

前記キメラタンパク質複合体が、第 2 のシグナル伝達物質をさらに含む、請求項 1 ～ 54 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

30

【請求項 56】

前記第 2 のシグナル伝達物質が、野生型または改変型シグナル伝達物質である、請求項 55 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 57】

前記第 2 のシグナル伝達物質が、ヒト：I F N α 2、I F N α 1、I F N β 、I F N γ 、コンセンサスインターフェロン、T N F、T N F R、T G F- α 、T G F- β 、V E G F、E G F、P D G F、F G F、T R A I L、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、I G F-1、または E P O から選択される、請求項 56 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 58】

癌を治療するまたは予防するための方法であって、請求項 1 ～ 57 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

40

【請求項 59】

癌を治療するまたは予防するための、請求項 1 ～ 57 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項 60】

癌の治療または予防のための薬物の作製のための請求項 1 ～ 57 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項 61】

50

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌（*kidney or renal cancer*）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（*NHL*）を含む）、小リンパ球性（*SL*）*NHL*、中悪性度／濾胞性*NHL*、中悪性度びまん性*NHL*、高悪性度免疫芽細胞*NHL*、高悪性度リンパ芽球性*NHL*、高悪性度小型非切れ込み核細胞性*NHL*、巨大腫瘍病変*NHL*、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（*CLL*）、急性リンパ性白血病（*ALL*）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（*PTLD*）、ならびに母斑症に関連する異常血管増殖、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群の1種または複数から選択される、請求項58に記載の方法または請求項59もしくは請求項60に記載の使用。

10

【請求項62】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための方法であって、請求項1～57のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

20

【請求項63】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための請求項1～57のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項64】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための薬物の作製のための、請求項1～57のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の使用。

30

【請求項65】

前記自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患が、多発性硬化症、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性硬化性胆管炎、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群（*Menier's syndrome*）、移植拒絶反応（例えば、同種移植片拒絶の防止）、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、重症筋無力症、ライター症候群、およびグレーブス病から選択される、請求項62に記載の方法または請求項63もしくは請求項64に記載の使用。

40

【請求項66】

下記を含むホモダイマーである、Fcベースキメラタンパク質複合体：

（a）標的を認識しおよび／またはそれに結合する認識ドメインを含むターゲティング部分、

（b）シグナル伝達物質であって、

i）野生型シグナル伝達物質、または

ii）前記野生型シグナル伝達物質に比べて改善された安全性を付与する1個または複数の変異を有する改変型シグナル伝達物質

である、シグナル伝達物質、および

（c）Fcドメインであって、Fc鎖および任意選択で前記Fcドメインの1種または

50

複数のエフェクター機能を低減または除去するおよび／または前記Fcドメイン中のヒンジ領域を安定化する1個または複数の変異を有するFc鎖を含む、Fcドメイン。

【請求項67】

1個または複数のリンカーをさらに含む、請求項66に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項68】

前記Fcドメインが、IgG、IgA、IgD、IgM、またはIgEから選択される、請求項66または67に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項69】

前記IgGが、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から選択される、請求項68に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

10

【請求項70】

前記Fcドメインが、ヒトIgG、IgA、IgD、IgM、またはIgEから選択される、請求項68に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項71】

前記ヒトIgGが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から選択される、請求項70に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項72】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質が、野生型シグナル伝達物質に比べて前記シグナル伝達物質の受容体で低減された親和性または活性を有する、請求項66～71のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

20

【請求項73】

シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記ターゲティング部分が、前記シグナル伝達物質の受容体での前記改変型シグナル伝達物質の親和性または活性を回復する、請求項72に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項74】

前記Fcドメインに対する前記1個または複数の変異が、前記Fcドメインのエフェクター機能の低減または除去をもたらす、請求項66～73のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

30

【請求項75】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞、および／または腫瘍間質、および／またはECM、および／または免疫細胞上の抗原または受容体を認識しおよび／または結合する認識ドメインを含む、請求項66～74のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項76】

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、およびNK細胞から選択される、請求項75に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項77】

前記ターゲティング部分が、単ドメイン抗体、組換え重鎖のみで構成される抗体(VHH)、単鎖抗体(scFv)、サメ重鎖のみで構成される抗体(VNAR)、マイクロタンパク質、darpin、アンチカリン、アドネクチン、アプタマー、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、受容体に対する天然リガンド、または合成分子を含む、請求項66～76のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

40

【請求項78】

前記ターゲティング部分が、VHHを含む、請求項66～77のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項79】

前記ターゲティング部分が、前記標的の活性を実質的に中和することなくその標的を認

50

識するおよび／またはそれに結合するまたは前記ターゲティング部分が、その標的を認識するおよび／またはそれに結合しかつ前記標的の活性を実質的に中和する、請求項 66～78 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 80】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に免疫細胞を直接的または間接的に動員する、請求項 66～79 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 81】

前記ターゲティング部分が、抗原提示を強化する、請求項 66～80 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

10

【請求項 82】

前記ターゲティング部分が、任意選択で樹状細胞により、腫瘍抗原提示を強化する、請求項 66～81 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 83】

前記ターゲティング部分が、次の標的：CD8、CD13、CD20、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP α 、FAP、XCR1、テネイシンCA1、Flt3、またはECMタンパク質の 1 つに結合する、請求項 66～82 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 84】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質中の前記変異が、活性の減弱化を可能にする、請求項 66～83 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

20

【請求項 85】

アゴニストまたはアンタゴニスト活性が、減弱化される、請求項 84 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 86】

前記シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子から選択される、請求項 66～85 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 87】

前記改変型シグナル伝達物質が、ヒト：IFN α 2、IFN α 1、IFN β 、IFN γ 、コンセンサスインターフェロン、TNF、TNFR、TGF- α 、TGF- β 、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1、またはEPOから選択される、請求項 66～86 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

30

【請求項 88】

前記ヒト IFN α 2 が、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を基準にして R33A、T106X₃、R120E、R144X₁、A145X₂、M148A、R149A、および L153A から選択される 1 個または複数の変異を含み、X₁ が、A、S、T、Y、L、および I から選択され、X₂ が、G、H、Y、K、および D から選択され、かつ X₃ が、A および E から選択される、請求項 87 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

40

【請求項 89】

前記ヒト IFN β が、配列番号 3 のアミノ酸配列を基準にして W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、および R152G から選択される 1 個または複数の変異を含む、請求項 87 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 90】

前記ヒト IL-1 β が、配列番号 17 のアミノ酸配列を基準にして A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H

50

1 4 6 A、H 1 4 6 G、H 1 4 6 E、H 1 4 6 N、H 1 4 6 R、L 1 4 5 A / L 1 4 7 A、Q 1 4 8 E、Q 1 4 8 G、Q 1 4 8 L、Q 1 4 8 G / Q 1 5 0 G、Q 1 5 0 G / D 1 5 1 A、M 1 5 2 G、F 1 6 2 A、F 1 6 2 A / Q 1 6 4 E、F 1 6 6 A、Q 1 6 4 E / E 1 6 7 K、N 1 6 9 G / D 1 7 0 G、I 1 7 2 A、V 1 7 4 A、K 2 0 8 E、K 2 0 9 A、K 2 0 9 D、K 2 0 9 A / K 2 1 0 A、K 2 1 9 S、K 2 1 9 Q、E 2 2 1 S、E 2 2 1 K、E 2 2 1 S / N 2 2 4 A、N 2 2 4 S / K 2 2 5 S、E 2 4 4 K、および N 2 4 5 Q から選択される 1 個または複数の変異を含む、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 1】

前記ヒト IL-2 が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を基準にして R 3 8 A、F 4 2 A、Y 4 5 A、E 6 2 A、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、Q 1 2 6 F、D 1 0 9、および C 1 2 5 から選択される 1 個または複数の変異を含む、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 2】

前記ヒト TNF α が、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を基準にして R 3 2 G、N 3 4 G、Q 6 7 G、H 7 3 G、L 7 5 G、L 7 5 A、L 7 5 S、T 7 7 A、S 8 6 G、Y 8 7 0、Y 8 7 L、Y 8 7 A、Y 8 7 F、V 9 1 G、V 9 1 A、I 9 7 A、I 9 7 Q、I 9 7 S、T 1 0 5 G、P 1 0 6 G、A 1 0 9 Y、P 1 1 3 G、Y 1 1 5 G、Y 1 1 5 A、E 1 2 7 G、N 1 3 7 G、D 1 4 3 N、A 1 4 5 G、A 1 4 5 T、および Y 8 7 Q / I 9 7 A から選択される 1 個または複数の変異を含む、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 3】

前記シグナル伝達物質が、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を基準にして任意選択で R 1 4 9 A 変異を有する、改変型 I FN α 2 である、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 4】

前記ターゲット部分が、C l e c 9 A に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、任意選択で次の変異：R 3 3 A、R 1 4 4 A、R 1 4 4 I、R 1 4 4 L、R 1 4 4 S、R 1 4 4 T、R 1 4 4 Y、A 1 4 5 D、A 1 4 5 G、A 1 4 5 H、A 1 4 5 K、A 1 4 5 Y、M 1 4 8 A、および L 1 5 3 A の 1 個または複数の変異を有する、改変型 I FN α 2 である、請求項 8 8 または 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 5】

前記ターゲット部分が、P D - L 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 6】

前記ターゲット部分が、P D - 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 7】

(i) 前記ターゲット部分が、C l e c 4 C に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、または

(i i) 前記ターゲット部分が、X c r 1 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 8】

前記ターゲット部分が、C D 2 0 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 9 9】

前記ターゲット部分が、C D 1 3 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I FN α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 0】

前記ターゲット部分が、F A P に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F

10

20

30

40

50

N α 2である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 1】

前記ターゲティング部分が、C D 8 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 2】

前記ターゲティング部分が、F l t 3 に結合しかつ任意選択で F l t 3 L の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 3】

前記ターゲティング部分が、P D - L 1 に対する s c F v であり前記シグナル伝達物質が、野生型 I F N α 2 である、請求項 8 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 4】

前記ターゲティング部分が、P D - L 1 の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 5】

前記ターゲティング部分が、P D - 1 の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 6】

前記ターゲティング部分が、N G R ペプチドを含みかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N α 2 である、請求項 9 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 7】

前記シグナル伝達物質が、野生型 I F N β または改変型 I F N β である、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 8】

前記ターゲティング部分が、C l e c 9 A に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I F N β である、請求項 1 0 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 0 9】

前記シグナル伝達物質が、野生型 I L - 1 β または改変型 I L - 1 β である、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 0】

前記ターゲティング部分が、C D 8 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 I L - 1 β である、請求項 1 0 9 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 1】

前記シグナル伝達物質が、野生型 T N F α または改変型 T N F α である、請求項 8 7 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 2】

前記ターゲティング部分が、C D 2 0 に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型 T N F α である、請求項 1 1 1 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 3】

前記キメラタンパク質複合体が、第 2 のターゲティング部分をさらに含む、請求項 6 6 ~ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 4】

前記第 2 のターゲティング部分が、次の標的：C D 8、C D 1 3、C D 2 0、C l e c 9 A、C l e c 4 c、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、S I R P 1 α、F A P、X C R 1、テネイシン C A 1、F l t 3、または E C M タンパク質の 1 つに結合する、請求項 1 1 3 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 1 5】

前記キメラタンパク質複合体が、第 2 のシグナル伝達物質をさらに含む、請求項 6 6 ~

10

20

30

40

50

114のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項116】

前記第2のシグナル伝達物質が、野生型または改変型シグナル伝達物質である、請求項115に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項117】

前記第2のシグナル伝達物質が、ヒト：IFN α 2、IFN α 1、IFN β 、IFN γ 、コンセンサスインターフェロン、TNF α 、TNFR、TGF- α 、TGF- β 、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1、またはEPOから選択される、請求項116に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

10

【請求項118】

癌を治療するまたは予防するための方法であって、請求項66～117のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

【請求項119】

癌を治療するまたは予防するための請求項66～117のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項120】

癌を治療するまたは予防するための薬物の作製のための請求項66～117のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の使用。

20

【請求項121】

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘍病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常血管増殖、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群の1種または複数から選択される、請求項118に記載の方法または請求項119もしくは請求項120に記載の使用。

30

40

【請求項122】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための方法であって、請求項66～117のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

【請求項123】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための請求項66～117のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項124】

50

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための薬物の作製のための請求項 66～117 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項 125】

前記自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患が、多発性硬化症、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性硬化性胆管炎、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群 (Menier's syndrome)、移植拒絶反応 (例えば、同種移植片拒絶の防止)、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、重症筋無力症、ライター症候群、およびグレーブス病から選択される、請求項 122 に記載の方法または請求項 123 もしくは請求項 124 に記載の使用。

【請求項 126】

下記を含むヘテロダイマーである、Fc ベースキメラタンパク質複合体：

(a) 標的を認識しおよび／またはそれに結合する認識ドメインを含むターゲティング部分、

(b) シグナル伝達物質であって、

i) 野生型シグナル伝達物質、または

ii) 前記野生型シグナル伝達物質に比べて改善された安全性を付与する 1 個または複数の変異を有する改変型シグナル伝達物質である、シグナル伝達物質、および

(c) Fc ドメインであって、Fc 鎖を含みおよび任意選択で前記 Fc ドメインの Fc 鎖対形成を促進する 1 個または複数の変異を有しおよび任意選択で前記 Fc ドメインの 1 種または複数のエフェクター機能を低減するまたは除去する、および／または前記 Fc ドメイン中のヒンジ領域を安定化する 1 個または複数の変異をさらに有する、Fc ドメイン。

【請求項 127】

1 個または複数のリンカーをさらに含む、請求項 126 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 128】

前記 Fc ドメインの Fc 鎖が、IgG、IgA、IgD、IgM、または IgE から選択される、請求項 126 または 127 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 129】

前記 IgG が、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 から選択される、請求項 128 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 130】

前記 Fc ドメインの Fc 鎖が、ヒト IgG、IgA、IgD、IgM、または IgE から選択される、請求項 128 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 131】

前記ヒト IgG が、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 から選択される、請求項 130 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 132】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質が、野生型シグナル伝達物質に比べて前記シグナル伝達物質の受容体での低減された親和性または活性を有する、請求項 126～131 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 133】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記ターゲティング部分が、前記シグナル伝達物質の受容体での前記改変型シグナル伝達物質の親和性または活性

10

20

30

40

50

を回復する、請求項 1 3 2 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 4】

前記 F c 鎖対形成が、イオン対形成および／またはノブインホール対形成により促進される、請求項 1 2 6 ～ 1 3 3 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 5】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、F c ドメイン中の F c 鎖間のイオン対形成をもたらす、請求項 1 2 6 ～ 1 3 4 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 6】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、前記 F c ドメインのノブインホール対形成をもたらす、請求項 1 2 6 ～ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 7】

前記 F c ドメインに対する前記 1 個または複数の変異が、前記 F c ドメインのエフェクター機能の低減または除去をもたらす、請求項 1 2 6 ～ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 8】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞、および／または腫瘍間質、および／または E C M、および／または免疫細胞上の抗原または受容体を認識しおよび／または結合する認識ドメインを含む、請求項 1 2 6 ～ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 3 9】

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、および N K 細胞から選択される、請求項 1 3 8 に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 0】

前記ターゲティング部分が、単一ドメイン抗体、組換え重鎖のみで構成される抗体 (V H H)、単鎖抗体 (s c F v)、サメ重鎖のみで構成される抗体 (V N A R)、マイクロタンパク質、d a r p i n、アンチカリン、アドネクチン、アプタマー、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、ペプチド模倣分子、受容体に対する天然リガンド、または合成分子を含む、請求項 1 2 6 ～ 1 3 9 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 1】

前記ターゲティング部分が、V H Hを含む、請求項 1 2 6 ～ 1 4 0 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 2】

前記ターゲティング部分が、前記標的の活性を実質的に中和することなくその標的を認識するおよび／またはそれに結合するまたは前記ターゲティング部分が、その標的を認識するおよび／またはそれに結合しかつ前記標的の活性を実質的に中和する、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 3】

前記ターゲティング部分が、腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に免疫細胞を直接的または間接的に動員する、請求項 1 2 6 ～ 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 4】

前記ターゲティング部分が、抗原提示を強化する、請求項 1 2 6 ～ 1 4 3 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 5】

前記ターゲティング部分が、任意選択で樹状細胞により、腫瘍抗原提示を強化する、請求項 1 2 6 ～ 1 4 4 のいずれか 1 項に記載の F c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 6】

前記ターゲティング部分が、次の標的：CD 8、CD 1 3、CD 2 0、C l e c 9 A、C l e c 4 c、PD-1、PD-L 1、PD-L 2、S I R P 1 α、F A P、X C R 1、テネイシンC A 1、F l t 3、またはE C Mタンパク質の1つに結合する、請求項 1 2 6～1 4 5のいずれか1項に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 7】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質中の前記変異が、活性の減弱化を可能にする、請求項 1 2 6～1 4 6のいずれか1項に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 8】

アゴニストまたはアンタゴニスト活性が、減弱化される、請求項 1 4 7に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 4 9】

前記シグナル伝達物質が、改変型シグナル伝達物質でありかつ前記改変型シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子から選択される、請求項 1 2 6～1 4 8のいずれか1項に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 5 0】

前記改変型シグナル伝達物質が、ヒト：I F N α 2、I F N α 1、I F N β、I F N γ、コンセンサスインターフェロン、T N F α、T N F R、T G F-α、T G F-β、V E G F、E G F、P D G F、F G F、T R A I L、IL-1 β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-1 0、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-3 3、I G F-1、またはE P Oから選択される、請求項 1 2 6～1 4 9のいずれか1項に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 5 1】

前記ヒトI F N α 2が、配列番号1または2のアミノ酸配列を基準にしてR 3 3 A、T 1 0 6 X₃、R 1 2 0 E、R 1 4 4 X₁、A 1 4 5 X₂、M 1 4 8 A、R 1 4 9 A、およびL 1 5 3 Aから選択される1個または複数の変異を含み、X₁が、A、S、T、Y、L、およびIから選択され、X₂が、G、H、Y、K、およびDから選択され、かつX₃が、AおよびEから選択される、請求項 1 5 0に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 5 2】

前記ヒトI F N βが、配列番号3のアミノ酸配列を基準にしてW 2 2 G、R 2 7 G、L 3 2 A、L 3 2 G、R 3 5 A、R 3 5 G、V 1 4 8 G、L 1 5 1 G、R 1 5 2 A、およびR 1 5 2 Gから選択される1個または複数の変異を含む、請求項 1 5 0に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 5 3】

前記ヒトIL-1 βが、配列番号17のアミノ酸配列を基準にしてA 1 1 7 G / P 1 1 8 G、R 1 2 0 G、R 1 2 0 A、L 1 2 2 A、T 1 2 5 G / L 1 2 6 G、R 1 2 7 G、Q 1 3 0 A、Q 1 3 0 W、Q 1 3 1 G、K 1 3 2 A、S 1 3 7 G / Q 1 3 8 Y、L 1 4 5 G、H 1 4 6 A、H 1 4 6 G、H 1 4 6 E、H 1 4 6 N、H 1 4 6 R、L 1 4 5 A / L 1 4 7 A、Q 1 4 8 E、Q 1 4 8 G、Q 1 4 8 L、Q 1 4 8 G / Q 1 5 0 G、Q 1 5 0 G / D 1 5 1 A、M 1 5 2 G、F 1 6 2 A、F 1 6 2 A / Q 1 6 4 E、F 1 6 6 A、Q 1 6 4 E / E 1 6 7 K、N 1 6 9 G / D 1 7 0 G、I 1 7 2 A、V 1 7 4 A、K 2 0 8 E、K 2 0 9 A、K 2 0 9 D、K 2 0 9 A / K 2 1 0 A、K 2 1 9 S、K 2 1 9 Q、E 2 2 1 S、E 2 2 1 K、E 2 2 1 S / N 2 2 4 A、N 2 2 4 S / K 2 2 5 S、E 2 4 4 K、およびN 2 4 5 Qから選択される1個または複数の変異を含む、請求項 1 5 0に記載のF c ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 5 4】

前記ヒトIL-2が、配列番号18のアミノ酸配列を基準にしてR 3 8 A、F 4 2 A、Y 4 5 A、E 6 2 A、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、Q 1 2 6 F、D 1 0 9、およびC 1 2 5から選択される1個または複数の変異を含む、請求項 1 5 0に

10

20

30

40

50

記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項155】

前記ヒトTNF α が、配列番号14のアミノ酸配列を基準にしてR32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87O、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T、およびY87Q/I97Aから選択される1個または複数の変異を含む、請求項150に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項156】

前記シグナル伝達物質が、配列番号1または2のアミノ酸配列を基準にして任意選択でR149A変異を有する、改変型IFN α 2である、請求項150に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項157】

前記ターゲティング部分が、Clec9Aに結合しかつ前記シグナル伝達物質が、任意選択で次の変異：R33A、R144A、R144I、R144L、R144S、R144T、R144Y、A145D、A145G、A145H、A145K、A145Y、M148A、およびL153Aの1個または複数を含む、改変型IFN α 2である、請求項151または156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項158】

前記ターゲティング部分が、PD-L1に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項159】

前記ターゲティング部分が、PD-1に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項160】

(i) 前記ターゲティング部分が、Clec4Cに結合しかつ前記シグナル伝達物質が、かつ改変型IFN α 2である、または

(ii) 前記ターゲティング部分が、Xcr1に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、

請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項161】

前記ターゲティング部分が、CD20に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項162】

前記ターゲティング部分が、CD13に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項163】

前記ターゲティング部分が、FAPに結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項164】

前記ターゲティング部分が、CD8に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項165】

前記ターゲティング部分が、Flt3に結合しかつ任意選択でFlt3Lの細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項166】

前記ターゲティング部分が、PD-L1に対するscFvでありかつ前記シグナル伝達物質が、野生型IFN α 2である、請求項146に記載のFcベースキメラタンパク質複

10

20

30

40

50

合体。

【請求項 1 6 7】

前記ターゲティング部分が、PD-L1の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 6 8】

前記ターゲティング部分が、PD-1の細胞外ドメイン、またはその機能性部分を含み、かつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 6 9】

前記ターゲティング部分が、NGRペプチドを含みかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN α 2である、請求項156に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 0】

前記シグナル伝達物質が、野生型IFN β または改変型IFN β である、請求項150に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 1】

前記ターゲティング部分が、Clec9Aに結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IFN β である、請求項170に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 2】

前記シグナル伝達物質が、野生型IL-1 β または改変型IL-1 β である、請求項150に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 3】

前記ターゲティング部分が、CD8に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型IL-1 β である、請求項172に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 4】

前記シグナル伝達物質が、野生型TNF α または改変型TNF α である、請求項150に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 5】

前記ターゲティング部分が、CD20に結合しかつ前記シグナル伝達物質が、改変型TNF α である、請求項174に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 6】

前記キメラタンパク質複合体が、第2のターゲティング部分をさらに含む、請求項126～175のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 7】

前記第2のターゲティング部分が、次の標的：CD8、CD13、CD20、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP α 、FAP、XCR1、テネイシンCA1、Flt3、またはECMタンパク質の1つに結合する、請求項176に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 8】

前記キメラタンパク質複合体が、第2のシグナル伝達物質をさらに含む、請求項126～177のいずれか1項に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 7 9】

前記第2のシグナル伝達物質が、野生型または改変型シグナル伝達物質である、請求項178に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 1 8 0】

前記第2のシグナル伝達物質が、ヒト：IFN α 2、IFN α 1、IFN β 、IFN γ 、コンセンサスインターフェロン、TNF α 、TNFR、TGF- α 、TGF- β 、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1、またはEPOから選択される、請求項179に記載のFcベースキメラタンパク質複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 181】

癌を治療するまたは予防するための方法であって、請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

【請求項 182】

癌を治療するまたは予防するための請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項 183】

癌を治療するまたは予防するための薬物の作製のための請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の使用。

10

【請求項 184】

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびに B 細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性 NHL、中悪性度びまん性 NHL、高悪性度免疫芽細胞 NHL、高悪性度リンパ芽球性 NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性 NHL、巨大腫瘍病変 NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常血管増殖、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群の 1 種または複数から選択される、請求項 181 に記載の方法または請求項 182 もしくは請求項 183 に記載の使用。

20

30

【請求項 185】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための方法であって、請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の有効量をそれを必要としている患者に投与することを含む、方法。

【請求項 186】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の使用。

【請求項 187】

自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患を治療するまたは予防するための薬物の作製のための請求項 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の使用。

40

【請求項 188】

前記自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、および／または心臓血管疾患が、多発性硬化症、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性硬化性胆管炎、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群（Menier's syndrome）、移植拒絶反応（例えば、同種移植片拒絶の防止）、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エ

50

リテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、重症筋無力症、ライター症候群、およびグレーブス病から選択される、請求項 185 に記載の方法または請求項 186 もしくは請求項 187 に記載の使用。

【請求項 189】

請求項 1～57、66～117、または 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体、またはその構成成分をコードする核酸。

【請求項 190】

2 つのタンパク質の複合体である、請求項 1～57、66～117、または 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 191】

1 個または複数の融合タンパク質を含む、請求項 190 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 192】

図 1A～F、2A～H、3A～H、4A～D、5A～F、6A～J、7A～D、8A～F、9A～J、10A～F、11A～L、12A～L、13A～F、14A～L、15A～L、16A～J、17A～J、18A～F、19A～F、20A～E、38、46A～D、47、および 49 のいずれか 1 つに示されるような構造および／または配向／構造を有する、請求項 1～57、66～117、126～180、または 190～191 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 193】

図 7B に示されるような構造および／または配向／構造を有する、請求項 192 に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 194】

互いに対し、任意のターゲティング部分およびシグナル伝達物質、および／または互いに対し任意のターゲティング部分、および／または互いに対し任意のシグナル伝達物質に関して、トランス配向／構造を有する、請求項 1～57 または 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 195】

互いに対し、任意のターゲティング部分およびシグナル伝達物質、および／または互いに対し任意のターゲティング部分相互、および／または互いに対し任意のシグナル伝達物質相互に関して、シス配向／構造を有する、請求項 1～57 または 126～180 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 196】

Fc が、L234A、L235A、およびヒト IgG1 中の K322A、K322Q、D265A、P32G、および P331S 置換から選択される 1 つの追加の変異を含み、ナンバリングが、EU 規則に基づく、請求項 1～57、66～117、126～180、または 190～195 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【請求項 197】

Fc が、ヒト IgG4 中に S228P 置換を含み、ナンバリングが、EU 規則に基づく、請求項 1～57、66～117、126～180、または 190～195 のいずれか 1 項に記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は 2018 年 3 月 28 日出願の米国特許仮出願第 62/649,238 号、2018 年 3 月 28 日出願の同第 62/649,248 号および 2018 年 3 月 28 日出願の

10

20

30

40

50

同第62／649，264号の利益を主張する。これらの仮出願の全内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、一部は、断片結晶化可能領域（Fc）ベースキメラタンパク質複合体およびそれらの治療薬としての使用に関する。

【0003】

電子申請したテキストファイルの説明

本明細書と共に電子申請された次記のテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列リストのコンピュータ可読形式コピー（ファイル名：ORN-042PC_Sequence_listing、記録日付：2019年3月27日、ファイルサイズ：1,521,030バイト）。

【背景技術】

【0004】

エフェクター機能コード化生物製剤は、多くの潜在的治療用途を有する代表的生物製剤部類である。このような薬剤が疾患の治療に有用であるためには、効力の高いエフェクター機能をコードする場合には特に、それらの耐容性および治療指数を最大化することが極めて重要である（例えば、サイトカインは、ヒトにそのまま投与される場合にはその多くが全身毒性である）。従って、高い固有の安全性プロファイルを有するこのような薬剤を設計する必要性が存在し、それは、エフェクター機能の選択標的部位（例えば、目的の細胞型上の抗原）への高精度で制御された方式による標的化送達を必要とする。

【0005】

このような薬剤の一例は、シグナル伝達物質（例えば、サイトカイン）を有し、ターゲティング要素に連結されたキメラタンパク質であり、この中のシグナル伝達物質は、野生型であるかまたは、その標的（例えば、標的細胞上の抗原）へのターゲティング要素の結合時にそのエフェクター機能が回復され得るような方式でシグナル伝達物質の活性を減弱化させる（例えば、その受容体と相互作用する／結合するその能力を実質的に低減させる）ように改変されている（例えば、変異により）。

【0006】

しかし、このようなキメラタンパク質は、特定の条件、例えば、大規模生産される能力、治療上有益な効果を誘発するために薬物を暴露する十分な時間を確保するインビボ半減期、急速な排出または限定された組織浸透性および体内分布を回避するための適切なサイズ、ならびに機能の大きな低下のない適切な溶解度、安定性および貯蔵を保証する他の性質、が満たされる場合のみに、治療的使用に適用できる。重要なのは、全ての、または実質的にほとんどの上記性質が、エフェクター機能の条件付きターゲティングおよび改変シグナル伝達物質のその受容体との条件付き結合の維持の喪失なしに、達成されなくてはならないことである。多くの場合、単一の連続ポリペプチド鎖をコードするまたはそれにより表されるキメラタンパク質を用いて全てのこれらの目的を達成するのは困難である。その生物製剤の耐容性および治療指数を維持しながら、このような望ましい特性の生物製剤を達成できるということに対する必要性が当該技術分野で存在する。

【0007】

その生物製剤の耐容性および治療指数を維持しながら、このような望ましい特性の生物製剤を達成できるということに対する必要性が当該技術分野で存在する。さらに、疾患の治療または予防に対する療法として、製造での使用に適用できる、エフェクター機能をコードする生物製剤の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0008】

本技術は、全てでないにしても、上記で概要を述べた要求がほとんど満たされる、結晶性断片領域（Fc）ベースキメラタンパク質複合体を提供する。これらの構築物は、そのエフェクター機能が高精度で、および全身性有害事象なしに、または軽減量の全身性有害

事象で、最適標的に送達され得、それにより全身性交差反応性および関連する有害事象を制限し、また同時に、治療薬の製造を可能にする医薬品特性、例えば、所望のインビボ暴露時間（例えば、半減期）、サイズ（例えば、体内分布およびクリアランス特性のための）、ならびに商業生産のための大量生産および／または精製特性（例えば、適切な溶解度、純度、安定性および貯蔵特性を有する）を付与する特徴をもたらす、生物学的治療薬をコードする。

【0009】

いくつかの態様では、本技術は、標的を認識しそれに結合する認識ドメインを含むターゲティング部分、野生型または改変型シグナル伝達物質であって、改変型シグナル伝達物質が野生型シグナル伝達物質に比べ向上した安全性を付与する1個または複数の変異を有する、シグナル伝達物質、および1個または複数のFc鎖を有するFcドメイン、を含むFcベースキメラタンパク質複合体に関する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する、FcドメインのFc鎖対形成を促進する、および／またはFcドメインのヒンジ領域を安定化する、1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインの1個または複数のFc鎖は、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する、FcドメインのFc鎖対形成を促進する、および／またはFcドメインのヒンジ領域を安定化する、1個または複数の変異を有する。

10

【0010】

いくつかの実施形態では、このようなFcベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマーであり、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、トランス方向に配向される。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマーであり、対形成は、Ridgwayのノブインホール構造による（本明細書に記載のように）。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマーであり、対形成は、Merchantのノブインホール構造による（本明細書に記載のように）。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、このようなFcベースキメラタンパク質複合体は、ホモダイマーである。

30

【0012】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質中の1個または複数の変異は、野生型シグナル伝達物質に比べて、シグナル伝達物質の受容体での親和性または活性を低減する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は改変シグナル伝達物質の親和性または活性を回復する。

【0013】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1個または複数の追加のターゲティング部分および／または野生型または改変型シグナル伝達物質を含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、多重特異性である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は単一ドメイン抗体（VHH）である。

40

【0014】

別の態様では、本技術は、種々の疾患および障害を治療または予防するためのFcベースキメラタンパク質複合体の使用に関する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、癌、感染症、代謝疾患、（神経）変性疾患、ならびに心臓血管疾患および免疫異常の治療に使用される。

【0015】

図1A～F、2A～H、3A～H、4A～D、5A～F、6A～J、7A～D、8A～F、9A～J、10A～F、11A～L、12A～L、13A～F、14A～L、15A～L、16A～J、17A～J、18A～F、19A～F、20A～E、38、46A～D、47、および49は、本発明の種々のFcベースキメラタンパク質複合体の非限定的

50

概略図の例を示す。いくつかの実施形態では、それぞれの概略図は、本発明の組成物である。図中で該当する場合には、「TM」は、本明細書に記載の「ターゲティング部分」を指し、「SA」は、本明細書に記載の「シグナル伝達物質」を指し、

【化1】



は、本明細書に記載の任意選択の「リンカー」であり、2つの長い平行長方形は、例えば、本明細書に記載の IgG1 由来の、IgG2 由来の、または IgG4 由来の1個または複数のFc鎖を有する、ヒトFcドメインであり、任意選択で、本明細書でまた記載されるエフェクターノックアウトおよび／または安定化変異を有し、および片方が突出部を有し他方が陥凹部を有する2つの長い平行長方形は、例えば、本明細書に記載の IgG1 由来の、IgG2 由来の、または IgG4 由来の1個または複数のFc鎖を有する、ヒトFcドメインであり、本明細書で記載のノブインホールおよび／またはイオン対(a/k/a 荷電対、イオン結合イオン結合、または荷電残基対)変異を有し、および任意選択で本明細書でまた記載されるエフェクターノックアウトおよび／または安定化変異を有する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A-1F】ホモダイマー2鎖複合体の例を示す。これらの図は、ホモダイマー2鎖複合体の構造例を示す。

【図2A-2H】2個のターゲティング部分(TM) (本明細書に記載のように、いくつかの実施形態ではより多くのターゲティング部分が存在する場合もある) を有するホモダイマー2鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、TM1およびTM2の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、ボックスで示される構築物(すなわち、図2Bおよび2C)は、TM1とTM2の間、またはTM1とFcの間にシグナル伝達物質(SA)を有する。

【図3A-3H】2種のシグナル伝達物質(いくつかの実施形態では、本明細書に記載のように、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合もある) を有するホモダイマー2鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、SA1およびSA2の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、ボックスで示される構築物(すなわち、図3Gおよび3H)は、SA1とSA2の間にTMを、またはN末端またはC末端にTMを有する。

【図4A-4D】分離したTMおよびSA鎖、すなわち、Fcのノブ鎖上にTMおよびFcのホール鎖上にSAを有する、ヘテロダイマー2鎖複合体の例を示す。

【図5A-5F】分離したTMおよびSA鎖、すなわち、Fcのノブ鎖上に両TMおよびFcのホール鎖上にSAを有し、2個のターゲティング部分(本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合がある) を有する、ヘテロダイマー2鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、TM1およびTM2の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、TM1およびTM2は同一であり得る。

【図6A-6J】分離したTMおよびSA鎖、すなわち、Fcのノブ鎖上にTMおよびFcのホール鎖上にSAを有し、2種のシグナル伝達物質(本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合がある) を有する、ヘテロダイマー2鎖複合体の例を示す。これらの配向／構造では、1種のSAはノブ鎖上にあり、1種のSAはホール鎖上にある。いくつかの実施形態では、SA1およびSA2の位置は、交換可能である。

【図7A-7D】分離したTMおよびSA鎖、すなわち、Fcのノブ鎖上にSAおよびFcのホール鎖上にTMを有する、ヘテロダイマー2鎖複合体の例を示す。

【図8A-8F】分離したTMおよびSA鎖、すなわち、Fcのノブ鎖上にSAおよびFcのホール鎖上に両TMを有し、2個のターゲティング部分(本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合がある) を有する、ヘテロダイマー2鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、TM1およびTM

2 の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 は同一であり得る。

【図 9 A - 9 J】分離した T M および S A 鎖、すなわち、F c のノブ鎖上に S A および F c のホール鎖上に T M を有し、2 種のシグナル伝達物質（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合がある）を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。これらの配向／構造では、1 種の S A はノブ鎖上にあり、1 種の S A はホール鎖上にある。いくつかの実施形態では、S A 1 および S A 2 の位置は、交換可能である。

【図 10 A - 10 F】同じ鎖上に T M および S A、すなわち、F c のノブ鎖上に S A および T M の両方を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。

【図 11 A - 11 L】同じ鎖上に T M および S A 鎖、すなわち、F c のノブ鎖上に S A および T M の両方を有し、2 個のターゲティング部分（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合がある）を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 は同一であり得る。

【図 12 A - 12 L】同じ鎖上に T M および S A 鎖、すなわち、F c のノブ鎖上に S A および T M の両方を有し、2 種のシグナル伝達物質（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合がある）を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、S A 1 および S A 2 の位置は、交換可能である。

【図 13 A - 13 F】同じ鎖上に T M および S A、すなわち、F c のホール鎖上に S A および T M の両方を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。

【図 14 A - 14 L】同じ鎖上に T M および S A 鎖、すなわち、F c のホール鎖上に S A および T M の両方を有し、2 個のターゲティング部分（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する）を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 の位置は、交換可能である。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 は同一であり得る。

【図 15 A - 15 L】同じ鎖上に T M および S A 鎖、すなわち、F c のホール鎖上に S A および T M の両方を有し、2 種のシグナル伝達物質（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合がある）を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、S A 1 および S A 2 の位置は、交換可能である。

【図 16 A - 16 J】2 個のターゲティング部分（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合もある）ならびにノブ F c 上に S A および各鎖上に T M を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 は同一であり得る。

【図 17 A - 17 J】2 個のターゲティング部分（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合もある）ならびにホール F c 上に S A および各鎖上に T M を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。いくつかの実施形態では、T M 1 および T M 2 は同一であり得る。

【図 18 A - 18 F】2 種のシグナル伝達物質（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合もある）を有し、分離した S A および T M 鎖：ノブ F c 上に S A およびホール F c 上に T M を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。

【図 19 A - 19 F】2 種のシグナル伝達物質（本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのシグナル伝達物質が存在する場合もある）を有し、分離した S A および T M 鎖：ノブ F c 上に T M およびホール F c 上に S A を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。

【図 20 A - 20 E】実施例 1 に記載のようにして構築されたホモダイマーまたはヘテロダイマー F c ベースキメラタンパク質複合体の 5 つの変種を示す。これらの構築物の例で

10

20

30

40

50

は、抗ヒトC型レクチンドメイン含有9A (C l e c 9 A) VHHはターゲティング部分であり、R 1 4 9 A変異を有するヒトインターフェロンアルファ2はシグナル伝達物質であった。

【図21】図20A～図20Eの精製タンパク質を分離するSDS-PAGEゲルを示す。

【図22】凍結-解凍安定性実験を示す。

【図23】ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体の生物活性を示す。

【図24】マウスでの静脈内投与後のFc-AcTaféron (Fc-AFN) の血漿中濃度を示す。時点毎の3つの個別試料の平均値 (+SEM) がプロットされている。

【図25】緩衝液または2種の異なるFc-AFN構築物で治療後のヒト化マウスにおける腫瘍増殖曲線を示す。時点毎の6匹の動物の平均値 (+SEM) (mm³単位) がプロットされている。

【図26】HL116-hC l e c 9 A細胞に対するリンカー長バリエーションの生物活性を示す。HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したリンカー長バリエーションで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図27】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞に対するエフェクターバリエーションの生物活性を示す。親HL116または由来HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図28】バイオレイヤー干渉法 (BLI) での、(補体成分1q) C1qの、ヒトIgG1重鎖およびヒンジ領域 (hIgG1) のFcドメイン (CH2およびCH3ドメイン) または異なるエフェクター変異を有するFc-AcTaféron (AFN) への結合を示す。

【図29】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞における生物活性に与えるインターフェロン (IFN) 変異の効果を示す。親HL116または由来HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図30】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞に対する異なるFcフォーマットの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図31】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞に対する異なるノブインホール (KiH) を有するFc-AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図32】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞に対する一価および二価Fc-AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図33】一価および二価標的化Fc-AFNのHL116-hC l e c 9 A細胞への相対的結合を示す。

【図34】HL116およびHL116-hC l e c 9 A細胞に対するFc-AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hC l e c 9 A細胞を、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。2回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図35】マウスでの静脈内投与後のFc-AFNの血漿中濃度を示す。時点毎の3つの個別試料の平均値 (+SEM) がプロットされている。

【図36】緩衝液または4種の異なるFc-AFN構築物で治療後のヒト化マウスにおける腫瘍増殖曲線を示す。時点毎の5匹の動物の平均値 (+SEM) (mm³単位) がプロ

10

20

30

40

50

ットされている。

【図 37】緩衝液または漸増用量の単一 Fc-AFN 構築物で治療後のヒト化マウスにおける腫瘍増殖曲線を示す。時点毎の 5 匹の動物の平均値 (+SEM) (mm³ 単位) がプロットされている。

【図 38】PD-L1 VHH AFN バリエントの略図および生物活性を示す。親 HL116 を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図 39】PBS、PD-L1 抑制剤 (アテゾリズマブ) または PD-L1 標的化 Fc-AFN で治療後のヒト化マウスにおける腫瘍増殖曲線を示す。時点毎の 6 匹の動物の平均値 (+SEM) (mm³ 単位) がプロットされている。

10

【図 40】HL116 および HL116-hCleC4C 細胞に対する IFNa2 および CleC4C VHH Fc-AFN の生物活性を示す。親 HL116 または派生 HL116-hCleC4C 細胞を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図 41】HL116 および HL116-hCD20 細胞に対する IFNa2 および CD20 VHH Fc-AFN の生物活性を示す。親 HL116 または派生 HL116-hCD20 細胞を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図 42】HL116 細胞に対する CD13 VHH Fc-AFN の生物活性を示す。親 HL116 を、過剰 CD13 VHH の存在下または非存在下で段階希釈した CD13 Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

20

【図 43】HL116 および HL116-hFAP 細胞に対する IFNa2 および FAP VHH Fc-AFN の生物活性を示す。親 HL116 または派生 HL116-hFAP 細胞を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図 44】HL116 および HL116-hCD8 細胞に対する IFNa2 および CD8 VHH Fc-AFN の生物活性を示す。親 HL116 または派生 HL116-hCD8 細胞を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

30

【図 45】二重特異性 CleC9A および Fc-AFN を標的とする PD-L1 の、遊離 PD-L1 VHH 2LIG99 との競合を含む、親 PD-L1 陽性 HL116 細胞 (上段) および HL116-hCleC9A (両標的を発現している; 下段) への相対的結合を示す。

【図 46A-46D】2 個のターゲティング部分 (本明細書に記載のように、いくつかの実施形態では、より多くのターゲティング部分が存在する場合もある) ならびにノブ Fc 上に SA および各鎖上に TM を有する、ヘテロダイマー 2 鎖複合体の例を示す。各ターゲティング部分は、2 コピーで存在し、TM1 および TM2 の位置は、交換可能である。

【図 47】二重特異的 CleC9A-PD-L1 Fc-AFN バリエントの略図および生物活性を示す。親 HL116 (左) および HL116-hCleC9A (右) を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

40

【図 48】PBS、単一特異的または二重特異的 Fc-AFN で治療後のヒト化マウスにおける腫瘍増殖曲線を示す。時点毎の 4~5 匹の動物の平均値 (+SEM) (mm² 単位) がプロットされている。

【図 49】二重特異的 CleC4C-CD8 Fc-AFN バリエントの略図および生物活性を示す。親 HL116、HL116-hCleC4C および HL116-hCD8 を、段階希釈した Fc-AFN で 6 時間刺激した。3 回の繰り返し測定 of 平均ルシフェラーゼ値 (±STDEV) がプロットされている。

【図 50】HL116 および HL116-hXcr1 細胞に対する IFNa2 および sc

50

Fv XCR1 Fc AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hXcr1細胞を、段階希釈したFc AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。

【図51】HL116およびHL116-hCD20細胞に対するIFNa2およびscFv CD20 Fc AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hCD20細胞を、段階希釈したFc AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。

【図52】HEK-DualおよびHEK-Dual-hCD20細胞に対する腫瘍壊死因子(TNFα)およびCD20 Fc Actafactor (AFR)の生物活性を示す。親HEK-Dualまたは派生HEK-Dual-hCD20細胞を、段階希釈したFc AFRで一晩刺激した。3回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。

10

【図53】一過性遺伝子導入HeK293T細胞中のFMS様チロシンキナーゼ3リガンド(FLT3L)-Fc-AFN上のpSTAT1を示す。FLT3またはMOCK(空のベクター)遺伝子導入HeK293T細胞を、示したように刺激し、pSTAT1について染色した。2回の繰り返し測定のpSTAT1陽性細胞の平均%(±STDEV)がプロットされている。

【図54】HL116細胞に対するIFNa2およびプログラム細胞死タンパク質1の細胞外(ec)部分(PD-1)(PD-1ec)Fc AFNの生物活性を示す。親HL116を、過剰中和VHHの存在下または非存在下で、段階希釈したFc AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。

20

【図55】HL116およびHL116-hPD-1細胞に対するIFNa2およびPD-1ec Fc AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hPD-1細胞を、段階希釈したFc AFNで6時間刺激した。3回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。

【図56】CD13を標的とするNGRペプチドベースFc AFNの生物活性を示す。親HL116を、段階希釈したFc AFNで6時間刺激した。2回の繰り返し測定の平均ルシフェラーゼ値(±STDEV)がプロットされている。特異性は、Clec9A標的化Fc AFN(R1CHCL50)との比較により示される。

30

【図57】C型レクチンドメインファミリー4メンバーC(Clec4C)陽性および陰性細胞に対する標的化野生型および変異IFNa2の生物活性を示す。健康なドナー由来の末梢血単核球(PBMC)をClec4C Abで染色し、Clec4C標的化野生型または変異型IFNa2で15分間刺激した。固定および透過処理後、細胞をpSTAT1 Abで染色した。データは、pSTAT1陽性細胞のパーセンテージとしてプロットされる。

【図58】CD8陽性および陰性細胞に対する標的化野生型および変異IFNa2の生物活性を示す。健康なドナー由来の末梢血単核球(PBMC)をCD8 Abで染色し、CD8標的化野生型または変異IFNa2で15分間刺激した。固定および透過処理後、細胞をpSTAT1 Abで染色した。データは、pSTAT1陽性細胞のパーセンテージとしてプロットされる。

40

【図59】CD19陽性(すなわち、B細胞)および陰性細胞に対する標的化野生型および変異IFNa2の生物活性を示す。健康なドナー由来のPBMCをCD19 Abで染色し、CD20標的化野生型または変異IFNa2で15分間刺激した。固定および透過処理後、細胞をpSTAT1 Abで染色した。データは、pSTAT1陽性細胞のパーセンテージとしてプロットされる。

【図60】IFNa2中の点変異の概要を示す。この図は、アミノ酸No. 30~39および142~165由来の成熟ヒトIFNa2(配列番号2)の配列を示す。

【図61】HL116およびHL116-hClec9A細胞に対する種々のClec9A VHH Fc AFNの生物活性を示す。親HL116または派生HL116-hC

50

l e c 9 A細胞を、示した濃度のF c A F Nで6時間刺激した。3回の繰り返し測定
の平均ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。各変異体に対し、バーは
、左から右へ、1 0 0 0 n g / m l、1 0 n g / m l、0 . 1 n g / m l、および刺激な
し、である。

【図62】H L 1 1 6およびH L 1 1 6 - h C l e c 9 A細胞に対するI F N a 1および
C l e c 9 A V H H F c A F Nの生物活性を示す。親H L 1 1 6または派生H L 1
1 6 - h C l e c 9 A細胞を、段階希釈したF c A F Nで6時間刺激した。3回の繰
返し測定、の平均ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図63】H L 1 1 6およびH L 1 1 6 - h C l e c 9 A細胞に対するI F N bおよびC
l e c 9 A V H H F c A F Nの生物活性を示す。親H L 1 1 6または派生H L 1 1
6 - h C l e c 9 A細胞を、段階希釈したF c A F Nで6時間刺激した。3回の繰
返し測定、の平均ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図64】一過性遺伝子導入H E K - B l u e IL-1β細胞に対するA c T a l e u k i
n（A L N）の生物活性を示す。M O C K（空のベクター）またはヒトC D 8 遺伝子導入
細胞を、段階希釈野生型IL-1βまたはA L Nで一晩刺激した。3回の繰り返し測定、の平均
ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図65】H E K - D u a lおよびH E K - D u a l - h C D 2 0細胞に対するT N F α
およびC D 2 0 V H H F c A F Rの生物活性を示す。親H E K - D u a lまたは派
生H E K - D u a l - h C D 2 0細胞を、段階希釈したF c A F Rで一晩刺激した。3
回の繰り返し測定、の平均ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図66】H L 1 1 6およびH L 1 1 6 - h C D 8細胞に対するI F N a 2およびb i -
A c T a k i n eの生物活性を示す。親H L 1 1 6または由来H L 1 1 6 - h C D 8細胞
を、段階希釈したb i - A c T a k i n eで6時間刺激した。3回の繰り返し測定、の平均
ルシフェラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図67】一過性遺伝子導入H E K - B l u e IL-1β細胞に対するb i - A c T a k i
n eの生物活性を示す。M O C KまたはヒトC D 8 遺伝子導入細胞を、段階希釈野生型IL
-1βまたはb i - A c T a k i n eで一晩刺激した。3回の繰り返し測定、の平均ルシフェ
ラーゼ値（± S T D E V）がプロットされている。

【図68】ヒトI g G 1およびI g G 4をベースにしたC l e c 9 A F c A F Nバリ
アントの生物活性を示す。親H L 1 1 6およびH L 1 1 6 - h C l e c 9 Aを、段階希釈
したF c A F Nで6時間刺激した。3回の繰り返し測定、の平均ルシフェラーゼ値（± S
T D E V）がプロットされている。

【図69】マウスでの静脈内投与後のC l e c 9 A A F N（これは、F c ベースキメラ
タンパク質複合体である）の血漿中濃度を示す。時点毎の3つの個別試料の平均値（+ S
E M）がプロットされている。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本技術は、一部は、1個または複数のその受容体に対し低減された親和性または活性を
有するように任意選択で改変されたシグナル伝達物質、および特異的標的を認識し結合す
るターゲティング部分の発見に基づいている。いくつかの実施形態では、1種または複数
のシグナル伝達物質および1個または複数のターゲティング部分は、対を形成してF c ベ
ースキメラタンパク質複合体を形成できるF c ベースキメラタンパク質に連結および／ま
たは結合および／または融合される。このようなF c ベースキメラタンパク質複合体は、
意外にも、特に本明細書に記載のヘテロダイマー構造で、F c を欠くキメラに比べて、劇
的に改善されたインビボ半減期を有し、高められた溶解度、安定性およびその他の薬物様
特性のため、製造、精製、および医薬製剤に特に適合する。従って、本発明のF c ベース
キメラタンパク質複合体設計手法は、治療薬としての使用に特に好適な薬剤をもたらす。

【0018】

いくつかの実施形態では、これらのF c ベースキメラタンパク質複合体は、免疫細胞を
結合しかつ直接的にまたは間接的に治療処置の必要な部位（例えば、腫瘍または腫瘍微小

10

20

30

40

50

環境)に動員し得る。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、効果的な抗腫瘍免疫応答を誘発するための腫瘍抗原提示を強化する。いくつかの実施形態では、これらのFcベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍細胞、腫瘍微小環境関連細胞または間質標的を結合し得る。いくつかの実施形態では、これらのFcベースキメラタンパク質複合体は、罹患または疾患関連器官、組織および細胞に関連する組織特異的および／または細胞特異的マーカー(例えば、抗原、標的)に結合し得る。いくつかの実施形態では、これらのFcベースキメラタンパク質複合体は、同じまたは異なる細胞上に存在する2種以上の標的／タンパク質マーカー／抗原に結合し得る。いくつかの実施形態では、これらのFcベースキメラタンパク質複合体は、2つ以上の細胞型に結合し得る。いくつかの実施形態では、これらのFcベースキメラタンパク質複合体は、2つ以上の細胞型に結合し、細胞複合体(例えば、免疫細胞および腫瘍細胞)の形成を促進し得る。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、抗原提示を調節する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、免疫応答を調節して自己免疫を回避するか低減させる。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、免疫抑制をもたらす。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、患者のTregの、CD8+ T細胞および／またはCD4+ T細胞に対する比率を増大させる。いくつかの実施形態では、本方法は、患者の自己反応性T細胞の低減に関する。

【0020】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、ジスルフィド結合および／またはイオン対形成により形成されるタンパク質の複合体である。いくつかの実施形態では、タンパク質の複合体は、1種または複数の融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図1A～F、2A～H、3A～H、4A～D、5A～F、6A～J、7A～D、8A～F、9A～J、10A～F、11A～L、12A～L、13A～F、14A～L、15A～L、16A～J、17A～J、18A～F、19A～F、20A～E、38、46A～D、47、および49のいずれか1つに示すような構造および／または配向／構造を有する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図7Bに示すような構造および／または配向／構造を有する。

20

30

【0021】

本技術は、Fcベースキメラタンパク質複合体を含む医薬組成物ならびに、例えば、癌、自己免疫疾患、神経変性疾患、代謝疾患、心臓血管疾患および変性疾患を含む、種々の疾患の治療におけるそれらの使用を提供する。

【0022】

Fcドメイン

結晶性断片ドメイン(Fcドメイン)は、免疫系、例えば、Bリンパ球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、およびマスト細胞に関与する細胞の細胞表面上に位置するFc受容体と相互作用する抗体のテール領域である。IgG、IgAおよびIgD抗体アイソタイプでは、Fcドメインは、抗体の2個の重鎖の第2および第3の定常ドメイン由来の、2個の同一のタンパク質鎖で構成される。IgMおよびIgE抗体アイソタイプでは、Fcドメインは、各ポリペプチド鎖中に3個の重鎖定常ドメイン(C_Hドメイン2～4)を含む。

40

【0023】

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、このようなタンパク質複合体の形成を促進するFcドメインを有するキメラタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、IgG、IgA、IgD、IgM、またはIgEから選択される。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から選択される。

【0024】

50

いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG、IgA、IgD、IgM、またはIgEから選択される。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のFcドメインは、IgGのCH2およびCH3領域を含む。一部の実施形態では、IgGはヒトIgGである。いくつかの実施形態では、ヒトIgGは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4から選択される。

【0026】

いくつかの実施形態では、Fcドメインは1個または複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する。いくつかの実施形態では、変異Fcドメインは、標的受容体に対する低減された親和性または結合を有する。例えば、いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、FcγRへのFcドメインの結合を低減または除去する。いくつかの実施形態では、FcγRは、FcγRI；FcγRIIa、131R/R；FcγRIIa、131H/H、FcγRIIb；およびFcγRIIIから選択される、いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、例えば、C1qなどの相補体タンパク質への結合を低減または除去する。いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、FcγRおよび例えば、C1qなどの相補体タンパク質の両方への結合を低減または除去する。

【0027】

いくつかの実施形態では、FcドメインはLALA変異を含み、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する。例えば、いくつかの実施形態では、LALA変異は、ヒトIgG（例えば、IgG1）中にL234AおよびL235A置換を含む（ナンバリングは、EU規則（PNAS, Edelmann et al., 1969; 63(1) 78-85)）に準拠して、ヒトIgG1に対しよく使われるCH2残基のナンバリングを基準にする）。

【0028】

いくつかの実施形態では、ヒトIgGのFcドメインは、L234、L235、K322、D265、P329、およびP331の1個または複数の位置で変異を含み、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する。例えば、いくつかの実施形態では、変異は、L234A、L234F、L235A、L235E、L235Q、K322A、K322Q、D265A、P329G、P329A、P331G、およびP331Sから選択される。

【0029】

いくつかの実施形態では、FcドメインはFALA変異を含み、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する。例えば、いくつかの実施形態では、FALA変異は、ヒトIgG4中にF234AおよびL235A置換を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG4のFcドメインは、F234、L235、K322、D265、およびP329の1個または複数の位置で変異を含み、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する。例えば、いくつかの実施形態では、変異は、F234A、L235A、L235E、L235Q、K322A、K322Q、D265A、P329G、およびP329Aから選択される。

【0031】

いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、Fcドメイン中のヒンジ領域を安定化する。例えば、いくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgGのS228の位置に変異を含み、ヒンジ領域を安定化する。いくつかの実施形態では、変異はS228Pである。

【0032】

いくつかの実施形態では、Fcドメインに対する変異は、Fcドメイン中の鎖対形成を

10

20

30

40

50

促進する。いくつかの実施形態では、鎖対形成は、イオン対形成（a / k / a 荷電対、イオン結合、または荷電残基対）により促進される。

【0033】

いくつかの実施形態では、Fcドメインは、イオン対形成を促進するために、次のもう1個のIgGのアミノ酸残基の位置に変異を含む：D356、E357、L368、K370、K392、D399、およびK409。

【0034】

例えば、いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fcドメインは、イオン対形成を促進するために、表1中の変異の組み合わせの1個を含む。

【表1】

10

表1	
片方のFc鎖上の置換	もう一方のFc鎖上の置換
D356K D399K	K392D K409D
E357R L368R	K370D K409D
E357R L368K	K370D K409D
E357R D399K	K370D K409D
E357R	K370D
L368R D399K	K392D K409D
L368K D399K	K392D K409D
L368R D399K	K409D
L368K D399K	K409D
L368R	K409D
L368K	K409D
K370D K409D	E357R D399K
K370D K409D	E357R L368R
K370D K409D	E357R L368K
K370D K409D	E357R D399K
K370D K409D	E357R L368R
K370D K409D	E357R L368K
K370D	E357R
K370D	E357R
K392D K409D	D356K D399K
K392D K409D	L368R D399K
K392D K409D	L368K D399K
K392D K409D	D399K
D399K	K392D K409D
D399K	K409D
K409D	L368R
K409D	L368K
K409D	L368R D399K
K409D	L368K D399K
K409D	L368R
K409D	L368K
K409D	L368R D399K
K409D	L368K D399K
K409D	D399K

20

30

40

【0035】

50

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質複合体中の個別のFcドメインの鎖対形成は、ノブインホール変異により促進される。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、1個または複数の変異を含み、Fcドメイン中のノブインホール相互作用を可能にする。いくつかの実施形態では、第1のFc鎖は、「ノブ」を発現するように改変され、第2のFc鎖は、相補的「ホール」を発現するように改変される。例えば、いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fcドメインは、表2の変異を含み、ノブインホール相互作用を可能にする。

【表2】

表2	
片方のFc鎖上の置換	もう一方のFc鎖上の置換
T366Y	Y407T
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W	Y407A
T366W	Y407V
T366Y	Y407A
T366Y	Y407V
T366Y	Y407T

10

【0036】

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体中のFcドメインは、上記で開示の変異の任意の組み合わせを含む。例えば、いくつかの実施形態では、Fcドメインは、イオン対形成および／またはノブインホール相互作用を促進する変異を含む。例えば、いくつかの実施形態では、Fcドメインは、次の特性の1つまたは複数を含む変異を含む：イオン対形成を促進する、ノブインホール相互作用を誘導する、Fcドメインのエフェクター機能を低減または除去する、およびFc安定化（例えば、ヒンジで）をもたらす。

20

【0037】

例えば、いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fcドメインは、表3に開示の変異を含み、それらはFcドメイン中のイオン対形成を促進し、および／またはノブインホール相互作用を促進する。

30

【表 3】

表3	
片方のFc鎖上の置換	もう一方のFc鎖上の置換
T366W K370D	E357R Y407A
T366W K370D	E357R Y407V
T366W K409D	L368R Y407A
T366W K409D	L368R Y407V
T366W K409D	L368K Y407A
T366W K409D	L368K Y407V
T366W K409D	L368R D399K Y407A
T366W K409D	L368R D399K Y407V
T366W K409D	L368K D399K Y407A
T366W K409D	L368K D399K Y407V
T366W K409D	D399K Y407A
T366W K409D	D399K Y407V
T366W K392D K409D	D399K Y407A
T366W K392D K409D	D399K Y407V
T366W K392D K409D	D356K D399K Y407A
T366W K392D K409D	D356K D399K Y407V
T366W K370D K409D	E357R D399K Y407A
T366W K370D K409D	E357R D399K Y407V
T366W K370D K409D	E357R L368R Y407A
T366W K370D K409D	E357R L368R Y407V
T366W K370D K409D	E357R L368K Y407A
T366W K370D K409D	E357R L368K Y407V
T366W K392D K409D	L368R D399K Y407A
T366W K392D K409D	L368R D399K Y407V
T366W K392D K409D	L368K D399K Y407A
T366W K392D K409D	L368K D399K Y407V
E357R T366W	K370D Y407A
E357R T366W	K370D Y407V
T366W L368R	Y407A K409D
T366W L368R	Y407V K409D
T366W L368K	Y407A K409D
T366W L368K	Y407V K409D
T366W L368R D399K	Y407A K409D
T366W L368R D399K	Y407V K409D
T366W L368K D399K	Y407A K409D
T366W L368K D399K	Y407V K409D
T366W D399K	Y407A K409D
T366W D399K	Y407V K409D
1366W D399K	K392D Y407A K409D
T366W D399K	K392D Y407V K409D
T366W D356K D399K	K392D Y407A K409D
T366W D356K D399K	K392D Y407V K409D
E357R T366W D399K	K370D Y407A K409D
E357R T366W D399K	K370D Y407V K409D

10

20

30

40

表3	
片方のFc鎖上の置換	もう一方のFc鎖上の置換
E357R T366W L368R	K370D Y407A K409D
E357R T366W L368R	K370D Y407V K409D
E357R T366W L368K	K370D Y407A K409D
E357R T366W L368K	K370D Y407V K409D
T366W L368R D399K	K392D Y407A K409D
T366W L368R D399K	K392D Y407V K409D
T366W L368K D399K	K392D Y407A K409D

【0038】

例えば、いくつかの実施形態では、ヒト IgG Fcドメインは、表4に開示の変異を含み、それらはFcドメインのイオン対形成を促進し、および／またはノブインホール相互作用を促進し、またはこれらの組み合わせを促進する。いくつかの実施形態では、表4の「鎖1」および「鎖2」は、入れ替え可能である（例えば、鎖1はY407Tを有することができ、鎖2はT366Yを有することができる）。

【表 4】

表4			
鎖1変異	鎖2変異	文献	IgG
T366Y	Y407T	Ridgway <i>et al.</i> , 1996 Protein Engineering, Design and Selection, Volume 9, Issue 7, 1 July 1996, Pages 617-62	IgG1
T366Y/F405A	T394W/Y407T	Ridgway <i>et al.</i> , 1996 Protein Engineering, Design and Selection, Volume 9, Issue 7, 1 July 1996, Pages 617-62	IgG1
T366W	Y407A	Atwell <i>et al.</i> , 1997 JMB Volume 270, Issue 1, 4 July 1997, Pages 26-35	IgG1
T366W	T366S/L368V/Y407A	Atwell <i>et al.</i> , 1997 JMB Volume 270, Issue 1, 4 July 1997, Pages 26-35	IgG1
T366W	L368A/Y407A	Atwell <i>et al.</i> , 1997 JMB Volume 270, Issue 1, 4 July 1997, Pages 26-35	IgG1
T366W	T366S/L368A/Y407A	Atwell <i>et al.</i> , 1997 JMB Volume 270, Issue 1, 4 July 1997, Pages 26-35	IgG1
T366W	T366S/L368G/Y407V	Atwell <i>et al.</i> , 1997 JMB Volume 270, Issue 1, 4 July 1997, Pages 26-35	IgG1
T366W/D399C	T366S/L368A/K392C /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
T366W/K392C	T366S/L368A/D399C /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
S354C/T366W	Y349C/T366S/L368A /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
Y349C/T366W	S354C/T366S/L368A /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
E356C/T366W	Y349C/T366S/L368A /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
Y349C/T366W	E356C/T366S/L368A /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
E357C/T366W	Y349C/T366S/L368A /Y407V	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	IgG1
Y349C/T366W	E357C/T366S/L368A	Merchant <i>et al.</i> , 1998 Nature	IgG1

10

20

30

40

	/Y407V	Biotechnology volume 16, pages 677-681 (1998)	
D339R	K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339R	K409D	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K409D	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K360D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K392D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E356K	K392D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E357K	K392D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E356K	K409E/K439D	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E357K	K370D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E356K/E357K	K370D/K392D/K409E	Gunasekaran <i>et al.</i> , 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
S364H/F405A	Y349T/T394F	Moore <i>et al.</i> , 2011 mAbs, 3:6, 546-557	IgG1
S364H/T394F	Y349T/F405A	Moore <i>et al.</i> , 2011 mAbs, 3:6, 546-557	IgG1
D221R/P228R/K409R	D221E/P228E/L368E	Strop <i>et al.</i> , 2012 JMB Volume 420, Issue 3, 13 July 2012, Pages 204-219	IgG1
C223R/E225R/P228R/K409R	C223E/P228E/L368E	Strop <i>et al.</i> , 2012 JMB Volume 420, Issue 3, 13 July 2012, Pages 204-219	IgG2
F405L	K409R	Labriijn <i>et al.</i> , 2013 PNAS March 26, 2013. 110 (13) 5145-5150	IgG1
F405A/Y407V	T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013	IgG1

10

20

30

40

		mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	
F405A/Y407V	T366I/T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
F405A/Y407V	T366L/T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
F405A/Y407V	T366L/K392M/T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
L351Y/F405A/Y 407V	T366L/K392M/T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
T350V/L351Y/F 405A/Y407V	T350V/T366L/K392M /T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
T350V/L351Y/F 405A/Y407V	T350V/T366L/K392L /T394W	Von Kreudenstein <i>et al.</i> , 2013 mAbs Volume 5, 2013 - Issue 5, pp. 644-654	IgG1
K409W	D339V/F405T	Choi <i>et al.</i> , 2013 PNAS January 2, 2013. 110 (1) 270-275	IgG1
K360E	Q347R	Choi <i>et al.</i> , 2013 PNAS January 2, 2013. 110 (1) 270-275	IgG1
K360E/K409W	D339V/Q347R/F405T	Choi <i>et al.</i> , 2013 PNAS January 2, 2013. 110 (1) 270-275	IgG1
Y349C/K360E/K 409W	D339V/Q347R/S354C /F405T	Choi <i>et al.</i> , 2013 PNAS January 2, 2013. 110 (1) 270-275	IgG1
K392A/K409D	E356K/D399K	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 April-2016, Pages 641-651	IgG1
T366W	T366S/L358A/Y407A	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 April-2016, Pages 641-651	IgG1
D339M/Y407A	T336V/K409V	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 April-2016, Pages 641-651	IgG1
D339M/K360D/Y 407A	T336V/E345R/Q347R /K409V	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 April-2016, Pages 641-651	IgG1
Y349S/T366V/K	E357D/S364Q/Y407A	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016	IgG1

10

20

30

40

370Y/K409V		Structure Volume 24, Issue 4, 5 AprIL-2016, Pages 641-651	
Y349S/T366M/K 370Y/K409V	E356G/E357D/S364Q /Y407A	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 AprIL-2016, Pages 641-651	IgG1
Y349S/T366M/K 370Y/K409V	E357D/S364R/Y407A	Leaver-Fey <i>et al.</i> , 2016 Structure Volume 24, Issue 4, 5 AprIL-2016, Pages 641-651	IgG1
および米国特許出願公開第US20150284475A1号の表1-3に記載の任意の組み合わせ			

【0039】

例えば、いくつかの実施形態では、ヒト I g G F c ドメインは、表 5 に開示の変異を含み、それらは F c ドメイン中の F c γ R および／または補体結合を低減または除去する。いくつかの実施形態では、表 5 の変異は両鎖中に存在する。

【表 5】

表5		
鎖1変異	文献	IgG
L234A/L235A	Alegre <i>et al.</i> , 1994 Transplantation 57:1537-1543	IgG1
F234A/L235A	Alegre <i>et al.</i> , 1994 Transplantation 57:1537-1543	IgG4
L235E	Morgan <i>et al.</i> , 1995 Immunology. 1995 Oct; 86(2): 319-324.	IgG1
L235E	Morgan <i>et al.</i> , 1995 Immunology. 1995 Oct; 86(2): 319-324.	IgG4
L235A	Morgan <i>et al.</i> , 1995 Immunology. 1995 Oct; 86(2): 319-324.	IgG1
G237A	Morgan <i>et al.</i> , 1995 Immunology. 1995 Oct; 86(2): 319-324.	IgG1
N297H	Tao and Morrison, J. Immunol. 1989; 143:2595-2601	IgG1
N297Q	Tao and Morrison, J. Immunol. 1989; 143:2595-2601	IgG1
N297K	Tao and Morrison, J. Immunol. 1989; 143:2595-2601	IgG3
N297Q	Tao and Morrison, J. Immunol. 1989; 143:2595-2601	IgG3
D265A	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1
D270A, V, K	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1
K322A, L, M, D, E	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1
P329A, X	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1
P331A, S, G, X	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1

10

20

30

40

D265A	Idusogie <i>et al.</i> , 2000 J Immunol April-15, 2000, 164 (8) 4178-4184	IgG1
L234A	Hezareh <i>et al.</i> , 2001 J. Virol. December 2001 vol. 75 no. 24 12161-12168	IgG1
L234A/L235A	Hezareh <i>et al.</i> , 2001 J. Virol. December 2001 vol. 75 no. 24 12161-12168	IgG1
L234F/L235E/P331S	Oganesyan <i>et al.</i> , 2008 Acta Cryst. (2008). D64, 700-704	IgG1
H268Q/V309L/A330S/P331S	An <i>et al.</i> , 2009 mAbs Volume 1, 2009 - Issue 6, pp. 572-579	IgG1
G236R/L328R	Moore <i>et al.</i> , 2011 mAbs Volume 3, 2011 - Issue 6, pp. 546-557	IgG1
N297G	Couch <i>et al.</i> , 2013 Sci. Transl. Med., 5 (2013) 183ra57, 1-12	IgG1
N297G/D265A	Couch <i>et al.</i> , 2013 Sci. Transl. Med., 5 (2013) 183ra57, 1-12	IgG1
V234A/G237A/P328S/H268A/V309L/A330S/P331S	Vafa <i>et al.</i> , 2014 Methods Volume 65, Issue 1, 1 January 2014, Pages 114-126	IgG2
L234A/L235A/P329G	Lo <i>et al.</i> , 2016 The Journal of Biological Chemistry 292, 3900-3908	IgG1
N297D	Schlothauer <i>et al.</i> , 2016 Protein Engineering, Design and Selection, Volume 29, Issue 10, 1 October 2016, Pages 457-466	IgG1
S228P/L235E	Schlothauer <i>et al.</i> , 2016 Protein Engineering, Design and Selection, Volume 29, Issue 10, 1 October 2016, Pages 457-466	IgG4
S228P/L235E/P329G	Schlothauer <i>et al.</i> , 2016 Protein Engineering, Design and Selection, Volume 29, Issue 10, 1 October 2016, Pages 457-	IgG4

