

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7655896号

(P7655896)

(45)発行日 令和7年4月2日(2025.4.2)

(24)登録日 令和7年3月25日(2025.3.25)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 23 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-506483(P2022-506483)

(86)(22)出願日 令和2年7月31日(2020.7.31)

(65)公表番号 特表2022-542450(P2022-542450
A)

(43)公表日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(86)国際出願番号 PCT/CN2020/106309

(87)国際公開番号 WO2021/023117

(87)国際公開日 令和3年2月11日(2021.2.11)

審査請求日 令和5年7月20日(2023.7.20)

(31)優先権主張番号 201910711122.4

(32)優先日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(31)優先権主張番号 201911224135.5

(32)優先日 令和1年12月2日(2019.12.2)

最終頁に続く

(73)特許権者 519063037

康方▲薬▼▲業▼有限公司

AKESO PHARMACEUTIC
ALS, INC.

中華人民共和国, コアントン 5 1 0 7

9 9, コアンチョウ, ホアンブー, カン

ヤオ ロード サウス 1 5 8

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗C T L A 4／抗P D－1二重特異性抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

P D－1を標的化する第1のタンパク質機能性領域、及び

C T L A 4を標的化する第2のタンパク質機能性領域を含む二重特異性抗体であって、
前記第1のタンパク質機能性領域が免疫グロブリンであり、且つ前記第2のタンパク質
機能性領域が単鎖抗体であり；

前記免疫グロブリンの重鎖のアミノ酸配列が配列番号40に記載され、且つ前記免疫グ
ロブリンの軽鎖のアミノ酸配列が配列番号24に記載され；

前記単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号43に記載され、且つ前記単鎖
抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号44に記載され；

前記第1のタンパク質機能性領域が、第1のリンカー断片を介して前記第2のタンパク
質機能性領域に連結されており、且つ前記単鎖抗体の前記重鎖可変領域が、第2のリンカ
ー断片を介して前記単鎖抗体の前記軽鎖可変領域に連結されており、ここで前記第1のリン
カー断片及び前記第2のリンカー断片は同一又は異なるものであり；且つ、

前記単鎖抗体が前記免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている、二重特異性抗体。

【請求項2】

前記第1のリンカー断片及び前記第2のリンカー断片のアミノ酸配列が配列番号25及
び配列番号26から独立して選択される、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項3】

前記第1のリンカー断片及び前記第2のリンカー断片のアミノ酸配列が配列番号26に

記載される、請求項 1 又は 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の単離された核酸分子又は請求項 5 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体及びコンジュゲート化された部分を含む、コンジュゲートであって、前記コンジュゲート化された部分が、検出可能な標識である、コンジュゲート。

10

【請求項 8】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体又は請求項 7 に記載のコンジュゲートを含む、キットであって、

前記キットが、前記二重特異性抗体又はその抗原結合性断片を特異的に認識することができる第 2 の抗体を更に含む；かつ前記第 2 の抗体が、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色物質、又は酵素を更に含む、キット。

【請求項 9】

試料中の PD-1 及び／又は CTLA-4 の存在又はレベルを検出するためのキットの調製における、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体又は請求項 7 に記載のコンジュゲートの使用。

20

【請求項 10】

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体又は請求項 7 に記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物であって、任意選択的に、前記医薬組成物が、薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤を更に含む、医薬組成物。

【請求項 11】

1 つ又は複数の抗腫瘍化学療法剤を更に含む、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記 1 つ又は複数の抗腫瘍化学療法剤はチロシンキナーゼ阻害剤である、請求項 11 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 13】

前記チロシンキナーゼ阻害剤は、アンロチニブ若しくはその薬学的に許容される塩、又はレンバチニブ若しくはその薬学的に許容される塩である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記医薬組成物の単位用量が、前記二重特異性抗体の質量に基づいて、100～1000mg、200～800mg、200～500mg、300～600mg、400～500mg、又は450mgである、請求項 10～13 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

別々のパッケージ中に第 1 の製品及び第 2 の製品を含む、組合せ製品であって、前記第 1 の製品が、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項 8 に記載のコンジュゲート、又は請求項 10～14 のいずれかに記載の医薬組成物を含み；前記第 2 の製品が 1 つ又は複数の抗腫瘍化学療法剤を含む、組合せ製品。

40

【請求項 16】

前記第 1 の製品の単位用量が、前記二重特異性抗体の質量に基づいて、100～1000mg、200～800mg、200～500mg、300～600mg、400～500mg、又は450mgである、請求項 15 に記載の組合せ製品。

【請求項 17】

50

前記第2の製品の単位用量が、活性成分の質量に基づいて、0.1～100mg、0.5～50mg、1～20mg、2～15mg、4～12mg、又は8～12mgである、請求項15又は16に記載の組合せ製品。

【請求項18】

腫瘍若しくは貧血を治療及び／若しくは予防するための医薬の調製、又は腫瘍若しくは貧血を診断するための医薬の調製における、請求項1～3のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項7に記載のコンジュゲート、請求項10～14のいずれかに記載の医薬組成物、又は請求項15～17のいずれかに記載の組合せ製品の使用。