10

20

30

40

	466	
L234F/L235A/K322Q	Borrok <i>et al.</i> , 2017 J Pharm Sci April-2017 Volume 106, Issue 4, Pages 1008-1017	IgG1
L234F/L235Q/P331G	Borrok <i>et al.</i> , 2017 J Pharm Sci April-2017 Volume 106, Issue 4, Pages 1008-1017	IgG1
L234F/L235Q/K322Q	Borrok <i>et al.</i> , 2017 J Pharm Sci April-2017 Volume 106, Issue 4, Pages 1008-1017	IgG1
L234A/L235A/G237A/P328S/H268A/A330S/P331S	Tam <i>et al.</i> , 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG1
S228P/F234A/L235A	Tam <i>et al.</i> , 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG4
S228P/F234A/L235A/G237A/P238S	Tam <i>et al.</i> , 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG4
S228P/F234A/L235A/G236/G237A/P238S	Tam <i>et al.</i> , 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG4

10

20

30

【0040】

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体中のFcドメインは、ホモダイマーであり、すなわち、キメラタンパク質複合体中のFcドメインは、2個の同一のタンパク質鎖を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体中のFcドメインは、ヘテロダイマーであり、すなわち、キメラタンパク質複合体中のFcドメインは、2個の同一でないタンパク質鎖を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcドメインは、本明細書で記載のイオン対形成および／またはノブインホール変異を用いて改変される。いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、トランス配向／構造を有する。トランス配向／構造では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中の同じポリペプチド鎖上には認められない。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fcドメインの同じ末端（N末端またはC末端）上に存在する。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fcドメインの異なる末端（N末端またはC末端）上に存在する。

40

【0043】

いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcドメインは、本明細書で記載のイオン対

50

形成および／またはノブインホール変異を用いて改変される。いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、トランス配向を有する。

【0044】

トランス配向では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中の同じポリペプチド鎖上には認められない。トランス配向では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中の別々のポリペプチド鎖上に認められる。シス配向では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中の同じポリペプチド鎖上に認められる。

10

【0045】

2個以上のターゲティング部分が本明細書で記載のヘテロダイマータンパク質複合体中に存在するいくつかの実施形態では、1つのターゲティング部分は、トランス配向（シグナル伝達物質に対し）で存在し、一方、別のターゲティング部分はシス配向（シグナル伝達物質に対し）で存在し得る。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fcドメインの同じ末端／側（N末端またはC末端）上に存在する。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fcドメインの異なる側／末端（N末端またはC末端）上に存在する。

【0046】

本明細書で記載のヘテロダイマータンパク質複合体中に2個以上のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ヘテロダイマータンパク質複合体中の同じFc鎖上または2個の異なるFc鎖上に認められ得る（後者の場合には、ターゲティング部分は、それらが異なるFc鎖上に存在するので、相互に対しトランスになるはずである）。2個以上のターゲティング部分が同じFc鎖上に存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、Fc鎖の同じまたは異なる側／末端上に存在し得る（N末端または／C末端）。

20

【0047】

本明細書で記載のヘテロダイマータンパク質複合体中に2個以上のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ヘテロダイマータンパク質複合体中の同じFc鎖上または2個の異なるFc鎖上に認められ得る（後者の場合には、ターゲティング部分は、それらが異なるFc鎖上に存在するので、相互に対しトランスになるはずである）。2種以上のシグナル伝達物質が同じFc鎖上に存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、Fc鎖の同じまたは異なる側／末端上に存在し得る（N末端または／C末端）。

30

【0048】

2種以上のシグナル伝達物質が本明細書で記載のヘテロダイマータンパク質複合体中に存在するいくつかの実施形態では、1種のシグナル伝達物質は、トランス配向（ターゲティング部分に対し）で存在し、一方、別のシグナル伝達物質はシス配向（ターゲティング部分に対し）で存在し得る。

【0049】

いくつかの実施形態では、Fcドメインは野性型ヒトIgG1のコアヒンジ領域を含むかまたはその領域で始まり、この領域は、配列Cys-Pro-Pro-Cys（配列番号1341）を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインはまた、上部ヒンジ、またはその一部（例えば、DKTHTCPPC（配列番号1342）；国際公開第2009053368号参照）、EPKSCDKTHTCPPC（配列番号1343）、またはEPKSSDKTHTCPPC（配列番号1344；Lo et al., Protein Engineering vol. 11 no. 6 pp. 495-500, 1998）参照）を含む。

40

【0050】

シグナル伝達物質（SA）

50

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、1種または複数のシグナル伝達物質（SA）を含む。本明細書で開示のシグナル伝達物質は、野生型シグナル伝達物質または改変型シグナル伝達物質であり得る。

【0051】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて改善された標的選択性および安全性を有する野生型シグナル伝達物質を含む。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて改善された標的選択活性を有する野生型シグナル伝達物質を含む。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、条件付き活性を可能にする。

10

【0052】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特異的生物活性の1種または複数などの1種または複数の弱められた活性を有する野生型シグナル伝達物質を含む。

【0053】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、向上した安全性、例えば、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有する野生型シグナル伝達物質を含む。種々の実施形態では、向上した安全性は、本Fcベースキメラタンパク質が、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、野生型シグナル伝達物質のより低い毒性（例えば、全身性毒性および／または組織／器官関連毒性）；および／または低減されたまたは実質的に除去された副作用；および／または高められた耐容性、低減されたまたは実質的に除去された有害事象；および／または低減されたまたは実質的に除去された；および／または拡大された治療濃度域をもたらすことを意味する。

20

30

【0054】

いくつかの実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1個または複数のターゲティング部分を有する本発明の複合体中に包含することにより回復可能である。

【0055】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1個または複数のその受容体に対し、低減された、実質的に低減または除去された親和性、例えば、結合（例えば、 K_D ）および／または活性化（例えば、改変シグナル伝達物質がその受容体のアゴニストである場合、例えば、 K_A および／または EC_{50} として測定可能である）および／または阻害（例えば、改変シグナル伝達物質がその受容体のアンタゴニストである場合、例えば、 K_I および／または IC_{50} として測定可能である）を有する野生型シグナル伝達物質を含む。種々の実施形態では、シグナル伝達物質の受容体で低減された親和性は、活性の減弱化を可能にする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、野生型シグナル伝達物質に比較して、受容体に対する約1%、または約3%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約10%～20%、約20%～40%、約50%、約40%～60%、約60%～80%、約80%～100%の親和性を有する。いくつかの実施形態では、結合親和性は、Fcに融合されていないシグ

40

50

ナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、少なくとも約2倍低い、約3倍低い、約4倍低い、約5倍低い、約6倍低い、約7倍低い、約8倍低い、約9倍低い、少なくとも約10倍低い、少なくとも約15倍低い、少なくとも約20倍低い、少なくとも約25倍低い、少なくとも約30倍低い、少なくとも約35倍低い、少なくとも約40倍低い、少なくとも約45倍低い、少なくとも約50倍低い、少なくとも約100倍低い、少なくとも約150倍低い、または約10～50倍低い、約50～100倍低い、約100～150倍低い、約150～200倍低い、または200倍超低い。

【0056】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、Fcに融合されていないシグナル伝達物質、または複合体、例えば、限定されないが、ヘテロダイマー複合体ではないシグナル伝達物質に比べて、約75%、または約70%、または約60%、または約50%、または約40%、または約30%、または約25%、または約20%、または約10%、または約5%、または約3%、または約1%に低減されたシグナル伝達物質の内在性活性を有する野生型シグナル伝達物質を含む。

10

【0057】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型シグナル伝達物質に比べて、改善された標的選択性および安全性を付与する1個または複数の変異を有する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型シグナル伝達物質に比べて、改善された標的選択性を付与する1個または複数の変異を有する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、条件付き活性を可能にする1個または複数の変異を有する。

20

【0058】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、その1つまたは複数の受容体に対する低減された親和性または活性を有するように改変され、それはFcベースキメラタンパク質複合体の活性（アゴニズムまたはアンタゴニズムを含む）の減弱化を可能にし、および／またはFcベースキメラタンパク質複合体の非特異的シグナル伝達または望ましくない隔離を防止する。

【0059】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は野生型の形態ではアゴニストであり、そのアゴニスト活性を弱める1個または複数の変異を有する。

30

【0060】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は野生型の形態ではアンタゴニストであり、そのアンタゴニスト活性を弱める1個または複数の変異を有する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1個または複数の変異に起因してアンタゴニストであり、例えば、アゴニストシグナル伝達物質はアンタゴニストシグナル伝達物質に変換され、このような変換されたシグナル伝達物質は、場合により、そのアンタゴニスト活性を弱める1個または複数の変異も有する（例えば、国際公開第2015/007520号に記載のように。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。

【0061】

したがって、種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型シグナル伝達物質の改変（例えば、変異体）型である（例えば、1個または複数の変異を有する）。種々の実施形態では、改変（例えば、変異）は改変シグナル伝達物質が、非改変型または非変異型シグナル伝達物質、すなわち、野生型形態のシグナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変型または変異体形態の同じシグナル伝達物質を比較して）、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性の内の1種または複数などの1種または複数の弱められた活性を有することを可能にする。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異を含む。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異とは異なる。結果として、種々の実施形態では、変異は、シグナル伝達物質が、非変異型、すなわち、野生型シグ

40

50

ナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変（例えば、変異）型の同じシグナル伝達物質を比較して）、向上した安全性、例えば、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にする。

【0062】

本明細書に記載のように、シグナル伝達物質は、1個または複数の改変、例えば、変異により、向上した安全性を有し得る。種々の実施形態では、向上した安全性は、本Fcベースキメラタンパク質がより低い毒性（例えば、全身性毒性および／または組織／器官関連毒性）；および／または低減されたまたは実質的に除去された副作用；および／または高められた耐容性、低減されたまたは実質的に除去された有害事象；および／または低減されたまたは実質的に除去された；および／または拡大された治療濃度域をもたらすことを意味する。

10

【0063】

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

20

30

【0064】

いくつかの実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1個または複数のターゲティング部分を有する本発明の複合体中に包含することにより回復可能である。他の実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、1つまたは複数のターゲティング部分の活性により十分に回復可能ではない。

40

【0065】

種々の実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、それらのシグナル伝達物質が受容体に対する結合親和性または活性を弱めるまたは除去する変異を有するという理由で、オフターゲット効果を低減させる。種々の実施形態では、例えば、野生型シグナル伝達物質と比べて、副作用におけるこの低減が観察される。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、標的細胞に対し活性である。理由は、ターゲティング部分（単一または複数）が、実質的な活性化に必要とされる欠損した／不十分な結合（例えば、限定されないが、および／または結合力）を補償するためである。種々の実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質は、治療作用部位へ向かう途上では実質的に不活性であり、特異的に標的とされる細胞型に対してその効果を実質的に有し、これにより交差反応

50

性および／または関連し得る副作用を大きく低減する。

【0066】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、1つの受容体（すなわち、治療受容体）に対する結合または親和性を弱めるまたは低減させる1個または複数の変異および第2の受容体に対する結合または活性を実質的に低減または除去する1個または複数の変異を含み得る。このような実施形態では、これらの変異は、同じまたは異なる位置にあってよい（すなわち、同じ変異または複数の変異）。いくつかの実施形態では、1つの受容体に対し結合および／または活性を低減する変異（単一または複数）は、別の受容体に対し実質的に低減または除去する変異（単一または複数）とは異なる。いくつかの実施形態では、1つの受容体に対し結合および／または活性を低減する変異（単一または複数）は、別の受容体に対し実質的に低減または除去する変異（単一または複数）と同じである。いくつかの実施形態では、本Fcベースキメラタンパク質複合体は、治療受容体に対し結合および／または活性を弱めたがってより制御されたオンターゲット治療効果（例えば、野生型シグナル伝達物質に比較して）を可能にする変異および、別の受容体に対する結合および／または活性を実質的に低減または除去したがって副作用を低減する（例えば、野生型シグナル伝達物質に比べて）変異の両方を有する改変シグナル伝達物質を有する。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、本明細書で記載のターゲティング部分では十分に回復できない。いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、ターゲティング部分を用いて回復可能である。種々の実施形態では、第2の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、他の受容体により媒介される有害作用も防止し得る。あるいは、または加えて、その他の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、治療Fcベースキメラタンパク質複合体を治療作用部位から離して隔離するのを低減するまたは無くするので、治療効果を改善させる。例えば、いくつかの実施形態では、これは、他の受容体での損失を補償するための高用量の本発明のFcベースキメラタンパク質複合体の必要性を無くする。このような投与量を低減する能力は、さらに副作用の可能性を低くする。

20

【0068】

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

30

40

【0069】

50

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

10

【0070】

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

【0071】

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

20

【0072】

受容体結合活性は、当該技術分野において既知の方法を使用して測定され得る。例えば、親和性および／または結合活性は、スキャッチャードプロット分析および結合データのコンピューターフィッティング（例えば、Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51:660-672, 1949）またはBrechtら、Biosens Bioelectron 1993; 8:387-392により記載のように、フロースルー条件下で反射型干渉分光法により評価し得る。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0073】

本明細書に記載の野生型シグナル伝達物質のアミノ酸配列は、当該技術分野において、周知である。したがって、種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質の既知の野生型アミノ酸配列との少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、ま

40

50

たは少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性（例えば、約 60 %、または約 61 %、または約 62 %、または約 63 %、または約 64 %、または約 65 %、または約 66 %、または約 67 %、または約 68 %、または約 69 %、または約 70 %、または約 71 %、または約 72 %、または約 73 %、または約 74 %、または約 75 %、または約 76 %、または約 77 %、または約 78 %、または約 79 %、または約 80 %、または約 81 %、または約 82 %、または約 83 %、または約 84 %、または約 85 %、または約 86 %、または約 87 %、または約 88 %、または約 89 %、または約 90 %、または約 91 %、または約 92 %、または約 93 %、または約 94 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。

【0074】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質のいずれかのアミノ酸配列との少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性（例えば、約 60 %、または約 61 %、または約 62 %、または約 63 %、または約 64 %、または約 65 %、または約 66 %、または約 67 %、または約 68 %、または約 69 %、または約 70 %、または約 71 %、または約 72 %、または約 73 %、または約 74 %、または約 75 %、または約 76 %、または約 77 %、または約 78 %、または約 79 %、または約 80 %、または約 81 %、または約 82 %、または約 83 %、または約 84 %、または約 85 %、または約 86 %、または約 87 %、または約 88 %、または約 89 %、または約 90 %、または約 91 %、または約 92 %、または約 93 %、または約 94 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。

【0075】

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

【0076】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1 個または複数のアミノ酸の切断、例えば、N 末端切断および／または C 末端切断を含む。

【0077】

種々の実施形態では、本明細書の他の場所で記載のように、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。

【0078】

10

20

30

40

50

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

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型インターロイキンまたは改変インターロイキンであり、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35、IL-36またはそのフラグメント、バリエーション、類似体、またはファミリーメンバーを含む。インターロイキンは、リンパ球、単球、およびマクロファージにより合成される多機能サイトカイン群である。既知の機能は、免疫細胞（例えば、ヘルパーT細胞、B細胞、好酸球、およびリンパ球）の増殖の刺激、好中球およびTリンパ球の遊走作用、および／またはインターフェロンの阻害を含む。インターロイキン活性は、当該技術分野において既知のアッセイを使用して測定できる（Matthews et al., in *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*, Clemens et al., eds, IRL Press, Washington, D. C. 1987, pp. 221-225; and Orencole & Dinarello (1989) *Cytokine* 1, 14-20)。

【0082】

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

【0083】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型腫瘍壊死因子（TNF）または腫瘍壊死因子（TNF）の改変型またはTNFファミリーのタンパク質であり、限定されないが、TNF α 、TNF β 、LT β 、CD40L、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L、およびTRAILを含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達物質のI型サイトカ

イン受容体、I I 型サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーの受容体、TGFβ 受容体、免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリーの受容体、および／またはチロシンキナーゼスーパーファミリーの受容体に対する親和性および／または活性を低減させる 1 個または複数の変異を含む。

【0085】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、I 型サイトカイン受容体である。I 型サイトカイン受容体は当技術分野において既知であり、限定されないが、IL-2 (β サブユニット)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、GM-CSF、G-CSF、LIF、CNTF に対する受容体、およびトロンボポエチン (TPO)、プロラクチン、および成長ホルモンに対する受容体も含む。例示 I 型サイトカイン受容体としては、限定されないが、GM-CSF 受容体、G-CSF 受容体、LIF 受容体、CNTF 受容体、TPO 受容体、および I 型 IL 受容体が挙げられる。

10

【0086】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、I I 型サイトカイン受容体である。I I 型サイトカイン受容体は、異種のサブユニットからなる多量体受容体であり、主にインターフェロンに対する受容体である。この受容体ファミリーには、限定されないが、インターフェロン α、インターフェロン β およびインターフェロン γ、IL-10、IL-22、および組織因子に対する受容体が含まれる。例示 I I 型サイトカイン受容体としては、限定されないが、IFNα 受容体 (例えば、IFNAR1 および IFNAR2)、IFNβ 受容体、IFNγ 受容体 (例えば、IFNGR1 および IFNGR2)、および I I 型 IL 受容体が挙げられる。

20

【0087】

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

30

【0088】

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

40

50

TNF-R1である。別の実施形態では、TNFRファミリーメンバーは、CD120b (TNFRSF1B) またはTNF-R2である。

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

いくつかの実施形態では、インターフェロンはI型インターフェロンである。いくつかの実施形態では、I型インターフェロンは、IFN α 2、IFN α 1、IFN β 、IFN γ 、コンセンサスIFN、IFN ϵ 、IFN κ 、IFN τ 、IFN δ 、およびIFN ν から選択される。

【0093】

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

【0094】

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

IFN α 2a：

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPPQ
EEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SA AWD ETL
LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGVTE TPLMKEDS ILAVR
KYFQRITLYLKEKKYS PCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES
LRSKE (配列番号1)。

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、下記のアミノ酸配列 (これはアミノ酸位置23でIFN α 2aとは異なる) を有するIFN α 2bである：

IFN α 2b：

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPPQ
EEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SA AWD ETL
LDKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGVTE TPLMKEDS ILAVR
KYFQRITLYLKEKKYS PCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES

L R S K E（配列番号2）。

【0095】

いくつかの実施形態では、上記 I F N α 2 変異体（I F N α 2 a または I F N α 2 b）は、位置 1 4 4 ~ 1 5 4、例えば、アミノ酸位置 1 4 8、1 4 9 および／または 1 5 3 で、1 個または複数のアミノ酸の変異が導入されている。いくつかの実施形態では、I F N α 2 変異体は、L 1 5 3 A、R 1 4 9 A、および M 1 4 8 A から選択される 1 個または複数の変異を含む。このような変異体は、例えば、国際公開第 2 0 1 3 / 1 0 7 7 9 1 号および P i e h l e r ら、(2000) J. B i o l. C h e m, 2 7 5 : 4 0 4 2 5 - 3 3 に記載されている。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0096】

いくつかの実施形態では、I F N α 2 変異体は、I F N A R 1 に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 0 6 7 1 号に記載のように、I F N α 2 変異体は、F 6 4 A、N 6 5 A、T 6 9 A、L 8 0 A、Y 8 5 A、および Y 8 9 A から選択される 1 個または複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0097】

いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 0 8 / 1 2 4 0 8 6 号に記載のように、I F N α 2 変異体は、K 1 3 3 A、R 1 4 4 A、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A から選択される 1 個または複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0098】

いくつかの実施形態では、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号および国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 0 6 7 1 号に記載のように、I F N α 2 変異体は、R 1 2 0 E および R 1 2 0 E / K 1 2 1 E から選択される 1 個または複数の変異を含む。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、前記 I F N α 2 変異体は、野生型 I F N α 活性 2 をアンタゴナイズする。このような実施形態では、上記変異体 I F N α 2 は、I F N A R 1 に対する低減された親和性および／または活性を有するが、I F N R 2 に対する活性は保持される。

【0099】

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

【0100】

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

10

20

30

40

50

変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および／またはM148Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN α 2変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および／またはL153Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN α 2変異体は、変異N65A、L80A、Y85A、および／またはY89Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN α 2変異体は、変異N65A、L80A、Y85A、Y89Aおよび／またはD114Aを含む。いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、R144X₁、A145X₂、R33AおよびT106X₃から選択される1個または複数の変異を含み、X₁は、A、S、T、Y、L、およびIから選択され、X₂は、G、H、Y、K、およびDから選択され、X₃は、AおよびEから選択される。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、位置R33、R144、A145、M148、およびL153の1つで1個または複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、R33A、R144A、R144I、R144L、R144S、R144T、R144Y、A145D、A145G、A145H、A145K、A145Y、M148A、およびL153Aから選択される1個または複数の変異を含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、L15A、R22A、R23A、S25A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33A、R33K、R33Q、H34A、Q40A、D113R、L116A、R119A、R119E、R124A、R124E、K130A、E131A、K132A、K133A、M147A、R148A、S149A、L152A、N155A、(L30A、H57Y、E58NおよびQ61S)、(M147A、H57Y、E58NおよびQ61S)、(L152A、H57Y、E58NおよびQ61S)、(R143A、H57Y、E58NおよびQ61S)、(N65Y、L80A、Y85AおよびY89A)、(N65A、L80A、Y85A、Y89AおよびD113A)、(N65A、L80A、Y85A、Y89AおよびL116A)、(N65A、L80A、Y85A、Y89AおよびR119A)、(Y85A、Y89AおよびD113A)、(D113AおよびR1119A)、(L116AおよびR119A)、(L116A、R119AおよびK120A)、(R119AおよびK120A)、(R119EおよびK120E)、位置143でのRのA、D、E、G、H、I、K、L、N、Q、S、T、VまたはYとの置換、位置144でのAのD、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、VまたはYとの置換、および残基L160～E164の欠失から選択される1個または複数の変異を含む。

20

30

【0103】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、例えば、哺乳動物細胞培養で産生される場合、特定の位置でO結合型グリコシル化を許容しない変異を含む。いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、T106で変異を含む。いくつかの実施形態では、T106は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、またはYで置換される。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN α 2変異体は、IFN α 2-1bバリエーションの変異体である。IFN α 2-1bバリエーションでの変異は、国際公開第2015/168474号に開示されている。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態では、IFN α 2-1bは、次の変異の1個または複数の変異を含む：H58A、E59A、R145A、M149A、およびR150A。

【0105】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型インターフェロン α 1または改変型インターフェロン α 1である。いくつかの実施形態では、本発明は、野生型IFN α

50

1を含むキメラタンパク質を提供する。種々の実施形態では、野性型IFN α 1は、次のアミノ酸配列を含む：

C D L P E T H S L D N R R T L M L L A Q M S R I S P S S C L M D R H D F G F P Q
E E F D G N Q F Q K A P A I S V L H E L
I Q Q I F N L F T T K D S S A A W D E D L L D K F C T E L Y Q Q L N D L E A C V
M Q E E R V G E T P L M N A D S I L A V
K K Y F R R I T L Y L T E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S L S L S T N L Q E
R L R R K E (配列番号1562)。

【0106】

種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、改変型のIFN α 1、すなわち、IFN α 1変異体を含むIFN α 1バリエーションをシグナル伝達物質として含む。種々の実施形態では、IFN α 1バリエーションは、インターフェロンの変異体、機能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスバリエーション、またはフラグメントを包含する。

【0107】

いくつかの実施形態では、IFN α 1インターフェロンは、配列番号1562を基準にして、位置L15、A19、R23、S25、L30、D32、R33、H34、Q40、C86、D115、L118、K121、R126、E133、K134、K135、R145、A146、M149、R150、S153、L154、およびN157で1個または複数のアミノ酸変異を有する。変異は、任意選択で、疎水性の変異であってよく、例えば、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択され得る。いくつかの実施形態では、IFN α 1インターフェロンは、配列番号1562を基準にして、L15A、A19W、R23A、S25A、L30A、L30V、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、Q40A、C86S、C86A、D115R、L118A、K121A、K121E、R126A、R126E、E133A、K134A、K135A、R145A、R145D、R145E、R145G、R145H、R145I、R145K、R145L、R145N、R145Q、R145S、R145T、R145V、R145Y、A146D、A146E、A146G、A146H、A146I、A146K、A146L、A146M、A146N、A146Q、A146R、A146S、A146T、A146V、A146Y、M149A、R150A、S153A、L154A、およびN157Aから選択される1個または複数の変異を有するように改変される。いくつかの実施形態では、IFN α 1変異体は、配列番号1562を基準にして、L30A/H58Y/E59N/Q62S、R33A/H58Y/E59N/Q62S、M149A/H58Y/E59N/Q62S、L154A/H58Y/E59N/Q62S、R145A/H58Y/E59N/Q62S、D115A/R121A、L118A/R121A、L118A/R121A/K122A、R121A/K122A、およびR121E/K122Eから選択される1個または複数の変異を含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、IFN α 1インターフェロンは、配列番号1562を基準にして、アミノ酸位置C86で変異を有するように改変される。位置C86での変異は、例えば、C86SまたはC86Aであり得る。これらのIFN α 1のC86変異体は、還元システインによる凝集変異(reduced cysteine based aggregation mutant)と呼ばれる。

【0109】

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

活性を有する。

【0110】

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質はIFN β である。種々の実施形態では、IFN β は、官能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスバリエント、またはIFN β のフラグメントを包含する。種々の実施形態では、IFN β は、任意の種由来のIFN β を包含する。ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、改変型のマウスIFN β を含む。別の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、改変型のヒトIFN β を含む。ヒトIFN β は、166個のアミノ酸残基を含む約22kDaの分子量を有するポリペプチドである。ヒトIFN β のアミノ酸配列は次記である：

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDP
PEEIKQLQQFQKEDAAALT IYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN
ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSL
HLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRL
TGYLRN（配列番号3）。

【0111】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN β は、ヒトIFN β のグリコシル化型であるIFN β 1aである。いくつかの実施形態では、IFN β は、Met-1欠失およびCys-17のSerへの変異を有する非グリコシル化型のヒトIFN β であるIFN β 1bである。

【0112】

種々の実施形態では、改変IFN β は、IFNARのIFNAR1サブユニットに対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。一実施形態では、改変IFN β は、IFNAR1に対する低減された親和性および／または活性を有する。種々の実施形態では、改変IFN β は、ヒトIFN β であり、位置F67、R71、L88、Y92、I95、N96、K123、およびR124に1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1個または複数の変異は、F67G、F67S、R71A、L88G、L88S、Y92G、Y92S、I95A、N96G、K123G、およびR124Gから選択される置換である。ある実施形態では、改変IFN β は、F67G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、K123G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、F67GおよびR71A変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、L88GおよびY92G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、Y92G、I95A、およびN96G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、K123GおよびR124G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、F67G、L88G、およびY92G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、F67S、L88S、およびY92S変異を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、改変IFN β は、IFNARのIFNAR2サブユニットに対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。一実施形態では、改変IFN β は、IFNAR2に対する低減された親和性および／または活性を有する。種々の実施形態では、改変IFN β は、ヒトIFN β であり、位置W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152、およびY155に1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1個または複数の変異は、W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G、およびY155Gから選択される置換である。ある実施形態では、改変IFN β は、W22G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、L32A変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、L32G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、R35A変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、R35G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、V148G変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、R152A変異を含む。ある実施形態では、改変IFN β は、R152G変異を

含む。ある実施形態では、改変 I F N β は、Y 1 5 5 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N β は、W 2 2 G および R 2 7 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N β は、L 3 2 A および R 3 5 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N β は、L 1 5 1 G および R 1 5 2 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N β は、V 1 4 8 G および R 1 5 2 A 変異を含む。

【0114】

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

10

【0115】

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

【0116】

ヒト I F N β の結晶構造は既知であり、Karpusas et al., (1998) PNAS, 94 (22): 11813-11818 に記載されている。特に、ヒト I F N β の構造は、5 つの α ヘリックス (すなわち、A、B、C、D、および E) およびこれらのヘリックスを連結する 4 つのループ領域 (すなわち、AB、BC、CD、および DE ループ) を含むことが示された。種々の実施形態では、改変 I F N β は、A、B、C、D、E ヘリックス および / または AB、BC、CD、および DE ループ中に、I F N A R などの治療受容体に対するその結合親和性または活性を低減させる 1 個または複数の変異を有する。代表的変異は、国際公開第 2000/023114 号および米国特許出願公開第 20150011732 号に記載されている。これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 15、16、18、19、22、および / または 23 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 28~30、32、および 33 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 36、37、39、および 42 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 64 および 67 にアラニン置換を含み、位置 68 にセリン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 71~73 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 92、96、99、および 100 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 128、130、131、および 134 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。代表的実施形態では、改変 I F N β は、アミノ酸位置 149、153、156、および 159 にアラニン置換を含むヒト I F N β である。いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および W 2 2 で変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

30

40

【0117】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および R 2 7 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0118】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および W 2 2 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 2 7 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソ

50

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

【0119】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 3 2 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0120】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および R 3 5 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 3 2 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 3 5 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0122】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および F 6 7 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

【0123】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および R 7 1 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0124】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および F 6 7 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 7 1 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

30

【0125】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 8 8 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0126】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および Y 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0127】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および F 6 7 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、および L 8 8 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、および Y 9 2 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

40

【0128】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 8 8 での変異を含み

50

、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにY 9 2での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0129】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および I 9 5 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにY 9 2 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

【0130】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および N 9 6 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにY 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0131】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および Y 9 2 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、および I 9 5 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、および N 9 6 に変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および K 1 2 3 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

30

【0133】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および R 1 2 4 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0134】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および K 1 2 3 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 1 2 4 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

40

【0135】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 1 5 1 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0136】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および R 1 5 2 での変異を含み、変異は、グリシン（G）、アラニン（A）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、およびバリン（V）から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0137】

50

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および L 1 5 1 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 1 5 2 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0138】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および V 1 4 8 に変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、およびメチオニン (M) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0139】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および V 1 4 8 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに R 1 5 2 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0140】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N β は、配列番号 3 および Y 1 5 5 での変異を含み、変異は、グリシン (G)、アラニン (A)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、およびバリン (V) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列および位置 W 2 2 での変異を有し、変異は脂肪族疎水性残基である改変 I F N β ; および (b) 1 つまたは複数のターゲティング部分を含む F c ベースキメラタンパク質複合体に関し、上前記ターゲティング部分は、目的の抗原または受容体に特異的に結合する認識ドメインを含み、改変 I F N β およびターゲティング部分は、1 個または複数のリンカーと任意に結合されてもよい。種々の実施形態では、位置 W 2 2 の変異は、G、A、L、I、M、および V から選択される脂肪族疎水性残基である。種々の実施形態では、位置 W 2 2 の変異は G である。

【0142】

追加の代表的 I F N β 変異体は、国際出願第 P C T / E P 2 0 1 7 / 0 6 1 5 4 4 号で提供される。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0143】

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

【0144】

例えば、変異体 I F N γ は、変異、非限定的例であるが、切り詰めを含んでよい。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、例えば、約 5 ~ 約 2 0 個のアミノ酸残基、または約 1 6 個のアミノ酸残基、または約 1 5 個のアミノ酸残基、または約 1 4 個のアミノ酸残基、または約 7 個のアミノ酸残基、または約 5 個のアミノ酸残基の C 末端での切り詰めを有する。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、位置 Q 1、V 5、E 9、K 1 2、H 1 9、S 2 0、V 2 2、A 2 3、D 2 4、N 2 5、G 2 6、T 2 7、L 3 0、K 1 0 8、H 1 1 1、E 1 1 2、I 1 1 4、Q 1 1 5、A 1 1 8、E 1 1 9、および K 1 2 5 で 1 個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、V 5 E、S 2 0 E、V 2 2 A、A 2 3 G、A 2 3 F、D 2 4 G、G 2 6 Q、H 1 1 1 A、H 1 1 1

10

20

30

40

50

D、I 1 1 4 A、Q 1 1 5 A、および A 1 1 8 G から選択される置換である。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、V 2 2 A 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、A 2 3 G 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、D 2 4 G 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、H 1 1 1 A 変異または H 1 1 1 D 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、I 1 1 4 A 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、Q 1 1 5 A 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、A 1 1 8 G 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、A 2 3 G 変異および D 2 4 G 変異を含む。いくつかの実施形態では、変異体 I F N γ は、I 1 1 4 A 変異および A 1 1 8 G 変異を含む。I F N γ は、以下の配列番号 1 5 6 3 で示され、全変異は、配列番号 1 5 6 3 に対するものである。

10

【0 1 4 5】

いくつかの実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はコンセンサスインターフェロンである。コンセンサスインターフェロンは、いくつかのヒト非アレル I F N α サブタイプの配列を走査し、それぞれ対応する位置で最も高頻度に観察されるアミノ酸を割り当てることにより、生成される。コンセンサスインターフェロンは、1 6 6 個のアミノ酸の内の 2 0 個で I F N α 2 b とは異なり（8 8 % 相同性）、I F N β との比較は、3 0 % を超えるアミノ酸位置で同一性を示す。種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、次のアミノ酸配列を含む：

M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P Q
Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q
E R L R R K E （配列番号 4）。

20

【0 1 4 6】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、これは、配列番号 4 のアミノ酸配列とは、1 個のアミノ酸だけ異なり、すなわち、配列番号 5 は、配列番号 4 の最初のメチオニン残基を欠いている：

C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P Q
E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E S
L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A V
K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E
R L R R K E （配列番号 5）。

30

【0 1 4 7】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、野生型または改変型のコンセンサスインターフェロン、すなわち、コンセンサスインターフェロンバリエントをシグナル伝達物質として含む。種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、機能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスバリエント、またはコンセンサスインターフェロンのフラグメントを包含する。

【0 1 4 8】

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、米国特許第 4, 6 9 5, 6 2 3 号、同第 4, 8 9 7, 4 7 1 号、同第 5, 5 4 1, 2 9 3 号、および同第 8, 4 9 6, 9 2 1 号で開示されているコンセンサスインターフェロンバリエントから選択される。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例えば、コンセンサスインターフェロンバリエントは、米国特許第 4, 6 9 5, 6 2 3 号、同第 4, 8 9 7, 4 7 1 号、および同第 5, 5 4 1, 2 9 3 号で開示のような、I F N - C O N ₂ または I F N - C O N ₃ のアミノ酸配列を含み得る。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、次記の I F N - C O N ₂ のアミノ酸配列を含む：

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

40

50

KKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQERLRRKE（配列番号6）。

【0149】

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーション₃のミノ酸配列を含む：

CDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRISPFSCCLKDRHDFGFPEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDS SAAWDESLLEKFYTELYQQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQERLRRKE（配列番号7）。

10

【0150】

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、米国特許第8,496,921号で開示のバリエーションのいずれか1つのミノ酸配列を含む。例えば、コンセンサスバリエーションは、次のミノ酸配列を含み得る：

MCDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRISPFSCCLKDRHDFGFPEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDS SAAWDESLLEKFYTELYQQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQERLRRKE（配列番号8）。

20

【0151】

別の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、次記のミノ酸配列を含み得る：

MCDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRISPFSCCLKDRHDFGFPEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDS SAAWDESLLEKFYTELYQQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLCTNLQERLRRKE（配列番号9）。

【0152】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、ペグ化され得、すなわち、PEG部分を含む。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、配列番号9のS156Cの位置で結合されたPEG部分を含み得る。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、改変インターフェロンは、ヒトIFN α 2aのバリエーションであり、配列Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln（配列番号10）中の位置41の近傍へのAspの挿入によりGlu-Glu-Phe-Asp-Gly-Asn-Gln（配列番号11）が得られ（これはIFN α 2a配列に対する配列の再番号割当をもたらす）、次の変異Arg23Lys、Leu26Pro、Glu53Gln、Thr54Ala、Pro56Ser、Asp86Glu、Ile104Thr、Gly106Glu、Thr110Glu、Lys117Asn、Arg125Lys、およびLys136Thrを有する。コンセンサスインターフェロンについて記載する本明細書の全ての実施形態は、同様に、この遺伝子改変インターフェロンに該当する。

40

【0154】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、1個または複数のミノ酸変異を有するミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数のミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

【0155】

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

【0156】

種々の実施形態では、置換はまた、非古典的ミノ酸（例えば、セレノシステイン、ピ

50

ロールリジン、N-ホルミルメチオニンβ-アラニン、GABAおよびδ-アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、共通アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β-アラニン、フルオロアミノ酸、βメチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、Nα-メチルアミノ酸、および一般的にアミノ酸類似体)も含む。

【0157】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、1個または複数の変異を有するように改変される。いくつかの実施形態では、変異はコンセンサスインターフェロンバリエーションが、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロン(例えば、配列番号4または5のアミノ酸配列を有するコンセンサスインターフェロン)に比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性の内の1つまたは複数の1つまたは複数の弱められた活性を有することを可能にする。例えば、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロンに比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減した特定の生物活性などの1つまたは複数の弱められた活性は、IFNARなどの治療受容体に対するものであり得る。結果として、種々の実施形態では、変異は、コンセンサスインターフェロンバリエーションが、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロンに比べて、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にする。

【0158】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、IFNARなどの治療受容体に対するその結合親和性または活性を低減する変異を有するように改変される。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンにより与えられる活性は、治療受容体に対するアゴニズム(例えば、治療の部位での細胞効果の活性化)である。例えば、コンセンサスインターフェロンは、治療受容体を活性化し得る。このような実施形態では、変異は、治療受容体に対し低減された活性化作用を有するコンセンサスインターフェロンバリエーションをもたらす。

【0159】

いくつかの実施形態では、治療受容体の低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1個または複数のターゲティング部分を有する本発明の複合体中に包含することにより回復可能である。他の実施形態では、治療受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1個または複数のターゲティング部分を有する本発明の複合体中に包含することでは十分に回復可能ではない。種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、コンセンサスインターフェロンバリエーションが、治療受容体に対する結合親和性または活性を弱める変異を有するという理由で、オフターゲット効果を低減させる。種々の実施形態では、これは、例えば、野生型コンセンサスインターフェロンで観察される副作用を低減する。種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、治療作用部位へ向かう途上では実質的に不活性であり、特異的に標的とされる細胞型に対してその効果を実質的に有し、これにより望ましくない副作用を大きく低減する。

【0160】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、コンセンサスインターフェロンバリエーションが、1つまたは複数の治療受容体に対する弱められたまたは低減された親和性、例えば、結合(例えば、K_D)および/または活性化(例えば、K_Aおよび/またはEC₅₀として測定可能な)を有するようにさせる1個または複数の変異を有する。種々の実施形態では、治療受容体に対する低減された親和性は、治療受容体からの活性および/またはシグナル伝達の減弱化を可能にする。

【0161】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNARのIFNAR1サブユニットに対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。一実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNAR1に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNARのIFNAR2サブユニットに対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNAR1およびIFNAR2サブユニットの両方に対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNAR1に対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異、およびIFNAR2に対する結合またはその親和性を実質的に低減または除去する1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このようなコンセンサスインターフェロンバリエントを有するFcベースキメラタンパク質複合体は、標的選択的IFNAR1活性を提供できる（例えば、IFNAR1活性は、ターゲティング部分、例えば、SIRPαを介する標的化により回復可能である）。

【0163】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNAR2に対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異、およびIFNAR1に対する結合またはその親和性を実質的に低減または除去する1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このようなコンセンサスインターフェロンバリエントを有するFcベースキメラタンパク質複合体は、標的選択的IFNAR2活性を提供できる（例えば、IFNAR2活性は、ターゲティング部分、例えば、SIRPαを介する標的化により回復可能である）。

20

【0164】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、IFNAR1に対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異、およびIFNAR2に対するその結合または親和性を低減する1個または複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このようなコンセンサスインターフェロンバリエントを有するFcベースキメラタンパク質複合体は、標的選択的IFNAR1および／またはIFNAR2活性を提供できる（例えば、IFNAR1およびIFNAR2活性は、ターゲティング部分、例えば、SIRPαを介する標的化により回復可能である）。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号5を基準にして、位置145～155、例えば、アミノ酸位置149、150および／または154で、1個または複数のアミノ酸の変異を有するように改変される。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号5を基準にして、位置145～155、例えば、アミノ酸位置149、150および／または154で、1個または複数のアミノ酸の変異を有するように改変され、場合により、置換は疎水性であり、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択される。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロン変異体は、配列番号5を基準にして、M149A、R150A、およびL154Aから選択される1個または複数の変異を含む。

40

【0166】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号5を基準にして、アミノ酸位置121（すなわち、K121）で変異を有するように改変される。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号5を基準にして、K121E変異を含む。

【0167】

50

種々の実施形態では、野生型または改変シグナル伝達物質は、サイトカイン、増殖因子、およびホルモンの野生型または改変型から選択される。このようなサイトカイン、増殖因子、およびホルモンの例としては、限定されないが、リンホカイン、モノカイン、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの従来のポリペプチドホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）などのタンパク質ホルモン；肝臓増殖因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子 α および腫瘍壊死因子 β ；ミューラー管抑制因子；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF α などの神経成長因子；血小板増殖因子；形質転換増殖因子（TGF）例えば、TGF α およびTGF β ；インスリン様増殖因子-IおよびII；骨誘導因子；例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β およびインターフェロン γ （およびインターフェロンI、IIおよびIII型）などのインターフェロン；コロニー刺激因子（CSF）例えば、マクロファージ-CSF（M-CSF）、顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（ILs）例えば、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、およびIL-18などのインターロイキン；例えば、TNF- α またはTNF β などの腫瘍壊死因子；ならびにその他のポリペプチド因子、例えば、LIFおよびキットリガンド（KL）が挙げられる。本明細書で使用される場合、サイトカイン、増殖因子、およびホルモンは、天然源から得た、または組換えの細菌、真核生物または哺乳動物の細胞培養システムから生成されたタンパク質および天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0168】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、限定されないが、TGF- α およびTGF β （TGF β 1、TGF β 2、およびTGF β 3を含む種々のサブタイプのTGF β を含むおよびそのサブタイプ）などの形質転換増殖因子（TGF）、上皮増殖因子（EGF）、インスリン様増殖因子-IおよびIIなどのインスリン様増殖因子、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、ヘレグリン、血小板由来増殖因子（PDGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）から選択される野生型または改変型増殖因子である。

【0169】

ある実施形態では、増殖因子質は、改変型の繊維芽細胞増殖因子（FGF）である。FGFの例としては、限定されないが、FGF 1、FGF 2、FGF 3、FGF 4、FGF 5、FGF 6、FGF 7、FGF 8、FGF 9、FGF 10、FGF 11、FGF 12、FGF 13、FGF 14、マウスFGF 15、FGF 16、FGF 17、FGF 18、FGF 19、FGF 20、FGF 21、FGF 22、およびFGF 23が挙げられる。

【0170】

いくつかの実施形態では、野生型または改変シグナル伝達物質は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である。VEGFは、生理学的であるが病的でもある血管新生において重要な役割を果たし、血管透過性を調節し、VEGF受容体を発現する細胞に対して成長因子として作用できる、強力な成長因子である。さらなる機能には、特に、マクロファージ系統および内皮細胞の細胞遊走の刺激が含まれる。少なくとも3個の受容体（VEGFR 1、VEGFR 2およびVEGFR 3）に加えて、VEGF成長因子ファミリーのいくつかのメンバーが存在する。VEGFファミリーのメンバーは、2種以上のVEGFRタイプを結合し活性化できる。例えば、VEGF-Aは、VEGFR 1およびVEGFR 2を結合し、一方、VEGF-Cは、VEGFR 2およびVEGFR 3を結合できる。VEGFR 1およびVEGFR 2活性化は、血管新生を調節し、VEGFR 3活性化は、リンパ管新生に関与する。大部分の血管新生促進シグナルは、VEGFR 2の活性化から生成される。VEGFR 1活性化は、血管新生の負の役割と関連する可能性があることが報告された。VEGFR 1シグナル伝達は、腫瘍の骨髄由来VEGFR 1陽性細胞を介したイ

ンビボ進行にも重要である（骨中の転移前微小環境の形成の一因となる）ことも報告された。治療抗体に向けられた／治療抗体を中和するVEGF-Aをベースにしたいくつかの治療法が、主に、血管新生に依存する種々のヒト腫瘍の治療での使用のために開発されてきた。しかし、これらは、副作用がないわけではない。これは、これらが一般的な非細胞／組織特異的VEGF／VEGFR相互作用阻害剤として作用することを考慮すると驚くべきことではない。従って、特定の標的細胞（例えば、腫瘍血管系内皮細胞）に対するVEGF（例えば、VEGF-A）／VEGFR2阻害を制限することが望ましいであろう。

【0171】

いくつかの実施形態では、VEGFは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはVEGF-EおよびVEGF₁₂₁、VEGF_{121b}、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₈₉、およびVEGF₂₀₆などの種々のVEGF-Aのアイソフォームを含むこれらのアイソフォームである。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-1（Flt-1）および／またはVEGFR-2（KDR／Flk-1）に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-1（Flt-1）および／またはVEGFR-2（KDR／Flk-1）に対する低減または除去された親和性および／または活性を有する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-2（KDR／Flk-1）に対する低減された親和性および／または活性を有し、および／またはVEGFR-1（Flt-1）に対する低減または除去された親和性および／または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷治癒方法または虚血関連疾患の治療で使用される（理論に束縛されることを意図するものではないが、内皮細胞機能および血管新生に対するVEGFR2の効果により媒介されて）。種々の実施形態では、癌および炎症促進性活性と関連するVEGFR-1（Flt-1）への結合が回避される。種々の実施形態では、VEGFR-1（Flt-1）は、デコイ受容体として機能し、そのため、この受容体に対する親和性を実質的に低減または除去し、治療薬の隔離を回避する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-1（Flt-1）に対する低減または除去された親和性および／または活性を有し、および／またはVEGFR-2（KDR／Flk-1）に対する低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、VEGFは、VEGF-CまたはVEGF-Dである。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR3に対する低減された親和性および／または活性を有する。あるいは、改変シグナル伝達物質は、VEGFR3に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

【0172】

血管新生促進治療法はまた、種々の疾患（例えば、虚血性心疾患、出血など）において重要であり、VEGFベース治療薬を含む。VEGFR2の活性化は血管新生促進性である（内皮細胞上で作用する）。VEGFR1は、炎症細胞（例えば、マクロファージを含む）の遊走の刺激を生じ、血管過多透過性に関連する炎症をもたらし得る。VEGFR1の活性化はまた、腫瘍微小環境形成に関連する骨髄を活性化できる。従って、VEGFR2活性化に対し選択性があるVEGFベース治療薬は、この場合には望ましいであろう。さらに、例えば、内皮細胞を特異的に標的とする細胞が望ましいであろう。

【0173】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-2に対する低減された親和性および／または活性（例えば、拮抗的な性）を有し、および／またはVEGFR-1に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。腫瘍内皮細胞マーカー（例えば、PSMAなど）に結合するターゲティング部分を介して腫瘍血管系内皮細胞を標的にする場合、このような構築物は、このようなマーカー陽性細胞上に対し特異的にVEGFR2活性化を阻害するが、標的細胞へ向かう途上および標的細胞上では（活性が除去された場合）VEGFR1を活性化せず、従って、例えば、炎症反応の誘導を無くする。これは、VEGF-A中和療法に比べて、多くの腫瘍型に対するより選

択的で安全な抗血管新生薬療法を提供することになろう。

【0174】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、VEGFR-2に対する低減された親和性および／または活性（例えば、アゴニスト活性）を有し、および／またはVEGFR-1に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。血管内皮細胞への標的化により、いくつかの実施形態では、このような構築物は、VEGFR1が関連する炎症反応誘導を生じることなく、血管新生を促進する。従って、このような構築物は、VEGFR2ならびにVEGFR1の全身性活性化に起因する副作用の実質的に低減されたリスクを有する標的化血管新生促進効果を有するであろう。

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は改変VEGF₁₆₅であり、VEGF₁₆₅の野生型アミノ酸配列は下記である：

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDFQEYYP
DEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLEECVPTEESNITMQI
MRICKPHQGQHIGEMSFLLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPC
SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRC
DKPRR（配列番号12）。

【0175】

別の例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は改変VEGF_{165b}であり、VEGF_{165b}の野生型アミノ酸配列は下記である：

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDFQEYYP
DEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLEECVPTEESNITMQI
MRICKPHQGQHIGEMSFLLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPC
SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRSL
TRKD（配列番号13）。

【0176】

これらの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸I83での変異を有する（例えば、I83での置換変異、例えば、I83K、I83R、またはI83H）。理論に束縛されることを意図するものではないが、このような変異は、低減された受容体結合親和性を生じ得ると考えられている。例えば、米国特許第9,078,860号を参照されたい。この全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0177】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、限定されないが、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ゴナドトロピン放出ホルモン、アンドロゲン、エストロゲン、甲状腺刺激ホルモン、濾胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、プロラクチン、成長ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、抗利尿ホルモン、オキシトシン、チロトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、ドーパミン、メラトニン、チロキシン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、アドレナリン、ノルアドレナリン、プロゲステロン、インスリン、グルカゴン、アミリン、カルシトリオール、カルシフェロール、心房性ナトリウム利尿ペプチド、ガストリン、セクレチン、コレシストキニン、神経ペプチドY、グレリン、PYY3-36、インスリン様増殖因子（IGF）、レプチン、トロネボエチン、エリスロポエチン（EPO）、およびアンジオテンシノーゲンから選択される野生型または改変型のホルモンである。

【0178】

いくつかの実施形態では、野生型または改変シグナル伝達物質はTNF-αである。TNFは、細胞増殖、分化、アポトーシス、腫瘍形成、ウイルス複製、自己免疫、免疫細胞機能および輸送、炎症、ならびに敗血症性ショックの調節を含む、多くの多様な機能を有する多面的サイトカインである。それは、標的細胞：TNFR1（p55）およびTNFR2（p75）上の2つの別々の膜受容体に結合する。TNFR1は非常に広範な発現パターンを示すが、TNFR2はリンパ球、Treg、内皮細胞、特定のニューロン、ミクロ

10

20

30

40

50

グリア、心筋細胞および間葉系幹細胞の特定の集団上で選択的に発現される。受容体活性化に応答して、全く別々の生物学的経路が活性化されるが、若干の重なり合いも存在する。一般原則として、理論に束縛されることを望むものではないが、TNFR1シグナル伝達はアポトーシス（細胞死）の誘導に関連し、TNFR2シグナル伝達は細胞生存シグナルの活性化に関連する（例えば、NFκB経路の活性化）。TNFの投与は、全身的毒性であり、これは主にTNFR1の関与のためである。しかし、TNFR2の活性化もまた、TNFR1と同様に、多様な作用に関連し、TNF系治療薬の開発においては、TNFターゲティングおよび活性に対する制御が重要であることに留意されたい。

【0179】

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

【0180】

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

【0181】

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

【0182】

いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、例えば、TNFR 2 の活性化および／またはTNFR 1 の回避により（例えば、TNFR 2 に対する低減された親和性および／または活性を有し、および／またはTNFR 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する改変TNFにより）自己反応性T細胞の死をもたらす。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの自己反応性T細胞は、例えば、NFκB経路活性／シグナル伝達の変化により、変更されたアポトーシス／生存シグナルを有する。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、細胞死（アポトーシス）／生存シグナル特性の不均衡の根底にある、NFκB経路での損傷または変更および、場合により特定の死誘導シグナルに対する変更された感受性（例えば、TNFR 2 活性化）を有する自己反応性T細胞の死をもたらす。

10

【0183】

いくつかの実施形態では、TNFR 2 ベースのF c ベースキメラタンパク質複合体は、特に、自己免疫疾患、種々の心臓疾患、脱髄性および神経変性障害、および感染症を含む疾患に対する追加の治療用途を有する。

【0184】

ある実施形態では、野生型TNFαは、下記のアミノ酸配列を有する：

VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANG
VELRDNQLVVPSEGLYL IYSQVLFKGGQGC PSTHVL L THTI
SRI AVSYQT KVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYL
GGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFG IIAL（配列
番号14）。

20

【0185】

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

【0186】

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

30

40

50

29SおよびR32W変異を有する。いくつかの実施形態では、ヒトTNF α 部分は、D143NおよびA145R変異を有する。いくつかの実施形態では、ヒトTNF α 部分は、D143NおよびA145R変異を有する。いくつかの実施形態では、ヒトTNF α 部分は、A145T、E146D、およびS147D変異を有する。いくつかの実施形態では、ヒトTNF α 部分は、A145TおよびS147D変異を有する。

【0187】

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

【0188】

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

【0189】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はTNF β である。TNF β は、LT β (LT α 1 β 2)と、ホモトリマーまたはヘテロトリマーを形成できる。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、TNFR1および/またはTNFR2および/またはヘルペスウイルス侵入メディエーター (HEVM) および/またはLT β Rに対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0190】

ある実施形態では、野生型TNF β は、下記のアミノ酸配列を有する：

LPGVGLTPSAAQTARQHPKMH LAHSNLKPA AHLIGDPSKQ
NSLLWRANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVV
FSGKAYS PKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLS SQKM
VYPGLQEPWLHSMYHGAAAFQLTQGDQLSTHTDGI PHLVLS
PSTVFFFGAFA L (配列番号15)。

【0191】

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

【0192】

いくつかの実施形態では、国際公開第2015/007903号および国際出願第PC

10

20

30

40

50

T／I B 2 0 1 6／0 0 1 6 6 8号に記載のように、野生型または改変型物質は、TNFファミリーメンバー（例えば、TNF α 、TNF β ）であり、これは、単鎖トリマー型であり得る。これら特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

ある実施形態では、野生型TRAILは、下記のアミノ酸配列を有する：

MAMMEVQG G P S L G Q T C V L I V I F T V L L Q S L C V A V T Y V Y F T N
E L K Q M Q D K Y S K S G I A C F L K E D D S Y W D P N D E E S M N S P C W Q V
K W Q L R Q L V R K M I L R T S E E T I S T V Q E K Q Q N I S P L V R E R G P Q
R V A A H I T G T R G R S N T L S S P N S K N E K A L G R K I N S W E S S R S G
H S F L S N L H L R N G E L V I H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E E I K E N T
K N D K Q M V Q Y I Y K Y T S Y P D P I L L M K S A R N S C W S K D A E Y G L Y
S I Y Q G G I F E L K E N D R I F V S V T N E H L I D M D H E A S F F G A F L V
G（配列番号16）。

【0196】

このような実施形態では、改変TRAIL物質は、アミノ酸位置T127～R132、E144～R149、E155～H161、Y189～Y209、T214～I220、K224～A226、W231、E236～L239、E249～K251、T261～H264およびH270～E271に変異を含み得る（ジェンバンク受入番号NP_003801、バージョン10NP_003801.1、GI:4507593、ヒト配列に基づいてナンバリング；上記参照）。

【0197】

このような実施形態では、改変TRAIL物質は、切断、例えば、限定されないが、例

例えば、Trebing et al., (2014) Cell Death and Disease, 5:e1035に記載されているような切断を含む。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0198】

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

10

【0199】

いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R2に対するその親和性および／または活性を実質的に低減する1個または複数の変異を含み得る。このような実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R1に特異的に結合し得る。代表的変異には、アミノ酸位置G131、R149、S159、N199、K201、およびS215の内の1つまたは複数での変異が挙げられる。例えば、変異は、G131R、R149I、S159R、N199R、K201H、およびS215Dの内の1個または複数であり得る。ある実施形態では、改変TRAIL物質は、変異G131R、R149I、S159R、N199R、K201H、およびS215Dを含む。さらなるTRAIL変異は、例えば、Trebing et al., (2014) Cell Death and Disease, 5:e1035に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0200】

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

30

【0201】

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

40

【0202】

いくつかの実施形態では、野生型または改変型物質は、TGFファミリーメンバー(例えば、TGF α 、TGF β)であり、これは、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR

50

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

【0203】

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

【0204】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はインターロイキンである。ある実施形態では、改変型シグナル伝達物質はIL-1である。ある実施形態では、改変型シグナル伝達物質はIL-1 α またはIL-1 β である。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-1R1および／またはIL-1RAcPに対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-1R1および／またはIL-1RAcPに対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-1R2に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。例えば、いくつかの実施形態では、本改変型IL-1物質は、IL-1R2に対する相互作用を回避し、したがって、治療薬に対するデコイおよび／またはシンクとしてのその機能を実質的に低減する。

【0205】

ある実施形態では、野生型IL-1 β は、下記のアミノ酸配列を有する：

A P V R S L N C T L R D S Q Q K S L V M S G P Y E L K A L H L Q G Q D M E Q Q V
V F S M S F V Q G E E S N D K I P V A L G L K E K N L Y L S C V L K D D K P T L
Q L E S V D P K N Y P K K K M E K R F V F N K I E I N N K L E F E S A Q F P N W
Y I S T S Q A E N M P V F L G G T K G G Q D I T D F T M Q F V S S（配列番号17）。

【0206】

IL-1 β は、炎症促進性のサイトカインであり、重要な免疫系制御因子である。それは、CD4⁺T細胞応答の強力な活性化因子であり、Th17細胞の比率を高め、IFN γ およびIL-4産生細胞の増殖を増大させる。IL-1 β はまた、CD8⁺T細胞の強力な制御因子であり、抗原特異的CD8⁺T細胞増殖、分化、周辺部への移動および記憶を強化する。IL-1 β 受容体には、IL-1R1およびIL-1R2が含まれる。IL-1R1への結合およびIL-1R1を介したシグナル伝達は、IL-1 β が多くのその生物学的（および病理学的）作用を媒介する機序を構成する。IL-1R2は、デコイ受容体として機能できることにより、IL-1R1を介した相互作用およびシグナル伝達を行うためのIL-1 β の利用可能性を減らす。

【0207】

いくつかの実施形態では、改変IL-1 β は、IL-1R1に対する低減された親和性および／または活性（例えば、アゴニスト活性）を有する。いくつかの実施形態では、改変IL-1 β は、IL-1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。このような実施形態では、回復可能なIL-1 β /IL-1R1シグナル伝達ならびにIL-1R2

に対する治療用Fcベースキメラタンパク質複合体の損失の防止およびその結果としての必要なIL-1 β 投与量の削減（例えば、野生型またはILR1に対する減弱化変異のみを有するFcベースキメラタンパク質複合体に比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を刺激して抗癌応答を開始することを含む、例えば、癌を治療する方法で使用される。

【0208】

いくつかの実施形態では、改変IL-1 β は、IL-1R1に対し、低減された親和性および／または活性（例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または1個または複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を有する。いくつかの実施形態では、改変IL-1 β は、IL-1R2に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。このような実施形態では、IL-1 β /IL-1R1シグナル伝達は回復可能ではなく、ILR2に対する治療用Fcベースキメラタンパク質複合体の損失の防止およびその結果としての必要なIL-1 β 投与量の削減（例えば、野生型またはILR1に対する減弱化変異のみを有するFcベースキメラタンパク質複合体に比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を抑制することを含む、例えば、自己免疫疾患を治療する方法で使用される。

【0209】

このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、アミノ酸52～54の欠失を有し、これは、I型IL-1Rに対して、低減された結合親和性および低減された生物活性を有する改変ヒトIL-1 β が産生する。例えば、国際公開第1994/000491号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Qから選択される1個または複数の置換変異（Xはアミノ酸の任意の変化、例えば、非保存的变化であり得る）を有し、これらは、例えば、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007542号および国際公開第2015/007536号に記載のように、IL-1Rに対し低減された結合を示す（ジェンバンク受入番号NP_000567、バージョンNP_000567.1、GI:10835145、ヒトIL-1 β 配列に基づいてナンバリング）。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221SおよびE221Kから選択される1個または複数の変異を有し得る。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異Q131GおよびQ148Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異Q148GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびQ131Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびH146Aを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびH146Nを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびH146Rを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびH146Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびH146Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL-1 β は、変異R120G、F162A、およびQ164Eを含む。

【0210】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-2である。このような実

施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-2R α および／またはIL-2R β および／またはIL-2R γ に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-2R β および／またはIL-2R γ に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-2R α に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。このような実施形態は、例えば、改変IL-2がIL-2R β および／またはIL-2R γ に対するアゴニストである場合、癌の治療に適切であり得る。例えば、本発明の構築物は、IL-2受容体 β および γ を有するCD8⁺ T細胞（抗腫瘍効果を与えることができる）の減弱化された活性化を優先し、IL-2受容体 α 、 β 、および γ を有するT_{reg}（免疫抑制効果、腫瘍促進効果を与えることができる）を優先しない。さらに、いくつかの実施形態では、IL-2R α よりもIL-2R β および／またはIL-2R γ に対する選択性は、肺水腫などのIL-2副作用を回避させる。また、IL-2ベースのFcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、改変IL-2が、IL-2R β および／またはIL-2R γ に対してアンタゴニスト（例えば、天然のアンタゴニスト活性または1個または複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）である場合、疾患（例えば、自己免疫疾患）の治療に有用である。例えば、本発明の構築物は、IL-2受容体 β および γ を有するCD8⁺ T細胞の抑制の減弱化（したがって、免疫応答を抑制する）を優先し、IL-2受容体 α 、 β 、および γ を有するT_{reg}を優先しない。あるいは、いくつかの実施形態では、IL-2を有するFcベースキメラタンパク質複合体は、T_{reg}の活性化、したがって免疫抑制を優先し、CD8⁺ T細胞の活性化を優先しない。例えば、これらの構築物は、疾患または免疫抑制により恩恵を受けると思われる疾患、例えば、自己免疫障害の治療に使用される。

【0211】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD8⁺ T細胞に向けられた本明細書に記載のターゲティング部分を有し、改変IL-2物質は、IL-2R β および／またはIL-2R γ に対する低減された親和性および／または活性および／またはIL-2R α に対し実質的に低減されたまたは除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、これらの構築物は、CD8⁺ T細胞活性を標的とし、通常、T_{reg}細胞に対して不活性である（または実質的に低減された活性を有する）。いくつかの実施形態では、このような構築物は、野生型IL-2に比べて、高められた免疫刺激効果を有し（理論に束縛されることを望むものではないが、T_{reg}を刺激しないことにより）、一方で、IL-2に関連する全身毒性を除去または低減する。

【0212】

ある実施形態では、野生型IL-2は、下記のアミノ酸配列を有する：

A P T S S S T K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L
T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L
R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R
W I T F C Q S I I S T L T（配列番号18）。

【0213】

このような実施形態では、改変IL-2物質は1個または複数の変異を、アミノ酸L72の位置（L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R、またはL72K）、F42の位置（F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、またはF42K）およびY45の位置（Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45RまたはY45K）で有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL-2物質は、野生型IL-2と比べて、高親和性IL-2受容体に対して低減された親和性を有し、中間的親和性IL-2受容体に対しては親和性をそのまま維持すると考えられる。例えば、米国特許出願公開第2012/0244112号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0214】

いくつかの実施形態では、改変IL-2物質は、アミノ酸位置R38、F42、Y45、およびE62に1個または複数の変異を有する。例えば、改変IL-2物質は、R38A、F42A、Y45A、およびE62Aの内の1個または複数を含み得る。いくつかの実施形態では、改変IL-2物質は、C125で変異を含み得る。例えば、C125Sであってよい。このような実施形態では、改変IL-2物質は、例えば、Carmenate et al. (2013) The Journal of Immunology, 190:6230-6238に記載されているように、IL-2R α に対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL-2物質は、CD8+ T細胞およびNK細胞を含むが、Treg細胞を含まない、エフェクター細胞の増殖を誘導できる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL-2物質は、野生型IL-2物質よりも少ない毒性である。IL-2R α に対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL-2物質を含むFcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、腫瘍学において用途が見出され得る。

10

【0215】

いくつかの実施形態では、改変IL-2シグナル伝達物質は、配列番号18のN末端でAlaの欠失を含む。いくつかの実施形態では、改変IL-2シグナル伝達物質は、配列番号18の位置125でCysのSerによる置換を含む。いくつかの実施形態では、改変IL-2シグナル伝達物質は、配列番号18のN末端でAlaの欠失および位置125でCysのSerによる置換を含む。

20

【0216】

他の実施形態では、改変IL-2物質は、例えば、国際公開第2016/025385号に記載されているように、IL-2R β に対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、改変IL-2物質は、Treg細胞の増殖を誘導し得るが、CD8+ T細胞およびNK細胞などのエフェクター細胞の増殖を誘導し得ない。IL-2R β に対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL-2物質を含むFcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、自己免疫疾患の治療で用途が見出され得る。いくつかの実施形態では、改変IL-2物質は、アミノ酸位置N88、D20、および/またはA126に1個または複数の変異を有し得る。例えば、改変IL-2物質は、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、およびQ126Fの内の1個または複数を含み得る。

30

【0217】

種々の実施形態では、改変IL-2物質は、D109またはC125に変異を含み得る。例えば、変異は、D109CまたはC125Sであってよい。いくつかの実施形態では、D109またはC125での変異を有する改変IL-2は、PEG部分への結合のために利用され得る。

【0218】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-3である。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-3受容体に対する低減された親和性および/または活性を有し、IL-3受容体は共通のベータ（ベータcまたはCD131）サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-3受容体に対して実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有し、IL-3受容体は共通のベータ（ベータcまたはCD131）サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。

40

【0219】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-4である。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、1型および/または2型IL-4受容体に対する低減された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、1型および/または2型IL-4受容体に対する実質的に低減または除去された

50

親和性および／または活性を有する。1型IL-4受容体は、共通の γ 鎖を有するIL-4R α サブユニットから構成され、IL-4を特異的に結合する。2型IL-4受容体は、IL-13R α 1として知られる異なるサブユニットに結合したIL-4R α サブユニットを含む。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、2型IL-4受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

【0220】

ある実施形態では、野生型IL-4は、下記のアミノ酸配列を有する：

HKCDITLQEI I KTLNSLT EQKTLCTELTVTDIFAASKNTT
EKETFRCRAATVLRQFYSHHEK DTRCLGATAQQFHRHKQLI
RFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIM
REKYSKCSS（配列番号19）。

10

【0221】

このような実施形態では、改変IL-4物質は、アミノ酸R121（R121A、R121D、R121E、R121F、R121H、R121I、R121K、R121N、R121P、R121T、R121W）、E122（E122F）、Y124（Y124A、Y124Q、Y124R、Y124S、Y124T）およびS125（S125A）に1個または複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL-4物質は、I型受容体により媒介される活性を維持するが、その他の受容体により媒介される生物活性を顕著に低減すると考えられる。例えば、米国特許第6,433,157号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0222】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-6である。IL-6は、リガンド結合IL-6R鎖（CD126）およびシグナル伝達成分gp130を含む細胞表面I型サイトカイン受容体複合体を介して信号を伝達する。IL-6はまた、可溶性型のIL-6R（sIL-6R）にも結合し得、これは、IL-6Rの細胞外の部分である。sIL-6R/IL-6複合体は、神経突起の成長およびニューロンの生存に関与し、したがって、再ミエリン化による神経再生に重要であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-6R/gp130および／またはsIL-6Rに対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-6R/gp130および／またはsIL-6Rに対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

30

【0223】

ある実施形態では、野生型IL-6は、下記のアミノ酸配列を有する：

APVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISAL
RKETCNKSNMCESSEKEALAENNLNLPKMAEKDGCFSQSGFN
EETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFEESSEEQARAVQMST
KVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLTTKLQAQNNWLQ
DMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM（配列番号20）。

【0224】

このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、アミノ酸58、160、163、171または177に1個または複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL-6物質は、IL-6R α に対し低減された結合親和性および低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第97/10338号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0225】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-10である。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-10受容体1およびIL-10受容体2に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-10受容体1およびIL-10受容体2に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

50

【0226】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-11である。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-11R α および／またはIL-11R β および／またはg p 1 3 0に対する低減された親和性および／または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル型伝達物質は、IL-11R α および／またはIL-11R β および／またはg p 1 3 0に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

【0227】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-12である。このような実施形態では、改変シグナル型伝達物質は、IL-12R β 1 および／またはIL-12R β 2 に対する低減された親和性および／または活性を有する。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-12R β 1 および／またはIL-12R β 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

10

【0228】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-13である。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-4受容体 (IL-4R α) およびIL-13R α 1 に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-4受容体 (IL-4R α) またはIL-13R α 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

【0229】

ある実施形態では、野生型IL-13は、下記のアミノ酸配列を有する：

SPGPVPPSTALRELIEELVNITQNNQKAPLCNGSMVWSINL
TAGMYCAALESLLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQ
FSSLHVRDGTKIEVAQFVKDLLHLKKLFRGRFN (配列番号 2
1)。

20

【0230】

このような実施形態では、改変IL-13物質は、アミノ酸13、16、17、66、69、99、102、104、105、106、107、108、109、112、113および114に1個または複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL-13物質は、低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第2002/018422号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0231】

ある実施形態では、シグナル伝達物質は、野生型または改変型IL-15である。いくつかの実施形態では、改変IL-15は、インターロイキン15受容体に対する低減された親和性および／または活性を有する。

【0232】

ある実施形態では、野生型IL-15は、配列番号1564のアミノ酸配列を有する。

【0233】

このような実施形態では、改変IL-15物質は、アミノ酸S7、D8、K10、K11、E46、L47、V49、I50、D61、N65、L66、I67、I68、L69、N72、Q108で1個または複数の変異を有する。

40

【0234】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-18である。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-18R α および／またはIL-18R β に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、IL-18R α および／またはIL-18R β に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、シグナル伝達に必要なTIRドメインを欠くIL-18R α のアイソフォームであるIL-18R α II型に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

50

る。

【0235】

ある実施形態では、野生型IL-18は、下記のアミノ酸配列を有する：

MAAEPVEDNCIN FVAMKFI DNTLYFI AEDDENL ESDYFGK
LESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPR
TIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKII SFK
EMNPPDNIKDTKSDIIF FQRSVP GHDKMQFESSSYEGYF
LACEKERD LFKLILKK EDEL GDRSIMFTVQNE DL（配列番号22）。

【0236】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007542号に記載のように、改変IL-18物質は、Y37～K44、R49～Q54、D59～R63、E67～C74、R80、M87～A97、N127～K129、Q139～M149、K165～K171、R183およびQ190～N191から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に1個または複数の変異を含み得る（ジェンバンク受入番号AAV38697、バージョンAAV38697.1、G1：54696650、ヒトIL-18配列に基づいてナンバリング）。

【0237】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はIL-33である。このような実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、ST2受容体1およびIL-1RAcPに対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、ST2受容体およびIL-1RAcPに対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

【0238】

ある実施形態では、野生型IL-33は、下記のアミノ酸配列を有する：

MKPKMKYSTNKISTAKWKNTASKALCFKL GKSQQKAKEVC
PMYFMKLRSGLMIKKEAC YFRRET TKRPSLKTGRKHKRHL
VLAACQQQSTVECF AFGISGVQKYTRALHDSSITGISPIT
EYLASLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDEKKDKVL
LSYYESQHPSNESGDGV DGMMLMVTLSPTKDFWLHANNKE
HSVELHKCEKPLPDQAF FVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFI
GVKDNHLALIKVDSS ENLCTENILFKLSET（配列番号23）。

【0239】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007542号に記載のように、改変IL-33物質は、I113～Y122、S127～E139、E144～D157、Y163～M183、E200、Q215、L220～C227およびT260～E269から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に1個または複数の変異を含み得る（ジェンバンク受入番号NP_254274、バージョン254274.1、G1：15559209、ヒト配列に基づいてナンバリング）。

【0240】

ある実施形態では、改変型シグナル伝達物質は上皮増殖因子（EGF）である。EGFは、強力な成長因子のファミリーである。メンバーは、EGF、HB-EGF、およびTGFα、アンフィレギュリン、ニューレグリン、エピレギュリン、ベータセルリンなどの他のものを含む。EGFファミリー受容体は、EGFR（Erbb1）、Erbb2、Erbb3およびErbb4を含む。これらは、ホモダイマーおよび／またはヘテロダイマー受容体サブタイプとして機能し得る。異なるEGFファミリーメンバーは、種々の受容体サブタイプに対して、他と異なる選択性を示す。例えば、EGFは、Erbb1／Erbb1、Erbb1／Erbb2、Erbb4／Erbb2およびいくつかの他のヘテロダイマーサブタイプと結合する。HB-EGFは、類似のパターンを有するが、Erbb4／4と結合する。EGF（EGF様）増殖因子シグナル伝達の正または負方向への調節

は、大きな治療上の観点から関心がもたれている。例えば、E G F Rシグナル伝達の阻害は、E G F Rシグナル伝達が主要な成長促進シグナルを構成する種々の癌の治療で関心がもたれている。あるいは、E G F Rシグナル伝達の刺激は、例えば、創傷治癒（急性および慢性）、口腔粘膜炎（限定されないが、放射線療法を含む種々の癌療法の主要な副作用）における治療上の観点から関心が持たれている。

【0241】

いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および／またはE r b B 4に対する低減された親和性および／または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷の治療方法で使用される。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、およびE r b B 4の内の1種または複数に結合し、その受容体の活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および／またはE r b B 4に対する低減された親和性および／または活性を有し、これにより、その受容体の活性が弱められる様式でアンタゴナイズされる。このような実施形態は、例えば、癌の治療で使用される。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1に対する低減された親和性および／または活性を有する。E r b B 1は、キナーゼ阻害剤の治療標的であるが一大抵の場合、副作用があり、その理由は、それらがあまり選択的でないためである（例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ブリガチニブおよびイコチニブ）。いくつかの実施形態では、弱められた拮抗的E r b B 1シグナル伝達は、E G Fの受容体を標的とする他の物質より、オンターゲットであり、少ない副作用を有する。

【0242】

いくつかの実施形態では、改変型シグナル伝達物質は、E r b B 1に対し、低減された親和性および／または活性（例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または1個または複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）および／またはE r b B 4またはそれが相互作用し得る他のサブタイプに対し実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。ターゲティング部分を介した特異的標的化により、E r b B 1／E r b B 1受容体活性化の細胞選択的抑制（アンタゴニズム、例えば、天然のアンタゴニスト活性または1個または複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）が達成されるであろう—阻害関連副作用に関連する可能性のある他の受容体サブタイプを関与させずに。従って、身体中の全ての細胞型のE G F R活性を阻害するE G F Rキナーゼ阻害剤と対照的に、このような構築物は、副作用の低減された細胞選択的（例えば、受容体の増幅、過剰発現などによる活性化E G F Rシグナル伝達を有する腫瘍細胞）抗E G F R（E r b B 1）薬物作用を提供するのである。

【0243】

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

【0244】

ある実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質はインスリンまたはインスリン類似体である。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインスリン類似体は、インスリン受容体および／またはI G F 1またはI G F 2受容体に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインス

リン類似体は、インスリン受容体および／または I G F 1 または I G F 2 受容体に対する低減または除去された親和性および／または活性を有する。インスリン受容体に対する弱められた応答は、糖尿病、肥満症、代謝障害などの制御を可能とし、同時に、I G F 1 または I G F 2 受容体から離れた方向に向けることにより、癌促進性作用を回避する。

【0245】

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

【0246】

いくつかの実施形態では、野生型または改変型シグナル伝達物質は E P O である。種々の実施形態では、改変 E P O 物質は、野生型 E P O または本明細書で記載の他の E P O ベース物質に比べて、E P O 受容体 (E P O R) および／またはエフリン受容体 (E p h R) に対する低減された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変 E P O 物質は、E P O 受容体 (E P O R) および／または E p h 受容体 (E p h R) に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。E P O 受容体の例としては、限定されないが、E P O R ホモダイマーまたは E P O R / C D 1 3 1 ヘテロダイマーが挙げられる。また、ベータ共通受容体 (β c R) も E P O 受容体に含まれる。E p h 受容体の例としては、限定されないが、E P H A 1、E P H A 2、E P H A 3、E P H A 4、E P H A 5、E P H A 6、E P H A 7、E P H A 8、E P H A 9、E P H A 1 0、E P H B 1、E P H B 2、E P H B 3、E P H B 4、E P H B 5、および E P H B 6 が挙げられる。いくつかの実施形態では、改変 E P O タンパク質は、E P O タンパク質に、1 個または複数の異なる E P O 受容体または E p h 受容体 (例えば、限定されないが、E P O R - E P H B 4、E P O R - β c R - E P O R を含むヘテロダイマー、ヘテロトリマーなど) を含む受容体に対する低減された親和性を持たせる 1 個または複数の変異を含む。また、限定されないが、N E P O R を含む、E P 特許公報第 2 4 9 2 3 5 5 号の受容体も提供される (この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0247】

いくつかの実施形態では、ヒト E P O は、次のアミノ酸配列を有する (最初の 2 7 個のアミノ酸はシグナルペプチドである) :

M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E
R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C S L N E N I T V P D T K V N F Y A W K R
M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L
H V D K A V S G L R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I
T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L K L Y T G E A C R T G D R (配列番号 2 4)

いくつかの実施形態では、ヒト E P O タンパク質は、E P O の成熟型であり (シグナルペ

プチドは切断されている)、これは、次の配列を有する166個のアミノ酸残基の糖タンパク質である:

APPRLICDSRVLLERYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENIT
VPDTKVNIFYAWKRMEVGGQQAEEVWQGLALLSEAVLRGQAL
LVNSSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAIS
PPDAASAAPLRTITADTFRKLF RVYSNFLRGKLLKLYTGEA
CRTGDR (配列番号25)。

【0248】

ヒトEPOタンパク質の構造は、ヘリックスA、B、CおよびDを含む4ヘリックス束を含むと予測される。種々の実施形態では、改変EPOは、生物活性のために重要なEPOタンパク質の4つの領域、すなわち、アミノ酸残基10~20、44~51、96~108、および142~156に位置する1個または複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数の変異は、残基11~15、44~51、100~108、および147~151に位置する。これらの残基は、ヘリックスA (Val11、Arg14、およびTyr15)、ヘリックスC (Ser100、Arg103、Ser104、およびLeu108)、ヘリックスD (Asn147、Arg150、Gly151、およびLeu155)、およびA/B接続ループ (残基42~51) に局在化される。いくつかの実施形態では、改変EPOタンパク質は、アミノ酸41~52の残基ならびにアミノ酸147、150、151、および155の残基中に変異を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの残基の変異は、受容体結合およびインビトロ生物活性の両方に実質的な影響を有すると考えられている。いくつかの実施形態では、改変EPOタンパク質は、残基11、14、15、100、103、104、および108に変異を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの残基の変異は、受容体結合活性に対し中程度の影響を有し、インビトロ生物活性に対し遙かに大きい影響を有すると考えられている。置換の例としては、限定されないが、Val11Ser、Arg14Ala、Arg14Gln、Tyr15Ile、Pro42Asn、Thr44Ile、Lys45Asp、Val46Ala、Tyr51Phe、Ser100Glu、Ser100Thr、Arg103Ala、Ser104Ile、Ser104Ala、Leu108Lys、Asn147Lys、Arg150Ala、Gly151Ala、およびLeu155Alaの1つまたは複数が挙げられる。

【0249】

いくつかの実施形態では、改変EPOタンパク質は、生物活性に影響を与え、結合には影響を与えない変異、例えば、Eliot, et al. Mapping of the Active Site of Recombinant Human Erythropoietin January 15, 1997; Blood: 89 (2) に記載のものを含む。この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0250】

いくつかの実施形態では、改変EPOタンパク質は、受容体接触に関与するEPOタンパク質の表面残基を含む1個または複数の変異を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの表面残基の変異は、タンパク質フォールディングの影響が少ない可能性があり、そのため、いくらかの生物活性を保持すると考えられている。変異導入され得る表面残基の例としては、限定されないが、残基147および150が挙げられる。例示的实施形態では、変異は、N147A、N147K、R150AおよびR150Eの1つまたは複数を含む置換である。

【0251】

いくつかの実施形態では、改変EPOタンパク質は、残基N59、E62、L67およびL70での1個または複数の変異、およびジスルフィド結合形成に影響を与える1個または複数の変異を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変は、フォールディングに影響を与える、および/または埋没した位置にあることが予測され、従って、生物活性に間接的に影響を与えると考えられている。

【0252】

ある実施形態では、改変EPOタンパク質は、受容体結合を大きく低減するK20E置換を含む。例えば、Elliott, et al., (1997) Blood, 89:493-502を参照されたい。この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0253】

本発明のキメラEPOタンパク質に組み込み得る追加のEPO変異は、例えば、Elliott, et al., (1997) Blood, 89:493-502およびTaylor et al., (2010) PEDS, 23(4):251-260に開示されている。これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0254】

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

20

【0255】

ターゲティング部分(TM)

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの、特異的結合の可能なタンパク質ベース物質である。

【0256】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗体の誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、単ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体(重鎖抗体)(VHH)、単鎖抗体(scFv)、サメの重鎖のみで構成される抗体(VNAR)、マイクロタンパク質(システインノットタンパク質、ノッチン)、DARPin; テトラネクチン; アフィボディ; トランスボディ; アンチカリン; アドネクチン; アフィリン; ミクロボディ; ペプチドアプタマー; alterase; プラスチック抗体; フィロマー; ストラドボディ; マキシボディ; エビボディ; フィノマー; アルマジロリピートタンパク質(armadillo repeat protein); クニツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ; アフィマー、デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小(合成のまたは天然の)分子である。これらは、例えば、限定されないが、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3):310-317、も参照された

30

40

50

い。

【0257】

一実施形態では、ターゲティング部分は、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物由来のVHH、または設計されたVHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（VHH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。

【0258】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

10

【0259】

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

20

【0260】

種々の実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、1個または複数の免疫細胞上に見つけることができ、免疫細胞は、限定されないが、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含み得る。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、目的の標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合し、直接または間接的に1個または複数の免疫細胞を効果的に動員する。いくつかの実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、1個または複数の腫瘍細胞上に見つけられ得る。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的に免疫細胞を動員し得る。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、免疫細胞、例えば、腫瘍細胞を死滅させるおよび／または抑制できる免疫細胞を、作用部位（非限定的例であるが、腫瘍微小環境など）に直接的にまたは間接的に動員し得る。

30

【0261】

種々の実施形態では、ターゲティング部分は、疾患細胞および／またはエフェクター細胞などの細胞を直接にまたは間接的に動員できる。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍の免疫攻撃に有利なように免疫細胞を関与させ、免疫細胞のバランスを変化させることができ、またはその方法での用途が見つかる。例えば、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、臨床的に重要な部位の免疫細胞の比率を腫瘍を死滅させるおよび／または抑制することができる細胞（例えば、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーナチュラルキラーT（NKT）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、樹状細胞またはこれらのサブセット）に有利なように、および腫瘍を保護する細胞（例えば、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）、制御性T細胞（Treg）；腫瘍関連好中球（TAN）、M2マクロファージ、腫瘍関連マクロファージ（TAM））、またはこれらのサブセット）に不利なように変化させることができる。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、エフェクターT細胞の制御性T細胞に対する比率を高めることができる。

40

50

【0262】

例えば、いくつかの実施形態では、認識ドメインは、T細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、直接または間接的にT細胞を動員する。ある実施形態では、認識ドメインは、エフェクターT細胞に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、エフェクターT細胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。エフェクターT細胞の例としては、細胞傷害性T細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD8⁺、CD45RO⁺）；CD4⁺エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、CCR7⁺、CD62L^{hi}、IL-7R/CD127⁺）；CD8⁺エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD8⁺、CCR7⁺、CD62L^{hi}、IL-7R/CD127⁺）；エフェクターメモリーT細胞（例えば、CD62L^{low}、CD44⁺、TCR、CD3⁺、IL-7R/CD127⁺、IL-15R⁺、CCR7^{low}）；セントラルメモリーT細胞（例えば、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺；またはCCR7^{hi}、CD44⁺、CD62L^{hi}、TCR、CD3⁺、IL-7R/CD127⁺、IL-15R⁺）；CD62L⁺エフェクターT細胞；早期エフェクターメモリーT細胞（CD27⁺CD62L⁻）および後期エフェクターメモリーT細胞（CD27⁻CD62L⁻）（それぞれ、TemEおよびTemL）を含むCD8⁺エフェクターメモリーT細胞（TEM）；CD127⁽⁺⁾CD25^(low/-)エフェクターT細胞；CD127⁽⁻⁾CD25⁽⁻⁾エフェクターT細胞；CD8⁺幹細胞メモリーエフェクター細胞（TSCM）（例えば、CD44^(low)CD62L^(high)CD122^(high)sca⁽⁺⁾）；TH1エフェクターT細胞（例えば、CXCR3⁺、CXCR6⁺およびCCR5⁺；または $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-12R⁺、IFN γ R⁺、CXCR3⁺）；TH2エフェクターT細胞（例えば、CCR3⁺、CCR4⁺およびCCR8⁺；または $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-4R⁺、IL-33R⁺、CCR4⁺、IL-17RB⁺、CRTH2⁺）；TH9エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺）；TH17エフェクターT細胞（例えば、 $\alpha\beta$ TCR、CD3⁺、CD4⁺、IL-23R⁺、CCR6⁺、IL-1R⁺）；CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺エフェクターT細胞、ICOS⁺エフェクターT細胞；CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁽⁻⁾エフェクターT細胞；およびIL-2、IL-4および/またはIFN- γ を分泌するエフェクターT細胞が挙げられる。

【0263】

目的とするT細胞抗原の例としては、例えば、下記が挙げられる（該当する場合には、細胞外ドメインも含む）：CD8、CD3、SLAMF4、IL-2R α 、4-1BB/TNFRSF9、IL-2R β 、ALCAM、B7-1、IL-4R、B7-H3、BLAME/SLAMFS、CEACAM1、IL-6R、CCR3、IL-7R α 、CCR4、CXCR1/ILSRA、CCR5、CCR6、IL-10R α 、CCR7、IL-10R β 、CCRS、IL-12R β 1、CCR9、IL-12R β 2、CD2、IL-13R α 1、IL-13、CD3、CD4、ILT2/CD55j、ILT3/CD55k、ILT4/CD55d、ILT5/CD55a、Integrin α 4/CD49d、CDS、Integrin α E/CD103、CD6、Integrin α M/CD11b、CDS、Integrin α X/CD11c、Integrin β 2/CD1S、KIR/CD15S、CD27/TNFRSF7、KIR2DL1、CD2S、KIR2DL3、CD30/TNFRSFS、KIR2DL4/CD15Sd、CD31/PECAM-1、KIR2DS4、CD40リガンド/TNFSF5、LAG-3、CD43、LAIR1、CD45、LAIR2、CDS3、ロイコトリエンB4-R1、CDS4/SLAMF5、NCAM-L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229/SLAMF3、NKG2D、CD2F-10/SLAMF9、NT-4、CD69、NTB-A/SLAMF6、共通 γ 鎖/IL-2R γ 、オステオポンチン、CRACC/SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK/TNFRSF11A、CX3CR1、CX3CL1、L-セレクチン、CXC

R3、SIRPβ1、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCR/WSX-1、DNAM-1、サイモポエチン、EMMPRIN/CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas/TNFRSF6、TIM-3、Fasリガンド/TNFSF6、TIM-4、FcγRIII/CD16、TIM-6、TNFR1/TNFRSF1A、グラニューライシン、TNFRIII/TNFRSF1B、TRAILR1/TNFRSF10A、ICAM-1/CD54、TRAILR2/TNFRSF10B、ICAM-2/CD102、TRAILR3/TNFRSF10C、IFN-γR1、TRAILR4/TNFRSF10D、IFN-γR2、TSLP、IL-1R1およびTSLPR。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示T細胞抗原を結合する。

10

【0264】

種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、細胞受容体のための天然リガンドなどの細胞受容体に特異的に結合できるタンパク質ベース物質である。種々の実施形態では、細胞受容体は、1個または複数の免疫細胞上に見つけることができ、免疫細胞は、限定されないが、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M1マクロファージ）、B細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含み得る。いくつかの実施形態では、細胞受容体は、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、またはこれらのサブセット上に見つえられる。

20

【0265】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はケモカインなどの天然リガンドである。本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中に含め得る代表的ケモカインとしては、限定されないが、CCL1、CCL2、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2、CX3CL1、HCC-4、およびLDGF-PBPが挙げられる。例示的实施形態では、ターゲティング部分は、樹状細胞受容体XCR1を認識し、それに結合するケモカインであるXCL1であり得る。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR8を認識し、それに結合するケモカインであるCCL1である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR2またはCCR9を認識し、それに結合するケモカインであるCCL2である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1、CCR5、またはCCR9を認識し、それらに結合するケモカインであるCCL3である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1またはCCR5またはCCR9を認識し、それらに結合するケモカインであるCCL4である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1またはCCR3またはCCR4またはCCR5を認識し、それらに結合するケモカインであるCCL5である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1を認識し、それに結合するケモカインであるCCL6である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR2またはCCR9を認識し、それらに結合するケモカインであるCCL7である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1またはCCR2またはCCR2BまたはCCR5またはCCR9を認識し、それらに結合するケモカインであるCCL8である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1を認識し、それに結合するケモカインであるCCL9である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR1を認識し、それに結合するケモカインであるCCL10である。別の例示的实施形態では、ターゲティング部分は、CCR2またはCCR3またはCCR5またはCCR9を認識し、それらに結合するケモカイン

30

40

50

【 0 2 6 6 】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は F1 t 3 またはその切り詰められた領 50

域などの天然リガンドである。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、F l t 3 の細胞外ドメイン、またはその機能性部分（例えば、同族リガンドまたは受容体にまだ結合できる部分）である。

【0267】

天然リガンドの細胞外ドメインの機能的等価物は、完全長細胞外ドメインの結合能力を保持するN末端および／またはC末端短縮型を包含する。

【0268】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はN G R ペプチドまたはその切り詰められた領域である。

【0269】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のF c ベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上で発現されるチェックポイントマーカー、例えば、PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、Cd27、CD40L、TIM3、およびA2aRの1個または複数に対するターゲティング部分を有する。

【0270】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2の細胞外ドメイン、またはその機能性部分（例えば、同族リガンドまたは受容体にまだ結合できる部分）である。

【0271】

例えば、いくつかの実施形態では、認識ドメインは、B細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、B細胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。目的のB細胞抗原の例としては、例えば、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD70、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138、CDw150、およびB細胞成熟抗原（BCMA）が挙げられる。種々の実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示B細胞抗原に結合する。

【0272】

さらに、例えば、いくつかの実施形態では、認識ドメインは、ナチュラルキラー細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、ナチュラルキラー細胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。目的のナチュラルキラー細胞抗原の例としては、例えば、TIGIT、2B4/SLAMF4、KIR2DS4、CD155/PVR、KIR3DL1、CD94、LMIR1/CD300A、CD69、LMIR2/CD300c、CRACC/SLAMF7、LMIR3/CD300LF、DNAM-1、LMIR5/CD300LB、Fc-イプシロンRII、LMIR6/CD300LE、Fc-γRI/CD64、MICA、Fc-γRIIB/CD32b、MICB、Fc-γRIIC/CD32c、MUL T-1、Fc-γRIIA/CD32a、Nectin-2/CD112、Fc-γRIII/CD16、NKG2A、FcRH1/IRTA5、NKG2C、FcRH2/IRTA4、NKG2D、FcRH4/IRTA1、NKp30、FcRH5/IRTA2、NKp44、Fc-受容体様3/CD16-2、NKp46/NCR1、NKp80/KLRF1、NTB-A/SLAMF6、Rae-1、Rae-1α、Rae-1β、Rae-1δ、H60、Rae-1ε、ILT2/CD85j、Rae-1γ、ILT3/CD85k、TREM-1、ILT4/CD85d、TR

10

20

30

40

50

EM-2、ILT5/CD85a、TREM-3、KIR/CD158、TREML1/TLT-1、KIR2DL1、ULBP-1、KIR2DL3、ULBP-2、KIR2DL4/CD158dおよびULBP-3が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示NK細胞抗原を結合する。

【0273】

また、いくつかの実施形態では、認識ドメインは、マクロファージ/単球に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、マクロファージ/単球を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。目的のマクロファージ/単球抗原の例としては、例えば、SIRP1a、B7-1/CD80、ILT4/CD85d、B7-H1、ILT5/CD85a、共通β鎖、インテグリンα4/CD49d、BLAME/SLAMF8、インテグリンαX/CD11c、CCL6/C10、インテグリンβ2/CD18、CD155/PVR、インテグリンβ3/CD61、CD31/PECAM-1、Latexin、CD36/SR-B3、ロイコトリエンB4R1、CD40/TNFRSF5、LIMPIIISR-B2、CD43、LMIR1/CD300A、CD45、LMIR2/CD300c、CD68、LMIR3/CD300LF、CD84/SLAMF5、LMIR5/CD300LB、CD97、LMIR6/CD300LE、CD163、LRP-1、CD2F-10/SLAMF9、MARCO、CRACC/SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN/CD147、MGL2、エンドグリン/CD105、オステオアクチビン/GPNMB、Fc-γRI/CD64、オステオポンチン、Fc-γRIIB/CD32b、PD-L2、Fc-γRIIC/CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-γRIIA/CD32a、SIGNR1/CD209、Fc-γRIII/CD16、SLAM、GM-CSFRα、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-γR1、TLR4、IFN-γR2、TREM-1、IL-1RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL-10Rα、ALCAM、IL-10Rβ、アミノペプチダーゼN/ANPEP、ILT2/CD85j、共通β鎖、ILT3/CD85k、ClqR1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、インテグリンα4/CD49d、CCR5、インテグリンαM/CD11b、CCR8、インテグリンαX/CD11c、CD155/PVR、インテグリンβ2/CD18、CD14、インテグリンβ3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロイコトリエンB4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、LMIR3/CD300LF、凝固因子III/組織因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSFR、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、エンドグリン/CD105、NCAM-L1、Fc-γRI/CD64、PSGL-1、Fc-γRIIIICD16、RP105、G-CSFR、L-セレクチン、GM-CSFRα、シグレック-3/CD33、HVEM/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL-6R、TREM-2、CXCR1/IL-8RA、TREM-3およびTREML1/TLT-1が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示マクロファージ/単球抗原を結合する。

【0274】

また、いくつかの実施形態では、認識ドメインは、樹状細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、樹状細胞

10

20

30

40

50

胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。目的の樹状細胞抗原の例としては、例えば、CLEC9A、XCR1、RANK、CD36/SRB3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MSR、CD5L、SREC-1、CL-PL/COLEC12、SREC-1I、LIMPIII/SRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBBリガンド/TNFSF9、IL-12/IL-23p40、4-Amino-1、8-ナフタルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckine、ILT3/CD85k、8-oxo-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、lutegrin α 4/CD49d、Aa 10
g、インテグリン β 2/CD18、AMICA、Langerin、B7-2/CD86、ロイコトリエンB4R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、ClqR1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LBCCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAM1、CD2F-10/SLAMF9、Osteoactivin GPNMB、Chern23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、CLEC-8、シグレック-2/CD22、CRACC/SLAMF7、シグレック-3/CD33、DC-SIGN、シグレック-5、DC-SIGNR/CD299、シグレック-6、DCAR、シグレック-7、DCIR/CLEC4A、シグレック-9、DEC-205、シグレック-10、Dectin-1/CLEC7A、シグレック-F、Dectin-2/CLEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCCR/WSX-1、Fc- γ R1/CD64、TLR3、Fc- γ RIIB/CD32b、TREM-1、Fc- γ RIIC/CD32c、TREM-2、Fc- γ RIIA/CD32a、TREM-3、Fc- γ RIII/CD16、TREML1/TLT-1、ICAM-2/CD102、およびバニロイドR1が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示DC抗原を結合する。 20 30

【0275】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、限定されないが、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、またはこれらのサブセットから選択される免疫細胞上の標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、またはこれらのサブセットを、例えば、いくつかの実施形態では、直接または間接的に、治療部位（例えば、1個または複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に局在化させる。

【0276】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、巨核球および／または血小板に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的の巨核球および／または血小板抗原の例としては、例えば、GPIIb/IIIa、GPIb、vWF、PF4、およびTSPが挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示巨核球および／または血小板抗原を結合する。 40

【0277】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、赤血球に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的の赤血球抗原の例としては、例えば、CD34、CD36、CD38、CD41a（血小板糖タンパク質IIb/IIIa）、CD41b（GPIIb）、CD71（トランスフェリン受容体）、CD105、グリコホリンA、グリコ 50

ホリンC、c-kit、HLA-DR、H2 (MHC-I I)、およびRh抗原が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示赤血球抗原を結合する。

【0278】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、マスト細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的のマスト細胞抗原の例としては、例えば、SCFR/CD117、Fc ϵ RI、CD2、CD25、CD35、CD88、CD203c、C5R1、CMA1、FCER1A、FCER2、TPSAB1が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示マスト細胞抗原を結合する。

10

【0279】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、好塩基球に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的の好塩基球抗原の例としては、例えば、Fc ϵ RI、CD203c、CD123、CD13、CD107a、CD107b、およびCD164が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示好塩基球抗原を結合する。

【0280】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、好中球に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的の好中球抗原の例としては、例えば、7D5、CD10/CALLA、CD13、CD16 (FcRIII)、CD18タンパク質 (LFA-1、CR3、およびp150、95)、CD45、CD67、およびCD177が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示好中球抗原を結合する。

20

【0281】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、好酸球に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。目的の好酸球抗原の例としては、例えば、CD35、CD44およびCD69が挙げられる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの例示好酸球抗原を結合する。

【0282】

種々の実施形態では、認識ドメインは、当業者に既知の任意の適切な標的、抗原、受容体または細胞表面マーカーに特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、抗原または細胞表面マーカーは、組織特異的マーカーである。組織特異的マーカーの例としては、ACE、CD14、CD34、CDH5、ENG、ICAM2、MCAM、NOS3、PECAM1、PROCR、SELE、SELP、TEK、THBD、VCAM1、VWFなどの内皮細胞表面マーカー；ACTA2、MYH10、MYH11、MYH9、MYOCなどの平滑筋細胞表面マーカー；ALCAM、CD34、COL1A1、COL1A2、COL3A1、FAP、PH-4などの線維芽細胞（間質）細胞表面マーカー；CD1D、K6IRS2、KRT10、KRT13、KRT17、KRT18、KRT19、KRT4、KRT5、KRT8、MUC1、TACSTD1などの上皮細胞表面マーカー；CD13、TFNA、アルファ ν ベータ3 ($\alpha_{\nu}\beta_3$)、E-セレクトリンなどの新生血管マーカー；およびADIPOQ、FABP4、およびRETNなどの脂肪細胞表面マーカーが挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、1種または複数のこれらの抗原を結合する。

30

40

【0283】

いくつかの実施形態では、認識ドメインは、腫瘍細胞に関連する標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、認識ドメインは、直接または間接的に腫瘍細胞を動員する。例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の直接または間接的動員は、腫瘍細胞を死滅させることができるおよび／または抑制できる1個または複数のエフェクター細胞（例えば、本明細書に記載の免疫細胞）に対するものである。

50

【0284】

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

【0285】

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

【0286】

腫瘍抗原の例としては、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、シクロフィリンb、結腸直腸関連性抗原（CRC）-0017-1A/GA733、癌胎児抗原（CEA）およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異抗原（PSA）およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、MAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、GAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンおよび γ -カテニン、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質（AP

C)、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2
およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、
Smadファミリーの腫瘍抗原、Imp-1、NA、EBV-コード化核内抗原(EBNA
A)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-
40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、c-erbB-
2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD7
0、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、EPCAM、PD-
L1、PD-L2、PMSA、およびBCMA(TNFRSF17)が挙げられるが、こ
れらに限定されない。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲ
ティング部分は、1種または複数のこれらの腫瘍抗原を結合する。ある実施形態では、Fc
ベースキメラタンパク質複合体は、HER2に結合する。別の実施形態では、Fcベース
キメラタンパク質複合体は、PD-L2に結合する。

10

【0287】

種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体の認識ドメインは、
目的の標的(例えば、抗原、受容体)を結合するが、機能的に調節せず、例えば、認識ド
メインは、結合抗体であるか、または結合抗体に類似である。例えば、種々の実施形態で
は、認識ドメインは、抗原または受容体を単に標的とし、抗原または受容体有する生物
学的作用を実質的に阻害、低減または機能的に調節しない。例えば、いくつかの上記の抗
体フォーマット(例えば、完全抗体と比較して)は、アクセスが困難なエピトープを標的
とする能力を有し、より広範囲の特異的結合場面を提供する。種々の実施形態では、認識
ドメインは、その生物活性にとって重要な抗原または受容体部位(例えば、抗原の活性部
位)から物理的に離れたエピトープを結合する。

20

【0288】

このような非中和結合は、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体が直接的にまた
は間接的に活性免疫細胞をエフェクター抗原を介して必要な部位に動員するために用いら
れる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。例えば、種々の実施形態では、
腫瘍を縮小させるまたは除去する方法において、本発明のFcベースキメラタンパク質複
合体を使って、細胞傷害性T細胞をCD8を介して腫瘍細胞に直接的または間接的に動員
し得る(例えば、Fcベースキメラタンパク質複合体は、抗CD8認識ドメインおよび腫
瘍抗原に対する認識ドメインを含み得る)。このような実施形態では、直接的または間接
的にCD8発現細胞傷害性T細胞を動員するがCD8活性を機能的に調節しないのが望ま
しい。これに対して、これらの実施形態では、CD8シグナル伝達は、腫瘍を低減させる
または除去する作用の重要な部分である。さらなる例として、種々の実施形態では、腫
瘍を縮小させるまたは除去する方法において、本発明のFcベースキメラタンパク質複
合体を使って、Clec9Aを介して、直接的または間接的に樹状細胞(DC)を動員する
(例えば、Fcベースキメラタンパク質複合体は、抗Clec9A認識ドメインおよび腫瘍
抗原に対する認識ドメインを含み得る)。このような実施形態では、直接的または間接
的にClec9A発現細胞DCを動員するがClec9A活性を機能的に調節しないのが望
ましい。これに対して、これらの実施形態では、Clec9Aシグナル伝達は、腫瘍を低
減させるまたは除去する作用の重要な部分である。

30

40

【0289】

種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体の認識ドメインは、
免疫調節抗原に結合する(例えば、免疫刺激的または免疫抑制的)。種々の実施形態では
、免疫調節抗原は、4-1BB、OX-40、HVEM、GITR、CD27、CD28
、CD30、CD40、ICOSリガンド; OX-40リガンド、LIGHT(CD25
8)、GITRリガンド、CD70、B7-1、B7-2、CD30リガンド、CD40
リガンド、ICOS、ICOSリガンド、CD137リガンドおよびTL1Aの1種また
は複数である。種々の実施形態では、免疫刺激抗原は、腫瘍細胞上で発現される。種々の
実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体の認識ドメインは、そのよう
な免疫刺激抗原を結合するが、機能的に調節せず、従って、これらの抗原を発現している

50

細胞の動員を、潜在的な腫瘍低減または除去能力の低減または損失なしに可能にする。

【0290】

種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体の認識ドメインは、中和活性を有する2個の認識ドメインを含む、または中和活性を有する1個の認識ドメインおよび非中和（例えば、結合）活性を有する2個の認識ドメインを含む、Fcベースキメラタンパク質複合体に関連する。

【0291】

Clec9Aターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、Clec9Aに特異的に結合できるタンパク質ベース物質であるClec9Aターゲティング部分である。いくつかの実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、Clec9Aの機能的調節（例えば、部分的または完全な中和）を行わずにClec9Aに特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。Clec9Aは、死細胞由来の物質の取込とプロセッシングに特化された樹状細胞のサブセット（すなわち、BDCA₃+樹状細胞）の表面上で発現される5群C型レクチン様受容体（CTLR）である。Clec9Aは、細胞膜が損傷を受けた場合に露出される、有核細胞および無核細胞内の保存された成分を認識する。Clec9Aは、グリコシル化されたダイマーとして細胞表面で発現され、エンドサイトーシスを媒介できるが、食作用は媒介できない。Clec9Aは、Sykキナーゼを動員し炎症促進性サイトカイン産生を誘導できる細胞質免疫受容体チロシンベース活性化モチーフを有する（Huy samen et al. (2008), JBC, 283:16693-701を参照）。

【0292】

種々の実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、Clec9A上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、Clec9A上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、Clec9A上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、Clec9A上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0293】

種々の実施形態では、本発明のClec9Aターゲティング部分は、ヒトClec9Aの完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエーションおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエーション、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む任意の型のヒトClec9Aに結合し得る。ある実施形態では、Clec9A結合物質は、モノマー型のClec9Aに結合する。別の実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、ダイマー型のClec9Aに結合する。さらなる実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、グリコシル化型のClec9Aに結合し、これはモノマーであってもダイマーであってもよい。

【0294】

ある実施形態では、Clec9Aターゲティング部分は、ヒトClec9A上に存在する1個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する。ある実施形態では、ヒトClec9Aは、下記のアミノ酸配列を含む：

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

T G S L R K I K G S Y D Y W V G L S Q D G H S G R W L W Q D G S S P S P G L L P
A E R S Q S A N Q V C G Y V K S N S L L S S N C S T W K Y F I C E K Y A L R S S
V（配列番号26）。

【0295】

種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、特異的結合ができる。種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。

【0296】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（V H H）、単鎖抗体（s c F v）、サメの重鎖のみで構成される抗体（V N A R）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、D A R P i n；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アルファボディ；二環式ペプチド；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；アフィマー；ミクロボディ；アプタマー；a l t e r a s e；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（a r m a d i l l o r e p e a t p r o t e i n）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、F v、F a b、F a b'、F（a b'）₂、ペプチド模倣分子、または小（合成または天然）分子であるターゲティング部分を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7, 417, 130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5, 831, 012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7, 250, 297号、米国特許第6, 818, 418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7, 838, 629号、米国特許第7, 186, 524号、米国特許第6, 004, 746号、米国特許第5, 475, 096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6, 994, 982号、米国特許第6, 794, 144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7, 803, 907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7, 166, 697号に記載されている。S t o r z M A b s. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0297】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、V H Hなどの、単一ドメイン抗体である。V H Hは、例えば、ラクダ類、サメなどのV H H抗体を産生する生物から誘導されるか、またはV H Hは設計によるV H Hであってよい。V H Hは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。V H H技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（V_H H）および2つの定常ドメイン（C H 2およびC H 3）を含む。

【0298】

ある実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、V H Hを含む。いくつかの実施形態では、V H Hは、ヒト化V H Hまたはラクダ化V H Hである。

【0299】

いくつかの実施形態では、V H Hは、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、H U M A B O D Y（C r e s c e n d o B i o l o g i c s, C a m b r i d g e, U K）を含む。いくつかの実施形態では、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、H U M A B O D Yは、一価、二価、または三価である。いくつかの実施形態では、完全ヒトV_Hドメイン、例えば、H U M A B O D Yは、単一特異性、二重特異性、または三重特異性などの単一特異性または多重特異性である。例示的な完全ヒトV_Hドメイン、例えば、H U M A B O D I E Sは、例

えば、国際公開第2016/113555号および国際公開第2016/113557号に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0300】

いくつかの実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHであるターゲティング部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDR間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0301】

種々の実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、CDR1、CDR2、および/またはCDR3配列の少なくとも1つを含む可変ドメインを有するVHHを含む。種々の実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および/またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

【0302】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号27～112から選択される。

【0303】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号113～200から選択される。

【0304】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号201～287、LGR、およびVIKから選択される。

【0305】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号27、配列番号113、および配列番号201を含む。

【0306】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号28、配列番号114、および配列番号202を含む。

【0307】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号29、配列番号115、および配列番号202を含む。

【0308】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号27、配列番号116、および配列番号203を含む。

【0309】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号30、配列番号117、および配列番号205を含む。

【0310】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号31、配列番号118、および配列番号205を含む。

【0311】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号32、配列番号119、および配列番号206を含む。

【0312】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号33、配列番号120、および配列番号207を含む。

【0313】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号33、配列番号120、および配列番号208を含む。

【0314】

代表的実施形態では、C1e c 9 Aターゲティング部分は、配列番号33、配列番号1

10

20

30

40

50

20、および配列番号209を含む。

【0315】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号34、配列番号121、および配列番号210を含む。

【0316】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号35、配列番号122、および配列番号211を含む。

【0317】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号35、配列番号122、および配列番号212を含む。

10

【0318】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号36、配列番号123、および配列番号213を含む。

【0319】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号37、配列番号124、および配列番号214を含む。

【0320】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号38、配列番号125、および配列番号214を含む。

【0321】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号39、配列番号126、および配列番号214を含む。

20

【0322】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号40、配列番号127、および配列番号214を含む。

【0323】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号41、配列番号128、および配列番号214を含む。

【0324】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号42、配列番号128、および配列番号214を含む。

30

【0325】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号43、配列番号129、および配列番号215を含む。

【0326】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号44、配列番号130、およびLGRを含む。

【0327】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号44、配列番号131、およびLGRを含む。

40

【0328】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号44、配列番号132、およびLGRを含む。

【0329】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号45、配列番号133、およびLGRを含む。

【0330】

代表的実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、配列番号46、配列番号134、およびVIKを含む。

【0331】

50

例えば、いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

R 2 C H C L 8（配列番号 2 8 8）；R 1 C H C L 5 0（配列番号 2 8 9）；R 1 C H C L 2 1（配列番号 2 9 0）；R 2 C H C L 8 7（配列番号 2 9 1）；R 2 C H C L 2 4（配列番号 2 9 2）；R 2 C H C L 3 8（配列番号 2 9 3）；R 1 C H C L 1 6（配列番号 2 9 4）；R 2 C H C L 1 0（配列番号 2 9 5）；R 1 C H C L 3 4（配列番号 2 9 6）；R 1 C H C L 8 2（配列番号 2 9 7）；R 2 C H C L 3（配列番号 2 9 8）；R 2 C H C L 6 9（S E Q I D N O：2 9 9）；R 1 C H C L 5 6（配列番号 3 0 0）；R 2 C H C L 3 2（配列番号 3 0 1）；R 2 C H C L 4 9（配列番号 3 0 2）；R 2 C H C L 5 3（配列番号 3 0 3）；R 2 C H C L 2 2（配列番号 3 0 4）；R 2 C H C L 2 5（配列番号 3 0 5）；R 2 C H C L 1 8（配列番号 3 0 6）；R 1 C H C L 2 3（配列番号 3 0 7）；R 1 C H C L 2 7（配列番号 3 0 8）；R 2 C H C L 1 3（配列番号 3 0 9）；R 2 C H C L 1 4（配列番号 3 1 0）；R 2 C H C L 4 2（配列番号 3 1 1）；R 2 C H C L 4 1（配列番号 3 1 2）；R 2 C H C L 9 4（配列番号 3 1 3）；または R 2 C H C L 2 7（配列番号 3 1 4）。

【0 3 3 2】

例えば、いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

1 L E C 7（配列番号 3 1 5）；1 L E C 9（配列番号 3 1 6）；1 L E C 2 6（配列番号 3 1 7）；1 L E C 2 7（配列番号 3 1 8）；1 L E C 2 8（配列番号 3 1 9）；1 L E C 3 0（配列番号 3 2 0）；1 L E C 3 8（配列番号 3 3 3）；1 L E C 4 2（配列番号 3 3 4）；1 L E C 5 1（配列番号 3 3 5）；1 L E C 6 1（配列番号 3 3 6）；1 L E C 6 2（配列番号 3 3 7）；1 L E C 6 3（配列番号 3 3 8）；1 L E C 6 4（配列番号 3 3 9）；1 L E C 7 0（配列番号 3 4 0）；1 L E C 8 4（配列番号 3 4 1）；1 L E C 8 8（配列番号 3 4 2）；1 L E C 9 1（配列番号 3 4 3）；1 L E C 9 2（配列番号 3 4 4）；1 L E C 9 4（配列番号 3 4 5）；2 L E C 6（配列番号 3 4 6）；2 L E C 1 3（配列番号 3 4 7）；2 L E C 1 6（配列番号 3 4 8）；2 L E C 2 0（配列番号 3 4 9）；2 L E C 2 3（配列番号 3 5 0）；2 L E C 2 4（配列番号 3 5 1）；2 L E C 2 6（配列番号 3 5 2）；2 L E C 3 8（配列番号 3 5 3）；2 L E C 4 8（配列番号 3 5 4）；2 L E C 5 3（配列番号 3 5 5）；2 L E C 5 4（配列番号 3 5 6）；2 L E C 5 5（配列番号 3 5 7）；2 L E C 5 9（配列番号 3 5 8）；2 L E C 6 0（配列番号 3 5 9）；2 L E C 6 1（配列番号 3 6 0）；2 L E C 6 2（配列番号 3 6 1）；2 L E C 6 3（配列番号 3 6 2）；2 L E C 6 7（配列番号 3 6 3）；2 L E C 6 8（配列番号 3 6 4）；2 L E C 7 6（配列番号 3 6 5）；2 L E C 8 3（配列番号 3 6 6）；2 L E C 8 8（配列番号 3 6 7）；2 L E C 8 9（配列番号 3 6 8）；2 L E C 9 0（配列番号 3 6 9）；2 L E C 9 3（配列番号 3 7 0）；2 L E C 9 5（配列番号 3 7 1）；3 L E C 4（配列番号 3 7 2）；3 L E C 6（配列番号 3 7 3）；3 L E C 9（配列番号 3 7 4）；3 L E C 1 1（配列番号 3 7 5）；3 L E C 1 3（配列番号 3 7 6）；3 L E C 1 5（配列番号 3 7 7）；3 L E C 2 2（配列番号 3 7 8）；3 L E C 2 3（配列番号 3 7 9）；3 L E C 2 7（配列番号 3 8 0）；3 L E C 3 0（配列番号 3 8 1）；3 L E C 3 6（配列番号 3 8 2）；3 L E C 5 5（配列番号 3 8 3）；3 L E C 5 7（配列番号 3 8 4）；3 L E C 6 1（配列番号 3 8 5）；3 L E C 6 2（配列番号 3 8 6）；3 L E C 6 6（配列番号 3 8 7）；3 L E C 6 9（配列番号 3 8 8）；3 L E C 7 6（配列番号 3 8 9）；3 L E C 8 2（配列番号 3 9 0）；3 L E C 8 9（配列番号 3 9 1）；または 3 L E C 9 4（配列番号 3 9 2）。

【0 3 3 3】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、H H H H H H；配列番号 3 9 3）のない、配列番号 3 1 5～3 2 0 および 3 3 3～3 9 2（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0 3 3 4】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、H A タグ（すなわち、Y P Y D V P D Y G S ; 配列番号 3 9 4）のない配列番号 3 1 5 ~ 3 2 0 および 3 3 3 ~ 3 9 2（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0335】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、A A A リンカー（すなわち、A A A）のない配列番号 3 1 5 ~ 3 2 0 および 3 3 3 ~ 3 9 2（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0336】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ; 配列番号 3 9 5）のない配列番号 3 1 5 ~ 3 2 0 および 3 3 3 ~ 3 9 2（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0337】

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

【0338】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載の C l e c 9 A ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0339】

種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1 つに少なくとも 6 0 % 同一である配列を含む。例えば、C l e c 9 A ターゲティング部分は、本明細書で開示の C l e c 9 A 配列のいずれかに、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 1 %、少なくとも約 6 2 %、少なくとも約 6 3 %、少なくとも約 6 4 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 6 %、少なくとも約 6 7 %、少なくとも約 6 8 %、少なくとも約 6 9 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 1 %、少なくとも約 7 2 %、少なくとも約 7 3 %、少なくとも約 7 4 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 6 %、少なくとも約 7 7 %、少なくとも約 7 8 %、少なくとも約 7 9 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 1 %、少なくとも約 8 2 %、少なくとも約 8 3 %、少なくとも約 8 4 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % 同一（例えば、本明細書で開示の C l e c 9 A 配列のいずれか 1 つに、約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、約 9 9 % または約 1 0 0 % の配列同一性）である配列を含むターゲティング部分を含み得る。

【0340】

種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1 つに対して 1 個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1

つに対して1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、または20個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

【0341】

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

【0342】

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

10

【0343】

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

20

【0344】

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

【0345】

種々の実施形態では、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。代表的非古典的アミノ酸としては、限定されないが、セレノシステイン、ピロールリジン、N-ホルミルメチオニン β -アラニン、GABAおよび δ -アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、共通アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 t -ブチルグリシン、 t -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、 α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般が挙げられる。

30

【0346】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分のCDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域)中にあってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域(FR)(例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域)中にあってよい。

40

【0347】

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

50

いる。

【0348】

種々の実施形態では、変異は、C l e c 9 A に特異的に結合する本発明の C l e c 9 A 結合物質の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、C l e c 9 A に特異的に結合する本発明の C l e c 9 A 結合物質の能力を実質的に低下させず、かつ C l e c 9 A を機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）こともない。

【0349】

種々の実施形態では、ヒト C l e c 9 A の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／またはモノマーおよび／またはダイマー型および／または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に対する C l e c 9 A ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、ヒト C l e c 9 A の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に、約 1 μ M、約 900 nM、約 800 nM、約 700 nM、約 600 nM、約 500 nM、約 400 nM、約 300 nM、約 200 nM、約 100 nM、約 90 nM、約 80 nM、約 70 nM、約 60 nM、約 50 nM、約 40 nM、約 30 nM、約 20 nM、約 10 nM、または約 5 nM、または約 1 nM 未満の K_D で結合する。

【0350】

種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、C l e c 9 A を結合するが、機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。例えば、種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、単に抗原を標的とするが、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害、低減または中和する）しない。種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープに結合する。

【0351】

顕著な機能調節のないこのような結合は、C l e c 9 A ターゲティング部分がエフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するために用いられる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。例えば、種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、腫瘍細胞に C l e c 9 A を介して直接的または間接的に樹状細胞を動員するために使用され得る（例えば、C l e c 9 A 結合物質は、抗 C l e c 9 A 抗原認識ドメインを有するターゲティング部分および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。このような実施形態では、樹状細胞を直接的または間接的に動員するが C l e c 9 A 活性を機能的に調節または中和しないことが望ましい。これらの実施形態では、C l e c 9 A シグナル伝達は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く作用の重要な部分である。

【0352】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、樹状細胞による抗原提示を強化する。例えば、種々の実施形態では、C l e c 9 A ターゲティング部分は、C l e c 9 A を介して樹状細胞を直接または間接的に腫瘍細胞へ動員でき、そこでその後、腫瘍抗原が取り込まれ、強力な体液性および細胞傷害性 T 細胞応答の誘導のために樹状細胞上に提示される。

【0353】

他の実施形態では（例えば、自己免疫または神経変性疾患の治療に関連して）、C l e c 9 A ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、C l e c 9 A を結合し、中和する。例えば、種々の実施形態では、本発明の方法は、例えば、免疫応答を低減させるために

、C l e c 9 A シグナル伝達または発現を阻害または低減し得る。

【0354】

C D 8 ターゲティング部分

種々の実施形態では、ターゲティング部分は、C D 8 に特異的に結合できるタンパク質ベース物質であるC D 8 ターゲティング部分である。種々の実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、C D 8 を機能的に調節する（例えば、部分的なまたは完全な中和を行う）ことなく、C D 8 に特異的に結合できるタンパク質ベース物質である。

【0355】

C D 8 は、ヘテロダイマー I 型膜貫通型糖タンパク質であり、その α および β 鎖は両方が、伸長 O-グリコシル化ストークにより単回通過膜貫通ドメインに連結された免疫グロブリン (I g) 様細胞外ドメインおよび短い細胞質側末端から構成される。C D 8 α 鎖の細胞質領域は、s r c チロシンキナーゼ p 5 6 l c k (L c k) のためのドッキング部位として機能する 2 つのシステインモチーフを含む。対照的に、この L c k 結合ドメインは、C D 8 β 鎖には存在しないように見え、C D 8 β 鎖が下流シグナル伝達に関与しないことを示唆している。C D 8 は、T 細胞受容体に対する共受容体として機能し、その基本的な役割は、M H C への共受容体結合の後、L c k を T C R - p M H C 複合体に動員することである。このキナーゼの局所濃度の増加は、 ζ 鎖結合プロテインキナーゼ 7 0 (Z A P - 7 0) を動員および活性化するシグナル伝達カスケードを活性化し、その後、T 細胞活性化信号の増幅をもたらす。

【0356】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、C D 8 α および / または β 鎖上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、C D 8 α および / または β 鎖上の 1 個または複数の線形エピトープ (l i n e a r e p i t o p e) を認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、C D 8 α および / または β 鎖上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を意味する。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、C D 8 α および / または β 鎖上に存在する 1 個または複数の立体構造エピトープ (c o n f o r m a t i o n a l e p i t o p e) を認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および / または形状および / または三次構造を備えた 3 次元表面を形成する 1 個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0357】

種々の実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、ヒト C D 8 α および / または β 鎖の完全長型および / または成熟型および / またはアイソフォームおよび / またはスプライスバリエントおよび / またはフラグメントおよび / または任意のその他の天然または合成類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む任意の型のヒト C D 8 α および / または β 鎖に結合し得る。ある実施形態では、C D 8 結合物質は、モノマー型の C D 8 α 鎖または C D 8 β 鎖に結合する。別の実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、2 つの C D 8 α 鎖または 2 つの C D 8 β 鎖からなるホモダイマー型に結合する。さらなる実施形態では、C D 8 結合物質は、1 つの C D 8 α 鎖または 1 つの C D 8 β 鎖からなるヘテロダイマー型に結合する。

【0358】

ある実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、ヒト C D 8 α 鎖上に存在する 1 個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、ヒト C D 8 α 鎖は、アイソフォーム 1 のアミノ酸配列（配列番号 3 9 6）を含む。

【0359】

ある実施形態では、ヒト C D 8 α 鎖は、アイソフォーム 2 のアミノ酸配列（配列番号 3 9 7）を含む。

【0360】

ある実施形態では、ヒト C D 8 α 鎖は、アイソフォーム 3 のアミノ酸配列（配列番号 3

10

20

30

40

50

98)を含む。

【0361】

ある実施形態では、CD8ターゲティング部分は、ヒトCD8β鎖上に存在する1個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム1のアミノ酸配列（配列番号399）を含む。

【0362】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム2のアミノ酸配列（配列番号400）を含む。

【0363】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム3のアミノ酸配列（配列番号401）を含む。

【0364】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム4のアミノ酸配列（配列番号402）を含む。

【0365】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム5のアミノ酸配列（配列番号403）を含む。

【0366】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム6のアミノ酸配列（配列番号404）を含む。

【0367】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム7のアミノ酸配列（配列番号405）を含む。

【0368】

ある実施形態では、ヒトCD8β鎖は、アイソフォーム8のアミノ酸配列（配列番号406）を含む。

【0369】

いくつかの実施形態では、CD8ターゲティング部分は、特異的に結合できる。種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。

【0370】

いくつかの実施形態では、CD8ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、CD8ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィリン；アフィマー；マイクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小（合成のまたは天然の）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6

10

20

30

40

50

、 794、144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7、803、907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7、166、697号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0371】

いくつかの実施形態では、CD8ターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン(V_HH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。

10

【0372】

ある実施形態では、CD8ターゲティング部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

【0373】

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

20

【0374】

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

30

【0375】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、CDR1、CDR2、および／またはCDR3配列の少なくとも1つを含む可変ドメインを有するVHHを含む。

【0376】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号407～477から選択される。

【0377】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号478～548から選択される。

【0378】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号549～620から選択される。

40

【0379】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号478、および配列番号549を含む。

【0380】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号478、および配列番号550を含む。

【0381】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号478、および配列番号551を含む。

50

【0382】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号479、および配列番号549を含む。

【0383】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号479、および配列番号550を含む。

【0384】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号407、配列番号479、および配列番号551を含む。

【0385】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号478、および配列番号549を含む。

10

【0386】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号478、および配列番号550を含む。

【0387】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号478、および配列番号551を含む。

【0388】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号479、および配列番号549を含む。

20

【0389】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号479、および配列番号550を含む。

【0390】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、配列番号408、配列番号479、および配列番号551を含む。

【0391】

例えば、いくつかの実施形態では、CD8ターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：R3HCD27（配列番号621）；R3HCD129（配列番号622）；またはR2HCD26（配列番号623）。

30

【0392】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：1CDA7（配列番号624）；1CDA12（配列番号625）；1CDA14（配列番号626）；1CDA15（配列番号627）；1CDA17（配列番号628）；1CDA18（配列番号629）；1CDA19（配列番号630）；1CDA24（配列番号631）；1CDA26（配列番号632）；1CDA28（配列番号633）；1CDA37（配列番号634）；1CDA43（配列番号635）；1CDA45（配列番号636）；1CDA47（配列番号637）；1CDA48（配列番号638）；1CDA58（配列番号639）；1CDA65（配列番号640）；1CDA68（配列番号641）；1CDA73（配列番号642）；1CDA75（配列番号643）；1CDA86（配列番号644）；1CDA87（配列番号645）；1CDA88（配列番号646）；1CDA89（配列番号647）；1CDA92（配列番号648）；1CDA93（配列番号649）；2CDA1（配列番号650）；2CDA5（配列番号651）；2CDA22（配列番号652）；2CDA28（配列番号653）；2CDA62（配列番号654）；2CDA68（配列番号655）；2CDA73（配列番号656）；2CDA74（配列番号657）；2CDA75（配列番号658）；2CDA77（配列番号659）；2CDA81（配列番号660）；2CDA87（配列番号661）；2CDA88（配列番号662）；2CDA89（配列番号663）；2CDA91（配列番号664）；2CDA92（配列番号665）；2CDA

40

50

9 3（配列番号 6 6 6）；2 C D A 9 4（配列番号 6 6 7）；2 C D A 9 5（配列番号 6 6 8）；3 C D A 3（配列番号 6 6 9）；3 C D A 8（配列番号 6 7 0）；3 C D A 1 1（配列番号 6 7 1）；3 C D A 1 8（配列番号 6 7 2）；3 C D A 1 9（配列番号 6 7 3）；3 C D A 2 1（配列番号 6 7 4）；3 C D A 2 4（配列番号 6 7 5）；3 C D A 2 8（配列番号 6 7 6）；3 C D A 2 9（配列番号 6 7 7）；3 C D A 3 1（配列番号 6 7 8）；3 C D A 3 2（配列番号 6 7 9）；3 C D A 3 3（配列番号 6 8 0）；3 C D A 3 7（配列番号 6 8 1）；3 C D A 4 0（配列番号 6 8 2）；3 C D A 4 1（S E Q I D N O：6 8 3）；3 C D A 4 8（配列番号 6 8 4）；3 C D A 5 7（配列番号 6 8 5）；3 C D A 6 5（配列番号 6 8 6）；3 C D A 7 0（配列番号 6 8 7）；3 C D A 7 3（配列番号 6 8 8）；3 C D A 8 3（配列番号 6 8 9）；3 C D A 8 6（配列番号 6 9 0）；3 C D A 8 8（配列番号 6 9 1）；または 3 C D A 9 0（配列番号 6 9 2）。

10

【0 3 9 3】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、H H H H H H；配列番号 3 9 3）のない配列番号 6 2 4～6 9 2（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0 3 9 4】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、H A タグ（すなわち、Y P Y D V P D Y G S；配列番号 3 9 4）のない配列番号 6 2 1～6 9 2（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0 3 9 5】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、A A A リンカー（すなわち、A A A）のない配列番号 6 2 1～6 9 2（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0 3 9 6】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、A A A リンカーおよび H A タグのない配列番号 6 2 1～6 2 3（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0 3 9 7】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H；配列番号 3 9 5）を含まない配列番号 6 2 4～6 9 2（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0 3 9 8】

いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 7 1 4 6 2 号に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。種々の実施形態では、C D 8 結合物質は、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 7 1 4 6 2 号の表 0. 1、表 0. 2、表 0. 3、および／または図 1 A～1 2 I に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。種々の実施形態では、C D 8 ターゲティング部分は、配列番号 6 9 3 または 6 9 4 の H C D R 1 および／または配列番号 6 9 3 または 6 9 4 の H C D R 2 および／または配列番号 6 9 3 または 6 9 4 の H C D R 3 および／または配列番号 6 9 5 の L C D R 1 および／または配列番号 6 9 5 の L C D R 2 および／または配列番号 6 9 5 の L C D R 3 を含む。

40

【0 3 9 9】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載の C D 8 ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。いくつかの実施形態では、C D 8 ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0 4 0 0】

いくつかの実施形態では、C D 8 結合物質は、本明細書で開示の C D 8 配列のいずれか

50

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

【0401】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、本明細書で開示のCD8配列のいずれか1つに対して1個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、CD8結合物質は、本明細書で開示のCD8配列のいずれか1つに対して1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、または20個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含むターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

【0402】

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

【0403】

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

【0404】

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

【0405】

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

て定義される。

【0406】

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

10

【0407】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分のCDR（例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域）中にあってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域（FR）（例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域）中にあってよい。

【0408】

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

20

【0409】

種々の実施形態では、変異は、CD8に特異的に結合するCD8ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、CD8を機能的に調節することなくCD8に特異的に結合するCD8ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。

30

【0410】

種々の実施形態では、ヒトCD8αおよび／またはβ鎖の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび／または会合型を含む）に対するCD8ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付け得る。種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、ヒトCD8αおよび／またはβ鎖の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体（モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび／または会合型を含む）に、約1 μM、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合する。

40

【0411】

種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、CD8を結合するが、これを機能的に調節しない。例えば、種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、単に抗原を標的とするのみであり、抗原を機能的に調節することは実質的

50

に行わず、例えば、抗原が有する生物学的作用を阻害する、低下させる、または中和することは実質的に行わない。種々の実施形態では、CD8ターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

【0412】

このような非機能調節（例えば、非中和）結合は、CD8ターゲティング部分が直接的にまたは間接的に活性免疫細胞をエフェクター抗原を介して必要な部位に動員するのに用いられる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。例えば、種々の実施形態では、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、CD8ターゲティング部分を使って、直接的または間接的にCD8を介して細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞に動員し得る（例えば、CD8結合物質は、抗CD8抗原認識ドメインを有するターゲティング部分および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。このような実施形態では、CD8発現細胞傷害性T細胞を直接的または間接的に動員するが、CD8活性を中和しないのが望ましい。これらの実施形態では、CD8シグナル伝達は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く作用の重要な部分である。

【0413】

PD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合できるタンパク質ベース物質であるPD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分である。いくつかの実施形態では、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、PD-1、PD-L1、またはPD-L2を結合するが、機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。例えば、種々の実施形態では、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分は、単に抗原を標的とするが、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害、低減または中和する）しない。種々の実施形態では、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

【0414】

PD-1ターゲティング部分

プログラム細胞死タンパク質1はPD-1および表面抗原分類279（CD279）としても知られる、活性化T細胞、B細胞、およびマクロファージ上で主に発現される細胞表面受容体である。PD-1は、そのリガンド（PD-L1および／またはPD-L2）の結合時に、抗原受容体シグナル伝達を負に制御することが示されている。PD-1は、免疫系の下方制御およびT細胞炎症活性の抑制による自己寛容の促進において重要な役割を果たす。PD-1は、リガンド結合に関与するIg可変型（V型）ドメインおよびシグナル伝達分子の結合に関与する細胞質側末端を含むI型膜貫通型糖タンパク質である。PD-1の細胞質側末端は、2つのチロシンベースシグナル伝達モチーフ、ITIM（免疫受容抑制性チロシンモチーフ）およびITSM（免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ）を含む。

【0415】

いくつかの実施形態では、PD-1ターゲティング部分は、PD-1上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-1上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、PD-1上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-1上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0416】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、PD-1 の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成の類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、任意の形態のヒト PD-1 に結合し得る。ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、リン酸化型の PD-1 に結合する。

【0417】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、ヒト PD-1 上に存在する 1 個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、ヒト PD-1 は、下記のアミノ酸配列（下線はシグナルペプチド）を含む：

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPA
LLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWMYRMSPPSNQTDKLA
AFPEDRSQPGQDCRFRTVLPLNGRDFHMSVVRARRNDSGT
YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP
RPAGQFQTLVVGVGGLLGSLLVWVLAVICSR AARGTI
GARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREKTPEPPVP
CVPEQTEYATIVFP SGMGTSSSPARRGSADGPRSAQPLRPE
DGHCSWPL（配列番号 696）。

【0418】

別の実施形態では、ヒト PD-1 は、アミノ末端シグナルペプチドのない配列番号 696 のアミノ酸配列を含む。

【0419】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、特異的結合ができる。種々の実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。

【0420】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、抗体の誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィマー；マイクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプチド、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、Fab'）₂、ペプチド模倣分子、または小（合成のまたは天然の）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 7, 417, 130 号、米国特許出願公開第 2004/132094 号、米国特許第 5, 831, 012 号、米国特許出願公開第 2004/023334 号、米国特許第 7, 250, 297 号、米国特許第 6, 818, 418 号、米国特許出願公開第 2004/209243 号、米国特許第 7, 838, 629 号、米国特許第 7, 186, 524 号、米国特許第 6, 004, 746 号、米国特許第 5, 475, 096 号、米国特許出願公開第 2004/146938 号、米国特許出願公開第 2004/157209 号、米国特許第 6, 994, 982 号、米国特許第 6, 794, 144 号、米国特許出願公開第 2010/239633 号、米国特許第 7, 803, 907 号、米国特許出願公開第 2010/119446 号、および／または米国特許第 7, 166, 697 号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0421】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（V_HH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。

【0422】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

10

【0423】

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

20

【0424】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHを含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDR間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0425】

種々の実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および／またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。種々の実施形態では、PD-1 結合物質は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および／またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

30

【0426】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号697～710から選択される。

【0427】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号711～724から選択される。

【0428】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号725～738から選択される。種々の例示的な実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

40

2PD23（配列番号739）；2PD26（配列番号740）；2PD90（配列番号741）；2PD-106（配列番号742）；2PD-16（配列番号743）；2PD71（配列番号744）；2PD-152（配列番号745）；2PD-12（配列番号746）；3PD55（配列番号747）；3PD82（配列番号748）；2PD8（配列番号749）；2PD27（配列番号750）；2PD82（配列番号751）；または3PD36（配列番号752）。

【0429】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、HHHHHH；配列番号393）のない配列番号739～752（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

50

【0430】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、HA タグ（すなわち、YPYDVPDYGS；配列番号394）のない配列番号739～752（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0431】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、AAA リンカー（すなわち、AAA）のない配列番号739～752（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0432】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、AAA リンカー、HA タグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、AAAYPYDVPDYGS HHHHHH；配列番号395）を含まない配列番号739～752（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0433】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載のPD-1 ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0434】

いくつかの実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、抗PD-1 抗体ペムブロリズマブ（別名MK-3475、キイトルーダ）、またはそのフラグメントを含む。ペムブロリズマブおよびその他のヒト化抗PD-1 抗体は、Hamid, et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2) : 134-44, US 8, 354, 509、および国際公開第2009/114335号に開示されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのペムブロリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号753のアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号754のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0435】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、抗PD-1 抗体、ニボルバム（別名BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、オプジーボ）、またはそのフラグメントを含む。PD-1 に特異的に結合するニボルバム（クローン5C4）およびその他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号および国際公開第2006/121168号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、ニボルバムまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号755のアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号756のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0436】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、抗PD-1 抗体ピディリズマブ（別名CT-011、hBATまたはhBAT-1）、またはそのフラグメントを含む。ピディリズマブおよびその他のヒト化抗PD-1 モノクローナル抗体は、米国特許出願公開第2008/0025980号および国際公開第2009/101611号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗PD-1 抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2008/0025980号の配列番号15～18（本出願の配列番号757～760）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および／または米国特許出願公開第2008/0025980号の配列番号20～24（本出願の配列番号761～765）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

40

【0437】

50

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 1 8 (配列番号 7 6 0) を含む軽鎖および米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 5 9 8 0 号の配列番号 2 2 (配列番号 7 6 3) を含む重鎖を含む。

【0438】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、AMP-514 (別名 MEDI-0680) を含む。

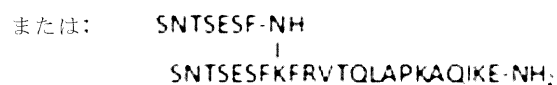
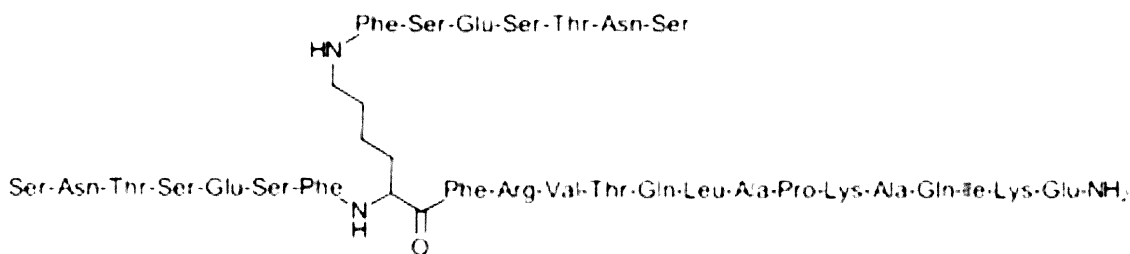
【0439】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、pd-12-Fc 融合タンパク質 AMP-224 を含み、これは、国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号および同第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 4 2 号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、ターゲティング部分は、国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号の配列番号 4 (本出願の配列番号 7 6 6) を含むターゲティングドメインおよび/または国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号の配列番号 8 3 (本出願の配列番号 7 6 7) を含む B7-DC 融合タンパク質を含み得る。

【0440】

ある実施形態では、PD-1 ターゲティング部分は、ペプチド AUNP12 または米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 8 3 7 3 号または米国特許第 8, 9 0 7, 0 5 3 号に開示のいずれかの他のペプチドを含む。例えば、ターゲティング部分は、AUNP12 (すなわち、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 8 3 7 3 号の化合物 8 または配列番号 4 9) を含み得、これは、下記配列を有する：

【化 2】



【0441】

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

【0442】

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

【0443】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号に開示のように、PD-1 ターゲティング部分は、抗 PD-1 抗体 1 H 3 またはそのフラグメントを含む。

この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1H3またはその抗原結合フラグメントは、配列番号772のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号773のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0444】

ある実施形態では、PD-1ターゲティング部分は、例えば、米国特許第8,907,065号および国際公開第2008/071447号に開示のように、PD-1に対するVHHを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-1に対するVHHは、米国特許第8,907,065号の配列番号347～351（配列番号774～778）を含む。

10

【0445】

ある実施形態では、PD-1ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2011/0271358号および国際公開第2010/036959号に開示のように、抗PD-1抗体またはそのフラグメントのいずれか1種を含み、これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号25～29（本出願の配列番号779～783）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号30～33（本出願の配列番号784～787）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0446】

いくつかの実施形態では、PD-1ターゲティング部分は、TSR-042（Tesarro, Inc.）、REGN2810（Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）、PDR001（Novartis Pharmaceuticals）、およびBGB-A317（BeiGene Ltd.）から選択されるPD-1に対する抗体、またはその抗体フラグメントである。