【請求項19】

PD-1へのPD-1の結合を遮断するための医薬；
PD-1の活性若しくはレベルを下方調節するための医薬；
生物においてPD-1の免疫抑制を緩和するための医薬；若しくは
Tリンパ球においてIFN-γ及び／若しくはIL-2の発現を上昇させるための医薬；
並びに／又は
B7へのCTLA4の結合を遮断するための医薬；
CTLA4の活性若しくはレベルを下方調節するための医薬；
生物においてCTLA4の免疫抑制を緩和するための医薬；若しくは
Tリンパ球においてIL-2の発現を上昇させるための医薬；
の調製における、請求項1～3のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項7に記載のコンジュゲート、請求項10～14のいずれかに記載の医薬組成物、又は請求項15～17のいずれかに記載の組合せ製品の使用。

【請求項20】

腫瘍若しくは貧血の治療及び／若しくは予防における使用のため、又は腫瘍若しくは貧血の診断における使用のための、請求項1～3のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項7に記載のコンジュゲート、請求項10～14のいずれかに記載の医薬組成物又は請求項15～17のいずれかに記載の組合せ製品。

【請求項21】

前記二重特異性抗体、前記コンジュゲート、前記医薬組成物又は前記組合せ製品は、外科治療の前若しくは後及び／又は放射線療法の前若しくは後の投与のためのものである、請求項20に記載の使用のための、請求項1～3のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項7に記載のコンジュゲート、請求項10～14のいずれかに記載の医薬組成物又は請求項15～17のいずれかに記載の組合せ製品。

【請求項22】

前記二重特異性抗体の単位用量が、体重1kg当たり0.1～100mgである、請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記二重特異性抗体、前記コンジュゲート、前記医薬組成物又は前記組合せ製品は、2又は3週のサイクルで行われる投与のためのものである、請求項20に記載の使用のための、請求項1～3のいずれかに記載の二重特異性抗体、請求項7に記載のコンジュゲート、請求項10～14のいずれかに記載の医薬組成物又は請求項15～17のいずれかに記載の組合せ製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍の治療及び分子免疫学の分野に関し、特には、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体及びその使用に関する。より特には、本発明は突然変異体抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

膜貫通型受容体PD-1（プログラム細胞死タンパク質1）はCD28ファミリーのメ

10

20

30

40

50

ンバーであり、活性化されたT細胞、B細胞及び骨髄細胞において発現される。PD-1の両方のリガンド、PDL1（プログラム細胞死1リガンド1、又はPDL-1）及びPDL2（プログラム細胞死1リガンド2、又はPDL-2）はB7スーパーファミリーのメンバーである。PDL1は、T細胞、B細胞、内皮細胞及び上皮細胞を含めて様々な細胞において発現され、PDL2は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞及びマクロファージにおいてのみ発現される。

【0003】

PD-1/PDL1シグナル伝達経路は、免疫寛容の調節、微小生物感染及び腫瘍免疫回避において重要な役割を果たす。PD-1は、免疫細胞、例えばT細胞において主に発現され、PD-1のリガンドPDL1は複数のヒト腫瘍組織において高発現される。PD-1/PDL1シグナル伝達経路の遮断は、阻害されたT細胞を活性化させて、そのため該T細胞ががん細胞を攻撃し得る。PD-1/PDL1シグナル伝達の遮断は、腫瘍抗原特異的T細胞の増殖を促進し、腫瘍細胞殺傷プロセスを活性化させ、更に局所的な腫瘍成長を阻害することができる（Julie R et al., 2012, N Engl J Med., 366:2455-2465）。追加的に、高いPDL1発現を有する腫瘍は、検出が困難ながんと関連付けられる（Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:3360-5）。有効な方法は、抗PD-1抗体を投与してPD-1の発現をモジュレートすることである。PD-1抗体の広い抗腫瘍の有望性及び驚くべき有効性に起因して、PD-1経路を標的化する抗体は様々な腫瘍、例えば、非小細胞肺癌、腎細胞癌、卵巣がん、黒色腫（Homet M. B., Parisi G., et al., 2015, Semin Oncol., 42(3):466-473）、白血病及び貧血（Held S A, Heine A, et al., 2013, Curr Cancer Drug Targets., 13(7):768-74）の治療においてブレイクスルーをもたらすであろうことが産業において広く認められている。

【0004】

細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA4）及びCD28分子は、遺伝子の構造、染色体上の位置、配列相同性及び遺伝子発現の局面において非常に類似している。両方の分子は共刺激分子B7の受容体であり、活性化されたT細胞の表面上に主に発現される。B7へのCTLA4の結合は、マウス及びヒトT細胞の活性化を阻害し、T細胞活性化において負の調節的役割を果たす。

【0005】

CTLA4抗体（若しくは抗CTLA4モノクローナル抗体）又はCTLA4リガンドは、CTLA4がその天然のリガンドに結合することを予防し、それによりT細胞へのCTLA4による負の調節シグナルの伝達を遮断し、且つ様々な抗原に対するT細胞の反応性を増強することができる。これに関して、インビボ及びインビトロの研究は本質的に一貫している。現在、臨床試験中の、又は前立腺がん、膀胱がん、結腸直腸がん、胃腸がん、肝臓がん、悪性黒色腫等を治療するために承認されたCTLA4モノクローナル抗体がある（Grosso JF., Jure-Kunkel MN., 2013, Cancer Immun., 13:5）。