【0447】

一実施形態では、ターゲティング部分は、PD-1に結合し、シグナル伝達部分は、野生型IFN α または改変型IFN α である。いくつかの実施形態では、Fcキメラタンパク質は、図4A～4Dに示す構造の1つであり、ターゲティング部分はPD-1に結合し、シグナル伝達部分は野生型IFN α である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、PD-1に結合し（例えば、scFv）、シグナル伝達部分は、野生型IFN α 2である。

30

【0448】

PD-L1ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はPD-L1ターゲティング部分である。プログラム死リガンド1（PD-L1）は、表面抗原分類274（CD274）またはB7ホモログ1（B7-H1）としても知られ、免疫系の抑制に大きな役割を果たすと推測されている1型膜貫通タンパク質である。PD-L1は、LPSおよびGM-CSF処理に応答してマクロファージおよび樹状細胞（DC）上で、ならびにTCRおよびB細胞受容体シグナル伝達時にT細胞およびB細胞上で発現上昇される。

40

【0449】

種々の実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、PD-L1上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-L1上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、PD-L1上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-L1上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指

50

す。

【0450】

種々の実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、ヒトPD-L1 の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエーションおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成類似体、バリエーション、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、任意の形態のヒトPD-L1 に結合し得る。ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、リン酸化型のPD-L1 に結合する。ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、アセチル化型のPD-L1 に結合する。

【0451】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、ヒトPD-L1 上に存在する1個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、ヒトPD-L1 は、下記のアミノ酸配列（下線はシグナルペプチド）を含む：

アイソフォーム1：

MRIFAVFIFMTYWHL LNAFTVTVPKDL YVVEYGSNMTIEC
KFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVQHSS
YRQRARLLKDKQLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG
ADYKRITVKVNAPY NKINQRILVVD PVTSEHELT CQAEGY
PKAEVIWTS SDHQVLSGKT TTTTNSKREEK LFNVTSTLRIN
TTTNEIF YCTFRRLDPEENHTAELV IPELPLAHP PNERTH
LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSK
KQSDTHLEET（配列番号788）；

アイソフォーム2：

MRIFAVFIFMTYWHL LNAPY NKINQRILVVD PVTSEHELT
CQAEGY PKAEVIWTS SDHQVLSGKT TTTTNSKREEK LFNVT
STLRINTTTTNEIF YCTFRRLDPEENHTAELV IPELPLAHP
PNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI
QDTNSK KQSDTHLEET（配列番号789）；または

アイソフォーム3：

MRIFAVFIFMTYWHL LNAFTVTVPKDL YVVEYGSNMTIEC
KFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVQHSS
YRQRARLLKDKQLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG
ADYKRITVKVNAPY NKINQRILVVD PVTSEHELT CQAEGY
PKAEVIWTS SDHQVLSGD（配列番号790）。

【0452】

種々の実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、特異的結合ができる。種々の実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、抗体を含む。

【0453】

いくつかの実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィリン；アフィマー；マイクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペブボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F（

10

20

30

40

50

a b')₂、ペプチド模倣分子、または小（合成または天然）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7, 417, 130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5, 831, 012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7, 250, 297号、米国特許第6, 818, 418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7, 838, 629号、米国特許第7, 186, 524号、米国特許第6, 004, 746号、米国特許第5, 475, 096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6, 994, 982号、米国特許第6, 794, 144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7, 803, 907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7, 166, 697号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

10

【0454】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（V_HH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。

20

【0455】

ある実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

【0456】

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

30

【0457】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHを含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0458】

種々の実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および／またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。種々の実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および／またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

40

【0459】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号791～821から選択される。

【0460】

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号822～852から選択される。

【0461】

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号853～883から選択される。

50

【0462】

種々の例示的实施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2LIG2（配列番号884）；2LIG3（配列番号885）；2LIG16（配列番号886）；2LIG22（配列番号887）；2LIG27（配列番号888）；2LIG29（配列番号889）；2LIG30（配列番号890）；2LIG34（配列番号891）；2LIG35（配列番号892）；2LIG48（配列番号893）；2LIG65（配列番号894）；2LIG85（配列番号895）；2LIG86（配列番号896）；2LIG89（配列番号897）；2LIG97（配列番号898）；2LIG99（配列番号899）；2LIG109（配列番号900）；2LIG127（配列番号901）；2LIG139（配列番号902）；2LIG176（配列番号903）；2LIG189（配列番号904）；3LIG3（配列番号905）；3LIG7（配列番号906）；3LIG8（配列番号907）；3LIG9（配列番号908）；3LIG18（配列番号909）；3LIG20（配列番号910）；3LIG28（配列番号911）；3LIG29（配列番号912）；3LIG30（配列番号913）；または3LIG33（配列番号914）。

10

【0463】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、HHHHHH；配列番号393）のない配列番号884～914（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0464】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、HAタグ（すなわち、YPYDVPDYGS；配列番号394）を含まない配列番号884～914（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0465】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、AAAリンカー（すなわち、AAA）を含まない配列番号884～914（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0466】

いくつかの実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、AAAYPYDVPDYGSHHHHHH；配列番号395）を含まない配列番号884～914（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0467】

ある実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体MED I 4736（別名デュルバルマブ）、またはそのフラグメントを含む。MED I 4736は、PD-L1に対し選択的であり、PD-L1のPD-1およびCD80受容体に対する結合を阻止する。本明細書で提供される方法で使用するためのMED I 4736およびその抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖または重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。MED I 4736の配列は、国際公開第2016/06272号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのMED I 4736またはその抗原結合フラグメントは、配列番号915のアミノ酸配列を含む重鎖および／または配列番号916のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

40

【0468】

例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのMED I 4736またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2016/06272号の配列番号4（配列番号917）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2016/06272号の配列番号3（配列番号918）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0469】

50

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、抗PD-L1 抗体アテゾリズマブ（別名MPDL3280A、RG7446）、またはそのフラグメントを含む。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号919のアミノ酸配列を含む重鎖；および／または配列番号920のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0470】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、抗PD-L1 抗体アベルマブ（別名MSB0010718C）、またはそのフラグメントを含む。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号921のアミノ酸配列を含む重鎖；および／または配列番号922のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

【0471】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1 抗体BMS-936559（別名12A4、MDX-1105）、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのBMS-936559またはその抗原結合フラグメントは、配列番号923のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号924のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0472】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1 抗体3G10、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための3G10またはその抗原結合フラグメントは、配列番号925のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号926のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0473】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1 抗体10A5、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための10A5またはその抗原結合フラグメントは、配列番号927のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号928のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0474】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1 抗体5F8、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための5F8またはその抗原結合フラグメントは、配列番号929のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号930のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0475】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1 抗体10H10、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的実施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための10H10またはその抗原結合フラグメントは、配列番号931のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号932のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0476】

50

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2013/0309250 号および国際公開第 2007/005874 号に開示のように、PD-L1 ターゲティング部分は、抗 PD-L1 抗体 1B12、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1B12 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 933 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 934 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0477】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2013/0309250 号および国際公開第 2007/005874 号に開示のように、PD-L1 ターゲティング部分は、抗 PD-L1 抗体 7H1、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための 7H1 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 935 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 936 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0478】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2013/0309250 号および国際公開第 2007/005874 号に開示のように、PD-L1 ターゲティング部分は、抗 PD-L1 抗体 11E6、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 11E6 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 937 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 938 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0479】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2013/0309250 号および国際公開第 2007/005874 号に開示のように、抗 PD-L1 抗体 12B7、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 12B7 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 939 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 940 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0480】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2013/0309250 号および国際公開第 2007/005874 号に開示のように、抗 PD-L1 抗体 13G4、またはそのフラグメントを含む。これら特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 13G4 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 941 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 942 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0481】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2014/0044738 号に開示のように、PD-L1 ターゲティング部分は、抗 PD-L1 抗体 1E12 またはそのフラグメントを含む。この特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1E12 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 943 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 944 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0482】

ある実施形態では、米国特許出願公開第 2014/0044738 号に開示のように、PD-L1 ターゲティング部分は、抗 PD-L1 抗体 1F4 またはそのフラグメントを含む。この特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための 1F4 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 945 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号 946 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

50

【0483】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2G11またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2G11またはその抗原結合フラグメントは、配列番号947のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号948のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0484】

ある実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、抗PD-L1抗体3B6、またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3B6またはその抗原結合フラグメントは、配列番号949のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号950のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0485】

ある実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2014/0044738号および国際公開第2012/145493号に開示のように、抗PD-L1抗体3D10、またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3D10またはその抗原結合フラグメントは、配列番号951のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号952のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0486】

ある実施形態では、PD-L1ターゲティング部分は、米国特許出願公開第2011/0271358号および国際公開第2010/036959号に開示のいずれか1種の抗PD-L1抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号34～38（配列番号953～957）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号39～42（配列番号958～961）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0487】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.7A4またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.7A4またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号2（配列番号962）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号7（配列番号963）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0488】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.9D10またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.9D10またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号12（配列番号964）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号17（配列番号965）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0489】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.14H9またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.14H9またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号22（配列番号966）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号27（配列番号967）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0490】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.20A8またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.20A8またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号32（配列番号968）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号37（配列番号969）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0491】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体3.15G8またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3.15G8またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号42（配列番号970）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号47（配列番号971）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0492】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体3.18G1またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3.18G1またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号52（配列番号972）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号57（配列番号973）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0493】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.7A4OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.7A4OPTまたはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号62（配列番号974）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号67（配列番号975）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0494】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、PD-L1ターゲティング部分は、抗PD-L1抗体2.14H9OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.14H9OPTまたはその抗原

10

20

30

40

50

結合フラグメントは、国際公開第 2011/066389 号の配列番号 72（配列番号 976）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第 2011/066389 号の配列番号 77（配列番号 977）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0495】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、国際公開第 2016/061142 号に開示されるいずれか 1 種の抗 PD-L1 抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2016/061142 号の配列番号 18、30、38、46、50、54、62、70、および 78（それぞれ、
10
配列番号 978、979、980、981、982、983、984、985、および 986）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または国際公開第 2016/061142 号の配列番号 22、26、34、42、58、66、74、82、および 86（それぞれ、配列番号 987、988、989、990、991、992、993、994、および 995）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0496】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、国際公開第 2016/022630 号に開示されるいずれか 1 種の抗 PD-L1 抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2016/022630 号
20
の配列番号 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、および 46（それぞれ、配列番号 996、997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、および 1007）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または国際公開第 2016/022630 号の配列番号 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、および 48（それぞれ、配列番号 1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、および 1019）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0497】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、国際公開第 2015/112900 号に開示されるいずれか 1 種の抗 PD-L1 抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2015/112900 号
30
の配列番号 38、50、82、および 86（それぞれ、配列番号 1020、1021、1022、および 1023）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または国際公開第 2015/112900 号の配列番号 42、46、54、58、62、66、70、74、および 78（それぞれ、配列番号 1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、および 1032）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0498】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、国際公開第 2010/077634 号および米国特許第 8,217,149 号に開示されるいずれか 1 種の抗 PD-L1 抗体を含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗 PD-L1 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2010/077634 号の配列番号 20（配列番号 1033）のアミノ酸配列を含む重鎖領域；および／または国際公開第 2010/077634 号の配列番号 21（配列番号 1034）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 20120039906 号に開示されているように、CN CM 受託番号 CN CM I-4122、CN CM I-4080 および CN CM I-4081 により入手可能なハイブリドーマから得るこ
40
50

とができるいずれか 1 種の抗 PD-L1 抗体を含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0499】

ある実施形態では、PD-L1 ターゲティング部分は、例えば、米国特許第 8,907,065 号および国際公開第 2008/071447 号に開示のように、PD-L1 抗体に向けられた VHH を含む。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-L1 に対する VHH は、米国特許第 8,907,065 号の配列番号 394~399 (それぞれ、配列番号 1035~1040) を含む。

【0500】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、PD-L1 に結合し、シグナル伝達部分は、野生型 IFN α または改変型 IFN α である。いくつかの実施形態では、Fc キメラタンパク質は、図 4A~4D に示す形式の 1 つであり、ターゲティング部分は PD-L1 に結合し、シグナル伝達部分は野生型 IFN α である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、PD-L1 に結合し (例えば、scFv)、シグナル伝達部分は、野生型 IFN α 2 である。

【0501】

PD-L2 ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は PD-L2 に対する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は PD-L2 ポリペプチドを選択的に結合する。いくつかの実施形態では、PD-L2 ターゲティング部分は、PD-L2 ポリペプチドを選択的に結合する抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質を含む。

【0502】

ある実施形態では、PD-L2 ターゲティング部分は、例えば、米国特許第 8,907,065 号および国際公開第 2008/071447 号に開示のように、PD-L2 に向けられた VHH を含む。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-L2 に対する VHH は、米国特許第 8,907,065 号の配列番号 449~455 (それぞれ、配列番号 1041~1047) を含む。

【0503】

ある実施形態では、PD-L2 ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2011/0271358 号および国際公開第 2010/036959 号に開示のいずれか 1 種の抗 PD-L2 抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 43~47 (それぞれ、配列番号 1048~1052) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖; および/または米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 48~51 (それぞれ、配列番号 1053~1056) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0504】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載の PD-1、PD-L1、または PD-L2 ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、ホモログおよびオルソログ (本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ) の使用を意図している。いくつかの実施形態では、PD-1、PD-L1、または PD-L2 ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0505】

種々の実施形態では、本明細書で開示の PD-1、PD-L1、または PD-L2 ターゲティング部分は、本明細書で開示の PD-1、PD-L1、および/または PD-L2 配列のいずれかに少なくとも約 60%、少なくとも約 61%、少なくとも約 62%、少なくとも約 63%、少なくとも約 64%、少なくとも約 65%、少なくとも約 66%、少なくとも約 67%、少なくとも約 68%、少なくとも約 69%、少なくとも約 70%、少な

10

20

30

40

50

くとも約 71 %、少なくとも約 72 %、少なくとも約 73 %、少なくとも約 74 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 76 %、少なくとも約 77 %、少なくとも約 78 %、少なくとも約 79 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 81 %、少なくとも約 82 %、少なくとも約 83 %、少なくとも約 84 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 86 %、少なくとも約 87 %、少なくとも約 88 %、少なくとも約 89 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % 同一（例えば、本明細書で開示の PD-1、PD-L1、および／または PD-L2 配列のいずれかと約 60 %、または約 61 %、または約 62 %、または約 63 %、または約 64 %、または約 65 %、または約 66 %、または約 67 %、または約 68 %、または約 69 %、または約 70 %、または約 71 %、または約 72 %、または約 73 %、または約 74 %、または約 75 %、または約 76 %、または約 77 %、または約 78 %、または約 79 %、または約 80 %、または約 81 %、または約 82 %、または約 83 %、または約 84 %、または約 85 %、または約 86 %、または約 87 %、または約 88 %、または約 89 %、または約 90 %、または約 91 %、または約 92 %、または約 93 %、または約 94 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、約 99 % または約 100 % の配列同一性）である、PD-1、PD-L1、または PD-L2 を標的とする配列を含む。

10

【0506】

種々の実施形態では、PD-1、PD-L1、または PD-L2 ターゲティング部分は、本明細書で開示の PD-1、PD-L1、または PD-L2 配列のいずれか 1 つに対して 1 個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む結合物質を含む。種々の実施形態では、PD-1、PD-L1、または PD-L2 ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1 つに対して 1 個、または 2 個、または 3 個、または 4 個、または 5 個、または 6 個、または 7 個、または 8 個、または 9 個、または 10 個、または 15 個、または 20 個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む結合物質を含む。いくつかの実施形態では、1 個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

20

【0507】

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

30

【0508】

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

40

【0509】

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

【0510】

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

【0511】

50

種々の実施形態では、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。代表的非古典的アミノ酸としては、限定されないが、セレノシステイン、ピロールリジン、N-ホルミルメチオニンβ-アラニン、GABAおよびδ-アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、共通アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β-アラニン、フルオロアミノ酸、βメチルアミノ酸などのデザイナアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、Nα-メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般が挙げられる。

10

【0512】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分のCDR（例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域）中にあってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域（FR）（例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域）中にあってよい。

【0513】

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

20

【0514】

種々の実施形態では、変異は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合するPD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合するPD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分の能力を実質的に低下させず、PD-1、PD-L1、またはPD-L2を機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。

30

【0515】

種々の実施形態では、ヒトPD-1、PD-L1、またはPD-L2の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／またはモノマーおよび／またはダイマー型および／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に対するPD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数(K_D)により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ターゲティング部分は、ヒトPD-1、PD-L1、またはPD-L2の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に、約1 μM、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合する。

40

【0516】

種々の実施形態では、本明細書で開示のPD-1、PD-L1、および／またはPD-L2ターゲティング部分は、本明細書で開示のPD-1、PD-L1、および／またはP

50

D-L2を標的とする重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域（CDR）、およびフレームワーク領域配列のいずれかの組み合わせを含み得る。

【0517】

PD-1、PD-L1および／またはPD-L2を選択的に結合するまたは標的にする追加の抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチドまたは融合タンパク質は、国際公開第2011/066389号、米国特許出願公開第2008/0025980号、米国特許出願公開第2013/0034559号、米国特許第8,779,108号、米国特許出願公開第2014/0356353号、米国特許第8,609,089号、米国特許出願公開第2010/028330号、米国特許出願公開第2012/0114649号、国際公開第2010/027827号、国際公開第2011/066342号、米国特許第8,907,065号、国際公開第2016/062722号、国際公開第2009/101611号、国際公開第2010/027827号、国際公開第2011/066342号、国際公開第2007/005874号、国際公開第2001/014556号、米国特許出願公開第2011/0271358号、国際公開第2010/036959号、国際公開第2010/077634号、米国特許第8,217,149号、米国特許出願公開第2012/0039906号、国際公開第2012/145493号、米国特許出願公開第2011/0318373号、米国特許第8,779,108号、米国特許出願公開第2014/0044738号、国際公開第2009/089149号、国際公開第2007/00587号、国際公開第2016/061142号、国際公開第2016/02263号、国際公開第2010/077634号、および国際公開第2015/112900号で開示されている。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

SIRP1 α ターゲティング部分

【0518】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、シグナル調節タンパク質 $\alpha 1$ （SIRP1 α ）を選択的に結合する。SIRP1 α （SIRP α としても知られる）は、阻害性（SIRP α ）、活性化（SIRP β ）、非シグナル伝達（SIRP γ ）および可溶性（SIRP δ ）メンバーを包含する細胞免疫受容体ファミリーに属する。SIRP1 α は、主に、マクロファージ、顆粒球、骨髄細胞（DC）、マスト細胞、および造血幹細胞を含むそれらの前駆物質で発現される。SIRP1 α は、広範に発現した膜貫通型糖タンパク質CD47と相互作用して食作用を調節する抑制性受容体として作用する。特に、標的細胞上に発現されるCD47によるマクロファージ上のSIRP1 α の結合は、標的細胞の食作用を負に調節する抑制シグナルを生成する。

30

【0519】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、マクロファージ上のSIRP1 α を特異的に認識し、結合する。

【0520】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、単球上のSIRP1 α を特異的に認識し、結合する。

【0521】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、TAM（腫瘍関連マクロファージ）上のSIRP1 α を特異的に認識し、結合する。

40

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、限定されないが、cDC2およびpDCを含む樹状細胞上のSIRP1 α を特異的に認識し、結合する。

【0522】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α 上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、SIRP1 α 上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、SIRP1 α 上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインによ

50

り認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0523】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成の類似体、バリエント、または変異体に結合する。ある実施形態では、SIRP1 α はヒトSIRP1 α である。種々の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む、任意の形態のヒトSIRP1 α に結合し得る。ある実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、モノマー型のSIRP1 α に結合する。別の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、ダイマー型のSIRP1 α に結合する。

10

【0524】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、ヒトSIRP1 α 上に存在する1個または複数のエピトープを認識する認識ドメインを含む。ある実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、シグナルペプチド配列を有するヒトSIRP1 α を認識する認識ドメインを含む。シグナルペプチド配列を有する代表的ヒトSIRP1 α ポリペプチドは、配列番号1057である。

【0525】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、シグナルペプチド配列のないヒトSIRP1 α を認識する認識ドメインを含む。シグナルペプチド配列のない代表的ヒトSIRP1 α ポリペプチドは、配列番号1058である。

20

【0526】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、ヒトSIRP1 α アイソフォーム2（配列番号1059）をコードするポリペプチドを認識する認識ドメインを含む。

【0527】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、ヒトSIRP1 α アイソフォーム4（配列番号1060）をコードするポリペプチドを認識する認識ドメインを含む。

30

【0528】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの、特異的結合の可能な任意のタンパク質ベース物質であり得る。

【0529】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、例えば、限定なしに、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィリン；ミクロボディ；ペプチドアプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペブボディ、ワクシボディ、ユニボディ；アフィマー；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小（合成のまたは天然の）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第200

40

50

4 / 2 0 9 2 4 3 号、米国特許第 7, 8 3 8, 6 2 9 号、米国特許第 7, 1 8 6, 5 2 4 号、米国特許第 6, 0 0 4, 7 4 6 号、米国特許第 5, 4 7 5, 0 9 6 号、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 1 4 6 9 3 8 号、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 1 5 7 2 0 9 号、米国特許第 6, 9 9 4, 9 8 2 号、米国特許第 6, 7 9 4, 1 4 4 号、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 2 3 9 6 3 3 号、米国特許第 7, 8 0 3, 9 0 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 1 1 9 4 4 6 号、および／または米国特許第 7, 1 6 6, 6 9 7 号に記載されている。Storz Mabs. 2011 May-Jun; 3 (3): 310-317、も参照されたい。

【0530】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、例えば、ラクダ類、サメなどの VHH 抗体を産生する生物由来の VHH、または設計された VHH などの単ドメイン抗体を含む。VHH は、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH 技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン (VHH) および 2 つの定常ドメイン (CH2 および CH3) を含む。

【0531】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、VHH を含む。いくつかの実施形態では、VHH は、ヒト化 VHH またはラクダ化 VHH である。

【0532】

いくつかの実施形態では、VHH は、完全ヒト V_H ドメイン、例えば、HUMABODY (Crescendo Biologics, Cambridge, UK) を含む。いくつかの実施形態では、完全ヒト V_H ドメイン、例えば、HUMABODY は、一価、二価、または三価である。いくつかの実施形態では、完全ヒト V_H ドメイン、例えば、HUMABODY は、単一特異性、二重特異性、または三重特異性などの単一特異性または多重特異性である。例示完全ヒト V_H ドメイン、例えば、HUMABODIES は、例えば、国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 3 5 5 5 号および国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 3 5 5 7 号に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0533】

例えば、いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α を選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、VHH、または融合タンパク質の内の 1 種または複数を含む。いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α に特異的に結合する抗体またはこれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α に特異的に結合するラクダ類重鎖抗体 (VHH) を含む。

【0534】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、4 つの「フレームワーク領域」または FR および 3 つの「相補性決定領域」または CDR を有する単一アミノ酸鎖を含む VHH であるターゲティング部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDR の間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含む VHH 中の可変領域を指す。種々の実施形態では、本発明の Fc ベースキメラタンパク質複合体は、少なくとも 1 つの CDR1、CDR2、および／または CDR3 配列を含む可変ドメインを有する VHH を含む。

【0535】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α を認識およびそれに結合することが既知である、重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域 (CDR)、およびフレームワーク領域配列のいずれかの組み合わせを含み得る。

【0536】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載の SIRP1 α ターゲティング部

10

20

30

40

50

分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0537】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、本明細書で開示の SIRP1 α 配列のいずれか1つに少なくとも60%同一である配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、本明細書で開示の SIRP1 α 配列のいずれかに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示の SIRP1 α 配列のいずれか1つに、約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、約99%または約100%の配列同一性）である配列を含む。

10

20

【0538】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α を認識し、結合することが既知のいずれかのターゲティング部分配列に対して1個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α を認識し、結合することが既知のいずれかのターゲティング部分配列に対して、1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、20個、30個、40個、または50個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

30

【0539】

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

40

【0540】

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

【0541】

50

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

【0542】

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

【0543】

種々の実施形態では、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。代表的非古典的アミノ酸としては、限定されないが、セレノシステイン、ピロールリジン、N-ホルミルメチオニン β -アラニン、GABAおよび δ -アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、共通アミノ酸のD-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β メチルアミノ酸などのデザイナアミノ酸、C α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般が挙げられる。

【0544】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分のCDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域)中にあってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域(FR)(例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域)中にあってよい。

【0545】

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

【0546】

種々の実施形態では、変異は、SIRP1 α を特異的に認識し、それに結合するSIRP1 α ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、SIRP1 α に特異的に結合するSIRP1 α ターゲティング部分の能力を実質的に低下させず、また、SIRP1 α を機能的に調節する(例えば、部分的にまたは完全に中和する)こともない。

【0547】

種々の実施形態では、SIRP1 α の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/またはモノマーおよび/またはダイマー型および/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体に対するSIRP1 α ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数(K_D)により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、SIRP1 α の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、バリエント、または変異体(モノマーお

10

20

30

40

50

よび／またはダイマー型を含む)に、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合する。

【0548】

種々の実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、SIRP1 α に結合するが、これを機能的に調節しない。例えば、いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、抗原を単に標的とし、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、実質的に阻害、低減または中和する）しない。種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

10

【0549】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、SIRP1 α を結合するが、しかし、機能的に調節する。例えば、いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、抗原、すなわち、SIRP1 α を標的とし、かつ抗原が有する生物学的作用を機能的に調節する（例えば、阻害、低減または中和する）。このような結合は、機能的調節と共に、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体がエフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するのに用いられる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。

20

【0550】

いくつかの実施形態では、SIRP1 α ターゲティング部分は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、腫瘍細胞へSIRP1 α を介して直接的または間接的にマクロファージを動員するために使用され得る（例えば、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、抗SIRP1 α 抗原認識ドメインを有するターゲティング部分および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。証拠は、腫瘍細胞がCD47を頻繁に上方制御し、それは食作用を回避するようにSIRP1 α を関与させることを示す。従って、種々の実施形態では、直接または間接的にマクロファージを腫瘍細胞に動員し、SIRP1 α の阻害活性を阻害、低減、または中和し、それによりマクロファージによる腫瘍細胞の食作用を生じさせることが望ましいであろう。種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、マクロファージによる腫瘍細胞または任意の他の望ましくない細胞の食作用を強化する。

30

【0551】

SIRPアルファターゲティング部分は、国際公開第200140307A1号、国際公開第2013056352A1号、国際公開第2015138600A2号、国際公開第2017178653A2号、国際公開第2018057669A1号、国際公開第2018107058A1号、国際公開第2018190719A2号、国際公開第2019023347A1号に記載の抗体のCDRを含み得る。これらの特許の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0552】

FAPターゲティング部分

線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）は、セリンプロテアーゼファミリーに属する170 kDaの黒色腫膜結合型ゼラチナーゼである。FAPは、上皮癌の反応性間質線維芽細胞、回復期創傷の肉芽組織、および骨および軟組織肉腫の悪性細胞で選択的に発現される。FAPは、発達、組織修復、および上皮発癌の間の線維芽細胞成長または上皮-間葉系相互作用の制御に関与すると考えられている。

【0553】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、FAPに特異的に結合できるタンパ

50

ク質ベース物質であるFAPターゲティング部分である。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、FAPの機能的調節（例えば、部分的または完全な中和）を行わずにFAPに特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。

【0554】

いくつかの実施形態では、線維芽細胞ターゲティング部分は、F2線維芽細胞を標的にする。いくつかの実施形態では、線維芽細胞ターゲティング部分は、F2線維芽細胞の微小環境を直接または間接的に変える。いくつかの実施形態では、線維芽細胞結合物質は、F2線維芽細胞をF1線維芽細胞に直接または間接的に分極させる。

【0555】

F2線維芽細胞は、腫瘍形成促進（または腫瘍促進）癌関連線維芽細胞（CAF）（a/k/a I I型-CAF）を指す。F1線維芽細胞は、腫瘍抑制性CAF（a/k/a I型-CAF）を指す。分極は、細胞の表現型を変更すること、例えば、腫瘍原性F2線維芽細胞を腫瘍抑制性F1線維芽細胞に変更することを指す。

【0556】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、FAPマーカを標的にする。

【0557】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、FAP上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する結合物質を含む。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、FAP上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、FAP上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、FAP上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および/または形状および/または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0558】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、FAPの完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意の他の天然または合成の類似体、バリエント、または変異体に結合できる。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む任意の型のヒトFAPに結合できる。ある実施形態では、FAPターゲティング部分は、モノマー型のFAPに結合する。別の実施形態では、FAPターゲティング部分は、ダイマー型のFAPに結合する。さらなる実施形態では、FAPターゲティング部分は、グリコシル化型のFAPに結合し、これはモノマーであってもダイマーであってもよい。

【0559】

ある実施形態では、FAPターゲティング部分は、ヒトFAP上に存在する1個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ヒトFAPは、配列番号1061のアミノ酸配列を含む。

【0560】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、特異的結合ができる。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。

【0561】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、抗体の誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランス

ボディ；アンチカリン；アドネクチン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィリン；アフィマー；マイクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプチド、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小（合成のまたは天然の）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

10

【0562】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（VHH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。

20

【0563】

ある実施形態では、FAPターゲティング部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

【0564】

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

30

【0565】

例えば、限定されないが、いくつかの実施形態では、ヒトVHH FAPターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2HFA44（配列番号1062）；2HFA52（配列番号1063）；2HFA11（配列番号1064）；2HFA4（配列番号1065）；2HFA46（配列番号1066）；2HFA10（配列番号1067）；2HFA38（配列番号1068）；2HFA20（配列番号1069）；2HFA5（配列番号1070）；2HFA19（配列番号1071）；2HFA2（配列番号1072）；2HFA41（配列番号1073）；2HFA42（配列番号1074）；2HFA12（配列番号1075）；2HFA24（配列番号1076）；2HFA67（配列番号1077）；2HFA29（配列番号1078）；2HFA51（配列番号1079）；2HFA63（配列番号1080）；2HFA62（配列番号1081）；2HFA26（配列番号1082）；2HFA25（配列番号1083）；2H

40

50

F A 1（配列番号1084）；2 H F A 3（配列番号1085）；2 H F A 7（配列番号1086）；2 H F A 3 1（配列番号1087）；2 H F A 6（配列番号1088）；2 H F A 5 3（配列番号1089）；2 H F A 9（配列番号1090）；2 H F A 7 3（配列番号1091）；2 H F A 5 5（配列番号1092）；2 H F A 7 1（配列番号1093）；2 H F A 6 0（配列番号1094）；2 H F A 6 5（配列番号1095）；2 H F A 4 9（配列番号1096）；2 H F A 5 7（配列番号1097）；2 H F A 2 3（配列番号1098）；2 H F A 3 6（配列番号1099）；2 H F A 1 4（配列番号1100）；2 H F A 4 3（配列番号1101）；および2 H F A 5 0（配列番号1102）。

【0566】

いくつかの実施形態では、F A Pターゲティング部分は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、HHHHHH；配列番号393）のない配列番号1062～1102（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0567】

いくつかの実施形態では、F A Pターゲティング部分は、H A タグ（すなわち、Y P Y D V P D Y G S；配列番号394）を含まない配列番号1062～1102（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0568】

いくつかの実施形態では、F A Pターゲティング部分は、A A Aリンカー（すなわち、A A A）を含まない配列番号1062～1102（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0569】

いくつかの実施形態では、F A Pターゲティング部分は、A A Aリンカー、H A タグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H；配列番号395）を含まない配列番号1062～1102（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0570】

例えば、限定されないが、いくつかの実施形態では、ヒトV H H F A Pターゲティング部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2 H F A 4 4（配列番号1103）；2 H F A 5 2（配列番号1104）；2 H F A 1 1（配列番号1105）；2 H F A 4（配列番号1106）；2 H F A 4 6（配列番号1107）；2 H F A 1 0（配列番号1108）；2 H F A 3 8（配列番号1109）；2 H F A 2 0（配列番号1110）；2 H F A 5（配列番号1111）；2 H F A 1 9（配列番号1112）；2 H F A 2（配列番号1113）；2 H F A 4 1（配列番号1114）；2 H F A 4 2（配列番号1115）；2 H F A 1 2（配列番号1116）；2 H F A 2 4（配列番号1117）；2 H F A 6 7（配列番号1118）；2 H F A 2 9（配列番号1119）；2 H F A 5 1（配列番号1120）；2 H F A 6 3（配列番号1121）；2 H F A 6 2（配列番号1122）；2 H F A 2 6（配列番号1123）；2 H F A 2 5（配列番号1124）；2 H F A 1（配列番号1125）；2 H F A 3（配列番号1126）；2 H F A 7（配列番号1127）；2 H F A 3 1（配列番号1128）；2 H F A 6（配列番号1129）；2 H F A 5 3（配列番号1130）；2 H F A 9（配列番号1131）；2 H F A 7 3（配列番号1132）；2 H F A 5 5（配列番号1133）；2 H F A 7 1（配列番号1134）；2 H F A 6 0（配列番号1135）；2 H F A 6 5（配列番号1136）；2 H F A 4 9（配列番号1137）；2 H F A 5 7（配列番号1138）；2 H F A 2 3（配列番号1139）；2 H F A 3 6（配列番号1140）；2 H F A 1 4（配列番号1141）；2 H F A 4 3（配列番号1142）；および2 H F A 5 0（配列番号1143）。

30

40

【0571】

いくつかの実施形態では、F A Pターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはF Rおよび3つの「相補性決定領域」またはC D Rを有する単一アミノ酸鎖を含むV H Hである結合物質を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「F R」は、C D R間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用され

50

る場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0572】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および／またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および／またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

【0573】

いくつかの実施形態では、ヒトFAPターゲティング部分は、配列番号1144～1172から選択されるCDR1配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトFAPターゲティング部分は、配列番号1173～1201から選択されるCDR2配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトFAPターゲティング部分は、配列番号1202～1232から選択されるCDR3配列を含む。

【0574】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示の選択された任意のFAPアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示の選択された任意のFAPアミノ酸配列と約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%の同一性を有する。

【0575】

種々の例示的实施形態では、マウスFAPターゲティング部分は、シブロッズマブのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する。

【0576】

いくつかの実施形態では、本技術は、本明細書で記載のFAPターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、または他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0577】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示のFAP配列のいずれか1つに少なくとも60%同一である配列を含む。例えば、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示のFAP配列のいずれかに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示のFAP配列のいずれか1つに、約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97

%、または約 98%、約 99%または約 100%の配列同一性)である配列を含み得る。

【0578】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか1つに対して1個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか1つに対して1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、または20個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

【0579】

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

【0580】

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

【0581】

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

【0582】

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

【0583】

いくつかの実施形態では、置換は非古典的アミノ酸を含む。例示非古典的アミノ酸としては、限定されないが、セレノシステイン、ピロールリジン、N-ホルミルメチオニン β -アラニン、GABAおよび δ -アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸(PABA)、共通アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、C α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般が挙げられる。

【0584】

いくつかの実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、FAPターゲティング部分のCDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域)中に存在する。別の実施形態では、1個または複数のアミノ酸変異は、ターゲティング部分のフレームワーク領域(FR)(例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域)中に存在する。

【0585】

アミノ酸配列の改変は、任意の当該技術分野において周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRベース変異誘発を用いて実現され得る。このような技術は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Lab

10

20

30

40

50

oratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 1989 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1989に記載されている。

【0586】

いくつかの実施形態では、変異は、FAPに特異的に結合するFAPターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。いくつかの実施形態では、変異は、FAPに特異的に結合する本発明のFAPターゲティング部分の能力を実質的に低下させず、FAPを機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。

10

【0587】

いくつかの実施形態では、ヒトFAPの完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／またはモノマーおよび／またはダイマー型および／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に対するFAPターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、FAPターゲティング部分は、ヒトFAPの完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合する。

20

【0588】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、FAPを結合するが、機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。例えば、いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、単に抗原を標的とするが、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害、低減または中和する）しない。いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

30

【0589】

顕著な機能調節のないこのような結合は、FAPターゲティング部分がエフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するために用いられる方法を含む、本技術のいくつかの実施形態で使用される。例えば、いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、FAPを介して直接的または間接的に樹状細胞を腫瘍細胞に動員するために使用され得る（例えば、FAPターゲティング部分は、抗FAP抗原認識ドメインを有する結合物質および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。このような実施形態では、樹状細胞を直接的または間接的に動員するがFAP活性を機能的に調節または中和しないことが望ましい。これらの実施形態では、FAPシグナル伝達は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く作用の重要な部分である。

40

【0590】

いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、樹状細胞による抗原提示を強化する。例えば、いくつかの実施形態では、FAPターゲティング部分は、FAPを介して樹状細胞を腫瘍細胞に直接または間接的に動員でき、その後、腫瘍抗原が取り込まれ、強力な体液性および細胞傷害性T細胞応答の誘導のために、樹状細胞上に提示される。

【0591】

50

他の実施形態では（例えば、癌、自己免疫または神経変性疾患の治療に関連して）、F A P ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、F A P を結合し中和する結合物質を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、例えば、免疫応答を低減させるために、F A P シグナル伝達または発現を阻害または低減し得る。

【0592】

X C R 1 ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、X C R 1 に特異的に結合できる X C R 1 ターゲティング部分である。種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、X C R 1 を機能的に調節する（例えば、部分的なまたは完全な中和を行う）ことなく、X C R 1 に特異的に結合できるタンパク質ベース物質である。X C R 1 は、G タンパク質共役受容体スーパーファミリーに属するケモカイン受容体である。ファミリーメンバーは、7 回膜貫通ドメインおよび多数の保存アミノ酸の存在を特徴とする。X C R 1 は、R B S 1 1 および M I P 1 - アルファ / R A N T E S 受容体に最も密接に関係している。X C R 1 は、細胞内カルシウムイオンレベルを高めることによりシグナルを伝達する。X C R 1 は、X C L 1 および X C L 2（またはリンホタクチン-1 および-2）に対する受容体である。

【0593】

いくつかの実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、X C R 1 上に存在するエпитープを認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、X C R 1 上に存在する 1 個または複数の線形エпитープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エпитープは、X C R 1 上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、X C R 1 上に存在する 1 個または複数の立体構造エпитープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エпитープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた 3 次元表面を形成する 1 個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0594】

いくつかの実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、X C R 1 の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成の類似体、バリエント、または変異体に結合できる。種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む任意の型のヒト X C R 1 に結合し得る。ある実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、モノマー型の X C R 1 に結合する。別の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、ダイマー型の X C R 1 に結合する。さらなる実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、グリコシル化型の X C R 1 に結合し、これはモノマーであってもダイマーであってもよい。

【0595】

ある実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、ヒト X C R 1 上に存在する 1 個または複数のエпитープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、ヒト X C R 1 は、配列番号 1 2 3 3 のアミノ酸配列を含む。

【0596】

種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、特異的結合ができる。種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを含む。

【0597】

いくつかの実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（V H H）、単鎖抗体（s c F v）、サメの重鎖のみで構成される抗体（V N A R）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、D A R P i n；テトラネクチン；アフィボディ；アフィ

10

20

30

40

50

マー；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アルファボディ；二環式ペプチド；アフィリン；ミクロボディ；ペプチドアプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプチボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小（合成のまたは天然の）分子を含む。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz MAbs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0598】

いくつかの実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（V_HH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、VHHを含む。

【0599】

いくつかの実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHを含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0600】

いくつかの実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および／またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。種々の実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および／またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

【0601】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書で記載のXCR1ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、XCR1ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導體、または他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0602】

いくつかの実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、本明細書で開示のXCR1配列のいずれか1つに少なくとも60%同一である配列を含む。例えば、XCR1ターゲティング部分は、本明細書で開示のXCR1配列のいずれかに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少

なくとも約 69%、少なくとも約 70%、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% 同一（例えば、本明細書で開示の XCR1 配列のいずれか 1 つに約 60%、または約 61%、または約 62%、または約 63%、または約 64%、または約 65%、または約 66%、または約 67%、または約 68%、または約 69%、または約 70%、または約 71%、または約 72%、または約 73%、または約 74%、または約 75%、または約 76%、または約 77%、または約 78%、または約 79%、または約 80%、または約 81%、または約 82%、または約 83%、または約 84%、または約 85%、または約 86%、または約 87%、または約 88%、または約 89%、または約 90%、または約 91%、または約 92%、または約 93%、または約 94%、または約 95%、または約 96%、または約 97%、または約 98%、約 99% または約 100% の配列同一性）である配列を含み得る。

10

【0603】

いくつかの実施形態では、XCR1 ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1 つに対して 1 個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、XCR1 ターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれか 1 つに対して 1 個、または 2 個、または 3 個、または 4 個、または 5 個、または 6 個、または 7 個、または 8 個、または 9 個、または 10 個、または 15 個、または 20 個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1 個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

20

【0604】

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

【0605】

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

30

【0606】

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

40

【0607】

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

【0608】

種々の実施形態では、置換は非古典的アミノ酸も含んでよい。代表的非古典的アミノ酸としては、限定されないが、セレノシステイン、ピロールリジン、N-ホルミルメチオニ

50

ンβ-アラニン、GABAおよびδ-アミノレブリン酸、4-アミノ安息香酸（PABA）、共通アミノ酸のD-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β-アラニン、フルオロアミノ酸、βメチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、Nα-メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般が挙げられる。

【0609】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分のCDR（例えば、CDR 1、CDR 2またはCDR 3領域）中にあってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域（FR）（例えば、FR 1、FR 2、FR 3、またはFR 4領域）中にあってよい。

【0610】

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

【0611】

種々の実施形態では、変異は、XCR1に特異的に結合するXCR1ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、XCR1に特異的に結合するXCR1ターゲティング部分の能力を実質的に低下させず、また、XCR1を機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）こともない。

【0612】

種々の実施形態では、ヒトXCR1の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／またはモノマーおよび／またはダイマー型および／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に対するXCR1ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ヒトXCR1の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型を含む）に、約1 μM、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合するターゲティング部分を含む。

【0613】

種々の実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、XCR1に結合するが、機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和する）しない。例えば、種々の実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、単に抗原を標的とするが、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害、低減または中和する）しない。種々の実施形態では、XCR1ターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエпитープに結合する。

【0614】

顕著な機能調節のないこのような結合は、X C R 1 ターゲティング部分がエフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するために用いられる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。例えば、種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、腫瘍細胞に X C R 1 を介して直接的または間接的に樹状細胞を動員するために使用され得る（例えば、X C R 1 ターゲティング部分は、抗 X C R 1 抗原認識ドメインを有する結合物質および腫瘍抗原または受容体に対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。このような実施形態では、樹状細胞を直接的または間接的に動員するが X C R 1 活性を機能的に調節または中和しないことが望ましい。これらの実施形態では、X C R 1 シグナル伝達は、腫瘍を縮小させるまたは取り除く作用の重要な部分である。

10

【0615】

いくつかの実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、樹状細胞による抗原提示を強化する。例えば、種々の実施形態では、X C R 1 ターゲティング部分は、腫瘍細胞に X C R 1 を介して直接または間接的に樹状細胞を動員でき、その後、腫瘍抗原が取り込まれ、強力な体液性および細胞傷害性 T 細胞応答の誘導のために、樹状細胞上に提示される。

【0616】

他の実施形態では（例えば、癌、自己免疫または神経変性疾患の治療に関連して）、X C R 1 ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、X C R 1 を結合し、中和する結合物質を含む。例えば、種々の実施形態では、本発明の方法は、例えば、免疫応答を低減させるために、X C R 1 シグナル伝達または発現を阻害または低減し得る。

20

【0617】

非細胞構造ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分の標的（例えば、抗原または受容体）は、非細胞構造の一部である。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、無傷の細胞または細胞構造の不可欠な構成要素ではない。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、細胞外の抗原または受容体である。いくつかの実施形態では、標的は、非タンパク質性の非細胞マーカーであり、これらは、限定されないが、例えば、壊死腫瘍細胞から放出された D N A、などの D N A または R N A を含む、核酸またはコレステロールなどの細胞外沈着物を含む。

30

【0618】

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

40

50

【0619】

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

10

【0620】

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

20

【0621】

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

30

【0622】

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

40

【0623】

50

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はテネイシン-C A 1 を認識する。

【0624】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、フィブロネクチンを認識し、結合する。フィブロネクチンは、細胞をECM中のコラーゲン繊維と連結し、細胞がECM中を移動することを可能とする糖タンパク質である。インテグリンに結合時には、フィブロネクチンは折り畳みをほどこして機能的ダイマーを形成する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、モノマーおよび／またはダイマー型のフィブロネクチンを認識する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、フィブロネクチン上の1個または複数のエピトープを認識する。例示的实施形態では、ターゲティング部分は、フィブロネクチン細胞外ドメインA (EDA) またはフィブロネクチン細胞外ドメインB (EDB) を認識する。EDAレベルの上昇は、乾癬、関節リウマチ、糖尿病、および癌を含む種々の疾患および障害に関連する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、EDAアイソフォームを含むフィブロネクチンを認識し、Fcベースキメラタンパク質複合体を癌細胞を含む疾患細胞に向けるのに使用し得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、EDBアイソフォームを含むフィブロネクチンを認識する。種々の実施形態では、このようなターゲティング部分は、Fcベースキメラタンパク質複合体を腫瘍新生血管を含む腫瘍細胞に向けるのに使用し得る。

【0625】

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

【0626】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、ラミニンを認識し、これに結合する。ラミニンは、基底膜の主要成分であり、細胞および器官のためのタンパク質ネットワーク基盤である。ラミニンは、 α 鎖、 β 鎖、および γ 鎖を含むヘテロトリマータンパク質である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ラミニン上の1個または複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、モノマー、ダイマーならびにトリマー型のラミニンを認識する。

【0627】

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

【0628】

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

【0629】

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

【0630】

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

【0631】

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

【0632】

種々の実施形態では、ターゲティング部分は、神経変性疾患と関連する脳プラーク中で見つかる1種または複数の非細胞構造を認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、アルツハイマー病の患者の脳中で見つかるアミロイド斑中に局在する1種または複数の非細胞構造を認識し、これに結合する。例えば、ターゲティング部分は、ペプチドアミロイドベータを認識し、これに結合する。ペプチドアミロイドベータは、アミロイド斑の主要な成分である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ハンチントン病の患者で見つかる脳プラーク中にある1種または複数の非細胞構造を認識し、これに結合する。種々の実施形態では、ターゲティング部分は、レヴィー小体認知症および封入体筋炎などの他の神経変性疾患または筋骨格疾患と関連するプラークで見つかる1種または複数の非細胞構造を認識し、これに結合する。

【0633】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの、特異的結合ができるタンパク質ベース物質である。

【0634】

CD3ターゲティング部分

いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上で発現されるCD3に対する1個または複数のターゲティング部分を有する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD3ポリペプチドを選択的に結合する1個または複数のターゲティング部分を有する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD3ポリペプチドを選択的に結合する、抗体、抗体の誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質の1種または複数を含む。

【0635】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗CD3抗体ムロモナブーCD3（別名Orthoclone OKT3）、またはそのフラグメントを含む。ムロモナブーCD3は、米国特許第4,361,549号およびWild et al. (1996) 51:865-894で開示されている。これらの文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのムロモナブーCD3またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1234のアミノ酸配列を含む重鎖；および／または配列番号1235のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

【0636】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗CD3抗体オテリキシズマブ、またはそのフラグメントを含む。オテリキシズマブは、米国特許出願公開第20160000916号およびChatenoud et al. (2012) 9:372-381で開示されている。これらの文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのオテリキシズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号1236のアミノ酸配列を含む重鎖；および／または配列番号1237のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0637】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗CD3抗体テプリズマブ（別名MGA031およびhOKT3γ1 (Ala-Ala)）、またはそのフラグメントを含む。テプリズマブは、Chatenoud et al. (2012) 9:372-381で開示されている。この文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのテプリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号1238のアミノ酸配列を含む重鎖；および／または配列番号1239のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0638】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗CD3抗体ビジリズマブ（別名Nuvion（登録商標）；HuM291）、またはそのフラグメントを含む。ビジリズマブは、米国特許第5,834,597号および国際公開第2004052397号およびCole et al., Transplantation (1999) 68:563-571で開示されている。これらの文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのビジリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号1240のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号1241のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0639】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、抗CD3抗体フォルマブ（別名NI-0401）、またはそのフラグメントを含む。種々の実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第20140193399号、米国特許第7,728,114号、米国特許出願公開第20100183554号および米国特許第8,551,478号で開示される抗CD3抗体のいずれか1種を含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0640】

例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗CD3抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許第7,728,114号の配列番号2および6（

50

それぞれ、配列番号 1 2 4 2 および 1 2 4 3) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または米国特許第 7, 7 2 8, 1 1 4 号の配列番号 4 および 8 (配列番号 1 2 4 4 および 1 2 4 5) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0 6 4 1】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許第 7, 7 2 8, 1 1 4 号の配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および米国特許第 7, 7 2 8, 1 1 4 号の配列番号 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 6 8 2 4 7 号で開示される抗 C D 3 抗体のいずれか 1 種を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 6 8 2 4 7 号の配列番号 6 ~ 9 (それぞれ、配列番号 1 2 4 6 ~ 1 2 4 9) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 6 8 2 4 7 号の配列番号 1 0 ~ 1 2 (それぞれ、配列番号 1 2 5 0 ~ 1 2 5 2) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

【0 6 4 2】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 7 5 6 9 9 号で開示される抗 C D 3 抗体のいずれか 1 種を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 7 5 6 9 9 号の配列番号 9 (配列番号 1 2 5 3) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 7 5 6 9 9 号の配列番号 1 0 (配列番号 1 2 5 4) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【0 6 4 3】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許第 8, 7 8 4, 8 2 1 号で開示される抗 C D 3 抗体のいずれか 1 種を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許第 8, 7 8 4, 8 2 1 号の配列番号 2、1 8、3 4、5 0、6 6、8 2、9 8、および 1 1 4 (それぞれ、配列番号 1 2 5 5、1 2 5 6、1 2 5 7、1 2 5 8、1 2 5 9、1 2 6 0、1 2 6 1、および 1 2 6 2) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許第 8, 7 8 4, 8 2 1 号の配列番号 1 0、2 6、4 2、5 8、7 4、9 0、1 0 6、および 1 2 2 (それぞれ、配列番号 1 2 6 3、1 2 6 4、1 2 6 5、1 2 6 6、1 2 6 7、1 2 6 8、1 2 6 9、および 1 2 7 0) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0 6 4 4】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 1 1 8 2 5 2 号で開示される抗 C D 3 結合構築物のいずれか 1 種を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 1 1 8 2 5 2 号の配列番号 6 および 8 6 (それぞれ、配列番号 1 2 7 1 および 1 2 7 2) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 7 5 6 9 9 号の配列番号 3 (配列番号 1 2 7 3) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

40

【0 6 4 5】

ある実施形態では、ターゲティング部分は、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 3 9 9 3 4 号で開示される抗 C D 3 結合タンパク質のいずれか 1 種を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 3 9 9 3 4 号の配列番号 6 ~ 9 (配列番号 1 2 7 4 ~ 1 2 7 7) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 3 9 9 3 4 号の配列番号 1 ~ 4 (配列番号 1 2 7 8 ~ 1 2 8 1) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖

50

を含む。

【0646】

種々の実施形態では、本発明のターゲティング部分は、本明細書で開示の配列のいずれかに少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示の配列のいずれかと約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、約99%または約100%の配列同一性）である、CD3を標的とする配列を含み得る。

【0647】

種々の実施形態では、本発明のターゲティング部分は、本明細書で開示のCD3を標的とする重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域（CDR）、およびフレームワーク領域配列のいずれかの組み合わせを含み得る。種々の実施形態では、本発明のターゲティング部分は、限定されないが、X35-3、VIT3、BMA030（BW264/56）、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、Fl11-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、WT31およびF101.01を含むCD3特異的抗体の、重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域（CDR）、およびフレームワーク領域配列のいずれかを含み得る。これらのCD3特異的抗体は、当該技術分野において周知であり、特に、Tunnaclyffe（1989）、Int. Immunol. 1, 546-550で記載されている。この文献の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0648】

選択的にCD3を結合または標的とする追加の抗体、抗体誘導体またはフォーマット、ペプチドまたはポリペプチド、または融合タンパク質は、米国特許出願公開第2016/0000916号、米国特許第4,361,549号、同第5,834,597号、同第6,491,916号、同第6,406,696号、同第6,143,297号、同第6,750,325号および国際公開第2004/052397号で開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0649】

CD20ターゲティング部分

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、CD20に特異的に結合できるタンパク質ベース物質である。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、CD20を中和することなく、CD20に特異的に結合できるタンパク質ベース物質である。CD20は、膜貫通4-A（MS4A）ファミリーの非グリコシル化メンバーである。

これは、マウスおよびヒトの両方におけるB細胞特異的分化抗原として機能する。特に、ヒトCD20 cDNAは、4つの疎水性膜貫通ドメイン、2つの細胞外ループおよび細胞内N末端およびC末端領域からなる膜貫通タンパク質をコードする。

【0650】

種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、CD20上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを有するターゲティング部分を含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、CD20上に存在する1個または複数の線形エピトープを認識する。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、CD20上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、CD20上に存在する1個または複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および／または形状および／または三次構造を備えた3次元表面を形成する1個または複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

10

【0651】

種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、CD20（例えば、ヒトCD20）の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエーションおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成の類似体、バリエーション、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む、任意の型のCD20（例えば、ヒトCD20）に結合し得る。ある実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、モノマー型のCD20に結合する。別の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、ダイマー型のCD20に結合する。別の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、テトラマー型のCD20に結合する。さらなる実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、リン酸化型のCD20に結合し、これはモノマー、ダイマー、またはテトラマーであってよい。

20

【0652】

ある実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、ヒトCD20上に存在する1個または複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有するターゲティング部分を含む。ある実施形態では、ヒトCD20は、配列番号1346のアミノ酸配列を含む。

【0653】

種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、特異的結合ができるターゲティング部分を含む。種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを有するターゲティング部分を含む。

30

【0654】

いくつかの実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、抗体誘導体またはフォーマットであるターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、単一ドメイン抗体、組み換え型の重鎖のみで構成される抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖のみで構成される抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；アフィマー；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；マイクロボディ；ペプチドアプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニツツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペブボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、ペプチド模倣分子、または小（例えば、合成のまたは天然の）分子であるターゲティング部分を含む。これらは、例えば、限定されないが、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米

40

50

国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および／または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz Mabs. 2011 May-Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0655】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、VHHなどの単一ドメイン抗体であるターゲティング部分を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導されるか、またはVHHは設計によるVHHであってよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体をベースにしている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン(V_HH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。VHHは、NANOBODIESの登録商標で市販されている。ある実施形態では、CD20ターゲティング部分は、ナノボディを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単一ドメイン抗体は、免疫グロブリン単一可変ドメインまたはISVDである。

【0656】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHであるターゲティング部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を指す。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

【0657】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および／またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。

【0658】

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号1347～1366から選択される。いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号1367～1383から選択される。いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号1384～1396から選択される。

【0659】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1347のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1367のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1384のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0660】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1347のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1368のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1384のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0661】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1348のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1367のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1384のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0662】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1349のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1367のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1384のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0663】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1350のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1369のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1385のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0664】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1351のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1370のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1386のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0665】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1352のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1371のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1387のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

10

【0666】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1353のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1371のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1388のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0667】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1354のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1372のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1389のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

20

【0668】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1355のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1373のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1390のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0669】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1355のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1374のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1390のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0670】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1355のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1375のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1390のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

30

【0671】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1356のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1374のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1390のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0672】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1357のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1376のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1391のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

40

【0673】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1358のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1377のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0674】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1359のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1377のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0675】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1360のアミノ酸配

50

列を含むCDR1、配列番号1377のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0676】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1361のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1378のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0677】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1362のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1379のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

10

【0678】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1363のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1377のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1392のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0679】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1364のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1380のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1393のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0680】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1365のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1381のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1394のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

20

【0681】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1366のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1382のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1395のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0682】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、配列番号1366のアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号1383のアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号1396のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

30

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：2HCD16（配列番号1397）；2HCD22（配列番号1398）；2HCD35（配列番号1399）；2HCD42（配列番号1400）；2HCD73（配列番号1401）；2HCD81（配列番号1402）；R3CD105（配列番号1403）；R3CD18（配列番号1404）；R3CD7（配列番号1405）；2HCD25（配列番号1406）；2HCD78（配列番号1407）；2HCD17（配列番号1408）；2HCD40（配列番号1409）；2HCD88（配列番号1410）；2HCD59（配列番号1411）；2HCD68（配列番号1412）；2HCD43（配列番号1413）；2MC57（配列番号1414）；R2MUC70（配列番号1415）；R3MUC17（配列番号1416）；R3MUC56（配列番号1417）；R3MUC57（配列番号1418）；R3MUC58（配列番号1419）；R2MUC85（配列番号1420）；R3MUC66（配列番号1421）；R2MUC21（配列番号1422）；2MC52（配列番号1423）；R3MUC22（配列番号1424）；R3MUC75（配列番号1425）；2MC39（配列番号1426）；2MC51（配列番号1427）；2MC38（配列番号1428）；2MC82（配列番号1429）；2MC20（配列番号1430）；2MC42（SEQ ID NO：1431）；R2MUC36（配列番号1432）；R3MCD137（配列番号1433）；またはR3MCD22（配列番号1434）。

40

【0683】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、末端ヒスチジントグ配列（

50

すなわち、HHHHHH；配列番号393）のない配列番号1397～1434（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0684】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、HAタグ（すなわち、YPDVPDYG S；配列番号394）のない配列番号1397～1434（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0685】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、AAAリンカー（すなわち、AAA）のない配列番号1397～1434（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0686】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、AAAリンカーおよびHAタグのない配列番号1397～1434（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0687】

いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチンタグ配列（すなわち、AAAYPYDVPDYG SHHHHHH；配列番号395）を含まない配列番号1397～1434（上記で提供される）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0688】

種々の実施形態では、本技術は、本明細書で記載のCD20ターゲティング部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、または他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0689】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、本明細書で開示のCD20配列のいずれか1つに少なくとも60%同一である配列を含むターゲティング部分を含む。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、上記で開示のCD20配列のいずれか1つから、リンカー配列、HAタグおよび／またはHIS₆タグを除いた配列に少なくとも60%同一である配列を含む。例えば、CD20ターゲティング部分は、本明細書で開示のCD20配列のいずれか1つに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示のCD20配列のいずれか1つに約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%、または100%同一）である配列を含む。

10

20

30

40

50

8 %、約 99 % または約 100 % の配列同一性) である配列を含み得る。

【0690】

種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、1 個または複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、CD20 ターゲティング部分は、上記で開示の CD20 配列のいずれか 1 つに対して 1 個、または 2 個、または 3 個、または 4 個、または 5 個、または 6 個、または 7 個、または 8 個、または 9 個、または 10 個、または 15 個、または 20 個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1 個または複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および切り詰めから独立に選択され得る。

【0691】

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

【0692】

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

【0693】

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

【0694】

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

【0695】

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

【0696】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、ターゲティング部分の CDR (例えば、CDR 1、CDR 2 または CDR 3 領域) 中であってよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、ターゲティング部分のフレームワーク領域 (FR) (例えば、FR 1、FR 2、FR 3、または FR 4 領域) 中であってよい。

【0697】

アミノ酸配列の改変は、任意の当該技術分野において周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発または PCR ベース変異誘発を用いて実現され得る。このような技術は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Lab

10

20

30

40

50

oratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 1989 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1989に記載されている。

【0698】

種々の実施形態では、変異は、CD20に特異的に結合するCD20ターゲティング部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、CD20に特異的に結合するCD20ターゲティング部分の能力を実質的に低下させることなく、CD20を中和しない。

10

【0699】

種々の実施形態では、ヒトCD20の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／またはモノマーおよび／またはダイマー型および／またはテトラマー型および／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型および／またはテトラマー型を含む）に対するCD20ターゲティング部分の結合親和性は、平衡解離定数（ K_D ）により特徴付けられ得る。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、ヒトCD20の完全長および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスバリエントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体（モノマーおよび／またはダイマー型および／またはテトラマー型を含む）に、約1 μ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約4.5 nM、または約1 nM未満の K_D で結合するターゲティング部分を含む。

20

【0700】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、目的の抗原、すなわち、CD20に結合するが、機能的に調節しないターゲティング部分を含む。例えば、種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、抗原を標的とするのみであり、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、実質的に阻害、低減または中和すること）しない。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープに結合する。

30

【0701】

顕著な機能調節のないこのような結合は、本出願の種々の実施形態で使用される。種々の実施形態では、変異は、CD20ターゲティング部分はCD20陽性細胞に結合し、このような細胞の死亡を誘導する。いくつかの実施形態では、CD20ターゲティング部分は、1つまたは複数のアポトーシスまたは直接細胞死、補体依存性細胞傷害（CDC）、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）により媒介されて、細胞死を誘導する。いくつかの実施形態では、本発明のCD20ターゲティング部分は、結合時に、細胞膜内の大きな脂質マイクロドメインまたは「脂質ラフト」中へのCD20の移動を誘導する。このクラスタリングプロセスは、補体の活性化を高め、強力な補体依存性細胞傷害（CDC）を発揮する。別の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、直接細胞死を誘導する。代替実施形態では、CD20ターゲティング部分の治療効力は、B細胞枯渇に依存しない。

40

【0702】

種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、エフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するために用いられ得る。例えば、種々の実施形態では、癌または腫瘍を縮小させるまたは取り除く方法において、CD20ターゲティング部分を使って、直接的または間接的に免疫細胞を癌または腫瘍細胞に動員

50

し得る（例えば、CD20ターゲティング部分は、抗CD20抗原認識ドメインおよび樹状細胞上に発現する抗原であるCLEC9Aに対する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有するターゲティング部分を含み得る）。これらの実施形態では、CD20シグナル伝達は、癌を減らすまたは取り除く作用の重要な部分である。種々の実施形態では、CD20ターゲティング部分は、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、およびナチュラルキラー（NK）細胞を動員し得る。

【0703】

二重特異的および多重特異的ターゲティング部分フォーマット

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、本明細書で開示の1個または複数のターゲティング部分を含む。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、2個の異なる細胞（例えば、シナプスを作るために）または同じ細胞（例えば、より高濃度のシグナル伝達物質効果を得るために）を標的とするターゲティング部分を有する。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、例えば、標的結合の親和性を高めるために、同じターゲティング部分の2個以上のコピー（多価）を有する。

【0704】

種々の実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、多重特異的であり、すなわち、Fcベースキメラタンパク質複合体は、2つ以上の標的（例えば、抗原、または受容体、またはエピトープ）を認識し、結合する認識ドメイン（例えば、抗原認識ドメイン）を有する2個以上のターゲティング部分を含む。このような実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、同じ抗原上または異なる抗原上または異なる受容体上の2個以上のエピトープを認識して結合する認識ドメインを有するさらに2個のターゲティング部分を含み得る。種々の実施形態では、このような多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、増大した結合力および／または改善された選択性などの有利な特性を示す。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、2つのターゲティング部分を含み、二重特異性であり、すなわち、同じ抗原上または異なる抗原上または異なる受容体上の2個のエピトープを結合し、認識する。したがって、種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、このような2個以上のターゲティング部分を含む多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体を包含する。

【0705】

種々の実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、それぞれのターゲティング部分が本明細書に記載の抗体または抗体誘導体である2個以上のターゲティング部分を含む。ある実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、1つの標的に対する抗原認識ドメインを含む少なくとも1種のVHHおよび腫瘍抗原および／または免疫細胞マーカーに対する認識ドメインを含む1種の抗体または抗体誘導体を含む。

【0706】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、異なる抗原または受容体を標的とする2個以上のターゲティング部分を有し、1つのターゲティング部分は、その抗原または受容体に対し減弱化され得、例えば、ターゲティング部分はその抗原または受容体を低親和性または低結合力で結合する（例えば、その他のターゲティング部分がその抗原または受容体に対して有する親和性または結合力より低い親和性または結合力で結合することを含み、例えば、結合親和性の間の差異は、約10倍、または25倍、または50倍、または100倍、または300倍、または500倍、または1000倍、または5000倍であってよく；例えば、より低い親和性または結合力のターゲティング部分はその抗原または受容体の中～高nMまたは低～中μMの範囲の K_D で結合し得るが、より高い親和性または結合力のターゲティング部分は、中～高pMまたは低～中nMの範囲の K_D で結合し得る）。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、無差別の抗原または受容体に向けられた減弱化ターゲティング部分を含み、これは目的の細胞への標的化を改善し（例えば、他のタ

ーゲティング部分を介して) かつ治療用の標的にされないものを含む、複数細胞型間にまたがる効果を防止し得る(例えば、これらの実施形態で与えられるものより高い親和性で無差別に抗原または受容体に結合することによる)。

【0707】

多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、当該技術分野において既知の方法を使用して構築され得る。例えば、米国特許第9,067,991号、米国特許出願公開第20110262348号および国際公開第2004/041862号を参照されたい。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、2個以上のターゲティング部分を含む多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、化学架橋により、例えば、アミノ酸残基を、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Blattler et al., Biochemistry 24, 1517-1524および欧州特許第294703号に記載のような有機誘導体化試薬を反応させることにより構築され得る。別の例示的实施形態では、2個以上のターゲティング部分を含む多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、遺伝子融合、すなわち、個別のターゲティング部分のポリペプチドを含む単一ポリペプチドを構築することにより、構築される。例えば、第1の標的に対する抗原認識ドメインを有する第1のVHHおよび、例えば、腫瘍抗原またはチェックポイント阻害剤に対する抗原認識ドメインを有する第2の抗体または抗体誘導体をコードする単一ポリペプチド構築物を形成し得る。二価または多価性のVHHポリペプチド構築物を産生する方法は、国際公開第96/34103号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。さらなる例示的实施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、リンカーを用いることにより構築され得る。例えば、第1の標的に対する抗原認識ドメインを有する第1のVHHのカルボキシ末端を、例えば、腫瘍抗原またはチェックポイント阻害剤に対する抗原認識ドメインを有する第2の抗体または抗体誘導体のアミノ末端に連結し得る(または逆もまた同じ)。使用し得るリンカーの例は、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体の成分は、リンカーを使用せずに、相互に直接連結される。

【0708】

種々の実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、標的(例えば、XCR1、CLEC9A、FAP、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、またはCD8)および1個または複数の免疫細胞上に見出される1種または複数の抗原を認識し、それらに結合する。免疫細胞は、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球(例えば、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞)、Bリンパ球、プラズマ細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、目的の抗原に特異的に結合し、直接または間接的に1個または複数の免疫細胞を効果的に動員する。

【0709】

種々の実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、標的(例えば、XCR1、CLEC9A、FAP、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、またはCD8)および腫瘍細胞上に見出される1種または複数の抗原を認識し、それらに結合する。これらの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、免疫細胞を直接的にまたは間接的に腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に動員し得る。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、免疫細胞、例えば、腫瘍細胞を死滅させるおよび/または抑制できる免疫細胞(例えば、CTL)を、作用部位(非限定的例であるが、腫瘍微小環境など)に直接的にまたは間接的に動員し得る。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、強力な体液性および細胞傷害性T細胞応答の誘導のために、樹状細胞による抗原の提示(例えば、腫瘍抗原の提示)を強化する。

【0710】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、非細胞構造に結合する2個以上のターゲティング部分を有し得る。いくつかの実施形態では、2個のターゲティング部分が存在し、1個は細胞を標的にし、一方、もう1個は非細胞構造を標的にする。

【0711】

いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、NK細胞、またはこれらのサブセットから選択される免疫細胞に対する1個または複数のターゲティング部分、および(ii) 本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に対する1個または複数のターゲティング部分、を有する。一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、(i) T細胞(限定されないが、エフェクターT細胞を含む)に対するターゲティング部分を有し、および(ii) ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) B細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii) ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) 樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii) ターゲティング部は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) マクロファージに対するターゲティング部分を有し、および(ii) ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) NK細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii) ターゲティング部分本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0712】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i) 例えば、CD8、SLAMF4、IL-2R α 、4-1BB/TNFRSF9、IL-2R β 、ALCAM、B7-1、IL-4R、B7-H3、BLAME/SLAMF5、CEACAM1、IL-6R、CCR3、IL-7R α 、CCR4、CXCR1/ILSRA、CCR5、CCR6、IL-10R α 、CCR7、IL-10R β 、CCRS、IL-12R β 1、CCR9、IL-12R β 2、CD2、IL-13R α 1、IL-13、CD3、CD4、ILT2/CDS5j、ILT3/CDS5k、ILT4/CDS5d、ILT5/CDS5a、lutealgrin α 4/CD49d、CDS、インテグリン α E/CD103、CD6、インテグリン α M/CD11b、CDS、インテグリン α X/CD11c、インテグリン β 2/CD11S、KIR/CD15S、CD27/TNFRSF7、KIR2DL1、CD2S、KIR2DL3、CD30/TNFRSFS、KIR2DL4/CD15Sd、CD31/PECAM-1、KIR2DS4、CD40リガンド/TNFSF5、LAG-3、CD43、LAIR1、CD45、LAIR2、CDS3、ロイコトリエンB4-R1、CDS4/SLAMF5、NCAM-L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229/SLAMF3、NKG2D、CD2F-10/SLAMF9、NT-4、CD69、NTB-A/SLAMF6、共通 γ 鎖/IL-2R γ 、オステオポンチン、CRAC/SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK/TNFRSF11A、CX3CR1、CX3CL1、L-セレクチン、CXCR3、SIRP β 1、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCCR/WSX-1、DNAM-1、サイモポエチン、EMMPRIN/CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas/TNFRSF6、TIM-3、Fasリガンド/TNFSF6、TIM-4、Fc γ RIII/CD16、TIM-6、TNFR1/TNFRSF1A、グラニューライシン、TNFRIII/TNFRSF1B、TRAILR1/TNFRSF10A、ICAM-1/CD54、TRAILR2/TNFRSF10B、ICAM-2/CD102、TRAILR3/TNFRSF10C、IFN- γ R1、TRAILR4/TNFRSF1