【0006】

インターロイキン2（IL-2）はT細胞により産生される。それは、T細胞亜群を調節する増殖因子であり、免疫応答の調節において重要な因子である。それは活性化B細胞の増殖を促進し、抗体応答、造血及び腫瘍サーベイランスに参加する。組換えヒトIL-2は、黒色腫、腎臓がん等を含めて、悪性腫瘍を治療するために米国FDAにより承認されており、慢性ウイルス感染症を治療するための臨床研究が現在進行中である（Chavez, A.R., et al., 2009, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1182:p.14-27）。CTLA4及びCTLA4抗体はT細胞機能の重要な影響因子であり、身体中の免疫微環境に干渉する。CTLA4抗体は、CTLA4の免疫抑制を特異的に緩和し、T細胞を活性化させ、且つIL-2生成を誘導し、疾患、例えば腫瘍及び寄生生物感染症に対する遺伝子療法における広い応用において有望であることをインビトロ及びインビボ研究は実証した。

【0007】

CTLA4抗体は、疾患に対する特有の治療効果及び顕著な有効性を生じさせることができ、伝統的な薬を補うため及び遺伝子療法の新たな手段を探索するために使用され得る。

【0008】

二重特異性抗体は二機能性抗体としても公知であり、これは2つの異なる抗原を同時に標的化する特有の薬物であり、免疫磁気分離により製造され得る。代替的に、それらは遺伝子操作により得られ得る。遺伝子操作は、結合部位最適化、合形成態、収率及び同種のものの局面において柔軟性を有し、そのためある特定の利点を有する。現在、45を上回る形態が実証されている (Dafne Muller, Kontermann R E., 2010, BioDrugs, 24(2):89-98)。多数の開発された二重特異性抗体は、IgG-s c F vの形態、即ち、Morrisonフォーマット (Coloma MJ, Morrison SL., 1997, Nat Biotechnol., 15:159-163) であり、これは、天然に存在するIgG形態に対するその類似性並びに抗体操作、発現及び精製における利点のために二重特異性抗体のための理想的な形態の1つであることが実証されている (Miller BR, Demarest SJ, et al., 2010, Protein Eng Des Sel, 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A., 2011, MAbs, 3:299-309)。

10

【0009】

ADCC (抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性) は、ウイルス感染細胞又は腫瘍細胞のエピトープへの抗体のFab断片の結合及びキラー細胞の表面上のFc受容体 (FcR) への抗体のFc断片の結合により媒介されるキラー細胞 (NK細胞、マクロファージ等) による標的細胞の殺傷を指す。

【0010】

CDC (補体依存性細胞傷害性) は、細胞膜表面上の対応する抗原への抗体の特異的結合により複合体が形成されて補体システムを活性化させ、それが標的細胞の表面上にMACを更に形成させて、その後の標的細胞溶解を結果としてもたらすことを指す。補体は、様々な細菌及び他の病原性生物の溶解を引き起こすことがあり、病原性生物の感染に対する重要な防御機構である。

20

【0011】

Fc受容体は、特有の免疫細胞の表面上に発現されて抗体Fc領域を認識し、免疫応答を媒介する、免疫グロブリンファミリーに属する。Fab領域が抗原を認識した後に、抗体のFc領域は免疫細胞 (例えば、キラー細胞) 上のFc受容体に結合して、免疫細胞の応答機能、例えば貪食及びADCCを開始させる。

【0012】

Fc受容体により認識される抗体の種類及び発現細胞の種類にしたがって、Fc受容体は主に3つのタイプ、FcγR、FcαR及びFcεRに分類される。FcγRは4つのサブタイプ、FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)、FcγRIII (CD16) 及びFcRn (新生児Fc受容体) に更に分類され得る。これらの中で、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIはADCC効果と密接に関連付けられる。FcγRIIIは、ADCCを媒介する最も優勢な分子であり、異なる細胞種中に2つの高度に相同的なサブタイプ、FcγRIIIa及びFcγRIIIbを有する。FcγRIIIa集団中に、単一ヌクレオチド多型 (SNP) の部位により区別される2つのサブタイプ、高い親和性を有するFcγRIIIa_V158及び低い親和性を有するFcγRIIIa_F158が存在する。FcγRIは、IgGのFc領域に対してより高い親和性を有し、且つADCCプロセスに参加し；FcγRIIは3つのサブタイプ、FcγRIIa、FcγRIIb及びFcγRIIc (それぞれCD32a、CD32b及びCD32cとも称される) を含み、これらの中でFcγRIIaはADCC活性を有し；FcγRIIaについて、単一ヌクレオチド突然変異に起因して2つのサブタイプ、FcγRIIa_H131及びFcγRIIa_R131がヒトにおいて存在し；FcγRIIbは阻害受容体であり、且つ近くのITAM経路を阻害する典型的な阻害性FcγRである。例えば、BCRへの免疫複合体の結合後に、Fc断片は同じ細胞上のFcγRIIbに結合して、B細胞活性化を負に調節し、抗体及びサイトカインの分泌を減少させる (Hogarth PM, Pietersz GA., 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331)。

30

40

【0013】

IgGファミリーは4つのメンバー、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含

50

み、これらは重鎖定常領域の結晶化可能断片（Fc）領域中のアミノ酸において異なり、FcγRに対するそれらの異なる親和性を結果としてもたらす。IgG1は、ヒトにおいて最も豊富に存在するサブタイプであり、そしてまた、モノクローナル抗体医薬品において使用される最も一般的なサブタイプである。IgG1は、様々なFcγRに結合することができ、ADCC及びCDC効果を誘導することができる。IgG2は、FcγRに対して最も低い親和性を有するが、依然としてFcγRIIaへの結合により単球媒介性ADCCを誘導することができる。IgG3は、FcγRへの最も高い結合能力を特徴とし、ADCC及びIgG1よりも高いCDC効果を誘導することができる。IgG4分子は、FcγRI以外のFcγRに対する弱い結合性を実証し、CDC及びNK細胞媒介性ADCCを引き起こすより低い確率を有する。しかしながら、IgG4サブタイプの抗体は、FcγRIへの結合を通じてADCP効果を媒介することができ、免疫細胞を標的化する抗体療法において存在するADCP効果は、免疫細胞に対する損傷を引き起こして、薬理的な有害効果を招き得る。現在、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体が結合する免疫細胞に対する抗体媒介性ADCC、ADCP及び／又はCDC活性により引き起こされる損傷を低減させ又は排除するため、並びに抗体療法の有効性を向上させるための新規の抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体を開発する必要性が依然として存在する。

【0014】

化学療法は現在、以下の9つのクラスに主に分類される（He Jie, et al., Clinical Oncology, Beijing, People's Medical Publishing House, 2016:230-237）。第1のクラスは、DNAに直接的に結合してDNA複製を予防する薬物であり、これには、様々なアルキル化剤、ミトマイシン、ブレオマイシン、ダカルバジン、白金ベースの薬物（例えば、シスプラチン及びカルボプラチン）、カンプトテシン、並びにこれらの誘導体が含まれる。第2のクラスは、腫瘍細胞の酵素系に主に影響してDNA及びRNAの前駆体の合成を遮断し、それによりDNA又はRNAの形成を阻害する、核酸合成を予防するための薬物であり、これには、メトトレキサート、フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ヒドロキシウレア及びシタラビンが含まれ；そのような薬物はS期の細胞に主に作用し、代謝拮抗化学療法剤及び細胞周期特異的抗がん薬である。第3のクラスは、薬物がDNA二重らせんに挿入されてDNA二重らせんと非共有結合を形成して、DNA依存性mRNAへのDNA上の遺伝情報の転写に干渉し、損なわれた鋳型機能及び邪魔された転写を引き起こす薬理的機構を通じて、転写に影響する化学療法剤である。第4のクラスは、チューブリン及び有糸分裂に影響するものであり、これには、ビンカルカロイド、ポドフィロトキシン及びタキサンが含まれる。第5のクラスは、リボソームの機能に影響してタンパク質合成を遮断する薬物であり；そのような薬物の代表はハリングトニンであり、これはタンパク質合成の開始を阻害し、リボソームを分解し且つ新たなペプチド鎖を放出させるが、リボソームへのmRNA及びtRNAの結合を遮断せず；そのような薬物は、核内DNA及び細胞質RNAの還元並びにポリソームの解重合を引き起こし、有糸分裂を阻害する。第6のクラスは、腫瘍細胞の膜に影響する薬物、例えばコンカナバリン（Con-A）及びフィトヘマグルチニン（PHA）であり；それらは、細胞膜上の糖タンパク質受容体に結合し、それにより、腫瘍細胞中でのDNA合成に影響して腫瘍細胞が分裂することを予防することができる。第7のクラスは、アポトーシスを誘導する薬物、例えば三酸化ヒ素である。第8のクラスは、内分泌系を調節することにより腫瘍を治療するホルモンであり、これには、エストロゲン、抗エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、コルチコステロイド、並びに抗コルチコステロイド（ジクロロジェニルジクロロエタン及びアミノグルテチミドを含む）が含まれる。第9のクラスは抗がん標的化療法であり、これには、モノクローナル抗体、上皮増殖因子シグナル伝達阻害剤（例えば、受容体チロシンキナーゼ経路に対する標的化薬物）、ユビキチン-プロテアソーム阻害剤、及び血管新生阻害剤が含まれる。

【0015】

アンロチニブはキノリン誘導体チロシンキナーゼ阻害剤である。多標的チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）として、それは腫瘍血管新生及び増殖シグナル伝達に影響する。主要

10

20

30

40

50

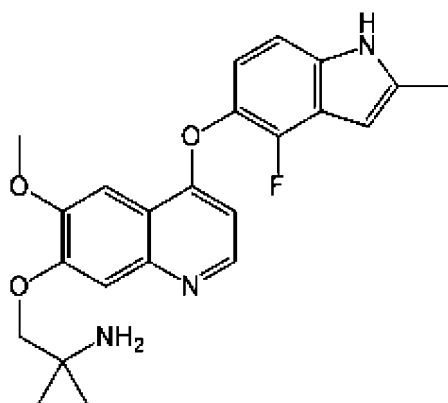
な標的としては、受容体チロシンキナーゼ血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）1～3、上皮増殖因子受容体（EGFR）、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）1～4、血小板由来増殖因子受容体（PDGFR） α 及び β 、並びに幹細胞因子受容体（SCFR）7、8及び9が挙げられる。フェーズ2試験は、アンロチニブは全生存のための潜在的な利益と共に無増悪生存期間を向上させることを示した（Han B, et al., Br J Cancer, 2018; 118(5):654-661）。多施設二重盲検無作為化フェーズ3臨床試験は、アンロチニブは中国人患者において延長された且つ無増悪性の生存を結果としてもたらすことを示した。該発見は、アンロチニブは忍容性良好であり、進行したNSCLCを有する患者のための潜在的なサードライン又は更なる治療であることを示唆した（Han B, et al., JAMA Oncol., 2018 Nov.; 4(11):1569-1575）。