OD、IFN- γ R2、TSLP、IL-1R1、またはTSLPRへの標的化により媒介される、T細胞に対するターゲティング部分を有し；および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0713】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明の多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、（i）T細胞上に発現したチェックポイントマーカー、例えば、PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、CD27、CD40L、TIM3、およびA2aRの内の1個または複数に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

10

【0714】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、CD8への標的化により媒介されるT細胞に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上のCD8に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0715】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、CD4への標的化により媒介されるT細胞に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上のCD4に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

20

【0716】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、CD3、CXCR3、CCR4、CCR9、CD70、CD103、または1個または複数の免疫チェックポイントマーカーへの標的化により媒介されるT細胞に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上のCD3に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

30

【0717】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、PD-1への標的化により媒介されるT細胞に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0718】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD70、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138、またはCDw150への標的化により媒介されるB細胞に対するターゲティング部分を有し、および（ii）ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、CD20に対するターゲティング部分を有する。

40

【0719】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、（i）例えば、CD

50

19、CD20またはCD70への標的化により媒介されるB細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0720】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、CD20への標的化により媒介されるB細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、B細胞上のCD20に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

10

【0721】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、2B4/SLAMF4、KIR2DS4、CD155/PVR、KIR3DL1、CD94、LMIR1/CD300A、CD69、LMIR2/CD300c、CRACC/SLAMF7、LMIR3/CD300LF、DNAM-1、LMIR5/CD300LB、Fc-イプシロンRII、LMIR6/CD300LE、Fc-γRI/CD64、MICA、Fc-γRIIB/CD32b、MICB、Fc-γRIIC/CD32c、MULT-1、Fc-γRIIA/CD32a、Nectin-2/CD112、Fc-γRIII/CD16、NKG2A、FcRH1/IRTA5、NKG2C、FcRH2/IRTA4、NKG2D、FcRH4/IRTA1、NKp30、FcRH5/IRTA2、NKp44、Fc-受容体様3/CD16-2、NKp46/NCR1、NKp80/KLRF1、NTB-A/SLAMF6、Rae-1、Rae-1α、Rae-1β、Rae-1δ、H60、Rae-1ε、ILT2/CD85j、Rae-1γ、ILT3/CD85k、TREM-1、ILT4/CD85d、TREM-2、ILT5/CD85a、TREM-3、KIR/CD158、TREML1/TLT-1、KIR2DL1、ULBP-1、KIR2DL3、ULBP-2、KIR2DL4/CD158dまたはULBP-3への標的化により媒介されるNK細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

20

【0722】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、Kir1アルファ、DNAM-1またはCD64への標的化により媒介されるNK細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

30

【0723】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、KIR1への標的化により媒介されるNK細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞上のKIR1に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

40

【0724】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、TIGITまたはKIR1への標的化により媒介されるNK細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞上のTIGITに対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0725】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合

50

体は、(i) CLEC9A、XCR1、RANK、CD36/SRB3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MSR、CD5L、SREC-1、CL-PL/COLEC12、SREC-II、LIMPIII/SRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBBリガンド/TNFSF9、IL-12/IL-23p40、4-Amino-1、8-ナフトルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6CKine、ILT3/CD85k、8-oxodG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、lutealgrin α4/CD49d、Aag、インテグリンβ2/CD18、AMICA、Langerin、B7-2/CD86、ロイコトリエンB4 R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、ClqR1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LBCCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAM L1、CD2F-10/SLAMF9、Osteoactivin GPNMB、Chern23、PD-L2、CEC-1、RP105、CEC-2、シグレック-2/CD22、CRACC/SLAMF7、シグレック-3/CD33、DC-SIGN、シグレック-5、DC-SIGNR/CD299、シグレック-6、DCAR、シグレック-7、DCIR/CEC4A、シグレック-9、DEC-205、シグレック-10、Dectin-1/CEC7A、シグレック-F、Dectin-2/CEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCR/WSX-1、Fc-γR1/CD64、TLR3、Fc-γRIIB/CD32b、TREM-1、Fc-γRIIC/CD32c、TREM-2、Fc-γRIIA/CD32a、TREM-3、Fc-γRII/CD16、TREML1/TLT-1、ICAM-2/CD102、またはパニロイドR1への標的化により媒介される樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0726】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、CEC-9A、DC-SIGN、CD64、CEC4A、またはDEC205への標的化により媒介される樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、樹状細胞上のCLEC9Aに対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0727】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、CLEC9Aへの標的化により媒介される樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、樹状細胞上のCLEC9Aに対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0728】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、XCR1への標的化により媒介される樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、樹状細胞上のXCR1に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0729】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、RANKへの標的化により媒介される樹状細胞に対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、樹状細胞上のRANKに対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0730】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)SIRP1a、B7-1/CD80、ILT4/CD85d、B7-H1、
 10 ILT5/CD85a、共通β鎖、インテグリンα4/CD49d、BLAME/SLAMF8、インテグリンαX/CD11c、CCL6/C10、インテグリンβ2/CD18、CD155/PVR、インテグリンβ3/CD61、CD31/PECAM-1、L
 atexin、CD36/SR-B3、ロイコトリエンB4R1、CD40/TNFRSF5、LIMPIIISR-B2、CD43、LMIR1/CD300A、CD45、L
 MIR2/CD300c、CD68、LMIR3/CD300LF、CD84/SLAMF5、LMIR5/CD300LB、CD97、LMIR6/CD300LE、CD16
 3、LRP-1、CD2F-10/SLAMF9、MARCO、CRACC/SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN/CD147、MGL2、エンド
 グリン/CD105、オステオアクチビン/GPNMB、Fc-γRI/CD64、オス
 20 テオポンチン、Fc-γRIIB/CD32b、PD-L2、Fc-γRIIC/CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-γRIIA/CD32a、SIGNR1/C
 D209、Fc-γRIII/CD16、SLAM、GM-CSFRα、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-γR1、TLR4、IFN-γ
 R2、TREM-1、IL-1RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL-1
 0Rα、ALCAM、IL-10Rβ、アミノペプチダーゼN/ANPEP、ILT2/CD85j、共通β鎖、ILT3/CD85k、ClqR1/CD93、ILT4/CD85d
 、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、CD206、インテグリンα4/CD49d、CCR5、インテグリンαM/CD11b、CCR8、インテグリンαX/CD1
 30 1c、CD155/PVR、インテグリンβ2/CD18、CD14、インテグリンβ3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロ
 イコトリエンB4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、L
 MIR3/CD300LF、凝固因子III/組織因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、
 CXCR6、M-CSFR、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、エンドグリン/CD105、NCAM-L1
 、Fc-γRI/CD64、PSGL-1、Fc-γRIIIICD16、RP105、G-CSFR、L-セレクチン、GM-CSFRα、シグレック-3/CD33、HVE
 40 M/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL-6R、TREM-2、CXCR1/IL-8RA
 、TREM-3、またはTREML1/TLT-1への標的化により媒介される単球/マクロファージに対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、
 本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0731】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、B7-H1、CD31/PECAM-1、CD163、CCR2、またはマクロファージマン
 ノース受容体CD206への標的化により媒介される単球/マクロファージに対するター
 50 ゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれ

かのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。

【0732】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)例えば、SIRP1aへの標的化により媒介される単球／マクロファージに対するターゲティング部分を有し、および(ii)ターゲティング部分は、本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞に向けられる。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、マクロファージ上のSIRP1aに対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1またはPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0733】

種々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、チェックポイントマーカー、例えば、PD-1／PD-L1またはPD-L2、CD28／CD80またはCD86、CTLA4／CD80またはCD86、ICOS／ICOSLまたはB7RP1、BTLA／HVEM、KIR、LAG3、CD137／CD137L、OX40／OX40L、CD27、CD40L、TIM3／Ga19、およびA2aRの内の1個または複数に対する1つまたは複数のターゲティング部分を有する。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)T細胞、例えば、PD-1上のチェックポイントマーカーに対するターゲティング部分、および(ii)本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、腫瘍細胞、例えば、PD-L1またはPD-L2に向けられるターゲティング部分を有する。ある実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上のPD-1に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L1に対する第2のターゲティング部分を有する。別の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞上のPD-1に対するターゲティング部分および腫瘍細胞上のPD-L2に対する第2のターゲティング部分を有する。

【0734】

いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、同じまたは異なる免疫細胞に向けられた2個以上のターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、(i)T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、NK細胞、またはこれらのサブセットから選択される免疫細胞に対する1個または複数のターゲティング部分、および(ii)本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達物質に加えて、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、NK細胞、またはこれらのサブセットから選択される同じまたは別の免疫細胞に対する1個または複数のターゲティング部分、を有する。

【0735】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞に対する1個または複数のターゲティング部分および同じまたは別のT細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびB細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞に対する1個または複数のターゲティング部分および樹状細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびマクロファージに対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、T細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびNK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。例えば、例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD8に対するターゲティング部分およびClec9Aに対するターゲティング部分を含み得る。別の例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD8に対するターゲティング部分およびCD3に対するターゲティング部分を含み得る。別の例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、CD8に対するターゲティング部分およびPD-1に

【 0 7 3 6 】

【 0 7 3 7 】

【 0 7 3 8 】

【 0 7 3 9 】

一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分および同じまたは別のNK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびT細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびB細胞に対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞に対する1個または複数のターゲティング部分およびマクロファージに対する1個または複数のターゲティング部分を含む。一実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、NK細胞に対する1個または

複数のターゲティング部分および樹状細胞に対する 1 個または複数のターゲティング部分を含む。

【0740】

一実施形態では、本発明の Fc ベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍細胞に対するターゲティング部分および同じまたは異なる腫瘍細胞に対する第 2 のターゲティング部分を含む。このような実施形態では、ターゲティング部分は、本明細書で記載のいずれかの腫瘍抗原に結合し得る。

【0741】

いくつかの実施形態では、本発明の Fc ベースキメラタンパク質複合体は、脂肪細胞（例えば、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞）、肝臓脂質細胞、肝臓細胞、腎臓細胞（例えば、腎臓壁細胞、腎臓唾液腺、乳腺など）、導管細胞（精囊、前立腺などの）、腸管刷子縁細胞（微絨毛を有する）、外分泌腺線条導管細胞、胆嚢上皮細胞、小遠心路非線毛細胞、精巢上体主部細胞、精巢上体基底細胞、内皮細胞、エナメル芽上皮細胞（歯のエナメル質分泌）、耳の前庭系の半月面上皮細胞（プロテオグリカン分泌）、コルチ器官歯間上皮細胞（有毛細胞を覆う蓋膜分泌）、疎性結合組織線維芽細胞、角膜線維芽細胞（角膜実質細胞）、腱線維芽細胞、骨髄網状組織線維芽細胞、非上皮性線維芽細胞、周皮細胞、椎間板の髓核細胞、セメント芽細胞（cementoblast）／セメント芽細胞（cementocyte）（歯根骨様イワン細胞分泌）、象牙芽細胞／オドントサイト（odontocyte）（歯象牙質分泌）、ガラス軟骨軟骨細胞、繊維軟骨軟骨細胞、弾性軟骨軟骨細胞、骨芽細胞／骨細胞、骨前駆体細胞（骨芽細胞の幹細胞）、眼の硝子体の硝子体細胞、耳の外リンパ腔の星状細胞、肝臓星状細胞（Ito細胞）、脾臓星状細胞、骨格筋細胞、衛星細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、虹彩の筋上皮細胞、外分泌腺の筋上皮細胞、外分泌物分泌性上皮細胞（例えば、唾液腺細胞、乳腺細胞、涙腺細胞、汗腺細胞、皮脂腺細胞、前立腺細胞、胃腺細胞、膵腺房細胞、肺細胞）、ホルモン分泌細胞（例えば、下垂体細胞、神経分泌細胞、腸管および気道細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、精巢のライディッヒ細胞、睪島細胞）、角質化上皮細胞、湿性層化バリア上皮細胞、神経細胞（例えば、感覚変換器細胞、自律神経ニューロン細胞、感覚器官および周辺神経支持細胞、および中枢神経系ニューロン、ならびに介在ニューロン、主細胞、星状膠細胞、乏突起膠細胞、および上衣細胞などのグリア細胞）から選択される 1 個または複数の細胞上に見出されるものを含む目的の標的（例えば、抗原、受容体）に結合する認識ドメインを有する 1 個または複数のターゲティング部分を含む。

【0742】

Fc ベースキメラタンパク質複合体

いくつかの実施形態では、本技術の Fc ベースキメラタンパク質複合体は、少なくとも 1 個の本明細書で開示の Fc ドメイン、少なくとも 1 種の本明細書で開示のシグナル伝達物質（SA）、および少なくとも 1 個の本明細書で開示のターゲティング部分（TM）を含む。

【0743】

本発明の Fc ベースキメラタンパク質複合体が 2 つの融合タンパク質を包含し得ることは理解されている。

【0744】

いくつかの実施形態では、Fc ベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、ヘテロダイマー Fc ベースキメラタンパク質複合体は、トランス配向／構造を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロダイマー Fc ベースキメラタンパク質複合体は、シス配向／構造を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロダイマー Fc ベースキメラタンパク質複合体は、単一ポリペプチド上にシグナル伝達物質およびターゲティング部分を含まない。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fc ドメインまたはその Fc 鎖の同じ末端（N 末端または C 末端）上に存在する。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fc ドメインまたはその Fc 鎖の異なる末端（N 末端または C 末端）上に存在する。

【0745】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質は、Fcを欠くキメラタンパク質またはヘテロダイマー複合体ではないキメラタンパク質に比べて改善されたインビボ半減期を有する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質は、Fcを欠くキメラタンパク質またはヘテロダイマー複合体ではないキメラタンパク質に比べて改善された溶解度、安定性およびその他の薬理学的特性を有する。

【0746】

ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、2個の異なるポリペプチドから構成される。本明細書で記載のいくつかの実施形態では、ターゲティングドメインは、シグナル伝達物質とは異なるポリペプチド上に存在し、従って、1個のみのターゲティングドメインコピー、および同様に1種のみのシグナル伝達物質を含むタンパク質を作製できる（これは、望ましい特性との起こり得る干渉を制御できる）。さらに、いくつかの実施形態では、1個のターゲティングドメイン（例えば、VHH）のみにより、細胞表面上の抗原の架橋（これは、望ましくない効果を誘発する場合があります）を回避できる。さらに、いくつかの実施形態では、1個のシグナル伝達物質は、分子の「密集」、およびターゲティングドメインに依存して、エフェクター機能の回復により媒介される結合力との起こり得る干渉を緩和し得る。さらに、いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、2個のターゲティング部分を有することができ、これらは、2個の異なるポリペプチド上に配置できる。例えば、いくつかの実施形態では、両方のターゲティング部分（例えば、VHH）のC末端をマスクして、潜在的自己抗体または既存の抗体（例えば、VHH自己抗体または既存の抗体）を回避できる。さらに、いくつかの実施形態では、例えば、シグナル伝達物質（例えば、野生型シグナル伝達物質）とは異なるポリペプチド上にターゲティングドメインを有するヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、2つの細胞型（例えば、腫瘍細胞および免疫細胞）の「架橋」を優先し得る。さらに、いくつかの実施形態では、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、それぞれ、異なるポリペプチド上に2つのシグナル伝達物質を有し、より複雑な反応を可能にする（例えば、本明細書で記載の任意の2種のシグナル伝達物質、例えば、IFNアルファ2およびTNF）。

【0747】

さらに、いくつかの実施形態では、例えば、シグナル伝達物とは異なるポリペプチド上にターゲティングドメインを有し、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質の組み合わせの多様性を有するヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体が、実用的な方法で提供される。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で記載のいずれかのターゲティング部分を有するポリペプチドは、「既製品として」本明細書で記載のいずれかのシグナル伝達物質を有するポリペプチドと組み合わせて、単一Fcベースキメラタンパク質複合体中のターゲティング部分およびシグナル伝達物質の種々の組み合わせの迅速な生成を可能にする。

【0748】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1個または複数のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcドメイン、シグナル伝達物質およびターゲティング部分を連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、シグナル伝達物質およびターゲティング部分をそれぞれ連結する（または2つ以上のターゲティング部分の場合、シグナル伝達物質をターゲティング部分の1つに連結する）リンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、各シグナル伝達物質をFcドメインに連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、各ターゲティング部分をFcドメインに連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ターゲティング部分を別のターゲティング部分に連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体はシグナル伝達物質を別のシグナル伝達物質に連結するリンカーを含む。

【0749】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、2個以上のターゲティング部分を含む。このような実施形態では、ターゲティング部分は、同じターゲティング部分であっても、異なるターゲティング部分であってもよい。

【0750】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、2個以上のシグナル伝達物質を含む。このような実施形態では、シグナル伝達物質は、同じターゲティング部分であっても、異なるターゲティング部分であってもよい。

【0751】

例えば、いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcドメイン、少なくとも2種のシグナル伝達物質(SA)、および少なくとも2個のターゲティング部分(TM)を含み、Fcドメイン、シグナル伝達物質、およびターゲティング部分は、本明細書で開示のFcドメイン、シグナル伝達物質、およびターゲティング部分のいずれかから選択される。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0752】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図1A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0753】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図2A～Hのいずれかの概略図の形式を取る。

【0754】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図3A～Hのいずれかの概略図の形式を取る。

【0755】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図4A～Dのいずれかの概略図の形式を取る。

【0756】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図5A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0757】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図6A～Jのいずれかの概略図の形式を取る。

【0758】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図7A～Dのいずれかの概略図の形式を取る。

【0759】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図7Bのいずれかの概略図の形式を取る。

【0760】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図8A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0761】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図9A～Jのいずれかの概略図の形式を取る。

【0762】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図10A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0763】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図11A～Lのいずれかの概略図の形式を取る。

10

20

30

40

50

【0764】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図12A～Lのいずれかの概略図の形式を取る。

【0765】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図13A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0766】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図14A～Lのいずれかの概略図の形式を取る。

【0767】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図15A～Lのいずれかの概略図の形式を取る。

【0768】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図16A～Jのいずれかの概略図の形式を取る。

【0769】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図17A～Jのいずれかの概略図の形式を取る。

【0770】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図18A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0771】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図19A～Fのいずれかの概略図の形式を取る。

【0772】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、図20A～Eのいずれかの概略図の形式を取る。

【0773】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質はターゲティング部分に連結され、ターゲティング部分は同じ末端上でFcドメインに連結される（図1A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0774】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分はFcドメインに連結され、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は同じ末端上で連結される（図1A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0775】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、シグナル伝達物質は同じ末端上でFcドメインに連結される（図1A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0776】

いくつかの実施形態では、ホモダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、2個以上のターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、4個のターゲティング部分および2種のシグナル伝達物質が存在し、ターゲティング部分はFcドメインに連結され、シグナル伝達物質は同じ末端上でターゲティング部分に連結される（図2A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。4個のターゲティング部分および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2個のターゲティング部分はFcドメインに連結され、2個のターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、これらは、同じ末端上でFcドメインに連結される（図2A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。4個のターゲティング部分および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2個のターゲティング部

10

20

30

40

50

分は相互に連結され、各対からの1個のターゲティング部分は同じ末端上でFcドメインに連結され、シグナル伝達物質は同じ末端上でFcドメインに連結される（図2A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。4個のターゲティング部分および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2個のターゲティング部分は相互に連結され、各対からの1個のターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、この対の他のターゲティング部分はFcドメインに連結され、Fcドメインに連結されるターゲティング部分は同じ末端上で連結される（図2A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0777】

いくつかの実施形態では、ホモダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、2個以上のシグナル伝達物質を含む。4種のシグナル伝達物質および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2種のシグナル伝達物質は相互に連結され、対からの1種のシグナル伝達物質は同じ末端上でFcドメインに連結され、ターゲティング部分は同じ末端上でFcドメインに連結される（図3A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。4種のシグナル伝達物質および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2種のシグナル伝達物質は同じ末端上でFcドメインに連結され、2種のシグナル伝達物質はそれぞれターゲティング部分に連結され、ターゲティング部分は同じ末端上でFcドメインに連結される（図3A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。4種のシグナル伝達物質および2種のシグナル伝達物質が存在するいくつかの実施形態では、2種のシグナル伝達物質は相互に連結され、対の1種のシグナル伝達物質はターゲティング部分に連結され、ターゲティング部分は同じ末端上でFcドメインに連結される（図3A～H参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはホモダイマーである。

【0778】

例えば、いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcドメインを含み、Fcドメインはイオン対形成変異および／またはノブインホール変異、少なくとも1種のシグナル伝達物質、および少なくとも1個のターゲティング部分を含み、イオン対形成モチーフおよび／またはノブインホールモチーフ、シグナル伝達物質、およびターゲティング部分は、本明細書で開示のいずれかのイオン対形成モチーフおよび／またはノブインホールモチーフ、シグナル伝達物質、およびターゲティング部分から選択される。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0779】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質はターゲティング部分に連結され、これは、Fcドメインに連結される（図10A～Fおよび13A～F参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、これは、Fcドメインに連結される（図10A～Fおよび13A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0780】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質およびターゲティング部分は、Fcドメインに連結される（図4A～D、7A～D、10A～F、および13A～F参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、同じ末端上で異なるFc鎖に連結される（図4A～Dおよび7A～D参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、異なる末端上の異なるFc鎖に連結される（図4A～Dおよび7A～D参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、同じFc鎖に連結される（図10A～Fおよび13A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0781】

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質はFcドメインに連結され、2個のターゲティング部分は、1) Fcドメインに連結された1個のターゲティング部分を用いて相互に連結され得るか、または2) それぞれFcドメインに連結され得る(図5A~F、8A~F、11A~L、14A~L、16A~J、および17A~J参照)。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は1つのFc鎖に連結され、シグナル伝達物質はもう一方のFc鎖に連結される(図5A~Fおよび8A~F参照)。いくつかの実施形態では、対を形成したターゲティング部分およびシグナル伝達物質は、同じFc鎖に連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分はFcドメインに連結され、もう一方のターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、対を形成したターゲティング部分は、Fcドメインに連結される(図11A~Lおよび14A~L、16A~J、および17A~J参照)。いくつかの実施形態では、対形成しないターゲティング部分および対形成したターゲティング部分は、同じFc鎖に連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつかの実施形態では、対形成しないターゲティング部分および対形成したターゲティング部分は、異なるFc鎖に連結される(図16A~Jおよび17A~J参照)。いくつかの実施形態では、対形成しないターゲティング部分および対形成したターゲティング部分は、同じ末端上で連結される(図16A~Jおよび17A~J参照)。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

10

【0782】

20

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、これは、Fcドメインに連結され、対形成しないターゲティング部分はFcドメインに連結される(図11A~Lおよび14A~L、16A~J、および17A~J参照)。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成しないターゲティング部分は、同じFc鎖に連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成したターゲティング部分は、異なるFc鎖に連結される(図16A~Jおよび17A~J参照)。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成しないターゲティング部分は、同じ末端上で連結される(図16A~Jおよび17A~J参照)。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

30

【0783】

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は一緒に連結され、シグナル伝達物質は対形成したターゲティング部分の1個に連結され、シグナル伝達物質に連結されないターゲティング部分はFcドメインに連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0784】

40

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は一緒に連結され、シグナル伝達物質は対形成したターゲティング部分の1個に連結され、シグナル伝達物質はFcドメインに連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0785】

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分は両方ともシグナル伝達物質に連結され、ターゲティング部分の1個は、Fcドメインに連結される(図11A~Lおよび14A~L参照)。いくつ

50

かの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0786】

1種のシグナル伝達物質および2個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質はFcドメインに連結される（図16A～Jおよび17A～J参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、末端上で連結される（図16A～Jおよび17A～J参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0787】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は同じ末端上でFcドメインに連結され、ターゲティング部分はFcドメインに連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、同じFc鎖上でFcドメインに連結され、ターゲティング部分は、もう一方のFc鎖上で連結される（図18A～Fおよび19A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0788】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質はターゲティング部分に連結され、これは、Fcドメインに連結され、もう一方のシグナル伝達物質はFcドメインに連結される（図6A～Jおよび9A～J、12A～L、および15A～L参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分および対形成しないシグナル伝達物質は、異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分および対形成しないシグナル伝達物質は、同じ末端上で異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分および対形成しないシグナル伝達物質は、異なる末端上で異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分および対形成しないシグナル伝達物質は、同じFc鎖に連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0789】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、ターゲティング部分はシグナル伝達物質に連結され、これは、Fcドメインに連結され、もう一方のシグナル伝達物質はFcドメインに連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成しないシグナル伝達物質は、異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成しないシグナル伝達物質は、同じ末端上で異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質および対形成しないシグナル伝達物質は、異なる末端上で異なるFc鎖に連結される（図6A～Jおよび9A～J参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0790】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は一緒に連結され、ターゲティング部分は対形成したシグナル伝達物質の1種に連結され、ターゲティング部分はFcドメインに連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

10

20

30

40

50

【0791】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は一緒に連結され、シグナル伝達物質の1種はFcドメインに連結され、ターゲティング部分はFcドメインに連結される（図12A～Lおよび15A～L、18A～F、および19A～F参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質およびターゲティング部分は、同じFc鎖に連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質およびターゲティング部分は、異なるFc鎖に連結される（図18A～Fおよび19A～F参照）。いくつかの実施形態では、対形成したシグナル伝達物質およびシグナル伝達物質は、同じ末端上で異なるFc鎖に連結される（図18A～Fおよび19A～F参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

10

【0792】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は両方ともターゲティング部分に連結され、シグナル伝達物質の1種はFcドメインに連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。いくつかの実施形態では、Fcドメインはヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、そのエフェクター機能を低減または除去する変異を含む。

【0793】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は一緒に連結され、シグナル伝達物質の1種はターゲティング部分に連結され、もう一方のシグナル伝達物質はFcドメインに連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。

20

【0794】

2種のシグナル伝達物質および1個のターゲティング部分が存在するいくつかの実施形態では、各シグナル伝達物質はFcドメインに連結され、ターゲティング部分はシグナル伝達物質の1種に連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、同じFc鎖に連結される（図12A～Lおよび15A～L参照）。

【0795】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分またはシグナル伝達物質は、 C_H2 および C_H3 ドメインの片方または両方、および任意選択でヒンジ領域を含む、Fcドメインに連結される。例えば、単一ヌクレオチド配列としてFcドメインに連結されたターゲティング部分、シグナル伝達物質、またはこれらの組み合わせをコードするベクターを用いて、このようなポリペプチドを作製できる。

30

【0796】

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

40

【0797】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ターゲティング部分およびシグナル伝達物質を連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、シグナル伝達物質内にリンカーを含む（例えば、単鎖TNFの場合には、トリマーを得るために2つのリンカーを含み、またはIFNγの場合には、ダイマーを得るために1つのリンカーを含み得る）。

【0798】

本技術は、種々のリンカー配列の使用を意図している。種々の実施形態では、リンカー

50

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

10

【0799】

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

20

【0800】

いくつかの実施形態では、リンカーの長さは、ターゲティング部分とシグナル伝達物質、および／またはFcドメインのそれらの標的（例えば、受容体）への効率的結合を可能にする。例えば、いくつかの実施形態では、リンカー長さは、1つのターゲティング部分とシグナル伝達物質の同じ細胞上の受容体への効果的結合、ならびにその他のターゲティング部分の別の細胞への効果的結合を可能とする。細胞対の例は、本明細書の他の場所で提供される。

30

【0801】

いくつかの実施形態では、リンカーの長さは、少なくとも、同じ細胞上のターゲティング部分、シグナル伝達物質、および／またはFcドメイン標的（例えば、受容体）の結合部位間の最短距離に等しい。いくつかの実施形態では、リンカーの長さは、同じ細胞上のターゲティング部分、シグナル伝達物質、および／またはFcドメイン標的の結合部位間の最短距離の、少なくとも2倍、または3倍、または4倍、または5倍、または10倍、または20倍、または25倍、または50倍、または100倍、または、それを超える。

40

【0802】

いくつかの実施形態では、あるリンカーは2個のターゲティング部分を相互に連結し、このリンカーは短い長さを有し、また、あるリンカーはターゲティング部分とシグナル伝達物質を連結し、このリンカーは2個のターゲティング部分を連結するリンカーより長い。例えば、2個のターゲティング部分を連結するリンカーと、ターゲティング部分とシグナル伝達物質とを連結するリンカーとの間のアミノ酸長さの差異は、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3

50

【 0 8 0 3 】

【 0 8 0 4 】

【 0 8 0 5 】

いくつかの実施形態では、リンカーは抗体（例えば、I g G、I g A、I g D、および I g E、サブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4、および I g A 1 および I g A 2）を含む）のヒンジ部である。種々の実施形態では、リンカーは抗体（例えば、I g G、I g A、I g D、および I g E、サブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4、および I g A 1 および I g A 2）を含む）のヒンジ部である。I g G、I g A、I g D、および I g E クラス抗体で見つかるヒンジ部は、フレキシブルスパーサーとして機能し、F a b 部が空間中で自由に動くことを可能にする。定常領域と対照的に、ヒンジドメインは、構造上多様であり、免疫グロブリンクラスおよびサブクラス中の配列および長さの両方で変動する。例えば、ヒンジ部の長さおよび可撓性は、I g G サブクラス内で変動する。I g G 1 のヒンジ部は、アミノ酸 2 1 6 ~ 2 3 1 を包含し、それが自由にフレキシブルであるために、F a b フラグメントは、それらの対称軸の周りで回転でき、最初の 2 つの重鎖間ジスルフィド架橋を中心とする球内で移動できる。I g G 2 は、I g G 1 より短いヒンジを有し、1 2 個のアミノ酸残基と 4 個のジスルフィド架橋を有する。I g G 2 のヒンジ部は、グリシン残基を欠き、比較的短く、また、追加の重鎖間ジスルフィド架橋により安定化された剛性ポリプロリン二重らせん体を含む。これらの特性は、I g G 2 分子の可撓性を制限する。I g G 3 は、6 2 個のアミノ酸を含む（2 1 個のプロリンと 1 1 個のシステインを含む）その特有の延長されたヒンジ部（I g G 1 ヒンジの約 4 倍の長さ）により、他のサブクラスとは異なり、柔軟性を欠くポリプロリン二重らせん体を形成する。I g G 3 では、F a b フラグメントは、F c フ

ラグメントから比較的遠くに離れており、より大きな可撓性を分子に与える。IgG3の伸びたヒンジは、他のサブクラスに比べて、そのより高分子量の原因でもある。IgG4のヒンジ部は、IgG1より短く、その可撓性は、IgG1とIgG2との中間である。ヒンジ部の可撓性は、次の順に低下すると報告されている：IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2。

【0806】

結晶学的調査によれば、免疫グロブリンヒンジ部は、機能的に次の3つの領域にさらに細分できる：上部ヒンジ部、コア部、および下部ヒンジ部。Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130:87を参照されたい。上部ヒンジ部は、C_{H1}のカルボキシル末端から運動を制限するヒンジ中の最初の残基、通常は2つの重鎖間の鎖間ジスルフィド結合を形成する最初のシステイン残基のアミノ酸を含む。上部ヒンジ部の長さは、抗体のセグメントの可撓性と相関する。コアヒンジ部は重鎖間ジスルフィド架橋を含み、下部ヒンジ部はC_{H2}ドメインのアミノ末端に繋がり、C_{H2}中の残基を含む。野性型ヒトIgG1のコアヒンジ部は、配列Cys-Pro-P-Cys（配列番号1341）を含み、これは、ジスルフィド結合形成により二量体化されると、環状オクタペプチドを生成し、これが旋回軸として機能することにより、可撓性を付与すると考えられている。種々の実施形態では、リンカーは、任意の抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）の1、または2、または3個の上部ヒンジ部、コア部および下部ヒンジ部を含む。ヒンジ部はまた、1つまたは複数のグリコシル化部位も含み得、これは、多くの構造上異なるタイプの炭水化物付着部位を含む。例えば、IgA1は、ヒンジ部の17アミノ酸セグメント内に5つのグリコシル化部位を含み、腸内プロテアーゼに対するヒンジ部ポリペプチドの耐性を付与し、これは、分泌性免疫グロブリンにとって、有利な性質であると考えられる。種々の実施形態では、本発明のリンカーは、1つまたは複数のグリコシル化部位を含む。種々の実施形態では、リンカーは、ヒトIgG4抗体のヒンジーC_{H2}-C_{H3}ドメインである。

【0807】

いくつかの実施形態では、リンカーはPEGなどの合成リンカーである。

【0808】

種々の実施形態では、リンカーは機能性であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、フォールディングおよび／または安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態学を改善するように、および／またはFcベースキメラタンパク質複合体の生物活性を改善するように機能し得る。別の例では、リンカーは、Fcベースキメラタンパク質複合体を特定の細胞型または部位に向けるように機能し得る。

【0809】

官能基

いくつかの実施形態では、本技術のFcベースキメラタンパク質複合体は、1個または複数の官能基、残基、または部分を含む。種々の実施形態では、1つまたは複数の官能基、残基、または部分は、本明細書に記載のFcタンパク質、シグナル伝達物質およびターゲティング部分のいずれかに結合されるか、または遺伝的に融合される。いくつかの実施形態では、このような官能基、残基または部分は、1つまたは複数の望ましい特性または官能基を本技術のFcベースキメラタンパク質複合体に付与する。このような官能基およびそれらをFcベースキメラタンパク質複合体に導入する技術の例は、当技術分野において既知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980)を参照されたい。

【0810】

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、別の物質と複合化および／または融合して、半減期を延長するか、または別の方法で薬力学的および薬物動態学的特性を改善し得る。例えば、いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合

体は、PEG、XTEN（例えば、rPEGとして）、ポリシアル酸（POLYXEN）、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミンまたはHSA）、エラスチン様タンパク質（ELP）、PAS、HAP、GLK、CTP、トランスフェリンなどの1種または複数と融合または複合化され得る。

【0811】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、好適な薬学的に許容可能なポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）（PEG）またはその誘導体（例えば、メトキシポリ（エチレングリコール）またはmPEG）を含む。いくつかの実施形態では、PEG部分の結合は、半減期を伸ばし、および／またはFcベースキメラタンパク質複合体の免疫原性を低減する。通常、抗体および抗体フラグメント（限定されないが、VHHなどの単ドメイン抗体を含む）に対し当該技術分野で用いられるペグ化などの、任意の好適な形態のペグ化が用いられる；例えば、Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002)；VeroneseおよびHarrisによる、Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003)，HarrisおよびChessによる、Nat. Rev. Drug Discov., 2, (2003)ならびに国際公開第04/060965号を参照されたい。これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質のペグ化のための種々の試薬も、例えば、Nektar Therapeutics, USAから市販されている。いくつかの実施形態では、特に、システイン残基を介する部位特異的なペグ化が使用される（例えば、Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)を参照されたい。この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、この目的のために、PEGは、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体中で自然発生するシステイン残基に結合され得る。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、PEGの結合のための1個または複数のシステイン残基を適切に導入するように改変されるか、またはPEGの結合のための1個または複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列が、当該技術分野において既知の技術を使用してFcベースキメラタンパク質複合体のアミノ末端および／またはカルボキシ末端に融合され得る。

【0812】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、N結合型またはO結合型グリコシル化を含む。いくつかの実施形態では、N結合型またはO結合型グリコシル化は、翻訳時修飾および／または翻訳後修飾の一部として導入される。

【0813】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、1つまたは複数の検出可能なラベルまたは他のシグナル生成基または部分を含む。好適なラベルおよびそれらの結合、使用および検出のための技術は、当技術分野において既知であり、限定されないが、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、ならびにフルオレサミンおよび蛍光金属、例えば、Euまたはランタニド系列の他の金属）、リン光標識、化学発光ラベルまたは生物発光ラベル（例えば、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウム・エステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、オキサレートエステル、ジオキセタンまたはGFPおよびその類似体）、放射性同位体、金属、金属キレートもしくは金属カチオンまたはインビボ、インビトロまたはインサイツ診断および画像処理での使用に特に適している他の金属もしくは金属カチオン、ならびに発色団および酵素（例えば、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルターV-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、ビオチンアビジンペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ）を含む。他の好適なラベル

としては、NMRまたはESR分光法を用いて検出できる部分が挙げられる。このように標識された本発明のVHHおよびポリペプチドは、特定の標識の選択により、例えば、インビトロ、インビボまたはインサイツアッセイ（これ自体ELISA、RIAおよびEIAおよびその他の「サンドイッチ法」などとして知られるイムノアッセイ）ならびにインビボ診断および画像処理の目的に使用し得る。

【0814】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、Fcベースキメラタンパク質複合体に結合または遺伝的に融合されたタグを含む。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、単一タグまたは複数タグを含み得る。例えば、タグは、Fcベースキメラタンパク質複合体の目的の、標的または、例えば、腫瘍抗原などのいずれか他の目的抗原に対する結合を阻害または妨害しない、ペプチド、糖、またはDNA分子である。種々の実施形態では、タグは、少なくとも約：3～5アミノ酸長、5～8アミノ酸長、8～12アミノ酸長、12～15アミノ酸長、または15～20アミノ酸長である。タグの例は、例えば、米国特許出願公開第2013/0058962号に記載されている。いくつかの実施形態では、タグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびヒスチジン（His）タグなどの親和性タグである。ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ヒスチジンタグを含む。

【0815】

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

【0816】

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

【0817】

Fcベースキメラタンパク質複合体の改変および産生

種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、VHHであるターゲットング部分を含む。種々の実施形態では、VHHは、特定の生物源または特定の産生法に限定されない。例えば、VHHは通常、次記により得ることができる：（1）天然の重鎖抗体のV_HHドメインを単離することにより；（2）天然のV_HHドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により；（3）天然のV_HHドメインの「ヒト化」により、またはこのようなヒト化V_HHドメインをコードする核酸の発現により；（4）ヒト由来などの哺乳動物種由来などの任意の動物種由来の天然のVHドメインの「ラクダ化」、またはこのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現により；（5）当該技術分野で記載の「ドメイン抗体」または「Dab」の「ラクダ化」により、またはこのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現により；（6）当該技術分野において既知のタンパク質、ポリペプチドまたはその他のアミノ酸配列のための合成または半合成技術を用い

ることにより；（７）当該技術分野において既知の核酸合成技術を用いてV_HHをコードする核酸を調製し、続けて、こうして得られた拡散を発現させることにより；および／または（８）前述の１つまたは複数の任意の組み合わせにより。

【0818】

ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、目的の標的に対する天然の重鎖抗体のV_HHドメインに対応するV_HHを含む。いくつかの実施形態では、このようなV_HH配列は通常、ラクダ科の動物種を目的の標的（例えば、XCR1、Clec9A、CD8、SIRP1α、FAPなど）に基づく分子で適切に免疫化する（すなわち、目的の標的に対する免疫応答を生じさせる、および／または目的の標的に対する重鎖抗体を産生させるように）ことにより、ラクダ科の動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、またはB細胞の任意の試料）を得ることにより、および任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、目的の標的に対するV_HH配列を生成することにより、生成または得ることができる。いくつかの実施形態では、目的の標的に対する天然のV_HHドメインは、ラクダ科の動物V_HH配列の未処理ライブラリーから、例えば、当該技術分野で既知の１種または複数のスクリーニング技術を使って、目的の標的、またはその少なくとも１つの部分、フラグメント、抗原決定基またはエピトープを用いてこのようなライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることができる。このようなライブラリーおよび技術は、例えば、国際公開第99/37681号、国際公開第01/90190号、国際公開第03/025020号、および国際公開第03/035694号に記載されている。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、例えば、国際公開第00/43507号に記載のランダム変異誘発および／またはCDRシャッフリングなどの技術により未処理V_HHライブラリーから得られたV_HHライブラリーなどの未処理V_HHライブラリー由来の改善された合成または半合成ライブラリーを使用し得る。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、目的の標的に対するV_HH配列を得る別の技術は、重鎖抗体を発現できる遺伝子導入哺乳動物を適切に免疫化し（すなわち、目的の標的に対する免疫応答を生じさせる、および／または目的の標的に対する重鎖抗体を産生させるように免疫化し）、遺伝子導入哺乳動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、またはB細胞の任意の試料）を得て、その後、任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、XCR1に対するV_HH配列を生成することを含む。例えば、このために、国際公開第02/085945号および国際公開第04/049794号（これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の重鎖抗体発現マウスおよびさらなる方法および技術を使用できる。

【0819】

ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、「ヒト化」、すなわち、天然のV_HH配列（および特に、フレームワーク配列中の）のアミノ酸配列の１個または複数のアミノ酸残基を、ヒトの従来の４鎖抗体由来のV_HHドメイン中の対応する位置（単一または複数）にある１個または複数のアミノ酸残基で置換しているV_HHを含む。これは、当該技術分野において既知のヒト化技術を使用して実施できる。いくつかの実施形態では、可能なヒト化置換またはヒト化置換の組み合わせは、当該技術分野において既知の方法、例えば、V_HHの配列と天然のヒトV_HHドメインの配列との間の比較により決定し得る。いくつかの実施形態では、ヒト化置換は、得られたヒト化V_HHが置換後の時点でも有利な機能特性を保持しているように選択される。通常、ヒト化の結果として、本発明のV_HHは、より「ヒト様」になり得るが、対応する天然のV_HHドメインと比較して、低減された免疫原性などの好ましい特性を依然として保持している。種々の実施形態では、本発明のヒト化V_HHは、当該技術分野において既知の任意の好適な方法で得ることができ、したがって、出発材料として天然のV_HHドメインを含むポリペプチドを用いて得たポリペプチドに厳密に限定されない。

【0820】

ある実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、「ラクダ化」、すなわち、

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

10

【0821】

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

20

30

【0822】

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

40

【0823】

本技術のF_cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸は、発現ベクター中に組み込まれ（連結され）てよく、このベクターは、遺伝子導入、形質転換、または形質導入技術により宿主細胞中に導入できる。例えば、本技術のF_cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸を、レトロウイルス形質導入により宿主細胞中に導入できる。宿主細胞の例は、大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胎児腎臓293（HEK293）細胞、ヒーラ細胞、仔ハムスター腎（BHK）細胞、サル腎培養細胞

50

(C O S)、またはヒト肝細胞癌細胞(例えば、H e p G 2)、および骨髓腫細胞である。形質転換宿主細胞は、宿主細胞に、本技術のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする遺伝子を発現させるのを可能にする条件下で増殖させることができる。したがって、種々の実施形態では、本発明は、本技術のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。種々の実施形態では、本発明は、このような発現ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

【0824】

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

【0825】

本技術のF cベースキメラタンパク質複合体は、タンパク質の発現を許容する条件下で、F cベースキメラタンパク質複合体をコードする発現ベクターを形質導入した宿主細胞を増殖させることにより産生できる。発現後、タンパク質を収集し、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(G S T)およびヒスチジン(H i s)などの親和性タグまたはクロマトグラフィーにより、当該技術分野において、周知の技術を用いて精製できる。ある実施形態では、F cベースキメラタンパク質複合体は、ヒスチジントグを含む。ある実施形態では、F cベースキメラタンパク質複合体結合物質はH i sタグおよびH i sタグの切断を可能にするタンパク分解部位を含む。

【0826】

したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸を提供する。種々の実施形態では、本発明は、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0827】

種々の実施形態では、本明細書に記載のF cベースキメラタンパク質複合体を改変および産生する方法は、2つ以上のターゲティング部分および/またはシグナル伝達物質を含む任意の多重特異的F cベースキメラタンパク質複合体の改変と産生に容易に適応させることができる。

【0828】

種々の実施形態では、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体は、例えば、患者中でインビボ発現され得る。例えば、種々の実施形態では、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体は、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする核酸の形態で投与され得る。種々の実施形態では、核酸はD N AまたはR N Aである。いくつかの実施形態では、本発明のF cベースキメラタンパク質複合体は、修飾m R N A、すなわち、1種または複数の修飾ヌクレオチドを含むm R N Aによりコードされる。いくつかの実施形態では、修飾m R N Aは、米国特許第8, 278, 036号で見出される1つまたは複数の修飾を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、修飾m R N Aは、m 5 C、m 5 U、m 6 A、s 2 U、Ψ、および2'-O-メチル-Uの内の1種または複数を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の1個または複数のF cベースキメラタンパク質複合体をコードする修飾m R N Aの投与に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾m R N Aを含む遺伝子治療ベクターに関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾m R N Aを含む遺伝子治療ベクターに関する。種々の実施形態では、核酸は、腫瘍溶解性ウイルス、例えば、アデノウイルス、レオウイルス、はしか、単純ヘルペス、ニューカッスル病ウイルスまたはワクシニアの形態である。

10

20

30

40

50

【0829】

薬学的に許容可能な塩および賦形剤

本明細書で記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、十分に塩基性の官能基を有することができ、これは無機もしくは有機酸またはカルボキシル基と反応することができ、またこれは、無機または有機塩基と反応することができ、薬学的に許容可能な塩を形成することができる。薬学的に許容可能な酸付加塩は、当該技術分野でよく知られているように、薬学的に許容可能な酸から形成される。このような塩には、例えば、Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) および The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002、に挙げられた薬学的に許容可能な塩を含む。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0830】

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

20

30

【0831】

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

40

【0832】

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

50

【0833】

医薬組成物および製剤

種々の実施形態では、本発明は、本明細書で記載のFcベースキメラタンパク質複合体および薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体を含む医薬組成物に関する。さらなる実施形態では、本発明は、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体と本明細書に記載のいずれか他の治療薬との組み合わせを含む医薬組成物に関する。本明細書で記載のいずれの医薬組成物も、薬学的に許容可能な担体またはビークルを含む組成物の成分として、対象に投与することができる。このような組成物は、適切な投与用の形態を与えるように、適切な量の薬学的に許容可能な賦形剤を任意に含み得る。

10

【0834】

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

20

【0835】

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

30

【0836】

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

40

【0837】

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

50

【0838】

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

【0839】

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

【0840】

一実施形態では、本明細書で記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、経口投与に適合された組成物として、常法に従って処方される。経口送達用の組成物は、錠剤、トローチ剤、水性または油性懸濁剤、粒剤、散剤、乳剤、カプセル剤、シロップ剤、またはエリキシル剤の形態であってよい。経口投与される組成物は、薬学的に口当たりの良い製剤を提供するために、1種または複数の薬剤、例えば、ラクトース、アスパルテームまたはサッカリンなどの甘味料、ペパーミント、冬緑油またはチェリー油などの調味料、着色料および保存剤を含み得る。さらに、タブレットまたは丸薬形態では、組成物をコートして、消化管での崩壊および吸収を遅らせることにより長期間にわたり持続作用を可能とすることができる。本明細書に記載のいずれかの浸透活性駆動性Fcベースキメラタンパク質複合体を取り囲む選択的透過性膜も、経口投与組成物として好適である。これらの後者のプラットフォームでは、カプセルの周りの環境からの液体が運搬化合物により吸収され、この化合物は膨潤し、開口部を介して薬剤または薬剤組成物を追い出す。これらの送達プラットフォームは、即時放出製剤の急上昇プロファイルとは対照的に、基本的に0次の送達プロファイルを提供することができる。グリセロールモノステアレートまたはグリセロールステアレートなどの時間遅延物質も使用することができる。経口組成物は、標準的な賦形剤、例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、および炭酸マグネシウムを含んでよい。一実施形態は、賦形剤は医薬品グレードである。活性化化合物に加えて、懸濁剤は、例えば、エトキシ化

【0841】

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

【0842】

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

好適な混合物を含む、溶媒または分散媒であってよい。

【0843】

本明細書にて提供される組成物は、単独でまたは他の好適な成分と組み合わせて、吸入により投与されるエーロゾル製剤（すなわち、「噴霧化」製剤）を作製することができる。エーロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの許容され得る加圧化噴射剤中に入れることができる。

【0844】

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

【0845】

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

【0846】

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

【0847】

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

【0848】

投与および投与量

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

【0849】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載のFcベースキメラタンパク質複合体の好適

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

10

【0850】

本明細書で記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体の個々の用量は、例えば、単位剤形当たり、約 0.01 mg ~ 約 100 g、約 0.01 mg ~ 約 75 g、約 0.01 mg ~ 約 50 g、約 0.01 mg ~ 約 25 g、約 0.01 mg ~ 約 10 g、約 0.01 mg ~ 約 7.5 g、約 0.01 mg ~ 約 5 g、約 0.01 mg ~ 約 2.5 g、約 0.01 mg ~ 約 1 g、約 0.01 mg ~ 約 100 mg、約 0.1 mg ~ 約 100 mg、約 0.1 mg ~ 約 90 mg、約 0.1 mg ~ 約 80 mg、約 0.1 mg ~ 約 70 mg、約 0.1 mg ~ 約 60 mg、約 0.1 mg ~ 約 50 mg、約 0.1 mg ~ 約 40 mg の有効成分、約 0.1 mg ~ 約 30 mg、約 0.1 mg ~ 約 20 mg、約 0.1 mg ~ 約 10 mg、約 0.1 mg ~ 約 5 mg、約 0.1 mg ~ 約 3 mg、約 0.1 mg ~ 約 1 mg、または単位剤形当たり約 5 mg ~ 約 80 mg を含む単位剤形として投与できる。例えば、単位剤形は、約 0.01 mg、約 0.02 mg、約 0.03 mg、約 0.04 mg、約 0.05 mg、約 0.06 mg、約 0.07 mg、約 0.08 mg、約 0.09 mg、約 0.1 mg、約 0.2 mg、約 0.3 mg、約 0.4 mg、約 0.5 mg、約 0.6 mg、約 0.7 mg、約 0.8 mg、約 0.9 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 3 mg、約 4 mg、約 5 mg、約 6 mg、約 7 mg、約 8 mg、約 9 mg、約 10 mg、約 15 mg、約 20 mg、約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、約 100 mg、約 200 mg、約 500 mg、約 1 g、約 2.5 g、約 5 g、約 10 g、約 25 g、約 50 g、約 75 g、約 100 g（これらの間の全ての値および範囲を含む）であってよい。

20

30

【0851】

一実施形態では、本明細書で記載の Fc ベースキメラタンパク質複合体は、毎日約 0.01 mg ~ 約 100 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 75 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 50 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 25 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 10 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 7.5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 2.5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 1 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 100 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 100 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 95 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 90 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 85 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 80 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 75 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 70 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 65 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 60 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 55 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 50 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 45 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 40 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 35 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 30 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 25 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 20 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 15 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 10 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 5 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 3 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 1 mg、または毎

40

50

日約5mg～約80mgの量で投与される。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、約0.01mg、約0.02mg、約0.03mg、約0.04mg、約0.05mg、約0.06mg、約0.07mg、約0.08mg、約0.09mg、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約0.6mg、約0.7mg、約0.8mg、約0.9mg、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mg、約50mg、約55mg、約60mg、約65mg、約70mg、約75mg、約80mg、約85mg、約90mg、約95mg、約100mg、約200mg、約500mg、約1g、約2.5g、約5g、約7.5g、約10g、約25g、約50g、約75g、約100g（これらの間の全ての値および範囲を含む）の1日量で投与される。 10

【0852】

本発明の特定の実施形態では、本明細書で記載のFcベースキメラタンパク質複合体を含む医薬組成物は、例えば、1日2回以上（例えば、毎日約2回、約3回、約4回、約5回、約6回、約7回、約8回、約9回、または約10回）、1日約1回、約1日おき、約3日おき、週約1回、2週毎に約1回、毎月約1回、2ヶ月毎に約1回、3ヶ月毎に約1回、6ヶ月毎に約1回、または毎年約1回投与してよい。

【0853】

併用療法および追加の治療薬

種々の実施形態では、本発明の医薬組成物は、追加の治療薬と共に同時投与される。同時投与は、同時または順次であってよい。 20

【0854】

一実施形態では、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体は、対象に同時に投与される。本明細書で使用される場合、用語の「同時に」は、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体が約60分以下、例えば、約30分以下、約20分以下、約10分以下、約5分以下、または約1分以下の時間間隔で投与されることを意味する。追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体の投与は、単一製剤（例えば、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体を含む製剤）または別々の製剤（例えば、追加の治療薬を含む第1の製剤およびFcベースキメラタンパク質複合体を含む第2の製剤）の同時投与により行うことが可能である。 30

【0855】

同時投与は、それらの投与のタイミングが、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体の薬理学的活性が時間経過と共に重なりあい、それにより組み合わせられた治療効果が発揮されるような場合には、治療薬が同時に投与される必要はない。例えば、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体は、順次に投与できる。本明細書で使用される場合、用語の「順次に」は、追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体が約60分を超える時間間隔で投与されることを意味する。例えば、追加の治療薬とFcベースキメラタンパク質複合体との逐次投与の間の時間間隔を、約60分を超えて、約2時間を超えて、約5時間を超えて、約10時間を超えて、約1日を超えて、約2日を超えて、約3日を超えて、約1週間を超えて間隔を開ける、約2週間を超えて間隔を開ける、または約1ヶ月を越えて間隔を開けることができる。最適投与時間は、投与される追加の治療薬およびFcベースキメラタンパク質複合体の代謝、排泄速度、および／または薬力学的活性に依存するであろう。追加の治療薬またはFcベースキメラタンパク質複合体のいずれかを、最初に投与してよい。 40

【0856】

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

【0857】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、別 50

の治療薬と同時投与されると、相乗的に作用する。このような実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体および追加の治療薬は、その治療薬が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。

【0858】

いくつかの実施形態では、本発明は、追加の治療薬としての化学療法剤に関する。例えば、限定されないが、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体と化学療法剤とのこのような組み合わせは、本明細書の別の場所で記載のように、癌の治療に使用される。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパ、CYTOXAN（シクロホスファミド）、スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン、アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ、エチレンイミン、メチラメラミン例えば、アルトレタミン、トリエチルエネメラミン、トリエチレンネフォスフォラミド、トリエチレンチオフォスフォラミドおよび、トリメチロールメラミン、アセトゲニン（例えば、プラタシン、プラタチノン）、カントテシン（合成類似剤トポテカンを含む）、ブリオスタチン、カリストアチン（callystatin）、CC-1065（アドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）、クリプトフィシン（例えば、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8など）、ドラスタチン、デュオカルマイシン（合成類似薬KW-2189およびCB1-TM1を含む）、エレウテロビン、パンクラチスタチン、サルコディクチン、スポンギスタチン、ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化メクロルエタミン塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン（ranimustine）、抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（カリチアマイシン、特にカリチアマイシガンマIIとカリチアマイシンオメガII（Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)を参照）、ダイネマイシン、ダイネマイシンAを含む、ビスフォスフォネート、例えば、クロドロネート、エスペラマイシン、ならびに、ネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン（ドキソルビシン）（モルフォリノドキソルビシン、シアノモルフォリノドキソルビシン、2-ピロリノドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（例えば、マイトマイシンC）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン、代謝拮抗薬、例えば、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）、葉酸の類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキサート、プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド（minogluthetamide）、ミトタン、トリロスタン、葉酸補充液、例えば、フロリン酸（frolinic acid）、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ビスアントレン、エダトラキセート（edatraxate）、デメコルチン、ジアジクオン、エルフォルミチン（elformithine）、エ

10

20

30

40

50

リプチニウムアセテート、エポチロン、エトグルシド、ガリウムニトレート、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン (lonidainine)、メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルビシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、PSK多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン (例えば、T2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイディン)、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド (アラ-C)、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えば、タキソールパクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、アブラキサクレモフォアフリー、アルブミン処理ナノ粒子形成パクリタキセル (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、タキソテールドキセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)、クロランブシル、ジェムザール (ゲムシタビン)、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキセート、白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン、ビンブラスチン、白金、エトポシド (VP-16)、イホスファミド、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ナベルビン (ビノレルビン)、ノバントロン、テニポシド、エダトレキセート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン (キャンプトサー, CPT-11) (イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンの治療法を含む)、トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000、ゲルルオロメチルオルニチン (DMFO)、レチノイド、例えば、レチノイン酸、カペシタビン、コンプレタスタチン、ロイコボリン (LV)、オキサリプラチン、オキサリプラチン治療法 (FOLFOX) を含む、ラパチニブ (Tykerb)、PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFRの阻害剤 (例えば、エルロチニブ (Tarceva) および細胞増殖を抑制するVEGF-Aならびに上述のいずれかの薬剤の薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体、が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療の方法は、放射線の使用をさらに含み得る。さらに、治療の方法は、光線力学的治療の使用をさらに含み得る。

10

20

30

【0859】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、Fcベースキメラタンパク質複合体および化学療法剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、化学療法剤を用いた治療を受けている患者に対するFcベースキメラタンパク質複合体の投与に関する。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、DNA挿入剤、例えば、限定されないが、ドキソルビシン、シスプラチン、ダウノルビシン、およびエビルビシンである。ある実施形態では、DNA挿入剤は、ドキソルビシンである。

【0860】

例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、ドキソルビシンと同時投与されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍または癌の治療での使用において、ドキソルビシンと同時投与されると相乗的に作用する。例えば、Fcベースキメラタンパク質複合体とドキソルビシンとの同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および/または進行および/または転移を遅らせ得る。例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体とドキソルビシンの組み合わせは、単剤療法の場合に単独で使用する薬剤に比べて、改善された安全性プロファイルを示し得る。例示的实施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体およびドキソルビシンは、その物質が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、変異IFN α 2などの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異IFN α 2は、配列番号1または配列番号2を基準にして

40

50

、M148A、R149A、およびL153Aなどのように、148、149および153の位置で1個または複数の変異を含む。

【0861】

いくつかの実施形態では、本発明は、1種または複数の免疫調節薬、例えば、限定されないが、免疫チェックポイントを調節する物質を用いる併用療法に関する。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、PD-L1、およびPD-L2の内の1種または複数

を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1阻害剤である。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、PD-L1、およびPD-L2の内の1種または複数に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、ニボルバム（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、オプジーボ、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペムブロリズマブ（キイトルーダ、MERCCK）、ピディリズマブ（CT-011, CURE TECH）、MK-3475（MERCCK）、BMS936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、MPDL3280A（ROCHE）などの抗体である。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lの内の1つまたは複数

を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lの内の1つまたは複数に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、ウレルマブ（BMS-663513および抗4-1BB抗体としても知られる）などの抗体である。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、固形腫瘍および／またはB細胞非ホジキンリンパ腫および／または頭頸部癌および／または多発性骨髄腫の治療のために、ウレルマブと組み合わせられる（任意選択で、ニボルバム、リリルマブ、およびウレルマブの内の1種または複数と組み合わせられる）。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2、およびPPP2R5Aの内の1種または複数

を標的とする物質である。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2、およびPPP2R5Aの内の1種または複数に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、イピリムマブ（MDX-010、MDX-101、ヤーボイ、BMS）および／またはトレメリムマブ（Pflizer）などの抗体である。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、黒色腫、前立腺癌、および肺癌の内の1種または複数の治療のために、イピリムマブと組み合わせられる（必要に応じ、バビツキシマブと組み合わせられる）。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、オフアツムマブ（GENMAB）、オビヌツズマブ（GAZYVA）、AME-133v（APPLIED MOLECULAR EVOLUTION）、オクレリズマブ（GENENTECH）、TRU-015（TRUBION/EMERGENT）、ベルツズマブ（IMMU-106）などの抗体である。

【0862】

いくつかの実施形態では、本発明は、Fcベースキメラタンパク質複合体およびチェックポイント阻害剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、チェックポイント阻害剤で治療を受けている患者に対するFcベースキメラタンパク質複合体の投与に関する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、およびCTLA-4（本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、および抗CTLA-4物質のいずれかを含む）の内の1種または複数

を標的とする物質である。いくつかの実施形態ではチェックポイント阻害剤は、ニボルバム（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、オプジーボ、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペムブロリズマブ（キイトルーダ、MERCCK）、ピディリズマブ（CT-011, CURE TECH）、MK-3475（MERCCK）、BMS936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、MPDL3280A（ROCHE）、イピリムマブ（MDX-010、MDX-101、ヤーボイ、BM

S) およびトレメリムマブ (P f i z e r) 内の 1 種または複数である。ある実施形態では、チェックポイント阻害剤は P D - L 1 に対する抗体である。

【0863】

例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、抗 P D - L 1 抗体と同時に投与されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍または癌の治療での使用において、抗 P D - L 1 抗体と同時に投与されると相乗的に作用する。例えば、F c ベースキメラタンパク質複合体と抗 P D - L 1 抗体との同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し、または腫瘍または癌の増殖および／または進行および／または転移を遅らせ得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体と抗 P D - L 1 抗体の組み合わせは、単剤療法の場合に
10
単独で使用される薬剤に比べて、改善された安全性プロファイルを示し得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体および抗 P D - L 1 抗体は、その薬剤が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、変異 I F N α 2 などの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異 I F N α 2 は、配列番号 1 または配列番号 2 を基準にして、M 1 4 8 A、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A などのように、1 4 8、1 4 9 および 1 5 3 の位置で 1 個または複数の変異を含む。

【0864】

いくつかの実施形態では、本発明は、F c ベースキメラタンパク質複合体および免疫抑制剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫抑制剤で治療
20
を受けている患者に対する F c ベースキメラタンパク質複合体の投与に関する。ある実施形態では、免疫抑制剤は、T N F である。

【0865】

例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、T N F と同時に投与されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍または癌の治療での使用において、T N F と同時に投与されると相乗的に作用する。例えば、F c ベースキメラタンパク質複合体と T N F との同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および／または進行および／または転移を遅らせ得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体と T N F の組み合わせは、単剤療法の場合に単独で使用される薬剤に比べて、改善された
30
安全性プロファイルを示し得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体および T N F は、その物質が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、変異 I F N α 2 などの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異 I F N α 2 は、配列番号 1 または配列番号 2 を基準にして、M 1 4 8 A、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A などのように、1 4 8、1 4 9 および 1 5 3 の位置で 1 個または複数の変異を含む。

【0866】

いくつかの実施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞療法と組み合わせて使用されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍または癌の治療において、C A R T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、血液系腫瘍の治療において、C A R T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例示的实施形態では、F c ベースキメラタンパク質複合体は、固形腫瘍の治療において、C A R T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例えば、F c ベースキメラタンパク質複合体および C A R T 細胞の使用は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し、または腫瘍または癌の増殖
40
および／または進行および／または転移を遅らせ得る。種々の実施形態では、本発明の F c ベースキメラタンパク質複合体は、C A R T 細胞分裂を誘導する。種々の実施形態では、本発明の F c ベースキメラタンパク質複合体は、C A R T 細胞増殖を誘導する。種
50

々の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、CAR T細胞増のアナジーを防止する。

【0867】

種々の実施形態では、CAR T細胞療法は、抗原（例えば、腫瘍抗原）、例えば、限定されないが、炭酸脱水酵素IX（CAIX）、5T4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD47、CS1、CD138、Lewis-Y、L1-CAM、MUC16、ROR-1、IL-13R α 2、gp100、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、B細胞成熟抗原（BCMA）、ヒトパピローマタイプ16 E6（HPV-16 E6）、CD171、葉酸受容体アルファ（FR α ）、GD2、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）、メソテリン、EGFRvIII、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、癌胎児抗原（CEA）、および血管内皮細胞増殖因子受容体2（VEGFR2）、ならびに当該技術分野において周知のその他の腫瘍抗原を標的とするCAR T細胞を含む。追加の腫瘍抗原の例としては、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPPIV）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、シクロフィリンb、結腸直腸関連性抗原（CRC）-0017-1A/GA733、癌胎児抗原（CEA）およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異抗原（PSA）およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、MAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、GAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、エーカドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニンおよび γ -カテニン、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質（APC）、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、Smadファミリーの腫瘍抗原、Imp-1、NA、EBV-コード化核内抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1 CT-7、c-erbB-2、CD19、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、およびPD-L2が挙げられるが、これらに限定されない。

【0868】

代表的CAR T細胞療法としては、JCAR014（Juno Therapeutics）、JCAR015（Juno Therapeutics）、JCAR017（Juno Therapeutics）、JCAR018（Juno Therapeutics）、JCAR020（Juno Therapeutics）、JCAR023（Juno Therapeutics）、JCAR024（Juno Therapeutics）、CTL019（Novartis）、KTE-C19（Kite Pharma）、BPX-401（Bellimum Pharmaceuticals）、BPX-501（Bellimum Pharmaceuticals）、BPX-601（Bellimum Pharmaceuticals）、bb2121（Bluebird Bio）、CD-19 Sleeping Beauty cells（眠れる森の美女細胞）（Ziopharm Oncology）、UCART19（Cellect

tis)、UCART123 (Collectis)、UCART38 (Collectis)、UCARTCS1 (Collectis)、OXB-302 (Oxford BioMedica、MB-101 (Mustang Bio) および Innovative Cellular Therapeutics により開発された CAR T 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0869】

いくつかの実施形態では、Fc ベースキメラタンパク質複合体は、限定されないが、3-インターフェロン、酢酸グラチラマー、T-インターフェロン、IFN β 2 (米国特許出願公開第 2002/0025304 号)、スピロゲルマニウム (例えば、N-(3-ジメチルアミノプロピル-2-アザ-8, 8-ジメチル-8-ゲルマスピロ [4:5] デカン、N-(3-ジメチルアミノプロピル-2-アザ-8, 8-ジエチル-8-ゲルマスピロ [4:5] デカン、N-(3-ジメチルアミノプロピル-2-アザ-8, 8-ジプロピル-8-ゲルマスピロ [4:5] デカン、および N-(3-ジメチルアミノプロピル-2-アザ-8, 8-ジブチル-8-ゲルマスピロ [4:5] デカン)、ビタミン D 類似体 (例えば、1, 25 (OH) 2 D 3、(例えば、米国特許第 5, 716, 946 号を参照)、プロスタグランジン (例えば、ラタノプロスト、ブリモニジン、PGE1、PGE2 および PGE3、例えば、米国特許出願公開第 2002/0004525 号を参照)、テトラサイクリンと誘導体 (例えば、ミノサイクリンおよびドキシサイクリン、例えば、米国特許出願公開第 2002/0022608 号を参照)、VLA-4 結合抗体 (例えば、米国特許出願公開第 2009/0202527 号を参照)、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質ステロイド、プレドニゾン、メチルプレドニソン、2-クロロデオキシアデノシン、ミトキサントロン、スルファサラジン、メトトレキセート、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、フマレート、抗 CD20 抗体 (例えば、リツキシマブ)、およびチザニジン塩酸塩を含む多発性硬化症 (MS) 治療薬の内の 1 種または複数と組み合わせて MS の治療方法で使用される。

【0870】

いくつかの実施形態では、Fc ベースキメラタンパク質複合体は、MS の 1 つまたは複数の症状または副作用を治療する 1 種または複数の治療薬と組み合わせて使用される。このような薬剤としては、アマンタジン、バクロフェン、パパベリン、メクリジン、ヒドロキシジン、スルファメトキサゾール、シプロフロキサシン、ドクセート、ペモリン、ダン

【0871】

いくつかの実施形態では、Fc ベースキメラタンパク質複合体は、1 種または複数の本明細書に記載の疾患修飾治療薬 (DMT) (例えば、表 A の物質) と組み合わせて多発性硬化症の治療方法で使用される。いくつかの実施形態では、本発明は、1 種または複数の開示結合物質を含まない場合の、1 個または複数の本明細書に記載の DMT (例えば、下表に挙げた物質) と比べて、改善された治療効果を提供する。ある実施形態では、Fc ベースキメラタンパク質複合体と 1 種または複数の DMT の組み合わせは、相乗的治療効果をもたらす。

【表 6】
疾患修飾治療薬の例

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
テリフルノミド	AUBAGIO (GENZYME)	毎日；丸薬の経口摂取；7 mgまたは14 mg
インターフェロンβ1a	AVONEX (BIOGEN IDEC)	週1回；筋肉内（筋肉中）注射；30 mcg
インターフェロンβ1b	BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)	隔日；皮下（皮膚の下）注射；250 mcg
酢酸グラチラマー	COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)	毎日；皮下（皮膚の下）注射；20 mg (20,000 mcg) または週3回；皮下（皮膚の下）注射；40 mg (40,000 mcg)
インターフェロンβ1b	EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	隔日；皮下（皮膚の下）注射；250 mcg
フィンゴリモド	GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	毎日；カプセル剤の経口摂取；0.5 mg
アレムツズマブ（抗CD52 モノクローナル抗体）	LEMTADA (GENZYME)	5日間連続静脈内注入、その後、1年後に3日間連続静脈内注入（12 mg）
ミトキサントロン	NOVANTRONE (EMD SERONO)	医療施設中で年4回IV注入2～3年間で約8～12用量の生涯累積投与量許容限度（140 mg/m ² ）
ペグ化インターフェロンβ1a	PLEGRIDY (BIOGEN IDEC)	14日毎；皮下（皮膚の下）注射；125 mcg
インターフェロンβ1a	REBIF (EMD SERONO, INC.)	週3回；皮下（皮膚の下）注射；44 mcg
ジメチルフマレート（BG-12）	TECFIDERA (BIOGEN IDEC)	1日2回；カプセル剤の経口摂取；1週間は120 mg、その後240 mg
ナタリズマブ（ヒト化モノクローナル抗体VLA-4 アンタゴニスト）	TYSABRI (BIOGEN IDEC)	4週毎に登録注入施設中でIV注入；300 mg
開発中の DMT		
アミロライド（酸感受性イオンチャネル-1、上皮型ナトリウムチャネル、Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体を標的とする）	PAR PHARMACEUTICAL, PERRIGO COMPANY, SIGMAPHARM LABORATORIES	経口
ATX-MS-1467（主要組織適合抗原クラスII、ミエリン塩基性タン	APITOPE / MERCK SERONO	皮内、皮下

10

20

30

40

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
パク質に対するT細胞応答を標的とする)		
BAF312 (スフィンゴシン1-ホスフェート (S1P) 受容体サブタイプS1P1およびS1P5、B細胞分布、T細胞分布を標的とする)	NOVARTIS PHARMA	経口
BGC20-0134 (炎症促進性および抗炎症性サイトカインを標的とする)	BTG PLC	経口
BIIB033 (LINGO-1 (「ロイシンリッチ反復および免疫グロブリン様ドメイン含有Nogo受容体相互作用タンパク質」)を標的とする)	BIOGEN	静脈内注入を第1相・第2相臨床試験で使用、皮下注射を第1相臨床試験で使用
クラドリビン (CD4+ T細胞、DNA合成および修復、E-セレクトリン細胞内接着性分子-1、炎症促進性サイトカイン、インターロイキン2およびインターロイキン2R、炎症促進性サイトカイン、インターロイキン8およびRANTESサイトカイン分泌単球およびリンパ球移動を標的とする)	MERCK SERONO	経口
シクロホスファミド (T細胞、特にCD4+ヘルパーT細胞、B細胞を標	BAXTER HEALTHCARE CORPORATION	経口、月1回の静注パルス療法

10

20

30

40

一般名 的とする)	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
ダクリズマブ（ CD25、T細胞の免 疫調節物質を標 的とするヒト化 モノクローナル 抗体）	BIOGEN IDEC/ABBVIE BIOTHERAPEUTICS	月1回のIM注射が計画されている
ダルファムプリ ジン（電位作動 型カリウムチャ ネル、デジェネ リン／上皮ナト リウムチャネル 、サブユニット Cavbeta3を含むL 型カルシウムチ ャネルを標的と する）	ACORDA THERAPEUTICS / BIOGEN IDEC	12時間毎に1錠（持続放出）、10 mg を1日2回
ドロナビノール （カンナビノイ ド受容体CB1、カ ンナビノイド受 容体CB2を標的と する）	ABBVIE INC.	経口
フィラテグラス ト（ $\alpha 4 \beta 1$ イ ンテグリンを標 的とする）	GLAXOSMITHKLINE	経口
GNbAC1MSRV-Env (MS関連レトロウ イルスのエンベ ロープタンパク 質を標的とする)	GENEURO SA / SERVIER	静脈内注入
イデベノン（活 性酸素種を標的 とする）	SANTHERA PHARMACEUTICALS	PPMSに対する臨床試験での経口投与 量は、2250 mg／日（750 mg用量、1 日3回）
イミレクルーセ ルT（ミエリン 特異的自己反応 性T細胞を標的 とする）	OPEXA THERAPEUTICS / MERCK SERONO	皮下に年5回投与（製造業者の情報に よる）
ラキニモド	TEVA	毎日、0.6 mgまたは1.2 mgの経口錠 剤の摂取が計画されている
マシチニブ（KIT （幹細胞因子、 （c-KITとも呼ば れる））受容体	AB SCIENCE	経口

10

20

30

40

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
を標的とし、加えて、その他のチロシンキナーゼ、マスト細胞を選択する)		
MEDI-551 (CD19 (B細胞受容体複合体の一部でありB細胞活性化のための閾値を決定する作用をするB細胞特異的抗原)、およびCD19を発現するがCD20は発現せず、大量の抗体を分泌するB細胞であるB細胞形質芽細胞を標的とする；形質芽細胞の枯渇は病原性自己抗体を含む自己免疫疾患に有用であり得る)	MEDIMMUNE	皮内、皮下
ミノサイクリン (T細胞、ミクログリア、白血球移動、マトリックスメタロプロテアーゼを標的とする)	VARIOUS	ペレット充填カプセル剤および経口懸濁剤として経口利用可能
MIS416 (自然免疫系、自然免疫系の病原体関連分子パターン認識受容体、自然免疫系の骨髄性細胞を標的とし、これは、SPMSで発生する調節解除された免疫系活性を再構築できると思われる)	INNATE IMMUNOTHERAPEUTICS	静脈内
ミコフエノール酸モフエチル (	MANUFACTURED BY GENENTECH	経口

10

20

30

40

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
プリン合成を標的とする)		
ナルトレキソン (オピオイド受容体、トール様受容体4を標的とする)	VARIOUS	「低用量ナルトレキソン」(または「LDN」)として経口剤形で低用量にて投与(3~4.5 mg/日)
オクレリズマブ およびオファツムマブ(CD20を標的とするヒト化モノクローナル抗体、B細胞の抑制)	ROCHE / GSK	IV輸注が計画されている
ONO-4641(スフィンゴシン1-ホスフェート受容体を標的とする)	ONO PHARMACEUTICAL CO.	経口
フェニトイン(ナトリウムチャンネルを標的とする)	PFIZER	静脈内、筋肉内、(あまり好ましくない選択肢)経口
ポネシモド	ACTELION	未決定
ラルテグラビル (レトロウイルスのインテグラーゼ、ヘルペスウイルスDNAパッケージングターミナーゼを標的とする)	MERCK	経口400 mg錠剤を毎日2回(製造業者の情報による)
RHB-104	REDHILL BIOPHARMA LIMITED	95 mgクラリスロマイシン、45 mgリファブチン、および10 mgクロファジミン
リルゾール(グルタミン酸神経伝達、グルタミン酸取り込みおよび放出、電位依存性ナトリウムチャンネル、プロテインキナーゼCを標的とする)	COVIS PHARMA / SANOFI	経口

10

20

30

40

【0872】

MS疾患進行は、疾患進行の最初期段階で、最も激しく、最も多くの損害を与え得る。

50

したがって、例えば、コストと副作用緩和を考慮した多くの償還方針および医療業務とは逆に、例えば、いわゆる二次治療として、最も強力なDMTを用いて治療を開始することが患者の長期疾患状態にとって最も有益である可能性がある。いくつかの実施形態では、患者は二次治療と組み合わせたFcベースキメラタンパク質複合体の投与計画により治療される。このような組み合わせを用いて、1種または複数の二次治療の副作用プロファイルが低減される。いくつかの実施形態では、この組み合わせを用いて、1種または複数の二次治療の投与頻度用量が低減される。例えば、組み合わせた場合、上記表に列挙された物質の用量を、約50%、または約40%、または約30%、または約25%低減し得、および／または投与頻度を通常の半分、または通常の1/3に、または例えば、毎日から隔日もしくは毎週に、隔日から毎週もしくは2週毎に、毎週から2週毎もしくは毎月に、

などに減らせ得る。したがって、いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、より都合のよい治療計画を可能にすることにより、患者のアドヒアランスを高める。さらに、いくつかのDMTは、例えば、ミトキサントロンに対する生涯の投与量限度として、 140 mg/m^2 の生涯累積投与量、または2、3年の治療に厳密に制限されるべきことが示唆されている。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体を補充し、このDMTのより低い用量またはより少ない頻度の投与を可能にすることにより、患者のミトキサントロンへの接触が維持される。

10

【0873】

いくつかの実施形態では、患者は、1種または複数のDMTでの治療を受けていない未処置患者であり、Fcベースキメラタンパク質複合体が二次治療の副作用を和らげるために使用される。したがって、未処置患者は、疾患の最初に、二次治療の長期間の効果から利益を得ることができる。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、二次治療の使用の前のエントリー治療として使用される。例えば、Fcベースキメラタンパク質複合体が、第一の約3ヶ月の治療期間投与されて疾患を安定化させ、その後患者は二次薬剤の維持療法に移行され得る。

20

【0874】

未処置患者は、1種または複数のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者に比べて、治療に応答する可能性が大きいと一般に考えられる。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1種または複数のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者に使用される。例えば、いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1種または複数のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者の治療効果を高め、これらの患者が未処置患者のように応答することを可能にし得る。

30

【0875】

いくつかの実施形態では、患者は1種または複数のDMTを受けたことがあるか受けているが、十分に応答していない。例えば、患者は1種または複数のDMTに対し、不応性であるか、または応答が不十分であり得る。いくつかの実施形態では、患者は、テリフルノミド (AUBAGIO (GENZYME)) ; インターフェロン β 1a (AVONEX (BIOMGEN IDEC)) ; インターフェロン β 1b (BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)) ; 酢酸グラチラマー (COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)) ; インターフェロン β 1b (EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)) ; フィンゴリモド (GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)) ; アレムツズマブ (LEMTRADA (GENZYME)) ; ミトキサントロン (NOVANTRONE (EMD SERONO)) ; ペグ化インターフェロン β 1a (PLEGRIDY (BIOMGEN IDEC)) ; インターフェロン β 1a (EBIF (EMD SERONO, INC.)) ; フマル酸ジメチル (BG-12) (TECFIDERA (BIOMGEN IDEC)) ; およびナタリズマブ (TYSABRI (BIOMGEN IDEC)) の内の1種または複数に対し、不応性であるか、または不十分な応答である。いくつかの実施形態では、1種または複数の開示結合物質は、患者における

40

50

1 種または複数の D M T の治療効果をもたらし、したがって、D M T に対する非応答性を低減または除去する。例えば、これは、より高い用量または頻度での 1 種または複数の D M T を用いる治療から患者を免れさせ得る。

【0876】

より侵攻性の疾患の患者では、1 つの手法は、誘導治療モデルであり、この場合、強力な効力があるが安全性の懸念の強い治療を最初に投与し、続いて、維持療法を行う。このようなモデルの例には、アレムツズマブによる最初の治療に続けて、I F N β 、G A、または B G - 1 2 による治療を含み得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質を用いて、療法を維持療法に切り替える必要性をなくする。いくつかの実施形態では、二次治療を含み、1 種または複数の開示結合物質を、1 種または複数の D M T に対する維持療法として用いられる。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質を、例えば、一次治療などの、誘導療法での第一の治療として用い、続けて維持療法として別の D M T を用いる。

10

【0877】

いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質を、約 3 ヶ月の初期治療期間の間投与して疾患を安定させ、その後患者を一次治療薬による維持療法に移行し得る。

【0878】

種々の実施形態では、1 種または複数の開示結合物質を用いて、限定されないが、本明細書で開示のいずれかの物質を含む、D M T の 1 種または複数の副作用を低減する。例えば、1 種または複数の開示結合物質は、1 種または複数の D M T の用量を節約可能とし、したがって、より少ない副作用とする投与計画で使用し得る。例えば、いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、A U B A G I O または関連物質の 1 種または複数の副作用を低減させ得る。この副作用には、毛髪菲薄化、下痢、インフルエンザ、悪心、異常な肝臓検査および手または足の異常な痺れまたは刺痛（知覚異常）、白血球のレベル（感染症のリスクの増大の可能性）；血圧の増大；および重篤な肝障害を含み得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、A V O N E X または関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、うつ、軽度の貧血、肝障害、アレルギー反応および心臓障害を含む 1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、B E T A S E R O N または関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、アレルギー反応、うつ、肝障害、および低白血球数を含む 1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、C O P A X O N E または関連物質の、注射部位反応、血管拡張（血管の拡張）；胸部痛；不安症、胸部痛、動悸、息切れおよび顔面紅潮を含む注射直後の反応を含む、1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、E X T A V I A または関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、アレルギー反応、うつ、肝障害、および低白血球数を含む 1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、G I L E N Y A または関連物質の、頭痛、インフルエンザ、下痢、背部痛、肝臓酵素上昇、咳、最初の投与後の遅い心拍数、感染症、および眼の膨潤を含む 1 つまたは複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、発疹、頭痛、発熱、鼻詰まり、悪心、尿路感染症、疲労、不眠、上気道感染症、じん麻疹、そう痒、甲状腺障害、真菌感染、関節、四肢および背中の痛み、下痢、嘔吐、顔面紅潮、および輸注反応（悪心、じん麻疹、そう痒、不眠、悪寒、顔面紅潮、疲労、息切れ、味覚の変化、消化障害、眩暈、疼痛を含む）を含む L E M T R A D A または関連物質の 1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、ノバンtron または関連物質の、投与の 2 4 時間後の緑色尿；感染症、骨髄抑制（疲労、紫斑、低血液細胞数）、悪心、毛髪菲薄化、膀胱感染症、口のびらん、および深刻な肝障害および心臓障害を含む 1 種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1 種または複数の開示結合物質は、P L E G R I D Y または関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、うつ、軽度の貧血、肝障害、アレルギー反応および心臓障害

20

30

40

50

を含む1種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種または複数の開示結合物質は、R E B I Fまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、肝障害、うつ、アレルギー反応、および低赤血球数または白血球数を含む1種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種または複数の開示結合物質は、T E C F I D E R Aまたは関連物質の、顔面紅潮（熱またはそう痒の感覚、皮膚の紅潮）、消化管障害（悪心、下痢、腹痛）、発疹、尿中タンパク、肝酵素の上昇；および血中のリンパ球（白血球）数の減少を含む1種または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種または複数の開示結合物質は、頭痛、疲労、尿路感染症、うつ、気道感染症、関節痛、胃もたれ、腹部不快感、下痢、膣炎、腕または脚部痛、発疹、輸注の2時間以内のアレルギー性反応または過敏症反応（眩暈、発熱、発疹、そう痒、悪心、顔面紅潮、低血圧、呼吸困難、胸部痛）を含むT Y S A B R Iまたは関連物質の1種または複数の副作用を低減し得る。

10

【0879】

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

【0880】

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

20

30

【0881】

限定されないが、自己免疫疾患適用を含むいくつかの実施形態では、追加の治療薬は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、ステロイド性抗炎症剤または非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）などの抗炎症剤である。ステロイド、特に副腎皮質ホルモン剤およびそれらの合成類似体は当該技術分野においてよく知られている。本発明で有用な副腎皮質ステロイドの例には、ヒドロキシトリアムシノロン、 α -メチルデキサメタゾン、 β -メチル β -メタゾン、ベクロメタゾンジプロピオネート、 β -メタゾンベンゾエート、 β -メタゾンジプロピオネート、 β -メタゾンバレレート、クロベタゾールバレレート、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラソンジアセテート、ジフルコルトロンバレレート、フルアドレノロン、フルクロロロンアセトニド、フルメタゾンピバレート、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルコルチンブ

40

50

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

【0882】

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

【0883】

さらにその他の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、例示的实施形態では、毒素、化学療法剤、放射性同位元素、およびアポトーシス、壊死または任意のその他の形の細胞死を引き起こす物質を含む細胞傷害薬をさらに含む。このような物質は、本明細書に記載の組成物に複合化され得る。

【0884】

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

【0885】

細胞傷害薬の例としては、メトトレキセート、アミノプテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン；アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ（thioepa）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、マイトマイシンC、ロムスチン（CCNU）、1-メチルニトロソウレア、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、メクロレタミン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、シス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチンおよびカルボプラチン（パラプラチン）；アントラサイクリン（ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およ

びドキソルビシン（アドリアマイシン）、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロンおよびビサントレンを含む）；抗生物質（ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ブレオマイシン、カリチアマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC）を含む）；有糸分裂阻害薬（antimytotic agent）（例えば、ビンカアルカロイドビンカアルカロイド、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。その他の細胞傷害薬には、パクリタキセル（タキソール）、リシン、緑膿菌外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、副腎皮質ステロイド、ミトタン（mytotan）（O, P'-（DDD））、インターフェロン、およびこれらの細胞傷害薬の混合物が挙げられる。

10

【0886】

さらなる細胞傷害薬としては、化学療法剤、例えば、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリチアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシン、VEGFアンタゴニスト、EGFRアンタゴニスト、プラチン、タキソール、イリノテカン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン（gemcytabine）、ロイコボリン、ステロイド類、シクロホスファミド、メルファラン、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビン）、ムスチン、チロシンキナーゼ阻害剤、放射線療法、性ホルモン拮抗薬、選択的アンドロゲン受容体調節薬、選択的エストロゲン受容体調節薬、PDGFアンタゴニスト、TNFアンタゴニスト、IL-1 β アンタゴニスト、インターロイキン（例えば、IL-12またはIL-2）、IL-12Rアンタゴニスト、毒素複合化モノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体、アービタックス、アバスチン、ペルツズマブ、抗CD20抗体、リツキサン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、DXL625、ハーセプチン（登録商標）、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。リシン、ジフテリア毒素およびシュードモナス毒素などの植物および細菌由来の毒性酵素は、治療薬（例えば、抗体）と複合体形成して、細胞型特異的殺作用剤を生成し得る（Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539 (1980); Krollick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980)）。

20

30

【0887】

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

40

【0888】

検出可能な部分の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光材料のさらなる例としては、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリンおよびダンシルクロリドが挙げられるが、これらに限定され

50

ない。化学発光部分のさらなる例としては、ルミノールが挙げられるが、これに限定されない。生物発光材料のさらなる例としては、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられるが、これらに限定されない。放射性材料のさらなる例としては、ヨウ素-125、炭素-14、硫黄-35、トリチウムおよびリン-32が挙げられるが、これらに限定されない。

【0889】

治療方法

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

【0890】

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

【0891】

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

【0892】

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

【0893】

種々の実施形態では、本発明は、癌の治療のための野生型または改変シグナル伝達物質を含むFcベースキメラタンパク質複合体を提供する。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、腫瘍を大幅に低減および／または除去する。いくつかの実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、その他の抗癌剤、例えば、化学療法剤、チェックポイント阻害剤、および免疫抑制剤と併せて対象に投与されると、腫瘍を大幅に低減および／または除去する。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体と他の抗癌剤の組み合わせは、相乗的に腫瘍サイズを低減するおよび／または腫瘍細胞を除去する。

10

20

30

40

50

【0894】

種々の実施形態では、本発明は、1つまたは複数のターゲティング部分および1種または複数の野生型または改変型シグナル伝達物質を含むキメラの一部であるFcベースキメラタンパク質複合体を用いる癌併用療法に関する。したがって、本発明は、例えば、ターゲティング部分および1種または複数のシグナル伝達物質を含むFcベースキメラタンパク質複合体および抗癌剤と組み合わせたその使用を提供する。

【0895】

例えば、種々の実施形態では、本発明は、Fcベースキメラタンパク質複合体、および限定されないが、ヒトインターフェロンアルファ2を含むIFNアルファなどの変異ヒトインターフェロンを含む野生型または改変型シグナル伝達物質を含む癌のための併用療法に関する。

10

【0896】

他の実施形態では、本発明のFcベースキメラタンパク質複合体は、複数のターゲティング部分を含み、従って二重特異性または三重特異性フォーマットで存在する。例えば、種々の実施形態では、本発明は、Fcベースキメラタンパク質複合体と、本明細書に記載のチェックポイント阻害剤結合物質（例えば、抗PD-L1、抗PD-1、抗PD-L2、または抗CTLA）、および限定されないが、ヒトインターフェロンアルファ2を含むIFNアルファなどの変異ヒトインターフェロンを含む改変シグナル伝達物質と、を含む癌のための併用療法剤に関する。

【0897】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、その1つまたは複数の受容体に対する低減された親和性または活性を有し、それにより、キメラタンパク質の活性（アゴニズムまたはアンタゴニズムを含む）の減弱化を可能にし、および／または非特異的シグナル伝達または望ましくない隔離を防止するように野生型であるか、または改変される。いくつかの実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の1個または複数のターゲティング部分を有する本発明の複合体中に包含することにより回復可能である。

20

【0898】

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

30

【0899】

いくつかの実施形態では、本発明は、慢性肉芽腫性疾患、大理石骨病、特発性肺線維症、フリードライヒ失調症、アトピー性皮膚炎、シャーガス病、癌、心不全、自己免疫疾患、鎌状赤血球症、地中海貧血症、失血、輸血反応、糖尿病、ビタミンB12欠乏症、膠原病性脈管疾患、シュワックマン症候群、血小板減少性紫斑病、セリアック病、甲状腺機能低下症またはアジソン病などの内分泌欠損状態、クローン病、全身性エリテマトーデス、関節リウマチまたは若年性関節リウマチなどの自己免疫疾患、潰瘍性大腸炎、好酸球性筋膜炎、低免疫グロブリン血症、または胸腺腫／胸腺癌などの免疫異常、移植片対宿主病、前白血病状態、非血液学的症候群（例えば、ダウン、デュボヴィッツ、ゼッケル症候群）、フェルティ症候群、溶血性尿毒症症候群、骨髄異形成症候群、夜間発作性血色素尿症、骨髄線維症、汎血球減少症、赤芽球ろう、シェーンラインーヘノッホ紫斑病、マラリア、タンパク質欠乏、月経過多、全身性硬化症、肝硬変、代謝低下状態、およびうつ血性心不全の1つまたは複数の治療、またはこれらの1つまたは複数の有する患者の治療に関する。

40

【0900】

いくつかの実施形態では、本発明は、慢性肉芽腫性疾患、大理石骨病、特発性肺線維症、フリードライヒ失調症、アトピー性皮膚炎、シャーガス病、マイコバクテリア感染症、

50

癌、強皮症、肝炎、C型肝炎、敗血性ショック、および関節リウマチの1つまたは複数の治療、またはこれらの1つまたは複数を含む患者の治療に関する。

【0901】

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

10

【0902】

種々の実施形態では、本発明は、自己免疫疾患および／または神経変性疾患を治療する用途を有する。

【0903】

種々の実施形態では、本発明の組成物は、1種または複数の望ましくないCTL活性を特徴とする状態、および／または高レベルの細胞死を特徴とする状態を治療するまたは予防するために使用される。例えば、種々の実施形態では、本発明の組成物は、1種または複数の無制御または過敏性の免疫応答に関連する状態を治療するまたは予防するために使用される。

【0904】

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

20

【0905】

種々の実施形態では、本発明は、自己免疫疾患および／または神経変性疾患を治療するまたは予防するために用いられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患および／または神経変性疾患は、MS（限定されないが、本明細書に記載のサブタイプを含む）、アルツハイマー病（限定されないが、早期発症型アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、および家族性アルツハイマー病（FAD）を含む）、パーキンソン病およびパーキンソニズム（限定されないが、特発性パーキンソン病、脳血管性パーキンソニズム、薬剤誘発性パーキンソニズム、レヴィー小体型痴呆、遺伝性パーキンソン病、若年性パーキンソン病を含む）、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS、限定されないが、突発性ALS、家族性ALS、西太平洋ALS、若年性ALS、平山病（Hirabayashi disease））から選択される。

30

【0906】

ある実施形態では、本発明は、ウイルス性肝炎、アルコール肝炎、自己免疫性肝炎、アルコール性肝障害、脂肪性肝疾患、脂肪症、脂肪性肝炎、非アルコール脂肪性肝疾患、薬剤誘発性肝疾患、肝硬変、線維症、肝不全、薬剤誘導肝不全、代謝症候群、肝細胞癌、胆管癌、原発性胆汁性肝硬変（原発性胆汁性胆管炎）、毛細胆管、ジルベール症候群、黄疸、およびいずれか他の肝毒性関連兆候から選択される肝障害の1つまたは複数の治療または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、肝線維症の治療または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、原発性硬化性胆管炎（PSC）、慢性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、C型肝炎感染症、アルコール性肝疾患、肝損傷（場合によ

40

50

り、進行性線維症および肝線維症に起因する）の治療または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の治療または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、線維症の軽減または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、肝硬変の軽減または予防のための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、肝細胞癌の軽減または予防のための方法を提供する。

【0907】

種々の実施形態では、本発明は、限定されないが、冠状動脈性心疾患（CHD）、脳血管疾患（CVD）、大動脈弁狭窄症、末梢血管疾患、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、心筋梗塞（心臓発作）、脳血管疾患（脳卒中）、一過性脳虚血発作（TIA）、狭心症（安定および不安定）、心房細動、不整脈、弁膜症、および／またはうっ血性心不全を含む心臓および脈管構造に影響を与える疾患または状態などの心臓血管疾患の治療または予防のための方法を提供する。種々の実施形態では、本発明は、炎症を伴う心臓血管疾患の治療または予防のための方法を提供する。

10

【0908】

種々の実施形態では、本発明は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気管支拡張症、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、肺血管収縮、炎症、アレルギー、呼吸障害、呼吸促迫症候群、嚢胞性線維症、肺高血圧症、肺血管収縮、肺気腫、ハンタウイルス肺症候群（HPV）、レフレル症候群、グッドパスチャー症候群、胸膜炎、間質性肺炎、肺水腫、肺線維症、サルコイドーシス、呼吸器多核体ウイルス感染症に関連する合併症、および他の呼吸器疾患などの1種または複数の呼吸器疾患の治療または予防のための方法を提供する。

20

【0909】

種々の実施形態では、本発明は、MSを治療または予防するために用いられる。種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、複数のMS症状を除去または低減するために用いられる。本明細書に記載の組成物および方法で予防または治療できる多発性硬化症に関連する症状の例には、視神経炎、複視、眼振、眼球運動測定異常、核間性眼筋麻痺、運動眼閃および音眼閃、求心性瞳孔障害、不全麻痺、単不全麻痺、不全対麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺、麻痺、対麻痺、半身麻痺、四肢麻痺、四肢不全麻痺（quadraplegia）、痙縮、構音障害、筋萎縮症、痙攣、筋痙攣、筋緊張低下、クロヌス、間代性筋痙攣、ミオキミア、不隠脚症候群、下垂足、反射機能不全、錯感覚、麻酔、神経痛、神経障害性および神経性疼痛、レルミット徴候、固有受容機能不全、三叉神経痛、運動失調、企図振戦、測定異常、前庭性運動失調、めまい、発語運動失調、ジストニア、拮抗運動反復障害、頻尿、膀胱痙攣、弛緩性膀胱、排尿筋・括約筋失症、勃起不全、無オルガスム症、不感症、便秘、便意切迫、便失禁、うつ、認知障害、認知症、気分変動、情緒不安定、多幸感、双極症候群、不安症、失語症、言語障害、疲労、ウートホフ徴候、胃食道逆流症および就眠障害が挙げられる。本明細書に記載の1種または複数の物質により、対象におけるこれらの症状の1種または複数の緩和または改善を実現できる。

30

【0910】

種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、単一の臨床症状（clinically isolated syndrome）（CIS）を治療または予防するために用いられる。単一の臨床症状（CIS）は、視神経炎、脳幹症状、および部分的な脊髄炎などのMSと合致する単一症状の発作である。第2の臨床的発作を経験するCISの患者は通常、臨床的に確実な多発性硬化症（CDMS）であると見なされる。CISおよびMRI病変の患者の80%超がMSを発病し、約20%は自己限定プロセスを有する。MSに適合する単一の臨床的発作を経験する患者は、臨床的に確実な多発性硬化症の発作の前に、多発性硬化症に合致する少なくとも1つの病変を有し得る。種々の実施形態では、本明細書中に記載されるFcベースキメラタンパク質複合体は、CISが、例えばRRMSを含むMSに進行しないように、CISを治療するために使用される。

40

50

【0911】

種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、単一の臨床症状(RIS)を治療または予防するために用いられる。RISでは、偶発画像所見が、臨床的徴候または症状の非存在下で炎症性脱髄を示唆する。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、RISが、例えば、RRMSを含むMSに進行しないように、RISを治療するために使用される。

【0912】

種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、良性多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症(RRMS)、二次性進行型多発性硬化症(SPM S)、進行性再発型多発性硬化症(P RMS)、および一次性進行型多発性硬化症(P P M S)の1種または複数を治療するために用いられる。

10

【0913】

良性多発性硬化症は、レトロスペクティブな診断であり、1~2回の増悪と完全な回復、継続しない能力障害および初期の発症後10~15年の間の無疾患進行を特徴とする。しかし、良性多発性硬化症は他の型の多発性硬化症に進行する可能性がある。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、良性多発性硬化症がMSに進行しないように良性多発性硬化症の治療に使用される。

【0914】

RRMSに罹患している患者は、散発性増悪または再発、ならびに寛解期間を経験する。病変および軸索喪失の証拠は、RRMSの患者のMRI上で見える場合も見えない場合もある。種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、RRMSを治療するために用いられる。いくつかの実施形態では、RRMSは、RRMSの患者;SPMSの患者で再発が重畳している患者;およびCISの患者で、その後のMRIスキャンでマクドナルド基準に従って病変の多発を示す患者を含む。本明細書で「再発」、「画定再発」、または「臨床的画定再発(clinically defined relapse)」としても使用され得る臨床的再発は、1種または複数の新しい神経学的異常の出現または1種または複数の以前に観察された神経学的異常の再出現である。この臨床状態の変化は、48時間持続しなければならず、直前に少なくとも30日間の比較的安定なまたは改善されている神経学的状態がなければならない。いくつかの実施形態では、対象の症状に、以前の評価に比べて総合障害度評価尺度(EDSS)スコアでの少なくとも1.00または7つのFSの2以上のスコアでの1グレードまたはFSの1つのスコアの2グレードの増加に一致する、観察される客観的な神経学的変化が付随する場合、イベントは再発としてカウントされる。

20

30

【0915】

SPMSは、RRMSから進化し得る。SPMSに罹患している患者は、再発し、寛解中の回復の程度の漸減、RRMS患者より頻度の少ない寛解および顕著な神経障害を有する。脳梁、正中中枢および脊髄の萎縮のマーカーである脳室拡大がSPMSの患者のMRIで認められる。種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、RRMSがSPMSに進行しないようRRMSを治療するために使用される。

【0916】

PPMSは、明確な発作または寛解なしに増大する神経障害の着実な進行を特徴とする。PPMSの患者のMRIでは、脳病変、びまん性脊髄損傷および軸索喪失の証拠が明白である。PPMSは急性増悪の期間があり、一方で、増大する神経障害の過程に沿って寛解することなく進行が続く。PRMSを罹患している患者のMRIでは、病変が明らかである。種々の実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、RRMSおよび/またはSPMSがPPMSに進行しないように、RRMSおよび/またはSPMSを治療するために使用される。

40

【0917】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、再発型のMSの治療の方法に使用される。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタン

50

パク質複合体は、再発型のMSの治療方法において使用され、身体障害の蓄積を遅らせ、および／または臨床的増悪の頻度を低減させ、かつ任意で、最初の臨床的発症を経験しMSに合致するMRIの特徴を有する患者に対して使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のFcベースキメラタンパク質複合体は、悪化する再発寛解型MS、進行再発型MSまたは二次性進行型MSの治療方法において使用され、神経障害および／または臨床的増悪の頻度を低減する。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、再発の頻度および／または重症度を低減する。

【0918】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、1回、または2回、または3回、または4回、または5回、または6回、または7回、または8回、または9回、または10回以上の疾患修飾治療(DMT)に対し不適切な応答のあった(または不応性である)患者における再発型のMSの治療方法で使用される。

10

【0919】

種々の実施形態では、対象の症状は、EDSS、または再発の頻度の減少、または持続性進行までの時間の増加、または高頻度の連続的MRI調査における磁気共鳴画像(MRI)挙動の改善によりなど、定量的に評価され、患者の治療前後の状態測定値を比較し得る。良好な治療において、が成功すると、患者の状態は改善されるであろう(例えば、EDSS測定スコアまたは再発の頻度が減少する、または持続性進行までの時間が増加する、またはMRIスキャンが病状の低下を示す)。

【0920】

20

いくつかの実施形態では、患者を、Fcベースキメラタンパク質複合体を受ける前、その間またはその後で応答性の指標を評価できる。種々の臨床的またはその他の治療の有効性の指標、例えば、EDSSスコア；MRIスキャン；再発数、比率、または重症度；多発性硬化症機能評価(MSFC)；多発性硬化症の生活の質質問票(MSQLI)；連続聞き取り加算検査(PASAT)；符号数字モダリティー検査(SDMT)；25フィートの歩行試験；9ホールペグ試験；低コントラスト視力；修正疲労重症度スケール；総合障害度評価スコア(EDSS)；多発性硬化症機能評価(MSFC)；ベックうつ病質問票；および7/24空間認知検査を使用できる。種々の実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、これらの尺度の内の1つまたは複数で改善をもたらす。さらに、患者を投与計画中の様々な時間でモニターできる。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、空間的、時間的マクドナルド多発性により評価して、疾患の改善をもたらす。例えば、空間的多発性に関しては、病変イメージング、例えば、実例として、Barkhof-TintoreのMRI基準、を使用し得る。病変イメージングには、ガドリニウム強調病変または9 T2高信号病変；少なくとも1つのテント下病変；少なくとも1つの傍骨性病変；少なくとも約3個の脳室周囲病変；脊髄病変を含む。時間的多発性に関してもまた、MRIを使用できる；例えば、最初の臨床的イベント後、3ヶ月以上実施された脳のMRIスキャンにより、新しいガドリニウム強調病変が示される場合、これは、新規CNS炎症性のイベントを示す可能性がある。理由は、MSのガドリニウム強調期間は通常、6週間未満であるためである。ガドリニウム強調病変はないが新しいT2病変が存在する場合(初期イベントの時のMRIを仮定して)、新しいT2病変またはガドリニウム強調病変を実証する3ヶ月後の反復MRIイメージングが必要となり得る。

30

40

【0921】

いくつかの実施形態では、疾患効果は、Lavery, et al. Multiple Sclerosis International, Vol 2014 (2014), Article ID 262350に記載されているいずれかの尺度を用いて評価される。この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0922】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、(a) EDSSの1.0ポイントの低下として定義される身体障害の悪化の防止、(b) 再発までの時間の増

50

加、(c) ガドリニウム強調病変の数および／または体積の低減または安定化、(d) 年間再発率の低下、(e) 再発持続時間およびNRSスコアによる重症度の低減、(f) MRIで測定して、疾患活動性(新規または拡大病変の年率)の低下、(g) 1年間、または2年間でのより低い再発平均数、(h) 3ヶ月のEDSSで測定した持続性疾患進行、(i) CDMSへの移行の防止、(j) 新規または強調T2病変がない、またはわずか、(k) 高信号T2病変体積の最小限の変化、(l) マクドナルド定義のMSまでの時間の延長、(m) 12週でのEDSSの持続性悪化により測定して身体障害の進行の防止、(n) 96週での再発までの時間の短縮、および(o) 脳萎縮(例えば、ベースラインからの%変化)の低減化または安定化の内の1つまたは複数をもたらす。

【0923】

10

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、治療の投与前の再発率に比べて(例えば、投与後12ヶ月、または12ヶ月未満、例えば、約10ヶ月、または約8ヶ月、または約4ヶ月、または約2ヶ月、またはそれ未満の月数の後の発生率と比較して)、または以前の再発後の3~24ヶ月(例えば、6~18ヶ月、例えば、12ヶ月)に測定した場合、治療の開始前と比べて、再発率の低下(例えば、少なくとも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%またはそれを超える再発率の低下)を効果的に生ずる。

【0924】

20

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、前処理状態からのEDSSスコアの増加の防止を効果的にもたらす。Kurtzke総合障害度評価尺度(EDSS)は、多発性硬化症での身体障害を定量化する方法である。EDSSは、MSの一群の人に対し、下括弧に入れて使用された、以前の障害度評価尺度を置き換えた。EDSSは、身体障害を8つの機能別障害度(FS)に定量化し、神経学者がこれらのそれぞれの機能別障害度スコア(FSS)に割り付けるのを可能にする。機能系は：錐体路機能、小脳機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能および脳機能である。

【0925】

30

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、Fcベースキメラタンパク質複合体の投与後のEDSSスコアに比較して(例えば、12ヶ月間または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4またはそれ未満の期間にわたる投与後、または治療開始以前に比較して)EDSSスコアの低減(例えば、少なくとも3ヶ月、6ヶ月、1年、またはそれより長期にわたり、例えば、1、1.5、2、2.5、3ポイント以上の低減)を効果的にもたらす。

【0926】

40

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、12ヶ月間、または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4ヶ月またはそれ未満の期間にわたるFcベースキメラタンパク質複合体の投与後、または治療開始以前の新しい病変の数に比べて、新しい病変全体の数またはいずれか1つの型の新しい病変の数の低減(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%の低減)を効果的にもたらす。

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、12ヶ月間または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4ヶ月またはそれ未満の期間にわたるFcベースキメラタンパク質複合体の投与後、または治療開始以前の病変の数に比べて、病変全体の数またはいずれか1つの型の病変の数の減少(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%の減少)を効果的にもたらす。

【0927】

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、12ヶ月間または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4ヶ月またはそれ未満の期間の投与後、または治療開始以前での新しい病変の数の出現比率に比べて、新しい病変全体の数またはいずれか1つの型の新しい病変の数の出現比率の低下(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%の比率の低下)を効果的にもたらす。

【0928】

50

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、12ヶ月間または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4ヶ月またはそれ未満の期間の投与後、または治療開始以前の病変面積の増加に比べて、病変面積全体またはいずれか1つの型の病変面積の低減（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%の低減）を効果的にもたらす。

【0929】

一実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体が投与され、12ヶ月間または12ヶ月未満の期間、例えば、10、8、4ヶ月またはそれ未満の期間の投与後、または治療開始以前の視神経炎の発生率または症状に比べて、視神経炎の発生率または症状の低減（例えば、視力の改善）を効果的にもたらす。

10

【0930】

種々の実施形態では、本発明の方法は、ヒト対象の処置に有用である。いくつかの実施形態では、ヒトは小児科のヒトである。他の実施形態では、ヒトは成人のヒトである。他の実施形態では、ヒトは老人のヒトである。他の実施形態では、ヒトは患者と呼ばれることもある。いくつかの実施形態では、ヒトは女性である。いくつかの実施形態では、ヒトは男性である。

【0931】

特定の実施形態では、ヒトは、約1～約18ヶ月、約18～約36ヶ月、約1～約5才、約5～約10才、約10～約15才、約15～約20才、約20～約25才、約25～約30才、約30～約35才、約35～約40才、約40～約45才、約45～約50才、約50～約55才、約55～約60才、約60～約65才、約65～約70才、約70～約75才、約75～約80才、約80～約85才、約85～約90才、約90～約95才または約95～約100才の範囲の年齢である。種々の実施形態では、ヒトは30才より大きい年齢である。

20

【0932】

免疫調節

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、免疫調節ができ、または免疫調節の方法において使用される。例えば、種々の実施形態では、本発明の治療方法は、本明細書に記載の免疫調節を含み得る。いくつかの実施形態では、免疫調節は、樹状細胞（DC）の場合、改変IFNシグナル伝達を含むIFNシグナル伝達を含む。

30

【0933】

種々の実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体が提供される。いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、第1の標的および1個または複数の免疫細胞上に見出される1種または複数の抗原を認識し、それらに結合する。免疫細胞は、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球（例えば、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞）、Bリンパ球、プラズマ細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、目的の抗原に特異的に結合し、直接または間接的に1個または複数の免疫細胞を効果的に動員する。

40

【0934】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、目的の抗原に特異的に結合し、効果的に、直接または間接的に1個または複数の免疫細胞を動員し、免疫抑制効果を生じさせる。例えば、Fcベースキメラタンパク質複合体は直接的または間接的に免疫抑制性免疫細胞を動員する。いくつかの実施形態では、免疫抑制性免疫細胞は、制御性T細胞（または、本明細書で使用される場合、免疫系を調節し、自己免疫疾患を抑制し、自己抗原に対する寛容を維持し、抗腫瘍免疫応答を妨害するT細胞の亜集団を指す、「Treg」）である。）。その他の免疫抑制性免疫細胞には、骨髄系サプレッサー細胞（または「MSC」で、本明細書で使用される場合、それらの骨髄起源、未成熟状態、およびT細胞応答を強力に抑制する能力により規定される不均一細胞集団を意味する）；腫瘍

50

関連好中球（または「TAN」で、本明細書で使用される場合、免疫応答を抑制することができる好中球サブセットを意味する）；腫瘍関連マクロファージ（または「TAM」で、本明細書で使用される場合、免疫応答を低減させ得るマクロファージのサブセットを意味する）、M2マクロファージ、および／または腫瘍誘導マスト細胞（本明細書で使用される場合、骨髄由来の長寿命不均一細胞集団のサブセットを意味する）が挙げられる。また、免疫抑制性免疫細胞は、Th2細胞およびTh17細胞を含む。さらに、免疫抑制性免疫細胞には、免疫細胞、例えば、1種または複数のチェックポイント阻害剤受容体を発現しているCD4+および／またはCD8+ T細胞（例えば、例えば、無制御免疫応答を防止または抑制する免疫細胞上に発現したCTLA-4、B7-H3、B7-H4、TIM-3を含む受容体）が挙げられる。Stagg, J. et al., Immunotherapeutic approach in triple-negative breast cancer. Ther Adv Med Oncol. (2013) 5 (3): 169-181)を参照されたい。

【0935】

いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、制御性T細胞(Treg)増殖を刺激する。Treg細胞は、Foxp3(Forkhead box p3)転写因子の発現を特徴とする。大部分のTreg細胞は、CD4+およびCD25+であり、ヘルパーT細胞のサブセットと見なすことができるが、小さい集団はCD8+である場合もある。したがって、本発明の方法により調節されるべき免疫応答は、Treg細胞の、場合により抗原に応答した、増殖誘導を含み得る。したがって、方法は、対象に抗原を含むFcベースキメラタンパク質複合体を投与することを含み得る。抗原はTreg細胞の増殖を促進するアジュバントと共に投与されてよい。

【0936】

この方法が特異的抗原に応答してTregの増殖と分化を伴う限り、それは免疫応答を刺激する方法であると見なすことができる。しかし、Tregは抗原に対し免疫系の他の細胞の応答を他の方法、例えば、それらの活性を阻害または抑制することで調節することができることを考慮すれば、全体としての免疫系に対する効果は、その抗原に対する応答を調節（例えば、抑制または阻害）することであり得る。したがって、本発明のこの態様の方法は、同様に、抗原に対する免疫応答を調節（例えば、阻害または抑制）する方法と呼ぶことができる。

【0937】

いくつかの実施形態では、方法は、その抗原に対する既存の免疫または進行中の免疫応答を有する対象の場合でも、特定の抗原に対する望ましくない免疫応答を治療的にまたは予防的に阻害または抑制する。これは、例えば、自己免疫疾患の処置に特に有用であり得る。

【0938】

特定の条件下では、Fcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分の標的を発現している抗原提示細胞を抗原の標的にすることにより、特定の抗原に対して対象を寛容化することも可能である。したがって、本発明は、対象の抗原に対する寛容を誘導する方法を提供し、この方法は、対象に抗原を含む組成物を投与することを含み、この場合、抗原はFcベースキメラタンパク質複合体のターゲティング部分に対する親和性を有する結合物質に結合され、その抗原はアジュバントの非存在下で投与される。この状況において、寛容は通常、その抗原に応答できるはずの免疫細胞の枯渇を伴うか、またはこのような免疫細胞の抗原に対する応答性の持続的低減の誘導を伴う。

【0939】

それに対し対象が望ましくない免疫応答を示す、または生じる危険性のある抗原に対して、Treg応答を高めることは特に望ましいであろう。例えば、それは、それに対し自己免疫疾患で免疫応答が起こる自己抗原であり得る。特定の抗原が病因になり得る可能性のある重要なものとして特定されている自己免疫疾患の例には、多発性硬化症（ミエリン塩基性タンパク質）、インスリン依存性糖尿病（グルタミン酸デカルボキシラーゼ）、イ

ンスリン耐性糖尿病（インスリン受容体）、セリアック病（グリアジン）、水疱性類天疱瘡（コラーゲンXV型）、自己免疫性貧血（Rhタンパク質）、自己免疫性血小板減少症（GpIIb/IIIa）、重症筋無力症（myasthenia gravis）（アセチルコリン受容体）、グレーブス病（甲状腺刺激ホルモン受容体）、グッドパスチャー病などの糸球体腎炎（アルファ3（IV）NC1コラーゲン）、および悪性貧血（内因子）が挙げられる。あるいは、標的抗原は、同様に宿主組織に損害をもたらす応答を刺激する外来性抗原であってもよい。例えば、急性リウマチ熱は、心筋細胞抗原と交差反応する連鎖球菌抗原に対する抗体応答により引き起こされる。したがって、これらの抗原、またはその特定のフラグメントまたはエピトープは、本発明での使用のために好適な抗原であり得る。

10

【0940】

種々の実施形態では、本発明の物質、またはこれらの物質を用いる方法は、自己反応性T細胞を低減または抑制する。いくつかの実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcベースキメラタンパク質複合体の存在下で、任意選択でインターフェロングシグナル伝達を介して、この免疫抑制をもたらす。いくつかの実施形態では、多重特異的Fcベースキメラタンパク質複合体は、PD-L1またはPD-L2シグナル伝達および/または発現を刺激し、これは自己反応性T細胞を抑制し得る。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、Fcベースキメラタンパク質複合体の存在下で、任意選択でインターフェロングシグナル伝達を介して、この免疫抑制をもたらす。いくつかの実施形態では、Fcベースキメラタンパク質複合体は、PD-L1またはPD-L2シグナル伝達および/または発現を刺激し、これは自己反応性T細胞を抑制し得る。

20

【0941】

種々の実施形態では、本発明の方法は、制御性T細胞対エフェクターT細胞の比率を、例えば、自己免疫疾患を治療するために、免疫抑制に有利なように調整することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1種または複数の細胞傷害性T細胞；エフェクターメモリーT細胞；セントラルメモリーT細胞；CD8⁺ 幹細胞メモリーエフェクター細胞；TH1エフェクターT細胞；TH2エフェクターT細胞；TH9エフェクターT細胞；TH17エフェクターT細胞を低減および/または抑制する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺制御性T細胞、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞、CD4⁺CD25⁻制御性T細胞、CD4⁺CD25^{high}制御性T細胞、TIM-3⁺PD-1⁺制御性T細胞、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG-3）⁺制御性T細胞、CTLA-4/CD152⁺制御性T細胞、ニューロピリン-1（Nrp-1）⁺制御性T細胞、CCR4⁺CCR8⁺制御性T細胞、CD62L（L-セレクチン）⁺制御性T細胞、CD45RB^{low}制御性T細胞、CD127^{low}制御性T細胞、LRRC32/GARP⁺制御性T細胞、CD39⁺制御性T細胞、GITR⁺制御性T細胞、LAP⁺制御性T細胞、1B11⁺制御性T細胞、BTLA⁺制御性T細胞、1型制御性T細胞（Tr1細胞）、Tヘルパー3型（Th3）細胞、ナチュラルキラーT細胞表現型の制御性細胞（NKTrég）、CD8⁺制御性T細胞、CD8⁺CD28⁻制御性T細胞および/またはIL-10、IL-35、TGF-β、TNF-α、ガレクチン-1、IFN-γおよび/またはMCP1分泌制御性T細胞の内の1種または複数を増加させる、および/または刺激する。

30

40

【0942】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、免疫刺激シグナルより免疫抑制シグナルを優先する。本発明の方法は、免疫活性化シグナルまたは共刺激シグナルの逆転または抑制を可能とする。いくつかの実施形態では、本方法は、免疫抑制シグナルの提供を可能とする。例えば、いくつかの実施形態では、本物質および方法は、免疫刺激シグナルの効果を低減する。免疫刺激シグナルは、限定されないが、4-1BB、OX-40、HVEM、GITR、CD27、CD28、CD30、CD40、ICOSリガンド；OX-40リガンド、LIGHT（CD258）、GITRリガンド、CD70、B7-1、B7-2

50

、CD30リガンド、CD40リガンド、ICOS、ICOSリガンド、CD137リガンドおよびTL1Aの内の1種または複数である。さらにいくつかの実施形態では、本物質および方法は、免疫抑制シグナルの効果を高める。これらのシグナルは、限定されないが、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160（BY55とも呼ばれる）、CGEN-15049、CHK1およびCHK2キナーゼ、A2aR、CEACAM（例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および／またはCEACAM-5）、および種々のB7ファミリーリガンド（限定されないが、B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6およびB7-H7を含む）の内の1種または複数である。

10

【0943】

キット

本発明はまた、本明細書に記載のいずれかのFcベースキメラタンパク質複合体の投与（追加の治療薬を含み、または含まずに）のためのキットを提供する。キットは、本明細書に記載の少なくとも1種の本発明の医薬組成物を含む、材料または成分の集合体である。したがって、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の少なくとも1種の医薬組成物を含む。

【0944】

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

20

【0945】

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

【0946】

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

30

【0947】

定義

本明細書で使用される場合、「a」、「an」、または「the」は、1つ（1種）または1つ（1種）を超えるを意味し得る。

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

【0948】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、望ましい治療的および／または予防的効果を達成するのに十分な量、例えば、疾患もしくは障害または疾患または障害と関連する1つまたは複数の兆候または症状の予防または軽減をもたらす量を指す。治療的または予防的適用の場合、対象に投与される組成物の量は、疾患の程度、タイプ、および重症度、ならびに総体的な健康、年齢、性別、体重および薬物耐性などの個体の特性に依存するであろう。当業者なら、これらおよび他の因子に基づいて適切な投与量を決定できるであろう。上記組成物はまた1種または複数の追加の治療化合物と組み合わせて投与できる。本明細書に記載される方法において、治療化合物は、疾患または障害の1種または複数の兆候または症状を有する対象に投与され得る。本明細書で使用される場合、物質または刺激の存在下で、このような調節の非存在下に比べて、活性および／または効果の出

40

50

力値がかなりの量、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、またはそれを超えて、少なくとも最大約100%（約100%を含む）低減されるとき、何かが「減少されている」。当業者により理解されるように、いくつかの実施形態では、活性は低下し、かついくつかの下流の出力値は低下するが、他のものは増加し得る。

【0949】

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

【0950】

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

【0951】

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

【0952】

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

【0953】

治療効果の達成に必要な本明細書で記載の組成物の量は、特定目的のための従来の手順に従って経験的に決定されてよい。一般に、治療目的のために治療薬を投与する場合、治療薬は薬理学的有効量で投与される。「薬理学的有効量」、「薬理学的有効用量」、「治療有効量」、または「有効量」は、特に障害または疾患を治療するために、目的の生理的な効果を生み出すのに十分な量または目的の結果を達成することができる量を意味する。本明細書で使用される場合、有効量は、例えば、障害または疾患の症状の進展を遅らせる、障害または疾患の症状の経過を変える（例えば、疾患の症状の進展を遅らせる）、障害または疾患の1つまたは複数の症状または発症を減らすまたはなくする、および障害または疾患の症状を回復させるのに十分な量を含んでよい。治療効果はまた、改善が実現されるかどうかにかかわらず、根底にある疾患または障害の進行を止めるまたは遅らせること

も含む。

【0954】

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

【0955】

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

【0956】

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

【0957】

実施例

いくつかの実施例では、ノブインホール技術の次の2つのバリエーションが使用される：Ridgway（Ridgway et al., Protein Engineering 1996; 9: 617-621に由来し、例えば、実施例1～6で使用される）およびMerchant（Merchant et al., Nature Biotechnology 1998; 16: 677-681に由来し、実施例7以降のほとんどの実施例で使用される）。配列は、Fc1およびFc2（それぞれ、Ridgwayのホールおよびノブ）およびFc3およびFc4（それぞれ、Merchantのホールおよびノブ）と呼ばれる。特に断りのない限り、Ridgway構築物中の「標準的」エフェクター変異は、LALA-PG（P329G）である（実施例4参照）。Merchant構築物については、この目的を達成するために、LALA-KQ（K322Q）変異が使用される（実施例4のデータに基づいて）。

Fc1: Ridgwayホール: 次記アミノ酸配列を有するhIgG1 Fc__L234A__L235A__P329G__Y407T:

DKTHTTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSTKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（配列番号1565）

Fc2: Ridgwayノブ: 次記アミノ酸配列を有するhIgG1 Fc__L234A__L235A__P329G__T366Y:

DKTHTTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号1566)

Fc3: Merchant ホール: 次のアミノ酸配列を有する hlgG1 Fc__L2
34A__L235A__K322Q__Y349C__T366S__L368A__Y407V:
DKTHTCPCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号1567)

10

Fc4: Merchant ノブ: 次のアミノ酸配列を有する hlgG1 Fc__L23
4A__L235A__K322Q__S354C__T366W:
DKTHTCPCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号1568)

20

【0958】

実施例全体を通して次の2つのCle9A VHHが使用される: R1CHCL50
(配列番号289) および3LEC89 (配列番号391)。両者は、元の配列で、また
は次の変異型で使用される:

○R1CHCL50__opt4: R1CHCL50__E1D-A74S-K83R-Q
108L-H13Q-T64K (E1D、A74S、K83R、Q108L、H13Q、
およびT64Kは配列番号289のアミノ酸配列を有するR1CHCL50 VHH中の
変異を指す)。R1CHCL50__opt4は次のアミノ酸配列を有する:
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSINVMGWYRQA
PGKERELVARITNGLPNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRPEDTAVYYCYLVALKA EYW GQGTLVTVSS (配列番号
1569);

30

○3LEC89__opt4: 3LEC89__E1D-Q5V-A74S-Q108L-
G75K (E1D、Q5V、A74S、Q108L、およびG75Kは配列番号391の
アミノ酸配列を有する3LEC89 VHH中の変異を指す)。

○3LEC89__opt4は次のアミノ酸配列を有する:
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQA
PGKQRELVA AITNQGA PTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGQGTLVTVSS (配列番号
1570)。

40

【0959】

実施例1: Fcベースキメラタンパク質複合体構築

ターゲティング部分およびシグナル伝達物質を有するキメラタンパク質を、低減された
FcγRおよびC1q結合のために変異導入したヒトlgG1 Fc-融合フォーマット
(LALA-PG変異)にクローン化した。合計5種の組み合わせ(図20A~E参照)
: 2種のホモダイマーおよび3種のヘテロダイマー(ノブインホール変異を基準にした;
Ridgway et al., Protein Engineering, Design and Selection, Volume 9, Issue 7, 1 July
1996, Pages 617-621を参照)を構築した。これらの融合タンパク質で
は、抗ヒトCle9A VHH 3LEC89がターゲティング部分であり、R149

50

A変異を有するヒトIFN α 2がシグナル伝達物質であった；これらの試薬を一般概念の説明に使用した。

【0960】

関連配列（識別子については、図20A～Eを参照）は以下の通り：

DおよびEで観察される。還元条件下では、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体の2つの部分は、うまく分離されている。

【0962】

ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体は、ホモダイマータンパク質より可溶性であるように見えた。後者のケースでは、1mg/ml未満の濃度でも、タンパク質は凝集し沈殿する傾向があった。Light Cycler 480 System (Roche)でSYPRO Orange (Sigma-Aldrich)を用いるタンパク質融解分析は、種々のタンパク質の融解温度は、ほぼ同等であり、66～70℃の範囲であったことを示した。

【表7】

				収率(mg)/リットル
ホモダイマー	A	P-956	Fc-3LEC89-IFNa2_R149A	73.2
	B	P-957	3LEC89-Fc-IFNa2_R149A	176.8
ヘテロダイマー	C	P-958 + P-959	3LEC89-Fc + Fc-IFNa2_R149A	199.2
	D	P-960 + P-962	Fc-3LEC89-IFNa2_R149A + Fc	174.8
	E	P-961 + P-962	3LEC89-Fc-IFNa2_R149A + Fc	156

【0963】

タンパク質の安定性をさらに推定するために、ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体「C」、「D」、および「E」（図20A～E参照）を5サイクルの凍結および解凍に供した。解凍直後にタンパク質凝集体を遠心分離により取り出し、タンパク質濃度を測定し、プロットした（図22参照）。タンパク質CおよびDは、タンパク質Eより凍結－解凍サイクルに対しより耐性のように思われた。

【0964】

実施例2：Fcベースキメラタンパク質複合体の特性評価

ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体のヒトClec9Aに対する親和性を、Octet instrument (FortéBio)でバイオレイヤー干渉(BLI)技術を用いて測定した。組換えClec9Aをビオチン化し、ストレプトアビジンセンサーで捕捉した。担持チップを段階希釈Fc融合体と共にインキュベートした。干渉縞でのシフトを結合および解離速度、およびそれによる親和性の定量化に使用した。下表のデータは、親和性はタンパク質CおよびEで同等であるが、一方、タンパク質Dでは、10倍低いことを示す。

【表8】

試料ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
958 + 959 (C)	2.61E-09	1.29E+05	3.37E-04
960 + 962 (D)	3.16E-08	3.12E+04	9.88E-04
961 + 962 (E)	3.88E-09	1.07E+05	4.16E-04

【0965】

ヘテロダイマーFcベースキメラタンパク質複合体の生物活性を試験するために、親およびHL116-hClec9A細胞株で6-16レポーター活性を測定した。HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞を、ヒトClec9A配列をコードする発現ベクターで遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンをG418含有培地中で選択した。親HL116およびHL116-hClec9A細胞を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し

た後、ポジティブコントロールとしての段階希釈 I F N a 2 および F c A F N で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 2 3 のデータは、ホモダイマー F c ベースキメラタンパク質複合体は、ヘテロダイマー F c ベースキメラタンパク質複合体よりもわずかにより活性であることを示す。いずれの場合も、標的細胞に対する活性は、親細胞に対する活性と比べて、10,000 倍を超える差異で観察された。

【0966】

実施例 3：マウスでの薬物動態学的調査

F c ベース A c T a f e r o n (F c - A F N) の薬物動態学的挙動を評価するために、分子 P 9 5 7 および P 9 5 8 / P 9 5 9 (実施例 1) の各構築物を 12 匹のマウスに対し 1.5 mg / kg で静脈内に投与した。K - E D T A 血液を、3 匹のマウスの第 1 群から 5 分、8 時間および 2 日目に採取し、3 匹のマウスの第 2 群から 15 分、1 日および 4 日目に採取し、3 匹のマウスの第 3 群から 1、7 および 14 日目に採取し、3 匹のマウスの第 4 群から 3 時間、21 日および 28 日目に採取した。未処理の F c - A F N の濃度を E L I S A で測定した。簡単に説明すると、M A X I S O R P N u n c I m m u n e プレート (T h e r m o S c i e n t i f i c) を P B S 中 0.5 μ g / m l の濃度の抗ヒトインターフェロンアルファ m A b (クローン M M H A - 13 ; P B L A s s a y S c i e n c e) で一晩コートした。プレートを P B S + 0.05 % ツイーニー 20 で 4 回洗浄後、P B S 中の 0.1 % カゼインを用いて室温で少なくとも 1 時間ブロッキングした。その後、希釈試料および標準物質を P B S 中の 0.1 % カゼイン中、室温下で 2 時間インキュベートした。別の洗浄サイクル後、注文製作のウサギ抗 V H H (P B S 中 0.1 % 中で 1 / 20000 に希釈) を室温で 2 時間インキュベートし、続け、追加の洗浄サイクルおよび H R P 標識ヤギ抗ウサギ (J a c k s o n - 111 - 035 - 144 ; 0.1 % カゼイン中 1 : 5000 に希釈) と共に室温で 1 時間のインキュベーションを行った。最後の洗浄サイクル後、製造業者の説明書に従い K P L 基質 (5120 - 0047 ; S e r a C a r e) を用いてペルオキシダーゼ活性を測定した。試料からの濃度を、G r a p h P a d P r i s m を使い計算した。測定した濃度を図 2 4 にプロットした。終末相半減期は、P 9 5 8 / P 9 5 9 が平均で約 4.5 日および P 9 5 7 が 3.25 日と推定された。

【0967】

実施例 4：ヒト化マウスでの有効性研究

F c ベース A F N のインビボ有効性を評価するために、分子 P 9 5 7 および P 9 5 8 / P 9 5 9 (実施例 1 ; ヒト C l e c 9 A 、高度に特異的な従来の樹状細胞 1 (c D C 1) マーカーを標的とする) をヒト化マウスの腫瘍モデルで試験した。簡単に説明すると、新生児 N S G マウス (1 ~ 2 日齢) に、100 c G y で垂致死量照射し、その後、 1×10^5 個の C D 34 + ヒト幹細胞 (H L A - A 2 陽性臍帯血由来) を肝内に送達した。13 週間後、幹細胞移入マウスに 2.5×10^5 個のヒト R L 濾胞性リンパ腫細胞 (A T C C C R L - 2261 ; インターフェロン (I F N) の直接抗増殖作用に感受性がない) を皮下に接種した。マウスを、30 μ g のヒト F M S 様チロシンキナーゼ 3 リガンド (F l t 3 L) タンパク質で、腫瘍接種後 6 日目 ~ 17 日目に毎日腹腔内治療した。触知できる腫瘍が認められたら、緩衝液または F c - A F N (25 μ g) での毎週の静脈内注射を、腫瘍接種後の 10 日目に開始した (群当たり n = 6 匹のマウス) 。腫瘍サイズ (ノギス測定値) 、体重および体温を、毎日評価した。図 2 5 は、第 2 の治療 (マウスは、毎週、P B S または A F N の注射を受け、データは、第 2 の毎週治療後 7 日までの腫瘍増殖を示す) 後 7 日までの腫瘍増殖を示し、全ての構築物が類似のレベルの腫瘍増殖抑制を誘導したことを示す。体重および体温のデータは、緩衝液治療および A F N 治療間で何ら大きな差異を示さず、A F N 治療が耐容性良好であったことを裏付けた。

【0968】

実施例 5：種々リンカー長さのヘテロダイマー構築物

実施例 1 および 2 のヘテロダイマー F c A F N 構造では、V H H と F c ならびに F c と I F N の間で 20 * G G S リンカーを使用した。バイオレイヤー干渉法 (B L I) で生

物活性（H L 1 1 6－h C l e c 9 Aレポーター）またはC l e c 9 Aに対する親和性に与えるこれらのリンカーの種々の長さの影響を評価した。

この実施例および次の実施例では、種々のF c バリエーションは以下の通りである（アミノ酸番号はE U 規則（P N A S、E d e l m a n e t a l., 1 9 6 9；6 3（1）7 8－8 5）に準ずる）：

・F c：h I g G 1 F c__L 2 3 4 A__L 2 3 5 A__P 3 2 9 G（L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、およびP 3 2 9 Gは、h I g G 1 F c 配列中の変異である）

・F c 1：R i d g w a y ホール：h I g G 1 F c__L 2 3 4 A__L 2 3 5 A__P 3 2 9 G__Y 4 0 7 T（L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、およびY 4 0 7 Tは、h I g G 1 F c 1 配列中の変異である）

・F c 2：R i d g w a y ノブ：h I g G 1 F c__L 2 3 4 A__L 2 3 5 A__P 3 2 9 G__T 3 6 6 Y（L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、およびT 3 6 6 Yは、h I g G 1 F c 配列中の変異である）

【0969】

発現に使用したリーダー配列は、実施例 1 のものと同じであり、この実施例では、いずれの構築物もさらに詳細に記載しない。

【0970】

使用したリンカーは、多数のG G S 反復と、それに続く任意選択の追加の単一グリシン残基からなる。これらは、n G G S と呼ばれ、n はG G S 反復の数を表し、任意の追加のG は構築物名中では別々に示されていない。

【0971】

構築物：

10

20

【化 4】

○ R1CHCL50_opt4-5*GGS-Fc1 (P-1105)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAIEYWGQGLTVTVSSGGSGSGSGSGSGSGSDKHTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1442)

10

○ R1CHCL50_opt4-3*GGS-Fc1 (P-1106)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAIEYWGQGLTVTVSSGGSGSGSGSGSDKHTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSPD
IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (配列番号: 1443)

20

○ 3LEC89_opt4-5*GGS-Fc1 (P-1107)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQAPGKQRELVAITNQGAPTYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGQGLTVTVSSGGSGSGSGSGSGSGSDKHTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1444)

○ 3LEC89_opt4-3*GGS-Fc1 (P-1108)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQAPGKQRELVAITNQGAPTYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGQGLTVTVSSGGSGSGSGSGSDKHTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSP
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (配列番号: 1445)

30

○ Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A (P-1109)

DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQIFNLSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSTNLQESLRSKE
(配列番号: 1446)

40

○ Fc2-5*GGS-IFNa2_R149A (P-1110)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGKG**GGSGGGSGGGSGGGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFG
 FPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLEACVIQGVGVTEPTP
 LMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSLSTNLQESLSRSKE (配列番号: 1447)

10

○ Fc2-3*GGS-IFNa2_R149A (P-1111)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGKG**GGSGGGSGGGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFG
 NQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLEACVIQGVGVTEPTPLMKEDSIL
 AVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSLSTNLQESLSRSKE (配列番号: 1448)

【0972】

20

リンカー長さバリエーションの産生と精製

Gene Art (Thermo Fisher) により種々の構築物を作製し、ホール (Fc1 ベース) およびノブ (Fc2 ベース) の組み合わせを、図 7 B で概要を示したような実施例 1 の構築物 P958/959 に類似のヘテロダイマー構造に結合し、製造業者の説明書に従い Exp iCHO 発現系 (Thermo Fisher) で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein アスピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。リンカー長さの変化は、産生 (100 ~ 300 mg / リットルの収率) および得られたタンパク質の安定性に影響を与えないように思われた。

30

【0973】

HL116 レポーター細胞株に対する生物活性

HL116 クローンをヒト HT1080 細胞株 (ATCC CCL-121) から誘導する。これは、IFN 誘導性 6-16 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親 HL116 細胞を、ヒト Clec9A 配列をコードする発現ベクターで遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンを G418 含有培地中で選択した。親 HL116 および HL116-hClec9A 細胞を 20,000 細胞 / 96 ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈の Fc-AFN で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 26 および表 6 のデータは、リンカー長さの変化が、標的細胞 (HL116-hClec9A 細胞) の生物活性に対し大きな影響を与えなかったことを示す。留意すべきは、3LEC89-5*GGS-Fc1 ベース構築物のいずれかについて測定された生物活性も、実施例 2 で測定したように、3LEC89-20*GGS-Fc1 / Fc2-20*GGS-IFNa2_R149A に対する測定生物活性と同等であることである。

40

【表 9】

表 6：リンカー長バリエーションの HL 116 細胞に対する生物活性。図 26 に測定した生物活性の EC₅₀ (ng/ml) 値をまとめた。

	EC ₅₀ (ng/ml)			
	R1CHCL50-5*GGS-Fc1	R1CHCL50-3*GGS-Fc1	3LEC89-5*GGS-Fc1	3LEC89-3*GGS-Fc1
Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A	2.04	3.37	1.52	3.11
Fc2-5*GGS-IFNa2_R149A	1.89	4.33	1.14	3.22
Fc2-3*GGS-IFNa2_R149A	2.42	3.63	1.15	2.35

10

【0974】

hClec9A に対する親和性

リンカー長バリエーションの hClec9A に対する親和性を、Octet instrument (ForteBio) でバイオレイヤー干渉 (BLI) 技術を用いて測定した。従って、組換え Clec9A をビオチン化し、ストレプトアビジンセンサー (ForteBio) で捕捉した。担持チップを段階希釈 Fc 融合体と共にインキュベートした。この実験では、3LEC89 および R1CHCL50 ホール構築物を 10*GGS ノブ構築物を有する 5*GGS または 3*GGS リンカーと組み合わせ、2つの 20*GGS リンカーを有する元の 3LEC89 構築物と比較した。干渉縞でのシフトを結合および解離速度 (およびそれによる親和性) の定量化に使用した。表 7 にまとめたデータは、リンカーの短縮化が hClec9A に対する親和性に悪い影響を与えないことを示す。

20

【表 10】

表 7：hClec9A に対するリンカー長バリエーションの親和性

	KD (M)	KD 誤差	ka (1/MS)	ka 誤差	kdis (1/s)	kdis 誤差
3LEC89-20*GGS-Fc1 + Fc2-20*GGS-IFNa2_R149A	7.50E-09	3.72E-11	1.07E+05	3.26E+02	8.00E-04	3.15E-06
3LEC89-5*GGS-Fc1 + Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A	8.42E-09	5.76E-11	1.23E+05	5.82E+02	1.00E-03	5.10E-06
3LEC89-3*GGS-Fc1 + Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A	3.12E-09	2.20E-11	1.67E+05	4.86E+02	5.00E-04	3.35E-06
R1CHCL50-5*GGS-Fc1 + Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A	7.46E-09	3.76E-11	1.60E+05	5.76E+02	1.20E-03	4.20E-06
R1CHCL50-3*GGS-Fc1 + Fc2-10*GGS-IFNa2_R149A	1.20E-08	9.07E-11	1.39E+05	8.59E+02	1.70E-03	7.26E-06

30

40

【0975】

実施例 6：種々リンカー長さのホモダイマー構築物

実施例 1 および 2 のホモダイマー Fc-AFN 構造で、VHH と Fc ならびに Fc と IFN の間に 20*GGS リンカーを使用した。これらの種々のリンカー長の生物活性 (HL 116-hClec9A レポーター) に与える影響を評価した。

【0976】

構築物：

10

20

30

40

50

50

50

50

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQAPGKQRELVAAITNQGAPTYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYQLQMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGQGTLVTVSS**AAAD**KTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**AAAGC**
DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCDKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSS
AAWDETLLDKFYELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRA
EIMASFSLSTNLQESLRSKE (配列番号: 1452)

リンカー長さバリエーションの産生と精製

Gene Art (Thermo Fisher) により図 1 A で概要を示したような実施例 1 の構築物 P 9 5 7 に類似の種々の構築物を作製し、製造業者の説明書に従って ExpiCHO 発現系 (Thermo Fisher) で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein A スピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【0978】

HL116 レポーター細胞株に対する生物活性

HL116 クローンをヒト HT1080 細胞株 (ATCC CCL-121) から誘導する。これは、IFN 誘導性 6-16 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親 HL116 細胞を、ヒト Clec9A 配列をコードする発現ベクターで遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンを G418 含有培地中で選択した。親 HL116 および HL116-hClec9A 細胞を 20,000 細胞/96 ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈の Fc-AFN で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。表 8 のデータは、リンカー長の変化が、標的細胞 (HL116-hClec9A 細胞) の生物活性に対し大きな影響を与えなかったことを示す。

【表 11】

表 8 : リンカー長ホモダイマーバリエーションの HL116 細胞に対する生物活性

	EC ₅₀ (ng/ml)
3LEC89(opt4)-10*GGG-Fc-10*GGG-IFNa2_R149A	1.77
3LEC89(opt4)-5*GGG-Fc-5*GGG-IFNa2_R149A	2.80
3LEC89(opt4)-3*GGG-Fc-3*GGG-IFNa2_R149A	2.33
3LEC89(opt4)-AAA-Fc-AAA-IFNa2_R149A	2.79

【0979】

実施例 7 : 別のエフェクター変異

Fc ドメインのエフェクター機能、すなわち、補体依存性細胞障害 (CDC) または抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を漸減させるために、主として Fc ガンマ受容体結合に影響を及ぼす L234A__L235A 変異を、4 つの余分の Fc エフェクター変異 (P329G、K322Q、K322A または P331S) と組み合わせて、補体結合をさらに低減させた。これらの変異を、20*GGG リンカーを有する 3LEC89 ベースヘテロダイマー Fc フォーマットに適用した。得られたタンパク質を生物活性 (HL116-hClec9A レポーター) および補体結合 (BLI; Octet) について試験した。