10

【0016】

特許文献国際公開第2008112407号パンフレットの実施例24は、キノリン由来チロシンキナーゼ阻害剤1-[[[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イル)オキシ-6-メトキシキノリン-7-イル]オキシ]メチル]シクロプロピルアミン及びその調製方法を開示する。キノリン由来チロシンキナーゼ阻害剤の構造式は式Iに示される。塩酸アンロチニブは式Iの化合物の塩酸塩である。

【化1】



式 I

20

30

エーザイ（日本）により開発された経口用の複数のチロシンキナーゼ阻害剤であるレンバチニブは、VEGFR1（FLT1）、VEGFR2（KDR）及びVEGFR3（FLT4）のキナーゼ活性を阻害する多標的受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。通常の細胞機能に加えて、レンバチニブはまた、線維芽細胞増殖因子（FGF）受容体FGFR1、FGFR2、FGFR3及びFGFR4、「rearranged during transfection」（RET）受容体、KIT並びに血小板由来増殖因子受容体 α （PDGFR α ）を含めて、病理性血管新生、腫瘍成長及びがんの進行に関与する他の受容体チロシンキナーゼを阻害する。レンバチニブはまた肝細胞癌細胞系において抗増殖活性を呈し、これはFGFRシグナル伝達の活性化及びFGF受容体基質2 α （FRS2 α ）のリン酸化の同時の阻害に依存する。

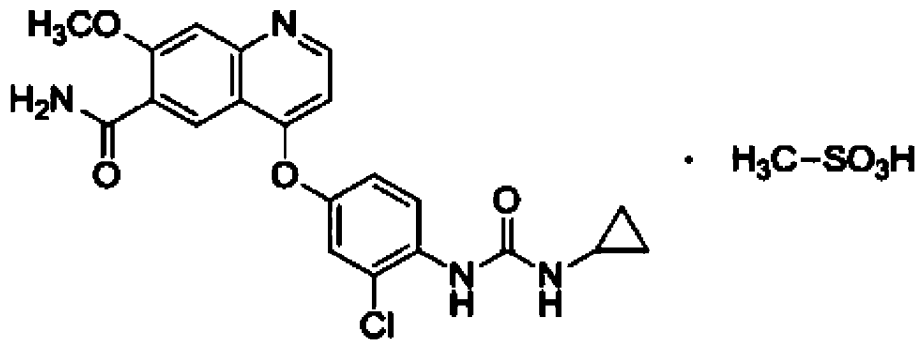
40

【0017】

レンバチニブ、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドの構造は米国特許第7,612,208号明細書の実施例368に開示されている。米国特許第7,253,286号明細書は、4-[3-クロロ-4-(シクロプロピルウレイド)フェノキシ]-7-メトキシキノリン-6-カルボキサミドメシル酸塩と命名される、レンバチニブのメシル酸塩形態（即ち、レンバチニブメシル酸塩）を開示し、その化学構造は以下（式II）に提供される：

50

【化 2】



式 I I

しかしながら、様々な腫瘍について、疾患は依然として化学療法後に長期にわたり制御可能ではなく、5年生存率は依然として非常に低い。したがって、より低い毒性及びより高い有効性を有する医薬品又は併用療法の開発は大きな意味を持つ。

【発明の概要】

【0018】

集中的な研究及び創造的な努力により、本発明者は、抗CTLA4／抗PD-1抗体構造のFc断片を対応的に改変して、Fc受容体に対するFc領域の結合能力を低減させ、それにより、免疫細胞に対するADCC、ADCP及び／又はCDC効果を低減させ且つ抗CTLA4／抗PD-1抗体の有効性を増加させた。

【0019】

本発明は以下において詳述される。

【0020】

本発明の1つの態様は、二重特異性抗体であって、PD-1を標的化する第1のタンパク質機能性領域、及びCTLA4を標的化する第2のタンパク質機能性領域を含み；第1のタンパク質機能性領域が免疫グロブリンであり、且つ第2のタンパク質機能性領域が単鎖抗体であり；又は、第1のタンパク質機能性領域が単鎖抗体であり、且つ第2のタンパク質機能性領域が免疫グロブリンであり；免疫グロブリンについて、重鎖可変領域が、配列番号27～29にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号30～32にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；単鎖抗体について、重鎖可変領域が、配列番号33～35にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号36～38にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；又は、免疫グロブリンについて、重鎖可変領域が、配列番号33～35にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号36～38にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；単鎖抗体について、重鎖可変領域が、配列番号27～29にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号30～32にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；免疫グロブリンがヒトIgG1サブタイプの免疫グロブリンであり；EUナンバリングシステムにしたがって、免疫グロブリンの重鎖定常領域が、位置234、235及び237のいずれか2つ又は3つにおいて突然変異を有し、且つFcγRIIa及び／又はC1qに対する二重特異性抗体の親和性定数が、突然変異前のものと比較して突然変異後に低減されており；好ましくは、親和性定数がFortebio Oct

e t システムにより測定される、
二重特異性抗体に関する。

【0021】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、上記の突然変異後に、FcγRIIIa、FcγRI、FcγRIIIa_H131、FcγRIIIa_V158及び／又はFcγRIIbに対する二重特異性抗体の親和性定数は、突然変異前のものと比較して低減されており；好ましくは、親和性定数はFortebio Octetシステムにより測定される。

【0022】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、EUNANBリングシステムにしたがって、免疫グロブリンの重鎖定常領域は、位置234、235及び／又は237において以下の突然変異：

L234A及びL235A；

L234A及びG237A；

L235A及びG237A；

又は

L234A、L235A及びG237A

を有する。

【0023】

本発明において、他に指定されなければ、位置番号の前の文字は突然変異前のアミノ酸を表し、且つ位置番号の後の文字は突然変異後のアミノ酸を表す。

【0024】

本発明は更に、二重特異性抗体であって、

PD-1を標的化する第1のタンパク質機能性領域、及び

CTLA4を標的化する第2のタンパク質機能性領域を含み；

第1のタンパク質機能性領域が免疫グロブリンであり、且つ第2のタンパク質機能性領域が単鎖抗体であり；又は、第1のタンパク質機能性領域が単鎖抗体であり、且つ第2のタンパク質機能性領域が免疫グロブリンであり；

免疫グロブリンについて、重鎖可変領域が、配列番号27～29にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号30～32にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；単鎖抗体について、重鎖可変領域が、配列番号33～35にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号36～38にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；

又は、

免疫グロブリンについて、重鎖可変領域が、配列番号33～35にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号36～38にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；単鎖抗体について、重鎖可変領域が、配列番号27～29にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のHCDR1～HCDR3を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号30～32にそれぞれ記載されるアミノ酸配列のLCDR1～LCDR3を含み；

免疫グロブリンがヒトIgG1サブタイプの免疫グロブリンであり；

EUNANBリングシステムにしたがって、免疫グロブリンの重鎖定常領域が、位置234、235及び／又は237において以下の突然変異：

L234A及びL235A；

L234A及びG237A；

L235A及びG237A；又は

L234A、L235A及びG237A

を有する、

二重特異性抗体に関する。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、EUナンバリングシステムにしたがって、免疫グロブリンの重鎖定常領域は、

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A及びK320A

から選択される1つ又は複数の突然変異を有する。

10

【0026】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体は、IgG-scFvの形態、即ち、Morrisonフォーマットである。

【0027】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号14及び配列番号18から選択され；免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号16及び配列番号20から選択され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号6、配列番号10、配列番号41及び配列番号43から選択され；単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4、配列番号8、配列番号12、配列番号42及び配列番号44から選択され；

20

又は、

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号6、配列番号10、配列番号41及び配列番号43から選択され；免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4、配列番号8、配列番号12、配列番号42及び配列番号44から選択され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号14及び配列番号18から選択され；単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号16及び配列番号20から選択される。

【0028】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体は、以下の(1)～(20)：

30

(1)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号14に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号16に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号2に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号4に記載される；

(2)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号14に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号16に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号6に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号8に記載される；

40

(3)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号14に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号16に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号10に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号12に記載される；

(4)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号18に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号20に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号2に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

50

(5)

(6)

10

(7)

(8)

20

(9)

(1 0)

30

(1 1)

(1 2)

40

(1 3)

(1 4)

50

列は配列番号 4 4 に記載される；

(15)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 8 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 0 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 1 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 2 に記載される；

(16)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 8 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 0 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 3 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 4 に記載される；

(17)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 1 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 2 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 4 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 6 に記載される；

(18)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 3 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 4 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 4 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 6 に記載される；

(19)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 1 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 2 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 8 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 0 に記載される；

及び、

(20)

免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 3 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 4 に記載され；単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 1 8 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 0 に記載される

のうちのいずれか 1 つから選択される。

【0029】

本発明の 1 つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、免疫グロブリンの重鎖のアミノ酸配列は配列番号 4 0 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 2 4 に記載される。

【0030】

本発明の 1 つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、免疫グロブリン又はその抗原結合性断片は、約 10^{-7} M より高い、例えば、約 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、若しくは 10^{-3} M より高い又はより高い親和性定数で FcγRIIIa__F158、FcγRI、FcγRIIIa__H131、FcγRIIIa__V158 及び／又は FcγRIIb に結合し；好ましくは、親和性定数は Fortebio Octet システムにより測定され；

好ましくは、免疫グロブリン又はその抗原結合性断片は、FcγRIIIa__F158、FcγRI、FcγRIIIa__H131、FcγRIIIa__V158 及び／又は FcγRIIb に対して結合シグナルを有しないか、又は 0.1 nm より低い結合シグナルを有し；好ましくは、結合シグナルは、Fortebio Octet システムにより測定される応答を指す。

【0031】

10

20

30

40

50

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、免疫グロブリン又はその抗原結合性断片は、約 10^{-9} Mより高い、例えば、約 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M、若しくは 10^{-5} Mより高い又はより高い親和性定数でC1qに結合し；好ましくは、親和性定数はFortebio Octetシステムにより測定され；好ましくは、免疫グロブリン又はその抗原結合性断片は、C1qに対して結合シグナルを有しないか、又は0.1nmより低い結合シグナルを有し；好ましくは、結合シグナルは、Fortebio Octetシステムにより測定される応答を指す。

【0032】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、第1のタンパク質機能性領域は、直接的に若しくはリンカー断片を介して第2のタンパク質機能性領域に連結されており；且つ／又は単鎖抗体の重鎖可変領域は、直接的に若しくはリンカー断片を介して単鎖抗体の軽鎖可変領域に連結されている。

10

【0033】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、リンカー断片は(GGGGS) n であり、 n は正の整数であり；好ましくは、 n は、1、2、3、4、5又は6である。

【0034】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、第1のタンパク質機能性領域及び第2のタンパク質機能性領域の数は、それぞれ独立して、1つ、2つ又はそれより多い。

20

【0035】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、第1のタンパク質機能性領域の数は1つであり、且つ第2のタンパク質機能性領域の数は2つである。