【0980】

構築物 :

○ 3LEC89-20*GGS-Fc1 P329G (P-958)

10

20

30

40

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQAPGKQRELVAAITNQGAITYADSVKGRFTIS
RDNAGNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGGGTQVTSS**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCAVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLTsklTvDKSRwQQGNVFscsvMHEALHNHYtqksLSLSPgk (配列番号：1457)

を有する Fc AFN を、Protein A バイオセンサー (ForteBio) にロードし、その後、組換え C1q (100 nM; ProSpec) と共にインキュベートした。図 28 のデータは、全てのエフェクターバリエーションが C1q に結合するそれらの能力を大きく失ったこと、および変異体間で大きな差異が認められなかったことを明確に示す。

【0984】

実施例 8 : IFNa2 バリエーション

ここで、我々は、位置 106 (T106) 上の hIFNa2 O-グリコシル化部位の変異の影響を評価し、2 種の天然 IFNa2 バリエーション : IFNa2 A および IFNa2 B の生物活性を比較する。

10

【0985】

構築物 :

【化 7】

○ R1CHCL50_opt4-5*GGG-Fc1 (P-1105)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAIEYWGQGTLLTVSSGGSGGGSGGGSGGSDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1461)

10

○ 3LEC89_opt4-5*GGG-Fc1 (P-1077)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSVNAMGWYRQAPGKQRELVAITNQGAPTYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKAFTRGDDYWGQGTLLTVSSGGSGGGSGGGSGGSDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1462)

○ Fc2-10*GGG-IFNa2A_R149A (P-1109)

20

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRKISLFSLCKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSTNLQESLRSKE
(配列番号: 1463)

○ Fc2-10*GGG-IFNa2A_T106A-R149A (P-1302)

30

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRKISLFSLCKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGV~~A~~ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSTNLQESLRSK
E (配列番号: 1464)

○ Fc2-10*GGG-IFNa2A_T106E-R149A (P-1303)

40

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRKISLFSLCKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGV~~E~~ETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSTNLQESLRSK
E (配列番号: 1465)

10

DKTHTCPPEAEEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKAQGPQPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRRISLFSCLKDRHDFGFPEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTSKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL
NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSSTNLQESLRSKE
(配列番号: 1466)

20

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK **GGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRRISLFSCLKDRHDFGFPPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ
NDLEACVIQGVGVAETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMASFSLSLNLQESLRSK
E (配列番号: 1467)

30

[illegible]

40

50

R1CHCL50-5*GGS-Fc1または3LEC89-5*GGS-Fc1を、10*GGSリンカーを介してFc2に融合した変異導入O-グリコシル化部位(T106、T106AまたはT106E)を有するまたは有しないIFNa2AまたはIFNa2BのR149A変異体と組み合わせて、図7Bに概要を示した構造を有するヘテロダイマーAcTaferon (AFN)を得た。組み合わせ物を、製造業者の説明書に従って、Exp iCHO発現系(Thermo Fisher)で一過的に発現させた。製造業者の説明書に従いPierce Protein Aスピンプレート(Thermo Fisher)を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。種々の組み合わせ物の産生量は同等であり、170~420 µg/mlで変動した。O-グリコシル化の減少をSDS-PAGEを用いて確認した。

HL 116 レポーター細胞株に対する生物活性
前に行った実施例に記載のように、代替りの IFN α 2 変異体の生物活性を測定した。
簡単に説明すると、親 HL 116 および由来 HL 116-hClc9A を段階希釈した
Fc-AFN で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を測定し、図 29 にプロットし、表

9にまとめた。データは、IFNa2BベースAFNが、IFNa2Aを有するものよりほんのわずかに強力であり、一方IFNa2 Oーグリコシル化部位T106の変異（AまたはEへの）は、シグナル伝達に影響を与えないことを示唆する。

【表12】

表9：IFNa2変異の生物活性に対する影響。図29で測定した生物活性のEC50（ng/ml）値をまとめた。

	EC ₅₀ (ng/ml)			
	3LEC89		R1CHCL50	
	IFNa2A	IFNa2B	IFNa2A	IFNa2B
野生型	0.98	0.58	1.68	1.07
T106A	0.58	0.37	1.49	0.61
T106E	1.04	0.38	1.58	1.18

10

【0988】

IFNAR2に対する親和性

ここで、IFNa2変異の、BLIでのその受容体IFNAR2に対する親和性に与える影響をOctet instrumentで評価した。IFNa2中に配列変化を有するR1CHCL50ベースFcバリエーションを、Protein Aバイオセンサー（Pall）にロードし、その後、段階希釈組換えIFNAR2（SinoBiological）と共にインキュベートした。干渉縞でのシフトを、結合および解離速度、およびそれによる親和性の定量化に使用した。これらの実験は、変異がIFNAR2に対する親和性に大きな影響を与えないことを示した。

20

【0989】

実施例9：追加のFcフォーマット

前の実施例では、VHH（R1CHCL50または3LEC89）がFc部分のN末端でクローン化されIFNa2変異体がC末端でクローン化されたヘテロマーFcフォーマットを用いた。この実施例では、分子の同じ側（NまたはC末端）にVHHおよびIFNa2変異体を有するフォーマットを生成した。得られたAFNを生物活性（HL116-hClec9Aレポーター）およびhClec9A親和性（Octet instrumentでのバイオレイヤー干渉法（BLI）技術）について試験した。

30

【0990】

構築物：

10

20

30

40

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRWVSFLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKGAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**
GSGSGSGSGSGSDQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPN
YADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAEYWQGGLTVTVSS (配列番号：1473)

[illegible]

10

種々の F c フォーマットの産生と精製

・ 3 L E C 8 9 - 2 0 * G G S - F c 1 + F c 2 - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R
1 4 9 A (構造: 図 7 B) ;

・ R 1 C H C L 5 0 - 2 0 * G G S - F c 1 + F c 2 - 2 0 * G G S - I F N a 2
R 1 4 9 A (構造: 図 7 B) ;

・ 3 L E C 8 9 - 2 0 * G G S - F c 1 + I F N a 2 _ R 1 4 9 A - 2 0 * G G S 20
- F c 2 (構造: 図 7 C) ;

・R1CHCL50-20*GGS-Fc1 + IFNa2__R149A-20*GGS-Fc2 (構造: 図7C) ;

・ F c 1 - 2 0 * G G S - 3 L E C 8 9 + F c 2 - 2 0 * G G S - I F N a 2 _
R 1 4 9 A (構造: 図 7 D) ;

・ F c 1 - 2 0 * G G S - R 1 C H C L 5 0 + F c 2 - 2 0 * G G S - I F N a
2 R 1 4 9 A (構造: 図 7 D) ;

これらの配列をExpiCHO細胞中で産生した。製造業者の説明書に従いPierce Protein Aスピンプレート(Thermo Fisher)を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。種々のFcの収率は同等であり、100~250 µg/mlの範囲であった。

【0 9 9 3】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

前に行った実施例に記載のように種々のFcフォーマットの生物活性を測定した。簡単に説明すると、親HL116および由来HL116-hCle9Aを、段階希釈したFc-AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を測定し、図30にプロットし、表10にまとめた。データは、C末端にクローン化されたVHHおよびIFNA2__R149Aの両方を有するFcフォーマットが、他の2つのフォーマットに比べて、標的細胞に対し幾分低い活性であることを示唆する。留意すべきは、非標的化細胞（親HL116）では、いずれの構築物に対してもシグナル伝達が観察されず、従って、全ての構築物は極めて高いターゲティング指数を保持している。

40

【表 1 3】

表 1 0 : 種々の F c フォーマットの生物活性。図 3 0 で測定した生物活性の E C 5 0 (n g / m l) 値をまとめた。

	EC50 (ng/ml)	
	R1CHCL50	3LEC89
VHH-20*GGS-Fc1 + Fc2- 20*GGS-IFNa2_R149A	0.63	0.79
VHH-20*GGS-Fc1 + IFNa2_R149A-20*GGS-Fc2	0.66	0.53
Fc1-20*GGS-VHH + Fc2- 20*GGS-IFNa2_R149A	1.28	1.47

10

【0 9 9 4】

h C l e c 9 A に対する親和性

異なる F c フォーマットのヒト C l e c 9 A に対する親和性を実施例 1 に記載のようにして測定した。表 1 1 にまとめたデータは、種々のフォーマット間の結合および解離（および従って K D）の差異はごくわずかなにすぎないことを示す。

【表 1 4】

20

表 1 1 : C l e c 9 A に対する種々の F c フォーマットの親和性

	KD (M)	KD 誤差	kon(1/Ms)	kon 誤差	kdis(1/s)	kdis 誤差
3LEC89-Fc + Fc-IFN	1.56E-09	1.17E-11	3.75E+05	1.22E+03	5.85E-04	3.92E-06
R1CHCL50-Fc + Fc-IFN	2.55E-09	2.41E-11	3.12E+05	1.70E+03	7.96E-04	6.13E-06
3LEC89-Fc + IFN-Fc	1.61E-09	1.72E-11	2.85E+05	1.13E+03	4.61E-04	4.55E-06
R1CHCL50-Fc + IFN-Fc	2.15E-09	2.39E-11	2.84E+05	1.54E+03	6.09E-04	5.92E-06
Fc-3LEC89 + Fc-IFN	3.23E-09	2.77E-11	2.85E+05	1.55E+03	9.19E-04	6.13E-06
Fc-R1CHCL50 + Fc-IFN	1.83E-09	1.48E-11	2.96E+05	1.02E+03	5.42E-04	3.95E-06

30

【0 9 9 5】

実施例 1 0 : 2 つの異なるノブインホール (K i H) 変異の比較

ここで、2 つのノブインホール技術のバリエーション: R i d g w a y (前の実施例で使用されたような) および M e r c h a n t を比較した。配列は、F c 1 および F c 2 (それぞれ、R i d g w a y のホールおよびノブ) および F c 3 および F c 4 (それぞれ、M e r c h a n t のホールおよびノブ) と呼ばれる。図 7 B に概要を示す構造を有する両方の K i H を有する F c 構築物を、V H H R 1 C H C L 5 0 および 3 L E C 8 9 をベースにして作製した。

40

・ F c 1 : R i d g w a y ホール: h I g G 1 F c _ _ L 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ P 3 2 9 G _ _ Y 4 0 7 T

・ F c 2 : R i d g w a y ノブ: h I g G 1 F c _ _ L 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ P 3 2 9 G _ _ T 3 6 6 Y

・ F c 3 : M e r c h a n t ホール: h I g G 1 F c _ _ L 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ K 3 2 2 Q _ _ Y 3 4 9 C _ _ T 3 6 6 S _ _ L 3 6 8 A _ _ Y 4 0 7 V

50

・ F C 4 : M e r c h a n t ノブ : h I g G 1 F c _ _ L 2 3 4 A _ _ L 2 3 5 A _ _ K 3
2 2 Q _ _ S 3 5 4 C _ _ T 3 6 6 W

【 0 9 9 6 】

構築物：

10

20

30

40

QVQLVESGGGLVHPGGSRLRSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVTGRFTIS
RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYLVALKAEYWGGGTQVTVSS**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPCKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCQVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDGFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号：1480)

【 0 9 9 7 】

ノブおよびホール構築物の組み合わせを、上述のようにExp i C H O細胞中で産生した。製造業者の説明書に従いP i e r c e P r o t e i n Aスピンプレート (T h e r m o F i s h e r) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。種々のノブインホール (K i H) の使用は、産生量に大きな影響を与えず、250~400 μg / ml 変動した。

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

前に行った実施例に記載のように種々の K i H F c A F N の生物活性を測定した。簡単に説明すると、親 H L 1 1 6 および由来 H L 1 1 6 - h C l e c 9 A を、段階希釈した F c - A F N で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を測定し、図 3 1 にプロットした。データは、種々の K i H 変化が標的細胞の生物活性（すなわち、C l e c 9 A 発現）に有意な影響を与えないことを示唆する。

【 0 9 9 9 】

この実施例では、R1CHCL50FcAFNの一価および二価標的化（すなわち、それぞれ1つまたは2つのVHHを有する分子）フォーマットの生物活性および相対的結合を比較した。

構築物：

30

○ R1CHCL50- 20*GGS-Fc3 (P-1451)

10

20

30

40

50

FACSでの相対的親和性

10

実施例 12：バリエント二価標的化Fcフォーマット

構築物：

○ R1CHCL50-20*GGS-R1CHCL50-20*GGS-Fc3

20

30

40

種々の F c フォーマットの産生と精製

【 1 0 0 7 】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

50

単に説明すると、親H L 1 1 6および由来H L 1 1 6－h C l e c 9 Aを、段階希釈したF c－A F Nで6時間刺激した。

【1008】

実施例13：マウスでの薬物動態学的調査

F cベースA F Nの薬物動態学的挙動を評価するために、全てがK 3 2 2 Q変異を有する4種の異なる分子を選択した：

・L A L A－K 3 2 2 Q変異を有するR i d g w a y K i H F cを用いて、I F N a 2__R 1 4 9 Aと組み合わせたR 1 C H C L 5 0 (o p t) 4 (構築物1と2を組み合わせる)

・L A L A－K 3 2 2 Q変異を有するR i d g w a y K i H F cを用いて、I F N a 2__R 1 4 9 A－T 1 0 6 Eと組み合わせたR 1 C H C L 5 0 (o p t) 4 (構築物1と3を組み合わせる)

・L A L A－K 3 2 2 Q変異を有するM e r c h a n t K i H F cを用いて、I F N a 2__R 1 4 9 Aと組み合わせたR 1 C H C L 5 0 (o p t) 4 (構築物4と5を組み合わせる)

・L A L A－K 3 2 2 Q変異を有するM e r c h a n t K i H F cを用いて、I F N a 2__R 1 4 9 A－T 1 0 6 Eと組み合わせたR 1 C H C L 5 0 (o p t) 4 (構築物5と6を組み合わせる)

【1009】

構築物：

10

20

【化 1 2】

1. R1CHCL50(opt4)-**5*GGS**-Fc1 (P329; K322Q) (P-1477)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAIEYWGQGLTVTVSS**GGSGGGSGSGSGSGSG**DKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1486)

10

2. Fc2 (P329; K322Q)-**10*GGS**- IFNa2_R149A (P-1481)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL
LHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ
NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSLNLQESLSRKE
(配列番号: 1487)

20

3. Fc2 (P329; K322Q)-**10*GGS**- IFNa2_R149A_T106E (P-1482)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLYCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL
LHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
MRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ
NDLEACVIQGVGVEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSLNLQESLSRKE
(配列番号: 1488)

30

4. R1CHCL50(opt4)-**5*GGS**-Fc3 (P-1479)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVKGRFTIS
RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCYLVALKAIEYWGQGLTVTVSS**GGSGGGSGSGSGSGSG**DKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号: 1489)

5. Fc4-**10*GGS**- IFNa2_R149A (P-1483)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL
ALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQ
QMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ
LNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVWRAEIMASFSLSLNLQESLSRKE
(配列番号: 1490)

40

ヒト化マウスの腫瘍モデルで試験した。簡単に説明すると、新生児NSGマウス（1～2日齢）を、100 cGyで垂致死量照射し、その後、 1×10^5 個のCD34+ヒト幹細胞（HLA-A2陽性臍帯血由来）を肝内に送達した。13週後、幹細胞移入マウスに 2.5×10^5 個のヒトRL濾胞性リンパ腫細胞（ATCC CRL-2261；IFNの直接抗増殖作用に感受性がない）を皮下接種した。マウスを30 μ gのヒトFlt3Lタンパク質で、腫瘍接種後10日目～19日目に毎日腹腔内治療した。触知できる腫瘍が認められると、緩衝液またはFc-AFN（8または75 μ g）での毎週の静脈内注射を、腫瘍接種後の11日目に開始した（群当たりn＝5匹のマウス）。腫瘍サイズ（ノギス測定値）、体重および体温を毎日評価した。図36および37でのデータは、第2の治療（マウスは、毎週、PBSまたはAFNの注射を受け、データは、第2の毎週治療後7日までの腫瘍増殖を示す）後6日までの腫瘍増殖を示す。図36は、全ての構築物が、8 μ gの低い投与量で、類似のレベルの腫瘍増殖抑制を誘導したことを示す。図37は、増大する腫瘍増殖抑制をもたらすMerchant構築物についてのより高い投与量の結果を示す。体重および体温のデータは、緩衝液治療およびAFN治療間で何ら大きな差異を示さず、全てのAFN治療が耐容性良好であったことを裏付けた。

10

【1014】

実施例15：PD-L1 VHHベースFc-AFN

この実施例では、腫瘍細胞または活性化免疫細胞を標的にするために、ヒトPD-L1特異的VHH（クローン2LIG99；PD-1との相互作用を遮断する）をベースにしたPD-L1（プログラム死リガンド1）標的化Fc-AFNを生成し、評価した。

20

【1015】

構築物：

10

20

30

40

[illegible]

20

P D - L 1 V H H ベース A F N の 産 生 と 精 製

ホモダイマー（2 L I G 9 9 - 2 0 * G G S - F c - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R 1 4 9 A ; スキーム : 図 1 A) 、一価ヘテロダイマー（2 L I G 9 9 - 2 0 * G G S - F c 1 + F c 2 - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R 1 4 9 A ; スキーム : 図 7 B) 、または 2 L I G 9 9 F c A F N の二価標的化ヘテロダイマー（2 L I G 9 9 - 2 0 * G G S - F c 3 + 2 L I G 9 9 - 2 0 * G G S - F c 4 - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R 1 4 9 A ; 図 1 6 A) バリエーション（図式表現は、図 3 8 参照）を、製造業者の説明書に従い、対応する構築物の一過的遺伝子導入により、E x p i C H O 細胞中で産生した。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート（T h e r m o F i s h e r）を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。ホモダイマー 2 L I G 9 9 - 2 0 * G G S - F c - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R 1 4 9 A は、精製後、かなり安定性が低く、凝集する高い傾向があったが、一方、他の 2 種の構築物は良好な溶解性を示した。

30

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞は、PD-L1を内在性に発現し、そのため、標的化を過剰の対応する遊離PD-L1 VHH (2LIG99)の存在下または非存在下で評価した。親HL116を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、2LIG99 (20 μg/ml)と共にプレインキュベートし、その後、段階希釈のFc AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図38のデータは、ホモダイマーおよび一価ヘテロダイマーバリエントが同等に活性であり(それぞれ、EC₅₀値: 2.98および2.14 ng/ml)、一方、二価標的化ヘテロダイマーバリエントは、40~50倍高い活性であることを示す。全ての3つのケースで、過剰な遊離VHHは、シグナル伝達を遮断するために十分であり、それにより、シグナル伝達のPD-L1依存性を示す。

40

実施例 16：ヒト化マウスでの有効性研究

FcベースPD-L1標的化AFNのインビボ有効性を評価するために、実施例15記載のようなホモダイマーバリエーション（2LIG99-20*GGS-Fc-20*GGS-IFNa2__R149A）をヒト化マウスの腫瘍モデルで試験した。上述のようにExp iCHO細胞中でタンパク質産生を行った。Hitrap Protein A HP（GE Healthcare）を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。低pH溶出タンパク質を、中和後、G25カラム（GE Healthcare）で脱塩し、

50

10

実施例 17 : C l e c 4 C V H H ベース F c A F N

20

構築物：

○ Clec4C VHH-20***GG**S-Fc3 (P-1571)

30

40

C l e c 4 C V H H ベース A F N の 産 生 と 精 製

50

【 1 0 2 2 】

HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞にヒトClec4C配列をコードする発現ベクターを遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンをG418含有培地中で選択した。親HL116およびHL116-hClec4C細胞を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈のFc A FNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図40のデータは、両細胞株は、野生型IFNa2に対し同程度に感受性であり、一方、Clec4C Fc A FNは、非標的化細胞(親HL116)に比較して、標的細胞(HL116-hClec4C)に対し遙かに活性であることを示す。

【 1 0 2 3 】

この実施例では、B細胞および／またはB細胞由来腫瘍細胞を標的にするために、ヒトCD20特異的VHH（クローン2HCD25）をベースにしたCD20標的化Fc-AFNを生成し、評価した。

【 1 0 2 4 】

【化 1.5】

- CD20 VHH-20***GGG**-Fc3 (P-1570)

QVQLQESGGGLAQAGGSLRLSCAASGRFTSMGWFRQAPGKEREFVAAITYSGGSPYYASSVRGRF
TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAANPTYGSDWNAENWGQGTVTVSS**GGSGGSGGSGGS**
GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNKGKEYKCQVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (配列番号：1499)

○ Fc4-20*GGS-IFNa2 R149A (P-1414)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGCDLPQTSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSLCKDRHDFGFPQE
EFGNQVFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGVEETPL
MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMASFSLSLTNLQESLSKE (配列番号：1500)

【 1 0 2 5 】

CD 20 VHHベースAFNの産生と精製

構築物CD20 VHH-20*GGS-Fc3およびFc4-20*GGS-IFNa2__R149Aを、ヘテロダイマーAFNに結合し（図式表現は、図7Bを参照）、製造業者の説明書に従って、Exp iCHO発現系（Thermo Fisher）で一過的に発現させた。遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein Aスピンプレート（Thermo Fisher）を

10

20

30

50

50

50

50

50

50

50

- 50

50

50

50

50

50

50

HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞は、CD13を内在性に発現し、そのため、標的化を過剰の対応する遊離CD13 VHHの存在下または非存在下で評価する。親HL116を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、CD13 VHHと共にプレインキュベートし、その後、段階希釈のFc AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図42のデータは、過剰CD13 VHHの存在下での刺激が、生物活性を60倍低下させることを示し、それにより、IFNシグナル伝達の再構成は

【 1 0 3 1 】

この実施例では、腫瘍間質細胞を標的にするために、3つのヒトFAP特異的VHH（クローン2PE14、3PE12および3PE42）をベースにしたFAP（線維芽細胞活性化タンパク質）標的化Fc-AFNを生成し、評価した。

構築物：

【化 1 7】

10

[illegible]

20

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSGNAMAWYRQAPGKRRELVAGISGGGVNTYPDSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMSSLPEDTAVYYCNLWPPRVSPGGGVYWGGGTQVTVSS**GSGSGSGSGS**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRWVSVLTVLHQDWLNKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC
AVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH
NHYTQKSLSLSPGK (配列番号：1503)

30

[illegible]

40

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK**GGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS**
GGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQE
EFGNQFQKAETIPVLHEMIQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVEETPL
MKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMASFSLSLTNLQESLSKE (配列番号: 1505)

10

20

30

40

50

実施例 21 : C D 8 V H H ベース F c A F N

【 1 0 3 6 】

構造物：

【化 18】

○ CD8 VHH-20*GGS-Fc3 (P-1568)

QVQLQESGGGLVHPGGSRLRSCAASGRSFSSYFMGWFRQAPGKEREFVAGIGWNDGSINYADSVK
GRFTISRDNAKNTGYLQMNSLPEDTAVYYCAASVSPLYGLEKSSAYTSWGQGQTQVTVSS**GSGSGS**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLLPFPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTIKAKQQPREPVCTLPSPRDELTKNQ
VSLSCAVKGFIYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALTHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号：1506)

○ Fc4-20*GGS-IFNa2 R149A (P-1414)

[illegible]

50

C D 8 V H H ベース A F N の産生と精製

構築物 C D 8 V H H - 2 0 * G G S - F c 3 および F c 4 - 2 0 * G G S - I F N a 2 _ R 1 4 9 A を、ヘテロダイマー A F N に結合し（図式表現は、図 7 B を参照）、製造業者の説明書に従って、E x p i C H O 発現系（T h e r m o F i s h e r）で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート（T h e r m o F i s h e r）を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【1038】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

H L 1 1 6 クローンをヒト H T 1 0 8 0 細胞株（A T C C C C L - 1 2 1）から誘導する。これは、I F N 誘導性 6 - 1 6 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親 H L 1 1 6 細胞にヒト C D 8 配列をコードする発現ベクターを遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンを G 4 1 8 含有培地中で選択した。親 H L 1 1 6 および H L 1 1 6 - h C D 8 細胞を 2 0 , 0 0 0 細胞 / 9 6 ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈の F c A F N で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 4 4 のデータは、両細胞株は、野生型 I F N a 2 に対し同程度に感受性であり、一方、C D 8 F c A F N は、非標的化細胞（親 H L 1 1 6）に比較して、標的細胞（H L 1 1 6 - h C D 8）に対し遙かに活性であることを示す。

10

【1039】

実施例 22：一価 C l e c 9 A および P D - L 1 標的化 F c A F N

20

この実施例では、我々は、C l e c 9 A（c D C 1 樹状細胞のマーカー）および P D - L 1（腫瘍細胞および活性化免疫細胞上に発現）の両方を標的化する F c A F N を生成し、評価した。標的化のために、我々は、2 つの V H H : R 1 C H C L 5 0（ヒト C l e c 9 A 特異的）および 2 L I G 9 9（ヒト P D - L 1 特異的）を使用した。

【1040】

構築物：

○ Fc4-20*GGS-IFNa2_R149A (P-1414)

[illegible]

10

- R1CHCL50-20***GG**S-2LIG99-20***GG**S-Fc3 (P-1467)

QVQLVESGGGLVHPGGSRLRSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVTGR
FTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCYLVALKAEYWGQGTQVTVSS**GGSGGSGGSGGSGGSGG**
GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
RLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTISRDN TKKTVSLQMNSLK
PEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS**GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG**
GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
VTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKQCV
SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:
1509)

20

○ 2LIG99-20*GGS-R1CHCL50-20*GGS-Fc3 (P-1469)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSNIRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRF
TISRDNTHKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGQTQVTVSS**GSGSGSGSGSGSGSG**
S**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSQVLVESGGGLVHPGGS**
LSCAASGSFSSINVMGWYRQAPGKERELVARITNLGLPNYADSVTGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLK
PEDTAVYYCYLVAKAEYWQGQTQVTVSS**GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG**
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSKHTHCPPEAPEAAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWWLNKEYKCQVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:
1510)

30

40

【 1 0 4 1 】

Clec9AおよびPD-L1 VHHベースAFNの産生と精製

次の組み合わせをE x p i C H O細胞中で一過的に遺伝子導入した：

i. R1CHCL50-2LIG99-Fc3+Fc4-IFNa2__R149A (二重特異的；一価標的化；スキーム：図8B)；

i i. 2 L I G 9 9 - R 1 C H C L 5 0 - F c 3 + F c 4 - I F N a 2 _ R 1 4 9 A (二重特異的；一価標的化；スキーム：図 8 B)；

【 1 0 4 2 】

遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce

50

Protein A スピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【1043】

FACS による相対的親和性

Clec9A および PD-L1 に対する相対的親和性を測定するために、二重特異的標的化 Fc-AFN、および HL116-hClec9A 細胞を、過剰の競合遊離 VHH 2LIG99 の存在下または非存在下で段階希釈の AFN と共にインキュベートした。その後、FITC 標識抗ヒト二次 Ab と共にインキュベーションすることにより結合を検出し、MACSQuant X instrument (Miltenyi Biotec h) で測定し、FlowLogic ソフトウェア (Miltenyi Biotec h) を用いて分析した。図 45 のデータは、両方の二重特異的標的化 AFN が、両標的に同時に結合でき、両標的を発現している細胞に対する増大した親和性を生ずることを示す。

10

【1044】

実施例 23：一価および二価 Clec9A および PD-L1 標的化 Fc-AFN

この実施例では、我々は、Clec9A (cDC1 樹状細胞のマーカー) および PD-L1 (腫瘍細胞および活性化免疫細胞上に発現) の両方を標的化する Fc-AFN を生成し、評価した。標的化のために、我々は、2 つの VHH: R1CHCL50 (ヒト Clec9A 特異的) および 2LIG99 (ヒト PD-L1 特異的) を使用した。2 種の二重特異的フォーマット (1 つは一価標的化を生じ、もう 1 つは、二価標的化を生ずる) の生物活性を単一特異性 Fc-AFN と比較した。二価二重特異的標的化は、図 46 A ~ D に概略的に示されている。

20

【1045】

構築物：

○ R1CHCL50-20*GGS-Fc3 (P-1451)

10

20

30

40

10

20

30

50

c 9 A ; スキーム : 図 7 B) ;

i i . 2 L I G 9 9 - F c 3 + F c 4 - I F N a 2 _ _ R 1 4 9 A (単一特異性 P D - L 1 ; スキーム : 図 7 B) ;

i i i . R 1 C H C L 5 0 - F c 3 + 2 L I G 9 9 - F c 4 - I F N a 2 _ _ R 1 4 9 A (二重特異的 ; 一価標的化 ; スキーム : 図 1 6 A) ;

i v . 3 L E C 8 9 - F c 3 - 2 L I G 9 9 + F c 4 - I F N a 2 _ _ R 1 4 9 A (二重特異的 ; 一価標的化 ; スキーム : 図 8 A) ;

v . R 1 C H C L 5 0 - 2 L I G 9 9 - F c 3 + R 1 C H C L 5 0 - 2 L I G 9 9 - F c 4 - I F N a 2 _ _ R 1 4 9 A (二重特異的および二価標的化 ; 図 4 6 C) 。

【1047】

遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート (T h e r m o F i s h e r) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【1048】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

H L 1 1 6 クローンをヒト H T 1 0 8 0 細胞株 (A T C C C C L - 1 2 1) から誘導する。これは、I F N 誘導性 6 - 1 6 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親 H L 1 1 6 細胞は、P D - L 1 を内在性に発現し、従って、P D - L 1 標的化をベースにしたシグナル伝達の評価に使用された。「非標的化」状況は、過剰の遊離 P D - L 1 V H H 2 L I G 9 9 の存在下での細胞の刺激により模倣した。C l e c 9 A 標的化は、親 H L 1 1 6 対 H L 1 1 6 - h C l e c 9 A 細胞のシグナル伝達を比較することにより評価した。親および由来細胞を 2 0 , 0 0 0 細胞 / 9 6 ウェルで一晩播種し、2 L I G 9 9 (2 0 μ g / m l) と共にプレインキュベートし (該当する場合には) 、その後、段階希釈の F c A F N で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 4 7 および表 1 2 のデータは、特に、下記を示す：

- ・ F c A F N 含有 2 L I G 9 9 は、予測通り両細胞株に対し活性であり、標的化の特異性は、遊離 V H H 2 L I G 9 9 との競合により実証される；

- ・ R 1 C H C L 5 0 のみをベースにした A F N は、H L 1 1 6 - h C l e c 9 A 細胞に対してのみ活性である；

- ・ 二重特異的 A F N は、単一特異性バリエーションと比較して、または P D - L 1 のみを発現している親 H L 1 1 6 に比較して、H L 1 1 6 - h C l e c 9 A 細胞 (両標的を発現している) に対して顕著により活性である；および

- ・ 二重特異的および二価標的化分子は、P D - L 1 のみを発現している細胞株に対して最も低い E C 5 0 を有し、二価の標的化により効力が増大するという以前の知見 (実施例 1 5) を確証する。

10

20

30

【表 15】

表 12：図 47 に示す二重特異的 C1ec9A-PD-L1 Fc AFN バリエーションの生物活性。

		EC50 (ng/ml)	
		親 HL116	HL116-hC1ec9A
(i)	R1CHCL50-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A	ND	0.14
(ii)	2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A	3.76	1.94
(iii)	R1CHCL50-Fc3 + 2LIG99-Fc4-IFNa2_R149A	7.16	0.0005
(iv)	3LEC89-Fc3-2LIG99 + Fc4-IFNa2_R149A	52.12	0.33
(v)	R1CHCL50-2LIG99-Fc3 + R1CHCL50-2LIG99-Fc4-IFNa2_R149A	0.76	0.012

10

【1049】

実施例 24：ヒト化マウスでの有効性研究

Fc ベース PD-L1 および／または C1ec9A 標的化 AFN のインビボ有効性を評価するために、実施例 23、表 12 に記載の分子 (i)、(ii)、および (iii) ならびに、分子 (i) および (ii) の混合物をヒト化マウスの腫瘍モデルで試験した。上述のように Exp i CHO 細胞中でタンパク質産生を行った。Hitrap Protein A HP (GE Healthcare) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。結合タンパク質を pH 3.5 (25 mM のクエン酸ナトリウム) でカラムから溶出し、1 M トリス pH 8.8 で中和した。最終的に、タンパク質を 10 mM NH₄-酢酸アンモニウム pH 5-123.5 mM NaCl-0.02% ツイーン 20 に対し G25 カラムで脱塩または G200 カラム (GE Healthcare) で脱塩および最終精製し、および 0.22 μm 濾過に供した。新生児 NSG マウス (1~2 日齢) を、100 cGy で亜致死量照射し、その後、1 x 10⁵ 個の CD34+ ヒト幹細胞 (HLA-A2 陽性臍帯血由来) を肝内に送達した。13 週後、幹細胞移入マウスに 25 x 10⁵ 個のヒト RL 濾胞性リンパ腫細胞 (ATCC CRL-2261) を皮下接種した。マウスを 30 μg のヒト Flt3L タンパク質で、腫瘍接種後 8 日目~15 日目に毎日腹腔内治療した。触知できる腫瘍が認められると、緩衝液または Fc-AFN を用いた静脈内注射を、腫瘍接種後の 9 および 15 日目に実施した (群当たり n = 4~5 匹のマウス)。2 回目の免疫の 4 日後まで、動物を追跡調査した。腫瘍サイズ (ノギス測定値) を定期的間隔で評価した。図 48 は、緩衝液治療のみに比較して、C1ec9A および PD-L1 の両方を標的化した AFN が腫瘍増殖を低減したという優位性を示す。PD-L1 および C1ec9A の両方を標的とする二重特異的 AFN は、単一標的化 AFN または単一標的化 AFN の組み合わせに比べて優れていると思われる。

20

30

40

【1050】

実施例 25：CD8 および C1ec4C 標的化 Fc AFN

この実施例では、我々は、C1ec4C (形質細胞様樹状細胞のマーカー) および CD8 (T 細胞サブセット) の両方を標的化する Fc AFN を生成し、評価した。標的化のために、我々は、2 つの VHH: 2CL92 (ヒト C1ec4C 特異的) および 1CDA65 (ヒト CD8 特異的) を使用した。二重特異的 フォーマットが、標的発現 HL116 細胞に対する生物活性を単一特異性 Fc AFN と比較される。

【1051】

構築物：

10

20

30

40

50

(i) C l e c 4 C V H H - F c 3 + F c 4 - I F N a 2 _ R 1 4 9 A (C l e c 4 C 特異的 A F N ; スキーム : 図 7 B) ;

(i i) C D 8 V H H - F c 3 + F c 4 - I F N a 2 _ R 1 4 9 A (C l e c 4 C 特異的 A F N ; スキーム : 図 7 B) ;

(i i i) C l e c 4 C V H H - F c 3 + C D 8 V H H - F c 4 - I F N a 2 _ R 1 4 9 A (二重特異的 A F N ; スキーム : 図 1 6 A) 。

【1053】

遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート (T h e r m o F i s h e r) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

10

【1054】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

H L 1 1 6 クローンをヒト H T 1 0 8 0 細胞株 (A T C C C C L - 1 2 1) から誘導する。これは、I F N 誘導性 6 - 1 6 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。ヒト C l e c 4 C またはヒト C D 8 をコードするベクターをこれらの H L 1 1 6 細胞に安定に遺伝子導入し、H L 1 1 6 - h C l e c 4 C および H L 1 1 6 - h C D 8 細胞株を得た。生物活性を測定するために、親および由来細胞を 2 0 , 0 0 0 細胞 / 9 6 ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈の F c A F N で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 4 9 のデータは、単一特異性 F c A F N は、それぞれの H L 1 1 6 - h C l e c 4 C および H L 1 1 6 - h C D 8 細胞株に対してのみ活性であり、一方、二重特異的 F c A F N は、両細胞株でシグナル伝達を誘導するが、親細胞では誘導しないことを示す。

20

【1055】

実施例 2 6 : s c F v X c r 1 A b A F N

この実施例では、我々は、従来の樹状細胞 1 型 (c D C 1) の標的化のために、ヒト X c r 1 A b 5 G 7 の s c F v バリエントをベースにした A F N を設計し、評価した。

【1056】

構築物 :

10

20

30

40

[illegible]

構築物 s c F v X c r 1 A b - 2 0 * G G S - F c 3 および F c 4 - 2 0 * G G S - I F N α 2 _ R 1 4 9 A を、図 7 B で概要を示した構造を有するヘテロダイマー A F N に結合し、製造業者の説明書に従って、E x p i C H O 発現系 (T h e r m o F i s h e r) で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート (T h e r m o F i s h e r) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞にヒトXcr1配列をコードする発現ベクターを遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンをG418含有培地中で選択した。親HL116およびHL116-hXcr1細胞を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈のFc-AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図50のデータは、両細胞株は、野生型IFNa2に対し同程度に感受性であり、一方、hXcr1-Fc-AFNは、非標的化細胞(親HL116)に比較して、標的細胞(HL116-hXcr1)に対し、より活性であることを示す。

この実施例では、我々は、B細胞および腫瘍細胞を標的化するために、ヒトCD20A b リツキシマブのs c F vバリエントをベースにしたAFNを設計し、評価した。

構築物：

構築物：

○ scFv CD20 Ab-20*GGG-Fc3 (P-1622)

10

20

30

AFRの産生および精製

構築物 s c F v C D 2 0 A b - 2 0 * G G S - F c 3 および F c 4 - 2 0 * G G S - 3 * T N F _ Y 8 7 F を、図 7 B で概要を示した構造を有するヘテロダイマー A F R に結合し、製造業者の説明書に従って、E x p i C H O 発現系 (T h e r m o F i s h e r) で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。P i e r c e P r o t e i n A スピンプレート (T h e r m o F i s h e r) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

HEK-Dual レポーター細胞株に対する生物活性

40

50

【 1 0 6 7 】

この実施例では、我々は、造血（血液）前駆細胞の標的化のために、FMS様チロシンキナーゼ3（F1t3L）をベースにしたAFNを設計し、評価した。

構築物

○ FLT3L-20*GGS-Fc3 (P-1623)

[illegible]

○ Fc4-20*GGS-IFNa2 R149A (P-1414)

[illegible]

F l t 3 L ベース A F N の 産 生 お よ び 精 製

構築物 F1t3L-20*GGS-Fc3 および Fc4-20*GGS-IFNa2_R149A を、図 7B で概要を示した構造を有する AFN バリエーションに結合し、製造業者の説明書に従って、Exp iCHO 発現系 (Thermo Fisher) で一過的に発現させた。遺伝子導入の 1 週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein A スピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

生物活性：一過的遺伝子導入Hek293T細胞でのSTAT1リン酸化

He k 2 9 3 T細胞にF L T 3 発現プラスミドまたは空のベクター（M O C K）を一過的に遺伝子導入した。遺伝子導入の2日後、細胞を、段階希釈（示したように）野生型I F N α 2 またはF L T 3 L - F c - A F N を用いて37℃で15分間刺激した。固定（10分間、37℃、F i x B u f f e r I ; B D B i o s c i e n c e s ）、透過処理（30分、氷上、P e r m I I I B u f f e r I ; B D B i o s c i e n c e s ）および洗浄後、細胞を抗S T A T 1 p Y 7 0 1 A b （B D B i o s c i e n c e s ）で染色した。試料をM A C S Q u a n t X i n s t r u m e n t （M i l t e n y i B i o t e c h ）で取得し、F l o w L o g i c ソフトウェア（M i l t e n y i B i o t e c h ）を用いて分析した。図53のデータは、F L T 3 L F c A F N は、F L T 3 中でのみS T A T 1 リン酸化を誘導でき、M O C K 遺伝子導入細胞では誘導

【 1 0 7 1 】

【 1 0 7 2 】

10

- PD-1ec-20*GGS-Fc3 (P-1829)

20

30

40

50

【 1 0 7 9 】

この実施例では、我々は、PD-L1を発現するT細胞およびプロB細胞への標的化のためにプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）の二価細胞外（ec）部分の使用に基づいて、または腫瘍細胞または活性化免疫細胞の標的化のためにプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）の二価細胞外（ec）部分の使用に基づいて、AFNを設計し、評価した。

構築物：

○ PD-1ec-20*GGS-Fc3 (P-1829)

[illegible][illegible]

FTVTVPKDLVVEYGSNMITECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQHSYRQRRARLLKD
QLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVWDPVTSEHELTCQAEGYPK
AEVIWTSDDHQVLGSKGTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHPPN
ERSGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 1536)

[illegible]

10

二価 e c - A F N の産生および精製

20

20

30

30

40

実施例 34 : NGR ペプチドベース Fc-AFN

構築物：

50

0

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce

Protein A スピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【1088】

HL116 レポーター細胞株に対する生物活性

HL116 クローンをヒト HT1080 細胞株 (ATCC CCL-121) から誘導する。これは、IFN 誘導性 6-16 プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親 HL116 細胞は NGR 標的 CD13 を内在性に発現する。細胞を 20,000 細胞/96 ウェルで一晩播種し、続けて、段階希釈の Fc AFN で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図 56 のデータは、NGR Fc AFN は、Clec9A 標的化 Fc AFN に比べて IFN 様シグナル伝達の誘導の点で明らかにより強力であることを示し、NGR 標的化の特異性を示す。

10

【1089】

実施例 35：野生型 IFN α 2 の標的化

この実施例では、我々は、野生型 IFN α 2 または AFN 変異体 IFN α 2__R149A の標的化時の、末梢血単核球 (PBMC) 内の特定の集団に対するシグナル伝達を比較した。サイトカイン、またはその変異体は、Fc 中の CD20 VHH (クローン 2HC D25)、CD8 VHH (クローン 1CDA65)、または Clec4C VHH (クローン 2CL92) を用いて標的化される。

【1090】

構築物：

20

○ CD20 VHH-20*GGS-Fc3 (P-1570)

10

20

30

40

[illegible]

10

20

30

40

50

勾配遠心分離を用いて単離した。細胞を、FACS緩衝液（2%FBS、PBS中1mMのEDTA）で2回洗浄し、FITC標識抗hCD8（Miltenyi Biotec）を用いて4℃で20分間染色した。2回の洗浄後、細胞を段階希釈の野生型または変異体FcAFNを用いて、37℃で15分間刺激した。固定（10分間、37℃、Fix Buffer I；BD Biosciences）および透過処理（30分、氷上、Perm III Buffer I；BD Biosciences）および洗浄後、細胞を抗STAT1 pY701 Ab（BD Biosciences）で染色した。試料をMACSQuant X instrument（Miltenyi Biotec）で取得し、FlowLogicソフトウェア（Miltenyi Biotec）を用いて分析した。データを図58にまとめている。CD8陽性および陰性細胞は、類似の効力（EC50の比率：約1）で野生型IFNa2に応答する。他方、野生型または変異体IFNa2は、CD8 VHHでCD8陽性細胞を標的にした場合、遙かに活性である。それぞれのEC50比率は、約125および>125である。

【1095】

CD20標的化時の生物活性：PBMCのSTAT1リン酸化

CD20標的化分子の生物活性を以下のように試験した：健康なドナーのパフィーコート由来のPBMCをFicoll-Paque（GE Healthcare）による密度勾配遠心分離を用いて単離した。細胞をFACS緩衝液（2%FBS、PBS中1mMのEDTA）で2回洗浄し、FITC標識抗hCD19（SinoBiologics）を用いて4℃で20分間、B細胞染色した。2回の洗浄後、細胞を段階希釈の野生型または変異体FcAFNを用いて、37℃で15分間刺激した。固定（10分間、37℃、Fix Buffer I；BD Biosciences）および透過処理（30分、氷上、Perm III Buffer I；BD Biosciences）および洗浄後、細胞を抗STAT1 pY701 Ab（BD Biosciences）で染色した。試料をMACSQuant X instrument（Miltenyi Biotec）で取得し、FlowLogicソフトウェア（Miltenyi Biotec）を用いて分析した。データを図59にまとめている。CD19陽性（すなわち、B細胞）および陰性細胞は、類似の効力（EC50の比率：約1）で野生型IFNa2に応答する。他方、野生型または変異体IFNa2は、CD20 VHHでCD19陽性細胞を標的にした場合、遙かに活性である。それぞれのEC50比率は、約25および>500である。

【1096】

実施例36：別のIFNa2AFN変異

この実施例では、標的化および非標的化細胞中のシグナル伝達に対する影響を評価するために、Clec9A標的化FcAFNにおいてIFNa2中のいくつかの異なる残基に変異導入した。種々の変異の位置を図60に示す（ここで、野生型は配列番号2である）。

【1097】

構築物（図60）

【化 3 1】

30-LKDRHDEGF-P-//--VVRAEIMRSESLSTNLQESLRSE-165: 野生型 1FNa2
 30-...A...-//--.....-165: P-1838: Fc4-hIFNa2_R33A
 30-.....-//--..A.....-165: P-1839: Fc4-hIFNa2_R144A
 30-.....-//--..I.....-165: P-1840: Fc4-hIFNa2_R144I
 30-.....-//--..L.....-165: P-1841: Fc4-hIFNa2_R144L
 30-.....-//--..S.....-165: P-1842: Fc4-hIFNa2_R144S
 30-.....-//--..T.....-165: P-1843: Fc4-hIFNa2_R144T
 30-.....-//--..Y.....-165: P-1844: Fc4-hIFNa2_R144Y
 30-.....-//--..D.....-165: P-1845: Fc4-hIFNa2_A145D
 30-.....-//--..G.....-165: P-1846: Fc4-hIFNa2_A145G
 30-.....-//--..H.....-165: P-1847: Fc4-hIFNa2_A145H
 30-.....-//--..K.....-165: P-1848: Fc4-hIFNa2_A145K
 30-.....-//--..Y.....-165: P-1849: Fc4-hIFNa2_A145Y
 30-.....-//--..A.....-165: P-1850: Fc4-hIFNa2_M148A
 30-.....-//--..A.....-165: P-1414: Fc4-hIFNa2_R149A
 30-.....-//--..A.....-165: P-1851: Fc4-hIFNa2_L153A

10

【1098】

A FNの産生および精製

Fc4-20*GGS-IFNa2の種々の変異バリエーションを、構築物R1CHCL50-20*GGS-Fc3と結合し、図7Bに概要を示した構造を有するAFNを生じた。タンパク質を、製造業者の説明書に従って、Exp iCHO発現系(Thermo Fisher)で一過的に発現させた。遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein Aスピンプレート(Thermo Fisher)を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

20

【1099】

HL116レポーター細胞株に対する生物活性

HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞にヒトClec9A配列をコードする発現ベクターを遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンをG418含有培地中で選択した。親HL116およびHL116-hClec9A細胞を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、続けて、異なる濃度のFc AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図61のデータは、全ての変異は、標的細胞(ここでは、HL116を発現するhClec9A)中で選択的にシグナル伝達をするFc AFNをもたらすことを示す。

30

【1100】

実施例37: インターフェロンアルファ1をベースにしたAcTakin

本実施例は、野生型インターフェロンアルファ1(IFNa1)をベースにし、ヒトClec9A特異的VHH(クローンR1CHCL50)を介して標的化されるAcTakinを評価し、生成する。

【1101】

構築物:

40

○ R1CHCL50-20*GGS-Fc3 (P-1451)

10

20

30

40

構築物：

○ R1CHCL50-20*GGS-Fc3 (P-1451)

10

20

30

40

構築物：

10

- 20

30

- 40

50

30

40

50

30

40

50

30

40

この実施例では、我々は、Y87F変異を有する腫瘍壊死因子（TNF__Y87F）をベースにし、ヒトClec9A特異的VHH（クローンR1CHCL50）を介して標的化されるAcTakineを生成し、評価した。TNF__Y87Fは、単鎖トリマー（GGGSリンカーを用いて）として1つのFcアーム上にクローン化され、得られたAcTakineは、以後、AcTafactor（AFR）と呼ばれる。

構築物：

- CD20 VHH-20***GG**S-Fc3 (P-1570)

10

- Fc4-20*GGS-3*TNF_Y87F (P-1545)

20

30

以下のように構築物を結合し、Exp i C H O発現系で一過的に発現させた：

【 1 1 1 5 】

【 1 1 1 6 】

40

50

【 1 1 1 7 】

この実施例では、我々は、IFNa2__R149AおよびhIL-1b__Q148Qの両方の変異を含みヒトCD8特異的VHH（クローン1CDA65）を介して標的化されるbi-AcTakineを生成および評価した。

【 1 1 1 8 】

【化 3 6】

[illegible][illegible]

【 1 1 1 9 】

構築物Fc3-20*GGs-IL-1b_Q148GおよびCD8 VHH-20*GGs-Fc4-20*GGs-IFNa2_R149Aを結合し、製造業者の説明書に従って、Exp iCHO発現系(Thermo Fisher)で一過的に発現させた。得られたbi-AcTakineは、図6Aで概要を説明した構造を有する。遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出した。Pierce Protein Aスピンプレート(Thermo Fisher)を用いて、組換えタンパク質を上清から精製した。

【 1 1 2 0 】

HL116レポーター細胞株を用いて、bi-AckineのIFN様シグナル伝達を試験した。親HL116細胞にヒトCD8配列をコードする発現ベクターを遺伝子導入した。安定に遺伝子導入されたクローンをG418含有培地中で選択した。親HL116およびHL116-hCD8細胞を20,000細胞/96ウェルで一晩播種し、続け

て、段階希釈のFc AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を細胞ライセート中で測定した。図66のデータは、両細胞株は、野生型IFNa2に対し同程度に感受性であり、一方、bi-AcTatineは、非標的化細胞（親HL116）に比較して、標的細胞（HL116-hCD8）に対し遙かに活性であることを示す。

【1121】

bi-AcTatineのIL-1 β 様シグナル伝達を、NF- κ B/AP1誘導性SEAP（分泌アルカリフォスファターゼ）レポーターを用いて、HEK-Blue（登録商標）IL-1 β 細胞（InvivoGen）で測定した。従って、細胞に、空のベクターまたはヒトCD8コード発現プラスミドを一過的に遺伝子導入した。遺伝子導入の36時間後、細胞を再懸濁し、段階希釈野生型IL-1 β またはbi-AcTatineで一晩刺激した。Phospho-Light SEAP Reporter Gene Assay System（ThermoFisher）を用い、製造業者の説明書に従ってSEAPを測定した。図67のデータは、MOCKまたはCD8遺伝子導入HEK-Blue細胞は、野生型IL-1 β に対し同等の感受性を示し、一方、bi-AcTatineは、標的（ここでは、CD8）を発現する細胞中では特異的にシグナル伝達を誘導できるがMOCK遺伝子導入細胞では誘導できないことを示す。

10

【1122】

実施例42：ヒトIgG4をベースにしたClec9A Fc AFN

この実施例では、我々は、ヒトIgG1またはヒトIgG4をベースにしたClec9A標的化（VHH R1CHCL50経由）AFNを設計し、評価した。使用したヒトIgG4は、S228P変異を有し、半分子のインビボ交換を回避する。加えて、ノブまたはホールがそれぞれのFc鎖中で改変された。

20

【1123】

構築物：

○ R1CHCL50-20*GGS-Fc3 (P-1451)

10

20

30

40

50

【 1 1 2 6 】

H L 1 1 6 レポーター細胞株に対する生物活性

10

20

30

40

50

のいくつかの構造の例は、例えば、図4A～Dに示され、標的化薬剤は、PD-L1に向けられたscFvであり、シグナル伝達物質は野生型IFN α 2である。

【1132】

PD-L1 scFvベースAFNの産生と精製

構築物を、製造業者の説明書に従い、対応する構築物の一過性遺伝子導入により、ExpiCHO細胞中で産生する。遺伝子導入の1週間後、上清を集め、遠心分離により細胞を取り出す。Pierce Protein アスピンプレート (Thermo Fisher) を用いて、組換えタンパク質を上清から精製する。

【1133】

HL116レポーター細胞株に対する生物活性

これらの構築物の生物活性を、HL116レポーター細胞株で調査する。HL116クローンをヒトHT1080細胞株(ATCC CCL-121)から誘導する。これは、IFN誘導性6-16プロモーターにより制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む。親HL116細胞は、PD-L1を内在性に発現し、そのため、過剰の対応する遊離PD-L1 scFvの存在下または非存在下で標的化を評価する。

【1134】

IFN α で武装した抗PD-L1の構造および特性評価を行う。80nMの濃度でのIFNAR1-/-A20細胞およびPD-L1-/-A20細胞中の示されたタンパク質の結合を示すために、フローサイトメトリーを使用する。

【1135】

数字は、平均蛍光強度(MFI)を示す。scFv PD-L1ベースFc AFNの生物活性を、抗ウイルス感染生物学的アッセイにより測定した。L929細胞を各タンパク質と共に一晚培養した後、VSV-GFPウイルスに感染させた。さらに30時間の培養後、ウイルス感染細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより測定した。

【1136】

Balb/cマウス(n=5)に3x10⁶個のA20細胞を接種する。腫瘍が確立された後で、マウスを、20 μ gの対照、抗PD-L1、IFN α -Fc、またはscFv PD-L1ベースFc AFNによる腫瘍内または静脈内注射(11日目および15日目)で治療する。

【1137】

腫瘍サイズを週2回測定する。C57BL/6マウス(n=4~8)に5x10⁵個のMC38細胞を接種する。マウスを、14日目および18日目に、25 μ gの対照またはscFv PD-L1ベースFc AFNの静脈内注射で治療する。マウスに、25 μ gの示したタンパク質の静脈内注射を行う。異なる時点での腫瘍組織または血清中のタンパク質濃度を、ELISAで測定する。