【0036】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体について、単鎖抗体は免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている。免疫グロブリンは2つの重鎖を有するので、2つの単鎖抗体分子は1つの免疫グロブリン分子に連結されている。好ましくは、2つの単鎖抗体分子は同一である。好ましくは、単鎖抗体は、上述のリンカー断片を介してアミド結合を形成することにより免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている。

【0037】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、免疫グロブリンの定常領域はヒト化されている。例えば、重鎖定常領域はIgガンマー1鎖C領域、アクセッション：P01857であり、且つ軽鎖定常領域はIgカッパ鎖C領域、アクセッション：P01834である。

30

【0038】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体は、約 10^{-5} Mより低い、例えば、約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M若しくは 10^{-10} Mより低い又はより低い K_D でCTLA4タンパク質及び／又はPD-1タンパク質に結合する。

【0039】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体はモノクローナル抗体である。

40

【0040】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体はヒト化抗体である。

【0041】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、二重特異性抗体は、PD-1を標的化する第1のタンパク質機能性領域、及びCTLA4を標的化する第2のタンパク質機能性領域を含み；

第1のタンパク質機能性領域の数は1つであり、且つ第2のタンパク質機能性領域の数は2つであり；

第1のタンパク質機能性領域は免疫グロブリンであり、且つ第2のタンパク質機能性領域

50

は単鎖抗体であり；

免疫グロブリンの重鎖のアミノ酸配列は配列番号 40 に記載され、且つ免疫グロブリンの軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 24 に記載され；

単鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 43 に記載され、且つ単鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 44 に記載され；

単鎖抗体は免疫グロブリンの重鎖の C 末端に連結されており；

第 1 のタンパク質機能性領域は第 1 のリンカー断片を介して第 2 のタンパク質機能性領域に連結されており；且つ単鎖抗体の重鎖可変領域は第 2 のリンカー断片を介して単鎖抗体の軽鎖可変領域に連結されており；第 1 のリンカー断片及び第 2 のリンカー断片は同一又は異なるものであり；

好ましくは、第 1 のリンカー断片及び第 2 のリンカー断片のアミノ酸配列は配列番号 25 及び配列番号 26 から独立して選択され；

好ましくは、第 1 のリンカー断片及び第 2 のリンカー断片のアミノ酸配列は配列番号 26 に記載される。

【0042】

本発明の別の態様は、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体をコードする、単離された核酸分子に関する。

【0043】

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含む、ベクターに関する。

【0044】

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子又は本発明のベクターを含む、宿主細胞に関する。

【0045】

本発明の別の態様は、抗体又はその抗原結合性断片、及びコンジュゲート化された部分を含む、コンジュゲートであって、免疫グロブリンが本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体であり、且つコンジュゲート化された部分が、検出可能な標識であり；好ましくは、コンジュゲート化された部分が、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色物質、又は酵素である、コンジュゲートに関する。

【0046】

本発明の別の態様は、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体を含む又は本発明のコンジュゲートを含む、キットであって；

好ましくは、キットが、免疫グロブリン又はその抗原結合性断片を特異的に認識することができる第 2 の抗体を更に含み；任意選択的に、第 2 の抗体が、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色物質、又は酵素を更に含む、キットに関する。

【0047】

本発明の別の態様は、試料中の PD-1 及び／又は CTLA-4 の存在又はレベルを検出するためのキットの調製における、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体又はコンジュゲートの使用に関する。

【0048】

本発明の別の態様は、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体又はコンジュゲートを含む、医薬組成物であって；任意選択的に、薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤を更に含む、医薬組成物に関する。

【0049】

本発明の 1 つ又は複数の実施形態において、医薬組成物は、1 つ又は複数の抗腫瘍化学療法剤を更に含み；

好ましくは、抗腫瘍化学療法剤はチロシンキナーゼ阻害剤であり；より好ましくは、抗腫瘍化学療法剤は、アンロチニブ若しくはその薬学的に許容される塩（例えば、塩酸塩）、又はレンバチニブ若しくはその薬学的に許容される塩（例えば、メシル酸塩）である。

【0050】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、医薬組成物の単位用量は、二重特異性抗体の質量に基づいて、100～1000mg、200～800mg、200～500mg、300～600mg、400～500mg、又は450mgである。

【0051】

本発明の別の態様は、別々のパッケージ中に第1の製品及び第2の製品を含む、組合せ製品であって、

第1の製品が、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体、コンジュゲート又は医薬組成物を含み；

第2の製品が1つ又は複数の抗腫瘍化学療法剤を含み；好ましくは、抗腫瘍化学療法剤がチロシンキナーゼ阻害剤であり；より好ましくは、抗腫瘍化学療法剤が、アンロチニブ若しくはその薬学的に許容される塩（例えば、塩酸塩）、又はレンバチニブ若しくはその薬学的に許容される塩（例えば、メシル酸塩）であり；

好ましくは、第1の製品及び第2の製品が、独立して、1つ又は複数の薬学的に許容される賦形剤を更に含み；

好ましくは、組合せ製品がパッケージ挿入物を更に含む、

組合せ製品に関する。

【0052】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、組合せ製品について、第1の製品の単位用量は、二重特異性抗体の質量に基づいて、100～1000mg、200～800mg、200～500mg、300～600mg、400～500mg、又は450mgである。

【0053】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、組合せ製品について、第2の製品の単位用量は、活性成分の質量に基づいて、0.1～100mg、0.5～50mg、0.5～10mg、1～10mg、2～8mg、又は1～5mgである。