【1138】

等価物

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

【1139】

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

【1140】

参照による組み込み

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

10

20

30

40

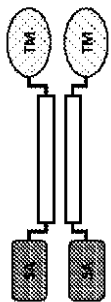
50

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

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

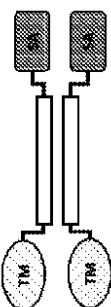
【図 1 A】

FIG. 1A



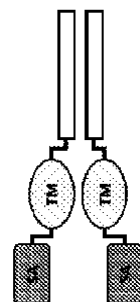
【図 1 B】

FIG. 1B



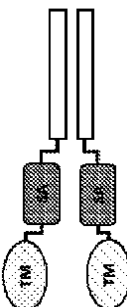
【図 1 C】

FIG. 1C



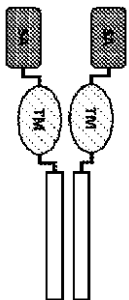
【図 1 D】

FIG. 1D



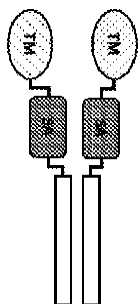
【図 1 E】

FIG. 1E



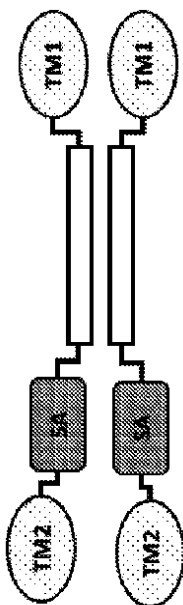
【図 1 F】

FIG. 1F



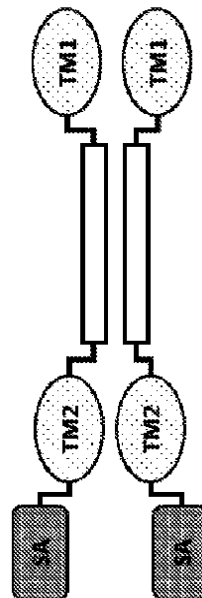
【図 2 B】

FIG. 2B



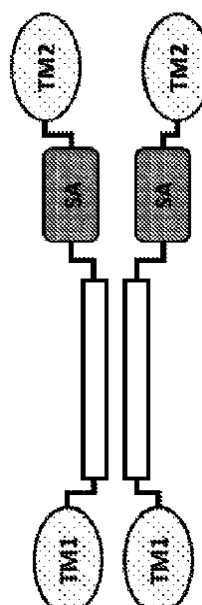
【図 2 A】

FIG. 2A



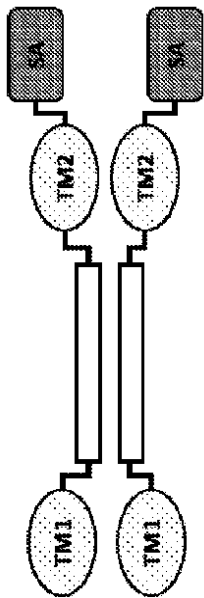
【図 2 C】

FIG. 2C



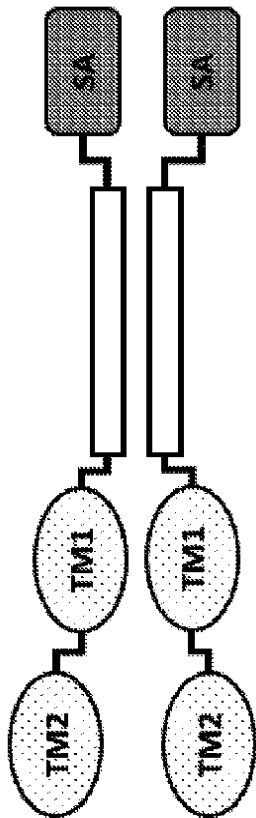
【図 2 D】

FIG. 2D



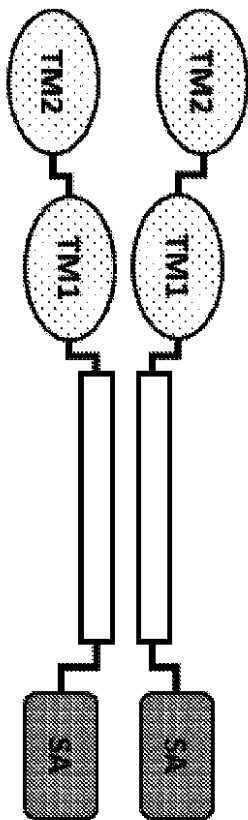
【図 2 E】

FIG. 2E



【図 2 F】

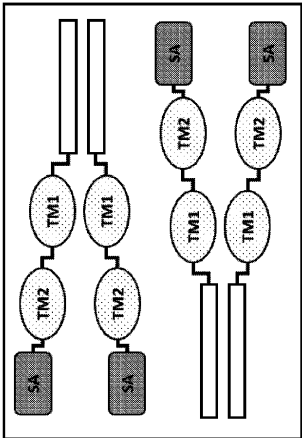
FIG. 2F



【図 2 G - 2 H】

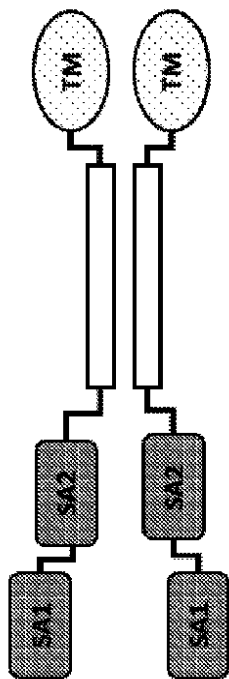
FIG. 2G

FIG. 2H



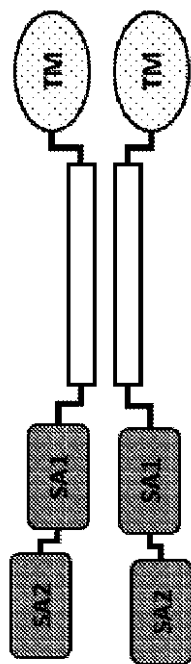
【図 3 A】

FIG. 3A



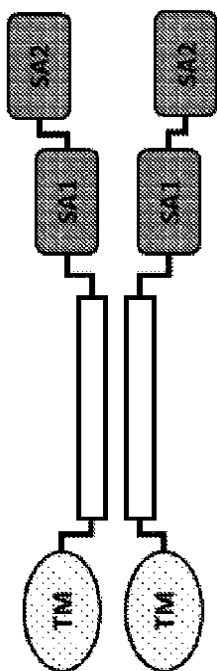
【図 3 B】

FIG. 3B



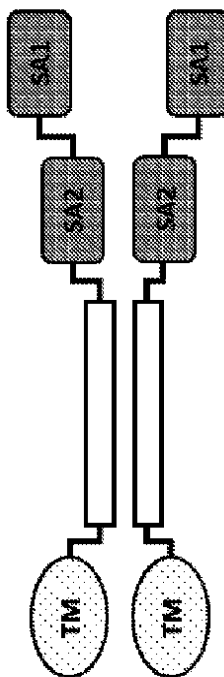
【図 3 C】

FIG. 3C



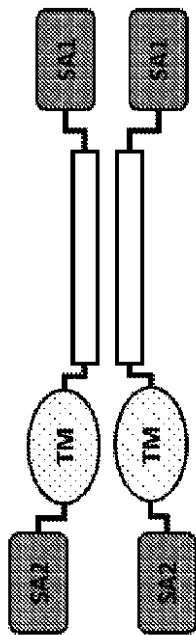
【図 3 D】

FIG. 3D



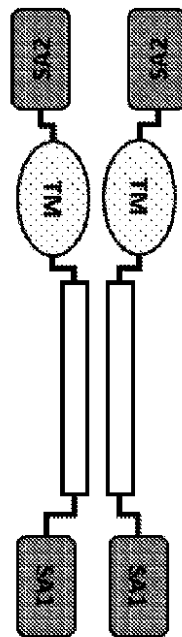
【図 3 E】

FIG. 3E



【図 3 F】

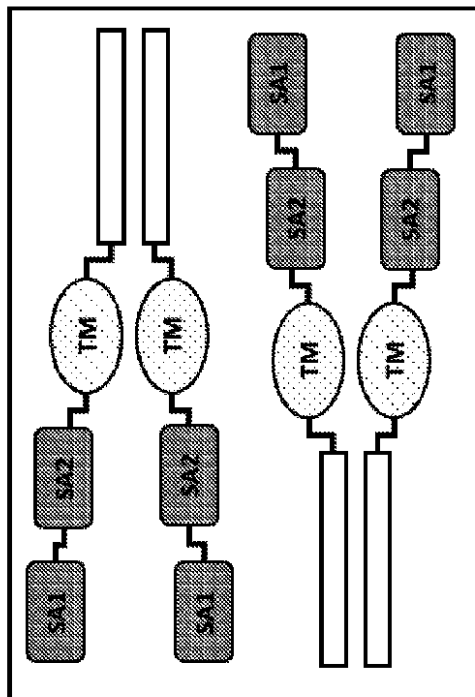
FIG. 3F



【図 3 G - 3 H】

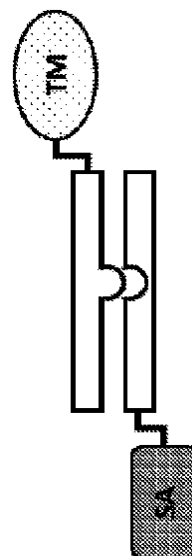
FIG. 3G

FIG. 3H



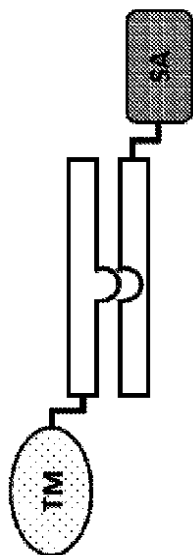
【図 4 A】

FIG. 4A



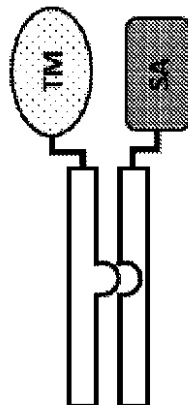
【図 4 B】

FIG. 4B



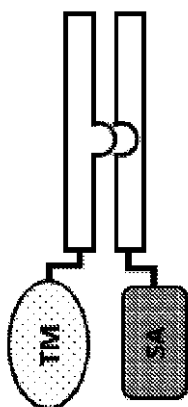
【図 4 C】

FIG. 4C



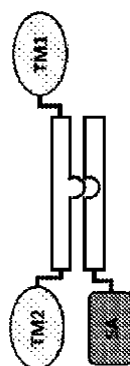
【図 4 D】

FIG. 4D



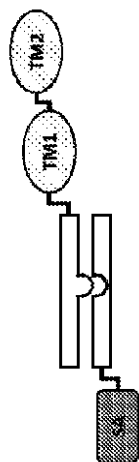
【図 5 A】

FIG. 5A



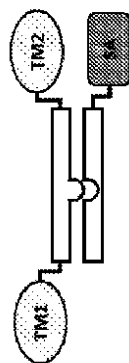
【図 5 B】

FIG. 5B



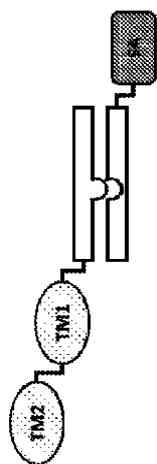
【図 5 C】

FIG. 5C



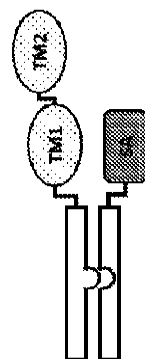
【図 5 D】

FIG. 5D



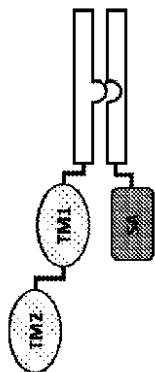
【図 5 E】

FIG. 5E



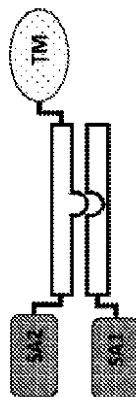
【図 5 F】

FIG. 5F



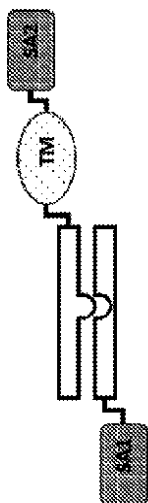
【図 6 A】

FIG. 6A



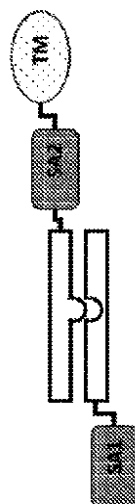
【図 6 B】

FIG. 6B



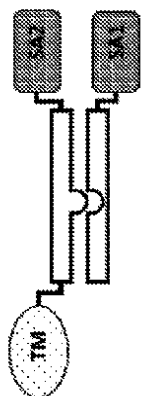
【図 6 C】

FIG. 6C



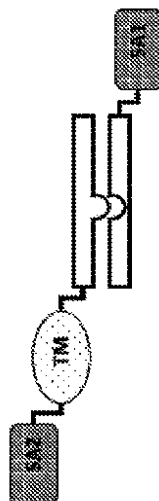
【図 6 D】

FIG. 6D



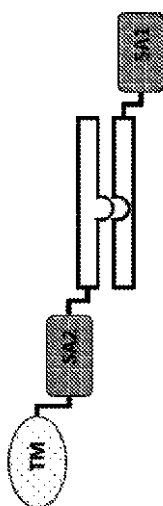
【図 6 E】

FIG. 6E



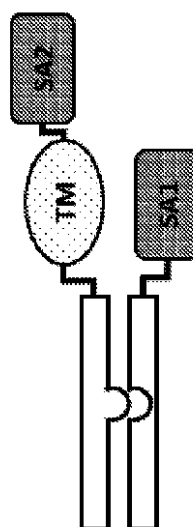
【図 6 F】

FIG. 6F



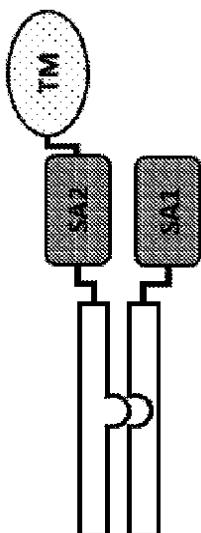
【図 6 G】

FIG. 6G



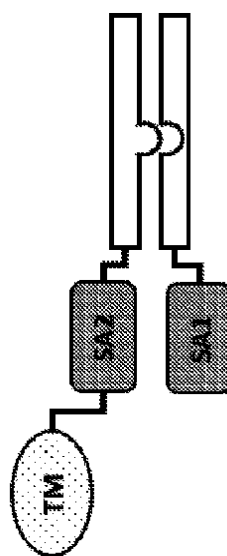
【図 6 H】

FIG. 6H



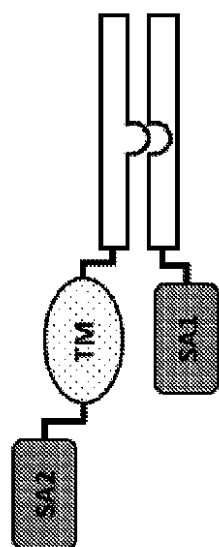
【図 6 I】

FIG. 6I



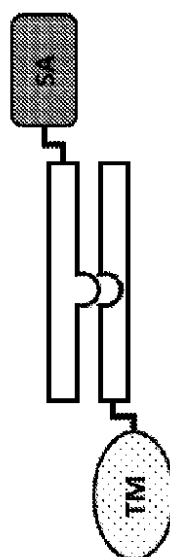
【図 6 J】

FIG. 6J



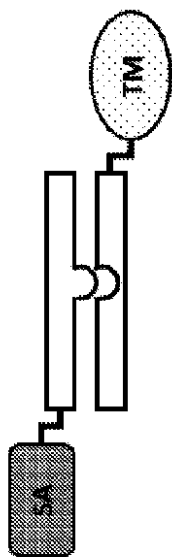
【図 7 A】

FIG. 7A



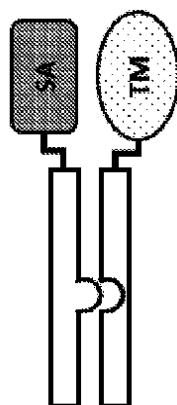
【図 7 B】

FIG. 7B



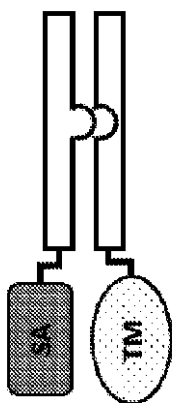
【図 7 C】

FIG. 7C



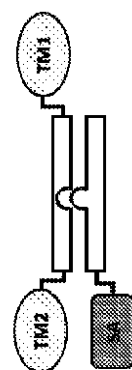
【図 7 D】

FIG. 7D



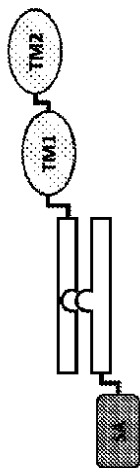
【図 8 A】

FIG. 8A



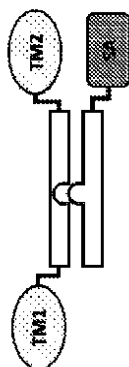
【図 8 B】

FIG. 8B



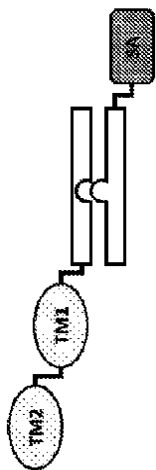
【図 8 C】

FIG. 8C



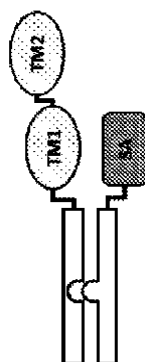
【図 8 D】

FIG. 8D



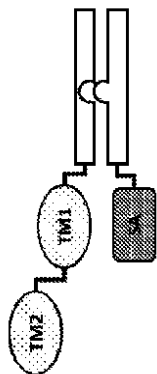
【図 8 E】

FIG. 8E



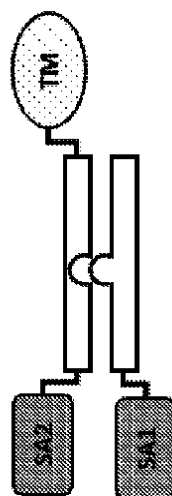
【図 8 F】

FIG. 8F



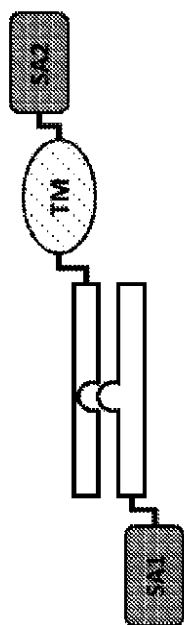
【図 9 A】

FIG. 9A



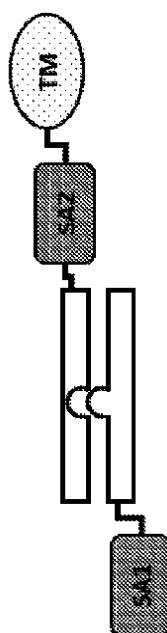
【図 9 B】

FIG. 9B



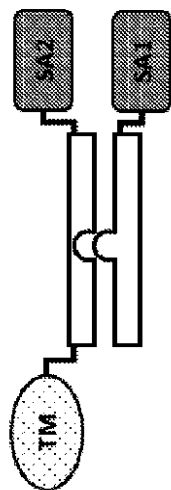
【図 9 C】

FIG. 9C



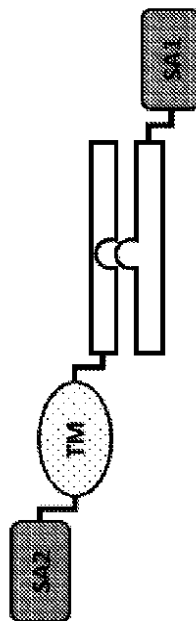
【図 9 D】

FIG. 9D



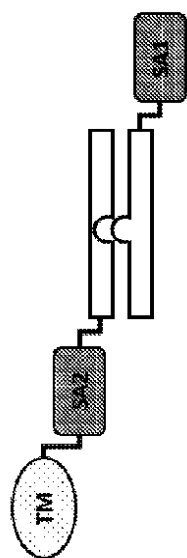
【図 9 E】

FIG. 9E



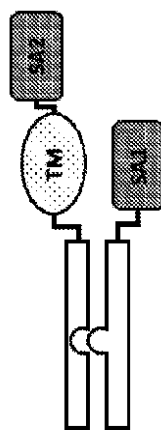
【図 9 F】

FIG. 9F



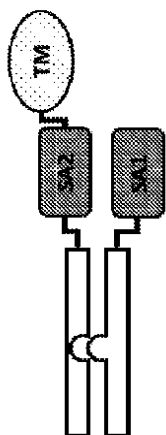
【図 9 G】

FIG. 9G



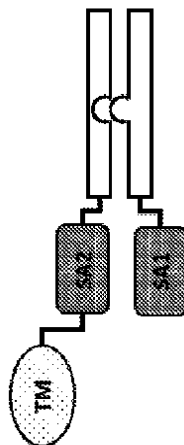
【図 9 H】

FIG. 9H



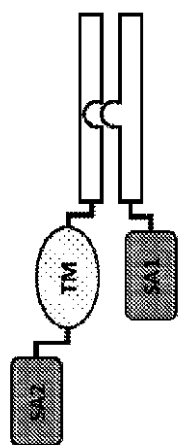
【図 9 I】

FIG. 9I



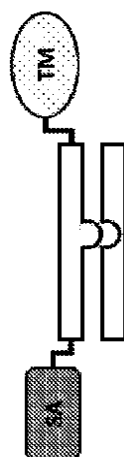
【図 9 J】

FIG. 9J



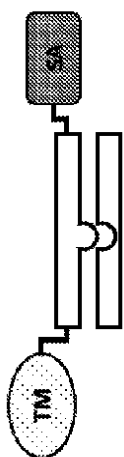
【図 10 A】

FIG. 10A



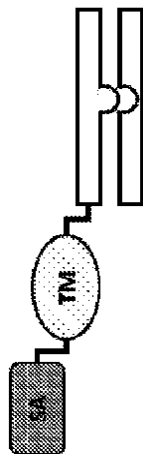
【図 10 B】

FIG. 10B



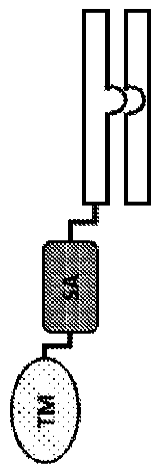
【図 10 C】

FIG. 10C



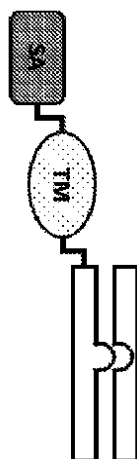
【図 10 D】

FIG. 10D



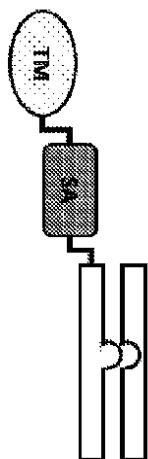
【図 10 E】

FIG. 10E



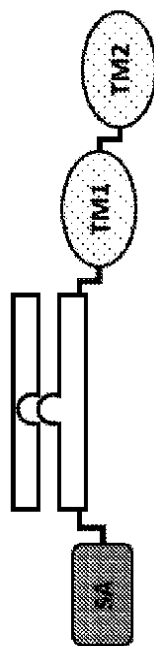
【図 10 F】

FIG. 10F



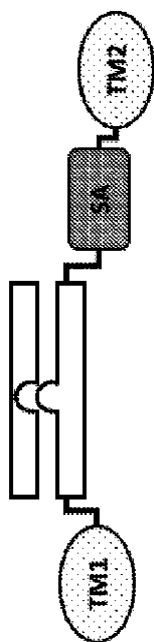
【図 11 A】

FIG. 11A



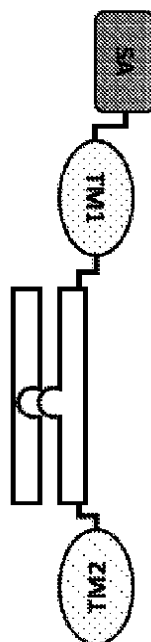
【図 11 B】

FIG. 11B



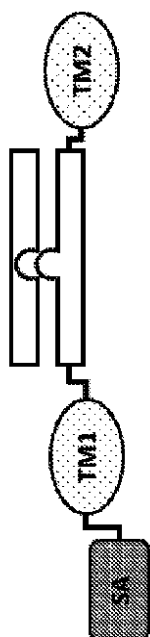
【図 11 C】

FIG. 11C



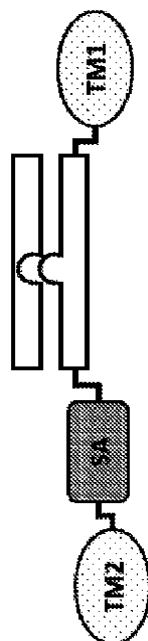
【図 1 1 D】

FIG. 11D



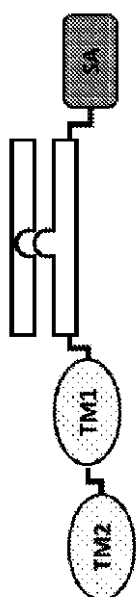
【図 1 1 E】

FIG. 11E



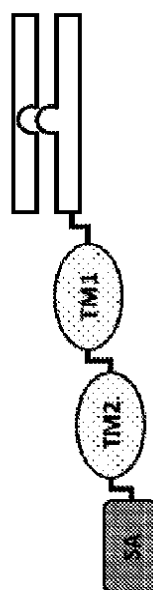
【図 1 1 F】

FIG. 11F



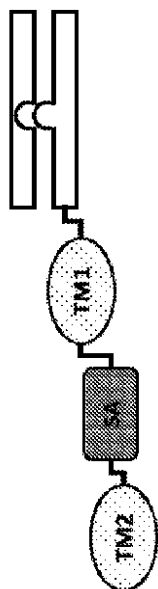
【図 1 1 G】

FIG. 11G



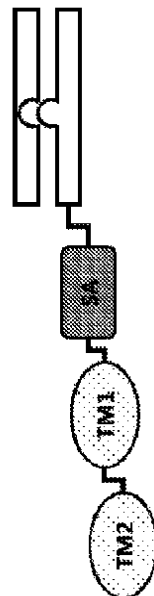
【図 1 1 H】

FIG. 11H



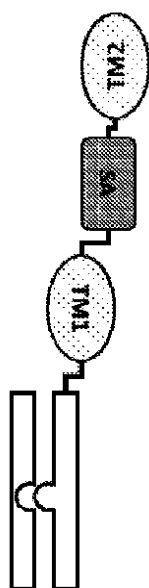
【図 1 1 I】

FIG. 11I



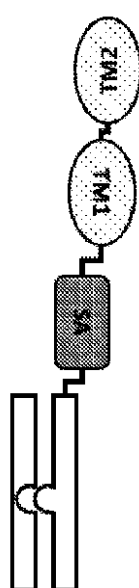
【図 1 1 J】

FIG. 11J



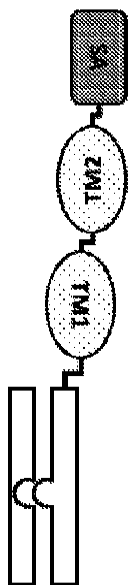
【図 1 1 K】

FIG. 11K



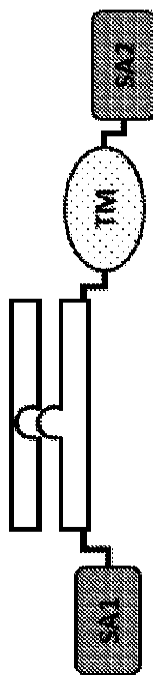
【図 1 1 L】

FIG. 11L



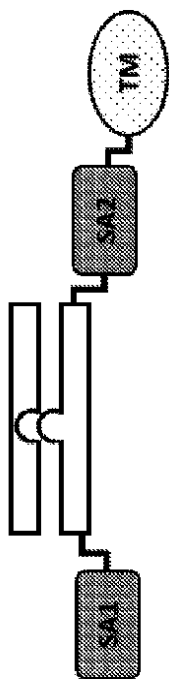
【図 1 2 A】

FIG. 12A



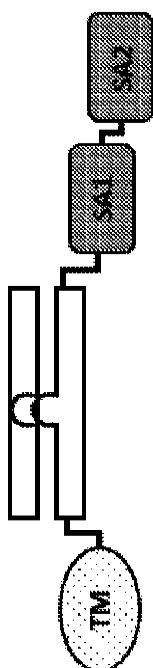
【図 1 2 B】

FIG. 12B



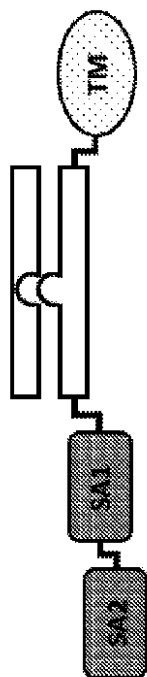
【図 1 2 C】

FIG. 12C



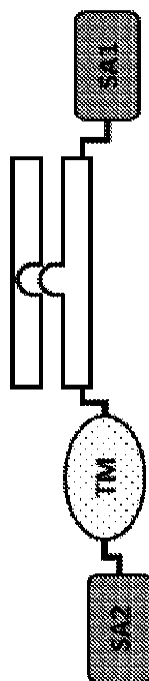
【図 1 2 D】

FIG. 12D



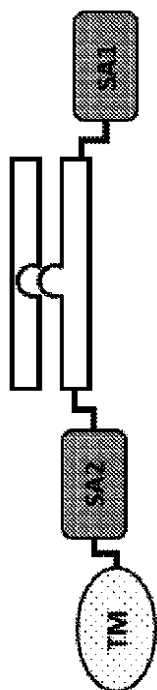
【図 1 2 E】

FIG. 12E



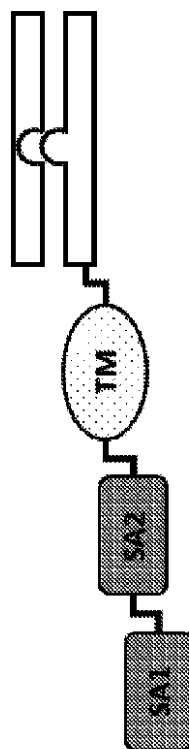
【図 1 2 F】

FIG. 12F



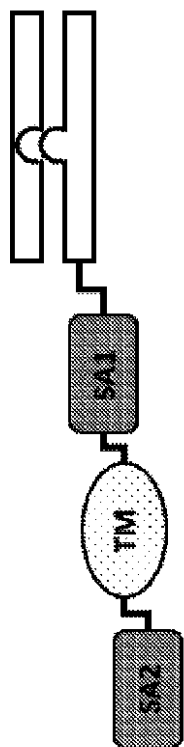
【図 1 2 G】

FIG. 12G



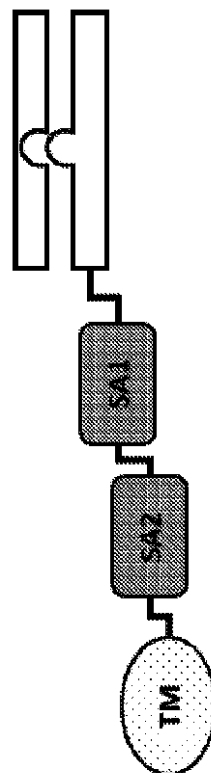
【図 1 2 H】

FIG. 12H



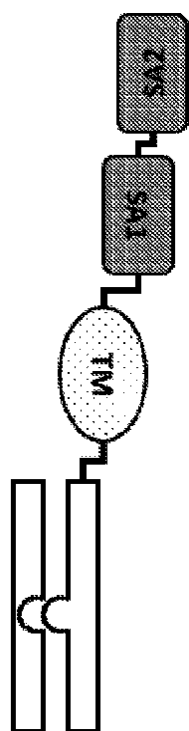
【図 1 2 I】

FIG. 12I



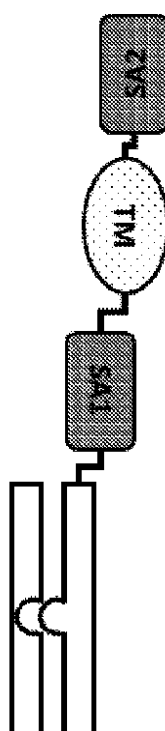
【図 1 2 J】

FIG. 12J



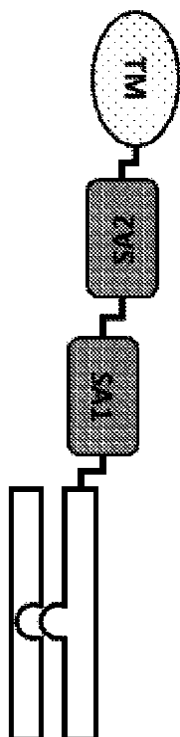
【図 1 2 K】

FIG. 12K



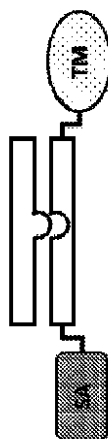
【図 1 2 L】

FIG. 12L



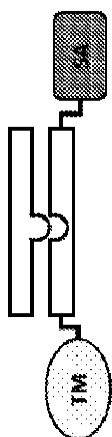
【図 1 3 A】

FIG. 13A



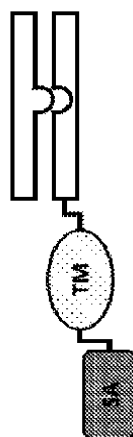
【図 1 3 B】

FIG. 13B



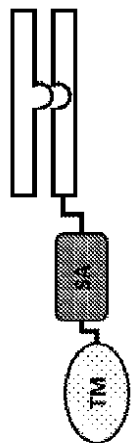
【図 1 3 C】

FIG. 13C



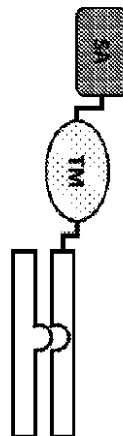
【図 1 3 D】

FIG. 13D



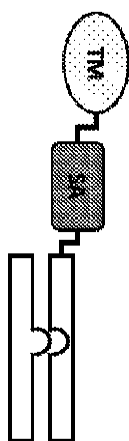
【図 1 3 E】

FIG. 13E



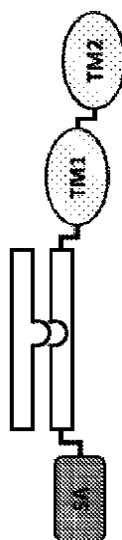
【図 1 3 F】

FIG. 13F



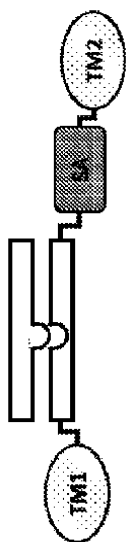
【図 1 4 A】

FIG. 14A



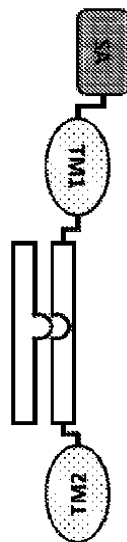
【図 1 4 B】

FIG. 14B



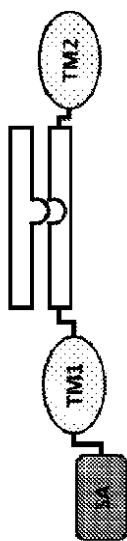
【図 1 4 C】

FIG. 14C



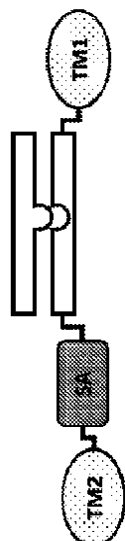
【図 1 4 D】

FIG. 14D



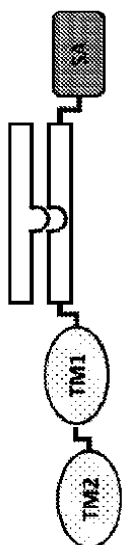
【図 1 4 E】

FIG. 14E



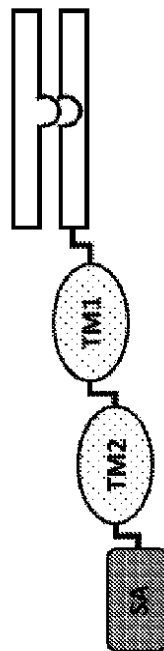
【図 1 4 F】

FIG. 14F



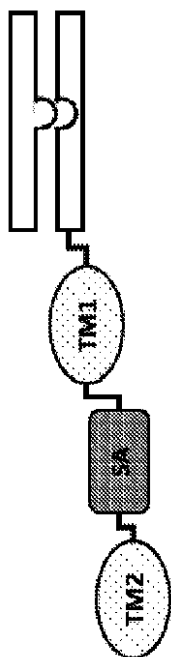
【図 1 4 G】

FIG. 14G



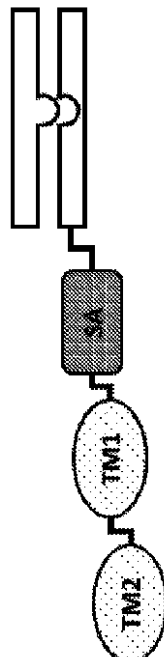
【図 1 4 H】

FIG. 14H



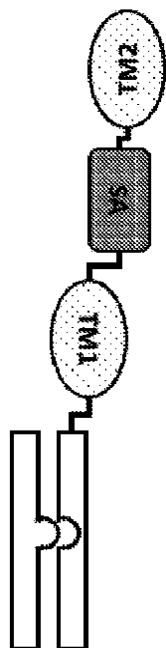
【図 1 4 I】

FIG. 14I



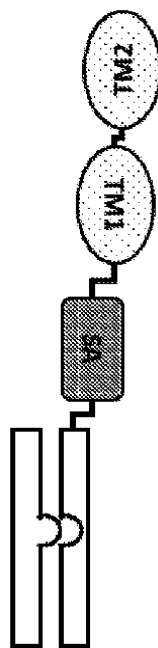
【図 1 4 J】

FIG. 14J



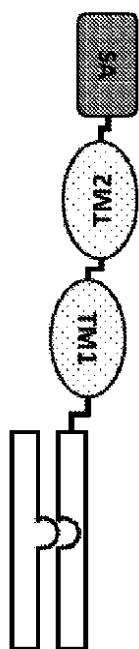
【図 1 4 K】

FIG. 14K



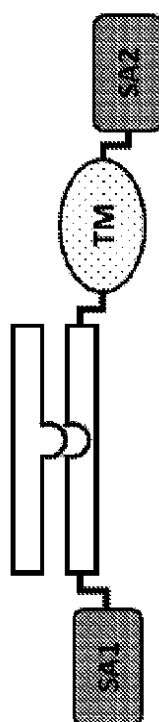
【図 1 4 L】

FIG. 14L



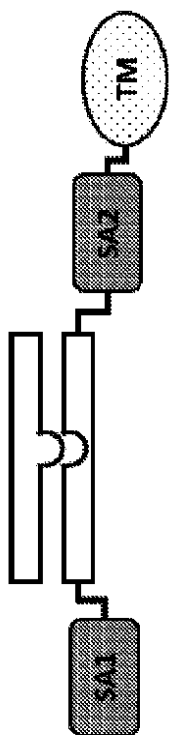
【図 1 5 A】

FIG. 15A



【図 1 5 B】

FIG. 15B



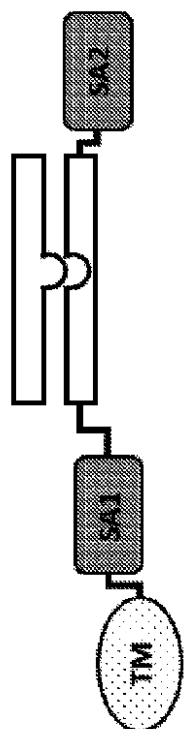
【図 1 5 C】

FIG. 15C



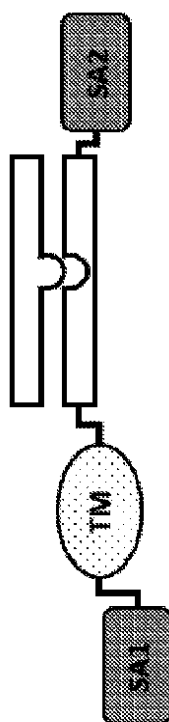
【図 1 5 D】

FIG. 15D



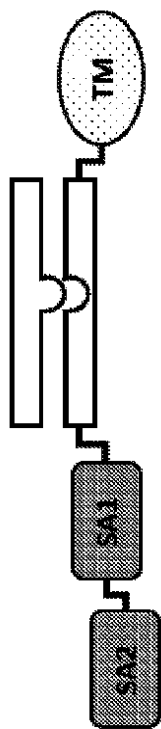
【図 1 5 E】

FIG. 15E



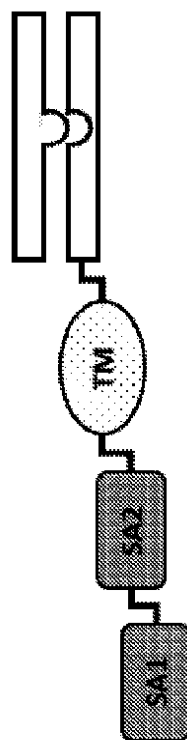
【図 15 F】

FIG. 15F



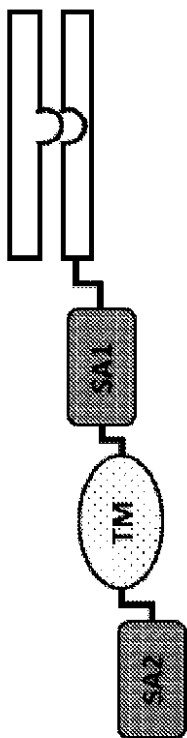
【図 15 G】

FIG. 15G



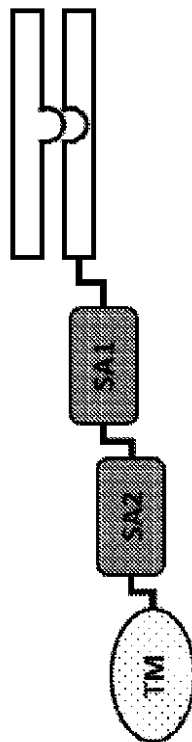
【図 15 H】

FIG. 15H



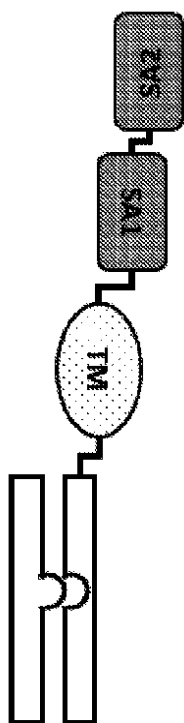
【図 15 I】

FIG. 15I



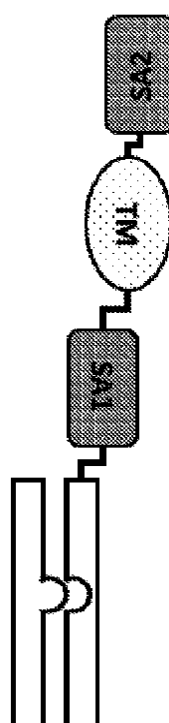
【図 15 J】

FIG. 15J



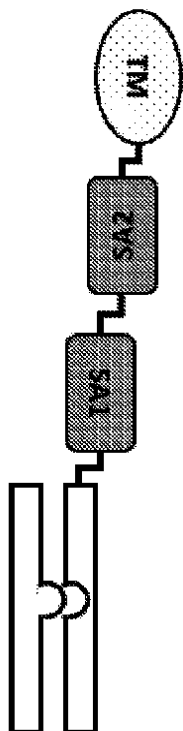
【図 15 K】

FIG. 15K



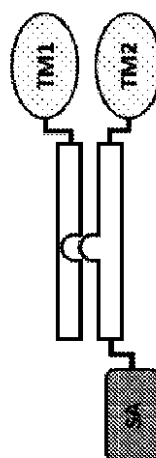
【図 15 L】

FIG. 15L



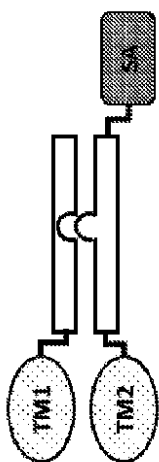
【図 16 A】

FIG. 16A



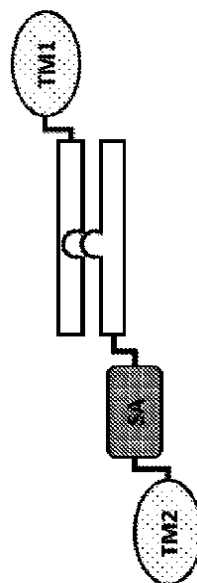
【図 1 6 B】

FIG. 16B



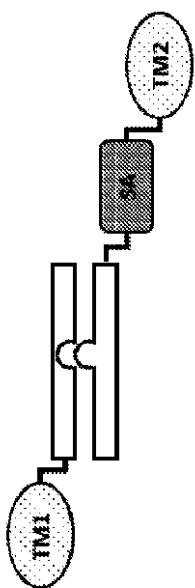
【図 1 6 C】

FIG. 16C



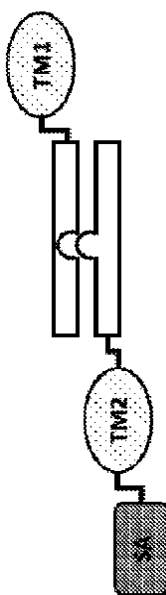
【図 1 6 D】

FIG. 16D



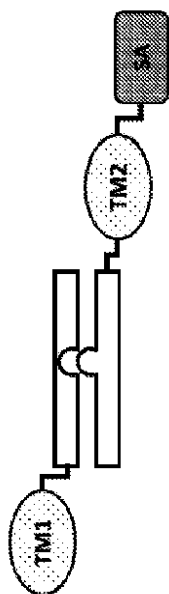
【図 1 6 E】

FIG. 16E



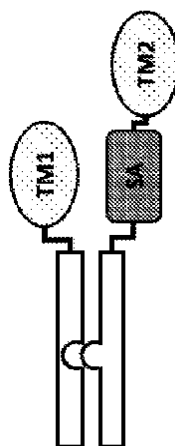
【図 1 6 F】

FIG. 16F



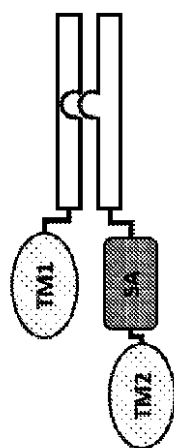
【図 1 6 G】

FIG. 16G



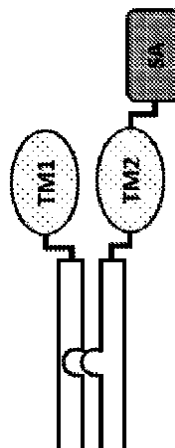
【図 1 6 H】

FIG. 16H



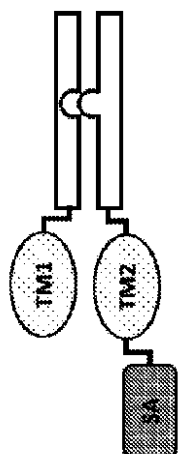
【図 1 6 I】

FIG. 16I



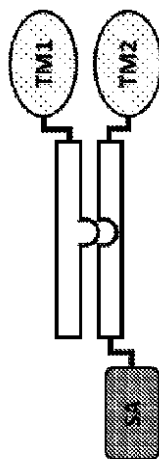
【図 16 J】

FIG. 16J



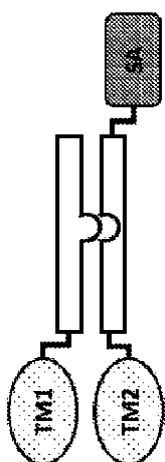
【図 17 A】

FIG. 17A



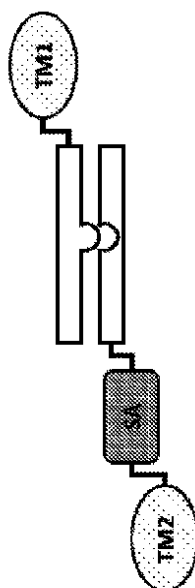
【図 17 B】

FIG. 17B



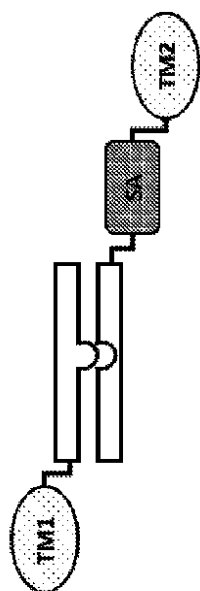
【図 17 C】

FIG. 17C



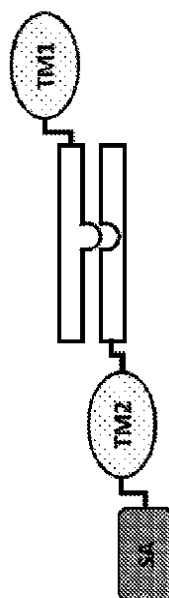
【図 17 D】

FIG. 17D



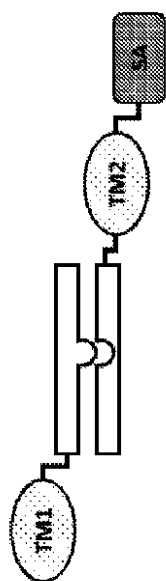
【図 17 E】

FIG. 17E



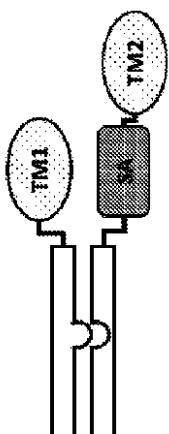
【図 17 F】

FIG. 17F



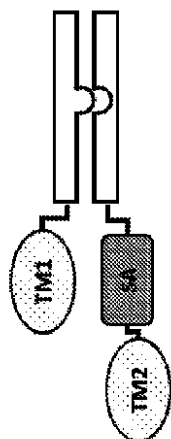
【図 17 G】

FIG. 17G



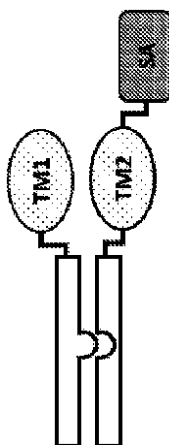
【図 17 H】

FIG. 17H



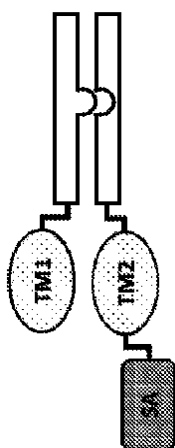
【図 17 I】

FIG. 17I



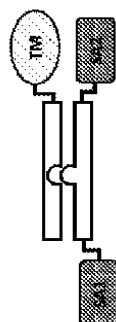
【図 17 J】

FIG. 17J



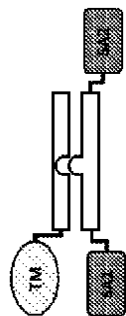
【図 18 A】

FIG. 18A



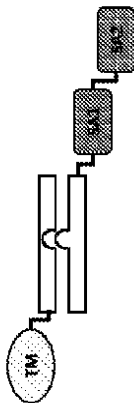
【図 18 B】

FIG. 18B



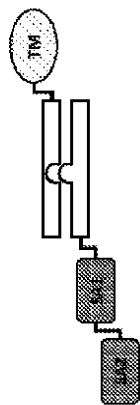
【図 18 C】

FIG. 18C



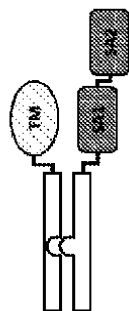
【図 18 D】

FIG. 18D



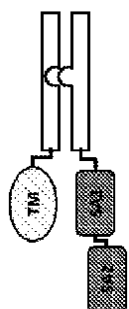
【図 18 E】

FIG. 18E



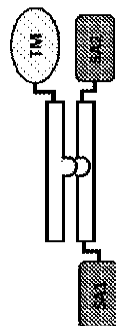
【図 18 F】

FIG. 18F



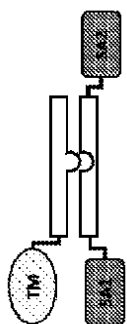
【図 19 A】

FIG. 19A



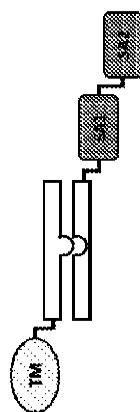
【図 19 B】

FIG. 19B



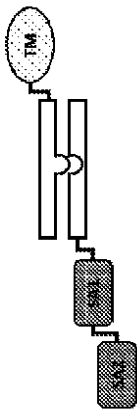
【図 19 C】

FIG. 19C



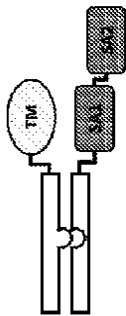
【図 19 D】

FIG. 19D



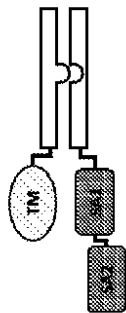
【図 19 E】

FIG. 19E



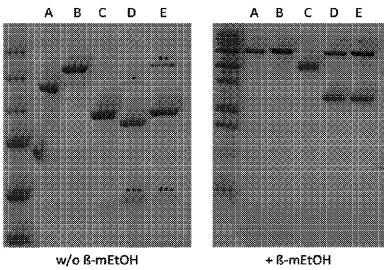
【図 19 F】

FIG. 19F

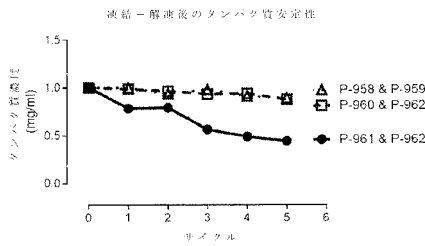


【図 2 1】

FIG. 21



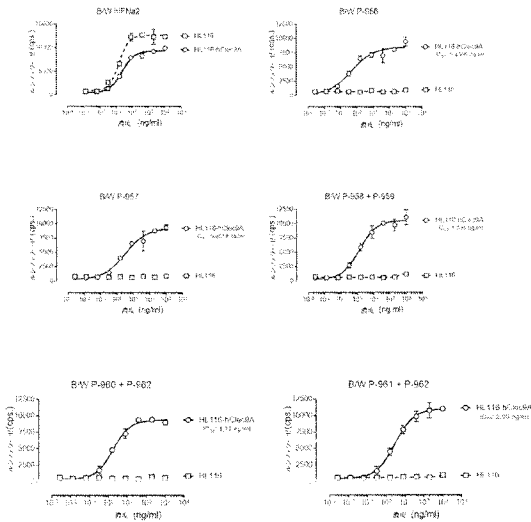
【図 2 2】



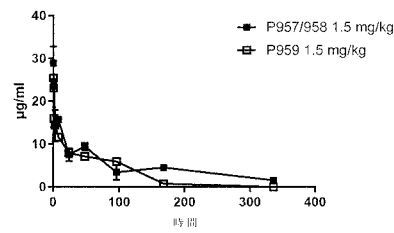
【図 2 0】

ホモダイマー		ヘテロダイマー	
MW 136.1 kDa (17.11 kDa/monomer)	MW 80.5 kDa (41.8 kDa)	MW 80.5 kDa (55.2 kDa)	MW 80.5 kDa (55.2 kDa)
Mr 63.5 or 57.5 kDa pI 6.66/5.40	Mr 63.5 or 57.5 kDa pI 6.66/5.40	Mr 54 or 130 kDa pI 6.13/7.20	Mr 54 or 130 kDa pI 6.13/7.20
P-956	P-957	P-958 + P-959	P-960 + P-962

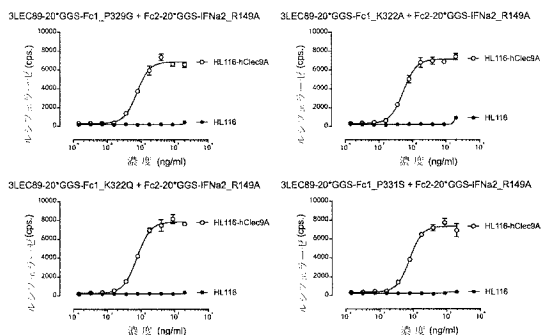
【図 2 3】



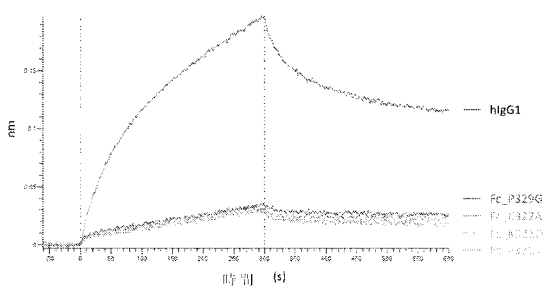
【図 2 4】



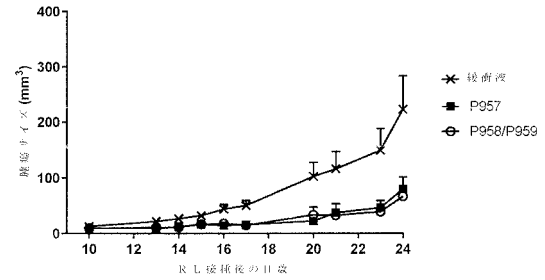
【図 2 7】



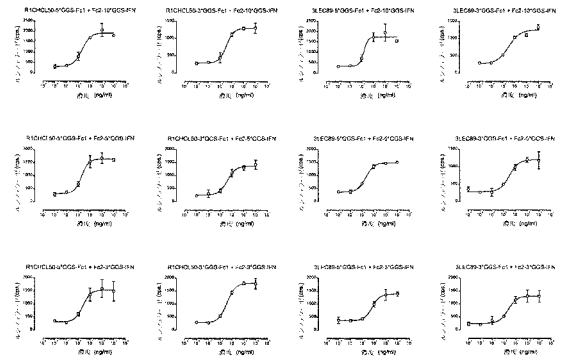
【図 2 8】



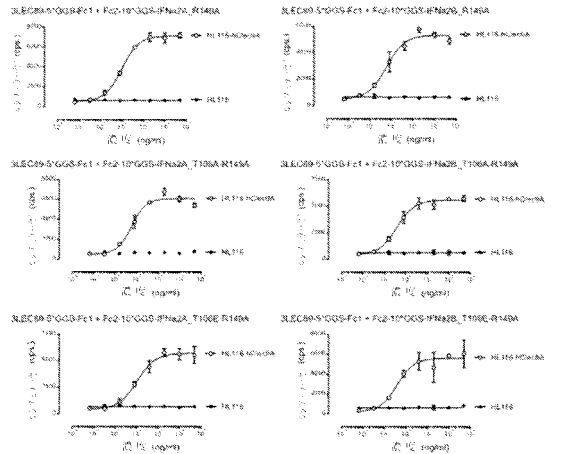
【図 2 5】



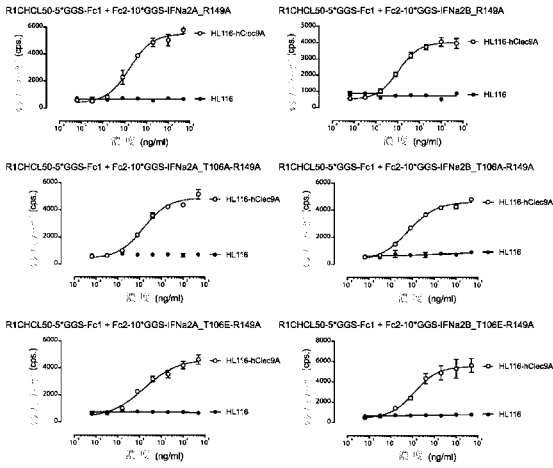
【図 2 6】



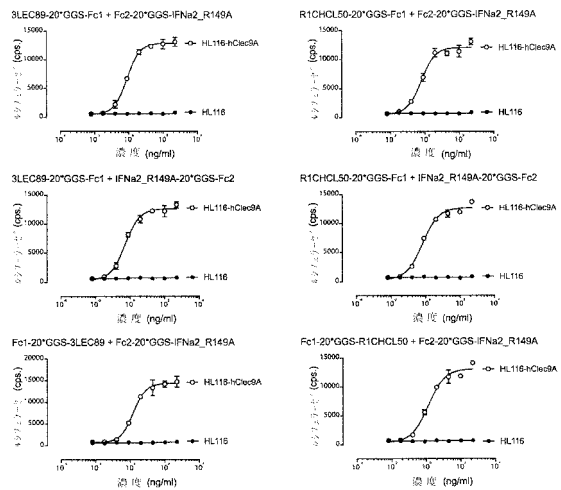
【図 2 9 - 1】



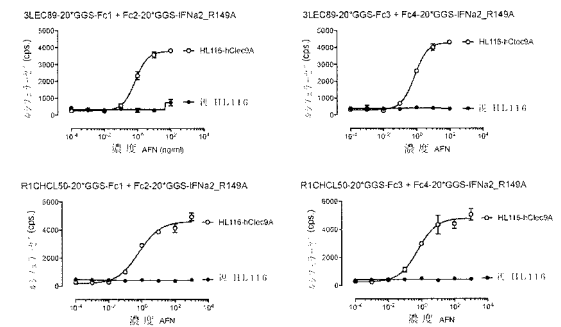
【図 29-2】



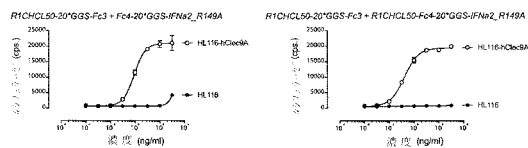
【図 30】



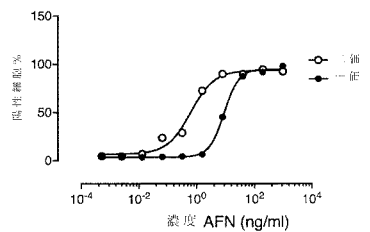
【図 31】



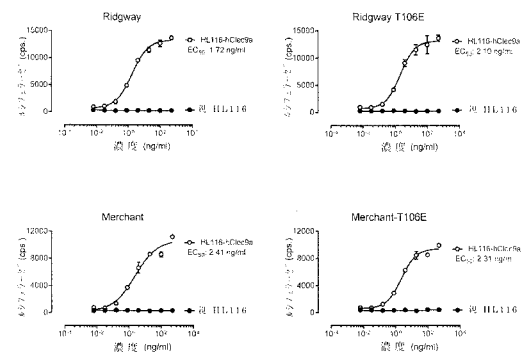
【図 32】



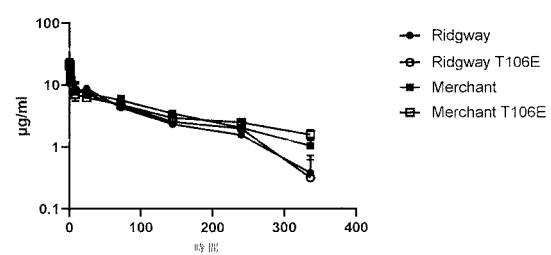
【図 33】



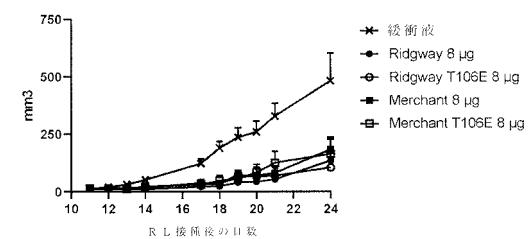
【図 34】



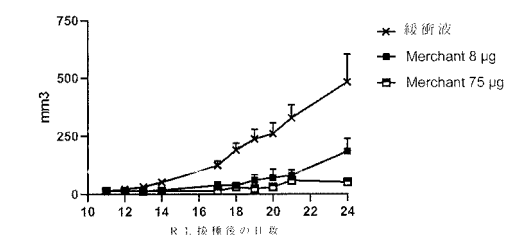
【図 35】



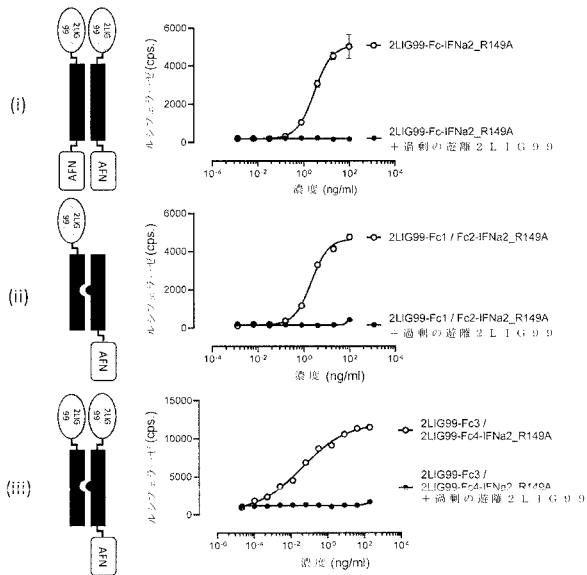
【図 36】



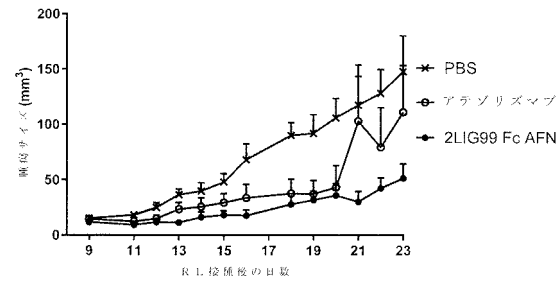
【図 37】



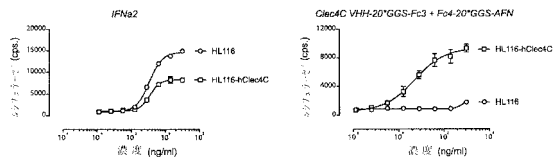
【図 38】



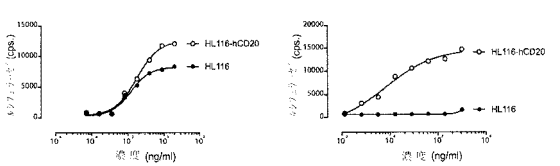
【図 39】



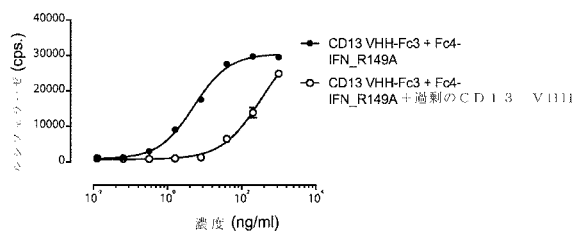
【図 40】



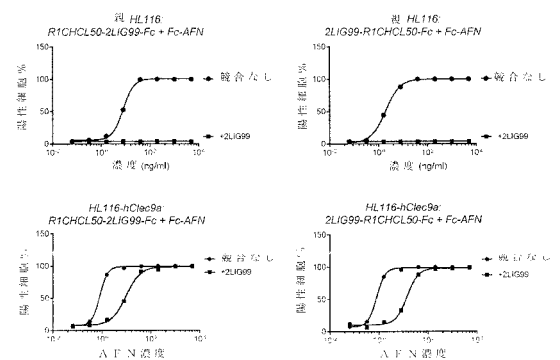
【図 41】



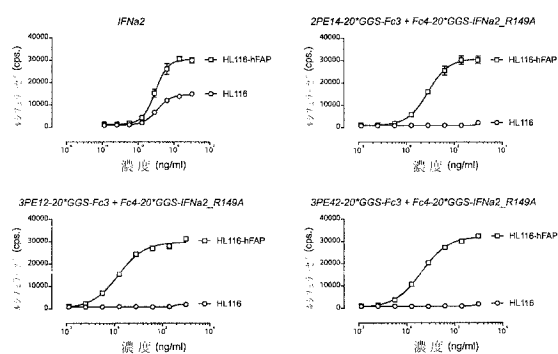
【図 42】



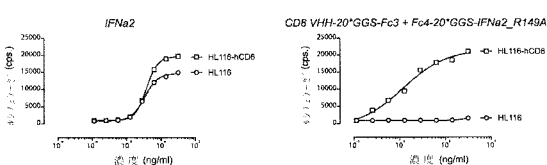
【図 45】



【図 43】

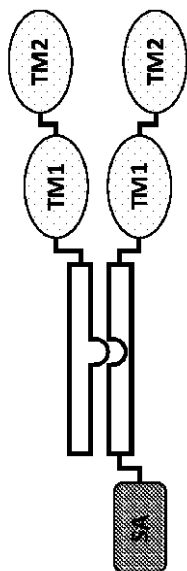


【図 44】



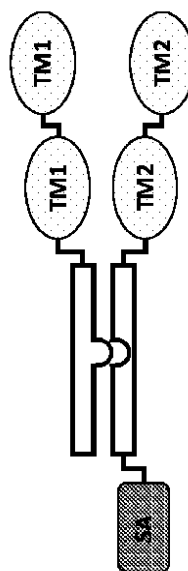
【図 4 6 A】

FIG. 46A



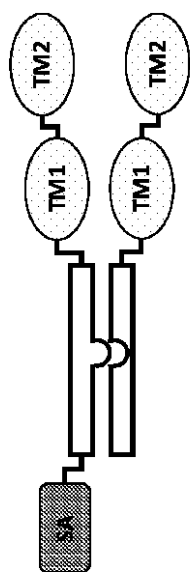
【図 4 6 B】

FIG. 46B



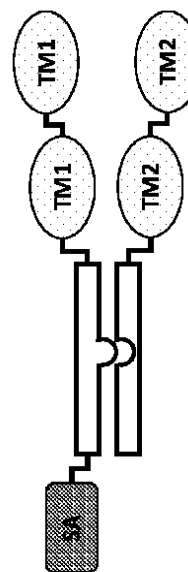
【図 4 6 C】

FIG. 46C

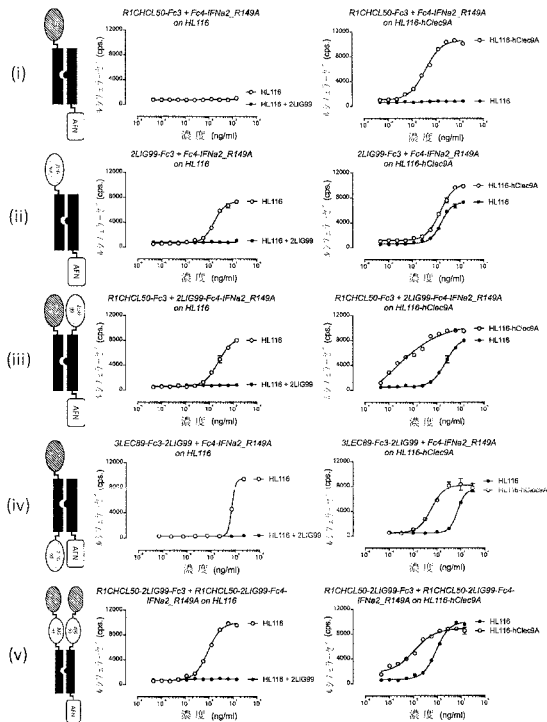


【図 4 6 D】

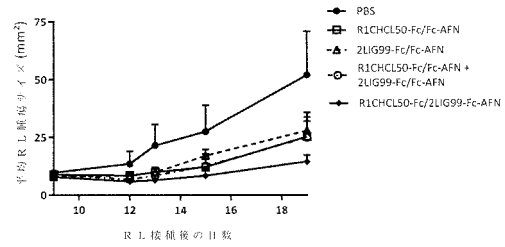
FIG. 46D



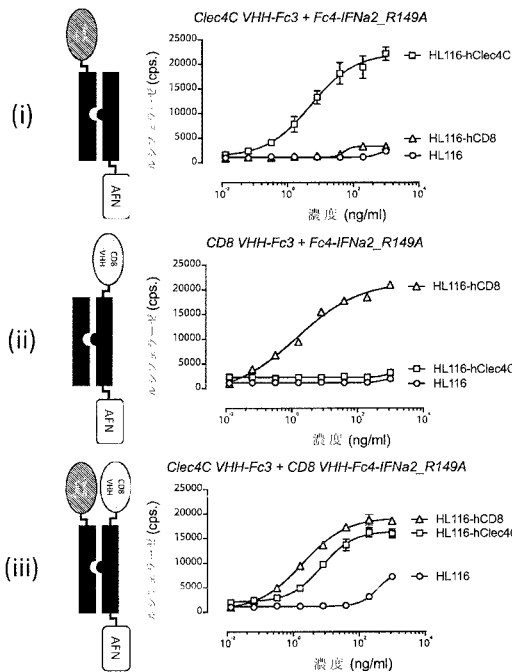
【図 47】



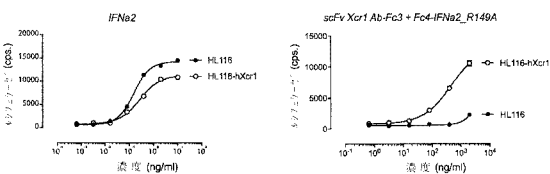
【図 48】



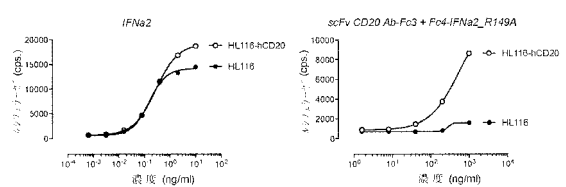
【図 49】



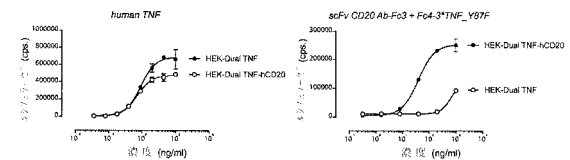
【図 50】



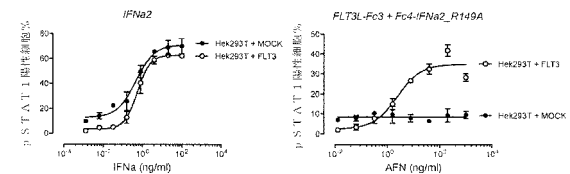
【図 51】



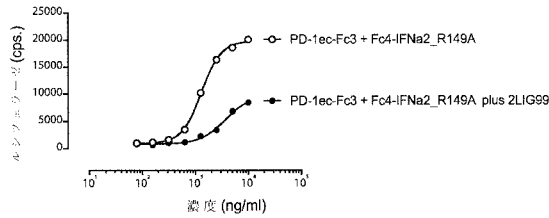
【図 52】



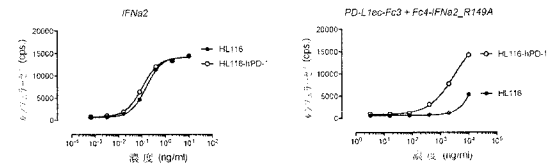
【図 53】



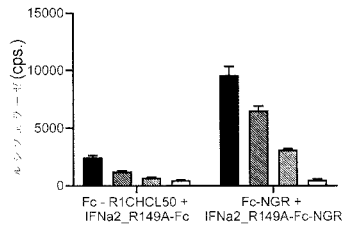
【図 5 4】



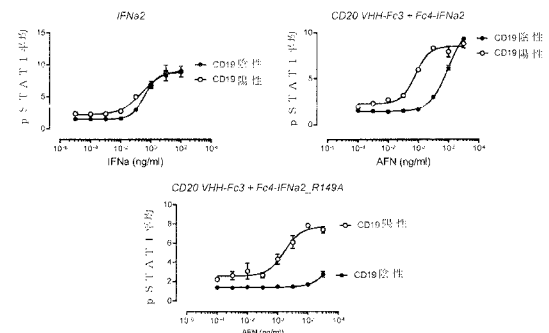
【図 5 5】



【図 5 6】



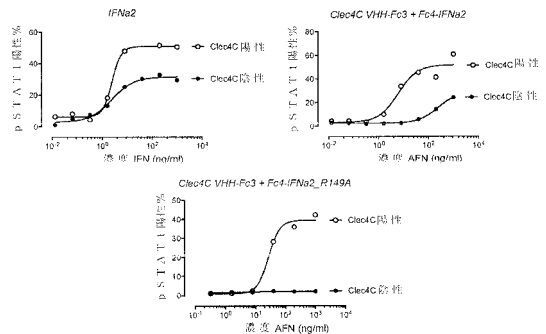
【図 5 9】



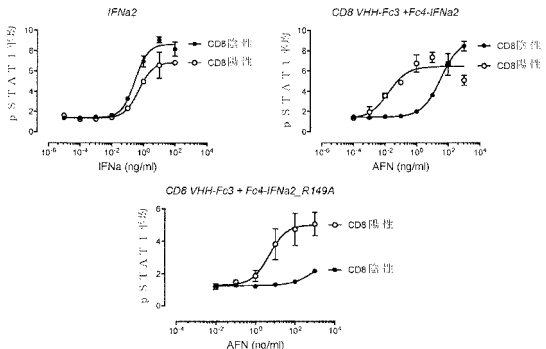
【図 6 0】

30-LKDRHDFGFP-//VVPAEIMRSESLSTNLQESLPSEK-165: 野生型 IFNa2
 30-...A...//...-165: P-1839: Fc4-hIFNa2_R33A
 30-...A...//...-165: P-1839: Fc4-hIFNa2_R34A
 30-...A...//...-165: P-1840: Fc4-hIFNa2_R144I
 30-...A...//...-165: P-1841: Fc4-hIFNa2_R144L
 30-...A...//...-165: P-1842: Fc4-hIFNa2_R144S
 30-...A...//...-165: P-1843: Fc4-hIFNa2_R144T
 30-...A...//...-165: P-1844: Fc4-hIFNa2_R144V
 30-...A...//...-165: P-1845: Fc4-hIFNa2_R145D
 30-...A...//...-165: P-1846: Fc4-hIFNa2_R145G
 30-...A...//...-165: P-1847: Fc4-hIFNa2_R145H
 30-...A...//...-165: P-1848: Fc4-hIFNa2_R145K
 30-...A...//...-165: P-1849: Fc4-hIFNa2_R145V
 30-...A...//...-165: P-1850: Fc4-hIFNa2_R146A
 30-...A...//...-165: P-1851: Fc4-hIFNa2_R146A
 30-...A...//...-165: P-1852: Fc4-hIFNa2_R146A
 30-...A...//...-165: P-1853: Fc4-hIFNa2_R146A

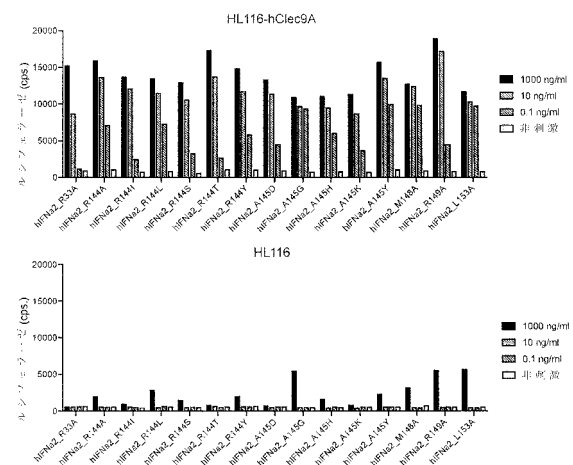
【図 5 7】



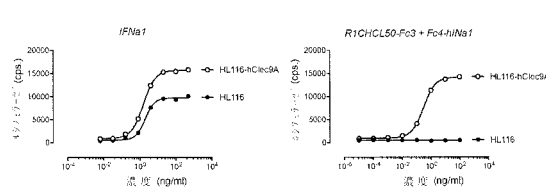
【図 5 8】



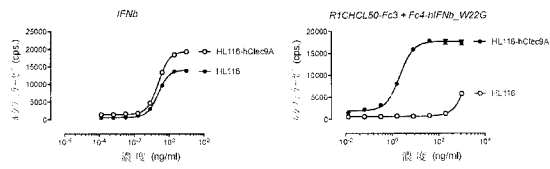
【図 6 1】



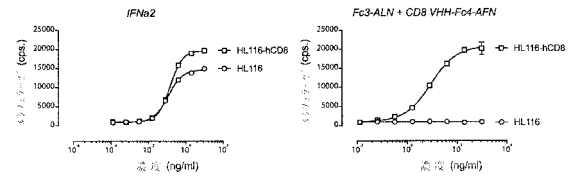
【図 6 2】



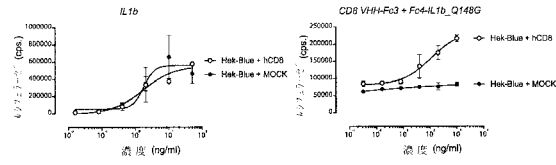
【図 6 3】



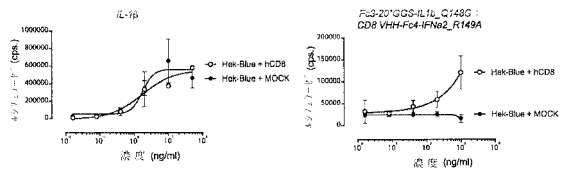
【図 6 6】



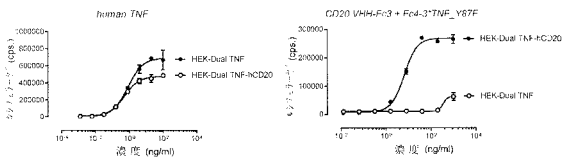
【図 6 4】



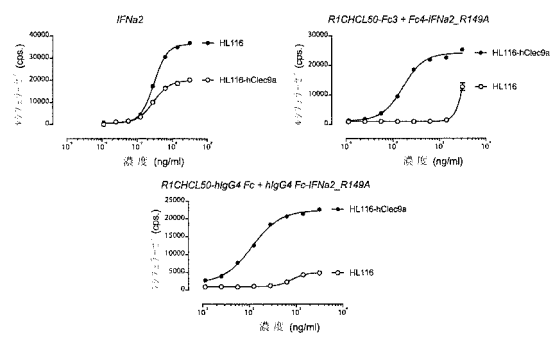
【図 6 7】



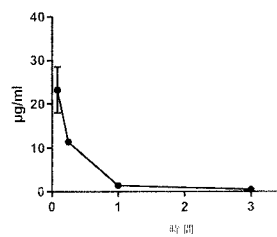
【図 6 5】



【図 6 8】



【図 6 9】



【手続補正書】

【提出日】 令和2年12月1日 (2020.12.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 配列表

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【配列表】

2021519089000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/24714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 38/17, 39/395; C07K 16/46 (2019.01) CPC - A61K 38/17, 39/395; C07K 16/46		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2017/077382 A1 (ORIONIS BIOSCIENCES NV, et al.) 11 May 2017; page 16, lines 15-24; page 32, lines 17-24; page 80, lines 30-31; page 84, line 26; page 86, line 32 – page 87, line 11; claim 1	1-2, 3/1-2, 5/3/1-2 4/3/1-2, 6/5/3/1-2, 66-67, 68/66-67, 69/67/66-67, 70/68/66-67, 71/70/68/66-67, 126-127, 128/126-127, 129/128/126-127, 130/128/126-127, 131/130/128/126-127
Y	WO 2013/012733 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 24 January 2013; page 2, 4th paragraph; page 4, 3rd-4th paragraphs; page 6, 5th paragraph; page 11, 2nd paragraph; page 15, 2nd-3rd paragraphs; page 28, 3rd paragraph; page 158, 1st paragraph – page 159, 4th paragraph; Figure 1; claims 77-78	4/3/1-2, 6/5/3/1-2, 66-67, 68/66-67, 69/67/66-67, 70/68/66-67, 71/70/68/66-67, 126-127, 128/126-127, 129/128/126-127, 130/128/126-127, 131/130/128/126-127
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 May 2019 (23.05.2019)		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2019
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/24714

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0294821 A1 (DUMONT, JA et al.) 2 October 2014; entire document	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 5/3/1-2, 6/5/3/1-2, 66-67, 68/66-67, 69/67/66-67, 70/68/66-67, 71/70/68/66-67, 126-127, 128/126-127, 129/128/126-127, 130/128/126-127, 131/130/128/126-127
P, X	US 2019/0048062 A1 (BRACCO SUISSE SA) 14 February 2019; entire document	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 5/3/1-2, 6/5/3/1-2, 66-67, 68/66-67, 69/67/66-67, 70/68/66-67, 71/70/68/66-67, 126-127, 128/126-127, 129/128/126-127, 130/128/126-127, 131/130/128/126-127

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/24714

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-65, 72-125, 132-197
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 C
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	5/14
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/16
			A 6 1 P	7/06
			A 6 1 P	29/00 1 0 1
			A 6 1 P	19/02
			A 6 1 P	21/04

(31)優先権主張番号 62/649,248

(32)優先日 平成30年3月28日(2018.3.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

- (72)発明者 クレイ, ニコライ
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02466, ニュートン, 275 グローブ ストリート
, オリオニス バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド内
- (72)発明者 デプラ, エリク
ベルギー国, ビー9052 ズウェイナールデ, リジュヴィッシェストラート 120
- (72)発明者 ザビュ, レンナート
ベルギー国, ビー9000 ヘント, デンデルモンゼスティーンウェグ 48 ビー501
- (72)発明者 タヴェルニエル, ジャン
ベルギー国, ビー9860 バエーゲム, ボッテルウェグ 2

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC07 CC27 EE41 EE59

4C084 AA17 BA44 DA12 DA21 DA25 MA05 NA06 NA13 ZA011 ZA012
ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA081 ZA082 ZA341 ZA342 ZA361 ZA362
ZA511 ZA512 ZA551 ZA552 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812
ZA891 ZA892 ZA941 ZA942 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112
ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZC061 ZC062 ZC211 ZC212 ZC351 ZC352
4C085 AA14 AA21 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB42
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74