【0054】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、組合せ製品について、第2の製品の単位用量は、活性成分の質量に基づいて、1～20mg、2～15mg、4～12mg、又は8～12mgである。

【0055】

本発明の別の態様は、腫瘍若しくは貧血を治療及び／若しくは予防するための医薬の調製、又は腫瘍若しくは貧血を診断するための医薬の調製における、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体、コンジュゲート、医薬組成物又は組合せ製品の使用であって；好ましくは、腫瘍が、黒色腫、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、直腸がん、胃がん、肝臓がん、肺がん、卵巣がん、白血病、乳がん、中皮腫、子宮頸がん、子宮内膜がん、リンパ腫及び鼻咽頭がんのうちの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、腫瘍がMSI-H／dMMR表現型の固形腫瘍であり；好ましくは、腫瘍が、MSI-H／dMMR表現型の結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、胃がん、中皮腫、肉腫、副腎皮質癌、悪性黒色腫又は卵巣生殖細胞新生物であり；

好ましくは、肺がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん及び扁平細胞肺がんのうちの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、胃がんが胃腺癌又は胃食道接合部腺癌である、使用に関する。

【0056】

MSIはマイクロサテライト不安定性を指す。マイクロサテライトは、1つ、2つ又はそれより多くのヌクレオチドの10～50個のリピートを含めて、ヒトゲノムの全体を通じた短いタンデムリピートである。ある特定の異常な細胞、例えば腫瘍中のマイクロサテライトは、正常細胞と比較してリピート単位の挿入又は欠失により長さにおいて変更されている。そのような変更はMSIと称される。不安定性及び程度に基づいて、MSIは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）、低頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-L）及びマイクロサテライト安定性（MSS）として分類され得る。MSIの

10

20

30

40

50

主要な原因はDNAミスマッチ修復（MMR）である。ヒトミスマッチ修復遺伝子（MMR遺伝子）は、転写及び翻訳を通じて対応するミスマッチ修復タンパク質を発現することができる。いかなるMMRタンパク質も存在しないことはミスマッチ修復不全に繋がることがあり、塩基対ミスマッチがそのような不全に起因してDNA複製のプロセス中に蓄積し、最終的にMSIを結果としてもたらす。結腸直腸がんの約15%はMSI経路に起因する。これは結腸直腸がんにおいて最初に報告され、胃がん、子宮内膜がん、副腎皮質癌及び同種のものにおいても起こり得る（Baretti M et al., Pharmacol Ther., 2018; 189:45-62）。MSI-H/dMMRの特徴は、その後の研究において中皮腫、肉腫、副腎皮質癌、悪性黒色腫及び卵巣生殖細胞新生物においても見出された。

【0057】

MSI-H及びdMMRは、2つの異なるアッセイの結果を表し、生物学的に一貫しており、MSI-H/dMMR又は高頻度MSI/dMMRと呼ばれるが、MSI-L及びMSSはプロフィシエントMMR（pMMR）の表現型である。dMMRの検出は、腫瘍検体（手術検体及び吸引検体を含む）に基づいてMSH2、MLH1、MSH6及びPMS2の4つのミスマッチ遺伝子についてタンパク質発現の免疫組織化学を実行することである。4つのタンパク質のいずれかの非存在はdMMRを裏付け；4つ全てのタンパク質の陽性の結果はpMMR、即ち、完全なミスマッチ修復機能を指し示す。MSIの検出は、腫瘍細胞及び体細胞中の繰返しのDNA配列（マイクロサテライト配列）の長さをマッチさせること、並びに長さを比較することである。American NCI standardに基づいてPCRを使用して5つの標準的な座位が検出された場合、2つ又はそれより多くの座位における非一貫性は、MSI-Hとして定義される不安定性を指し示し、1つの非一貫的な座位はMSI-Lを指し示し、5つの一貫的な座位はMSSを指し示す。ハイスループットシーケンシング（次世代シーケンシング、又はNGSとも称される）もまた、マイクロサテライト不安定性を検出するための方法として使用され得る。より多くのマイクロサテライト座位、例えば5つより多くの座位又は他のマイクロサテライト座位が選択される場合、PCRアッセイについて、 $\geq 30\%$ の座位における非一貫性はMSI-Hとして定義され、全ての座位における一貫性はMSSとして定義され、 $0\sim 30\%$ の非一貫性はMSI-Lとして定義される。

【0058】

本発明の別の態様は、
PD-L1へのPD-1の結合を遮断するための医薬、
PD-1の活性若しくはレベルを下方調節するための医薬、
生物においてPD-1の免疫抑制を緩和するための医薬、若しくは
Tリンパ球においてIFN- γ 及び／若しくはIL-2の発現を上昇させるための医薬；
並びに／又は
B7へのCTLA4の結合を遮断するための医薬、
CTLA4の活性若しくはレベルを下方調節するための医薬、
生物においてCTLA4の免疫抑制を緩和するための医薬、若しくは
Tリンパ球においてIL-2の発現を上昇させるための医薬
の調製における、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体又はコンジュゲートの使用に関する。

【0059】

本発明の別の態様は、腫瘍の予防及び／若しくは治療並びに／又はアジュバント治療及び／若しくは診断の方法であって、必要とする対象に有効量の本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体、コンジュゲート、医薬組成物又は組合せ製品を投与することを含み；好ましくは、腫瘍が、黒色腫、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、直腸がん、胃がん、肝臓がん、肺がん、卵巣がん、白血病、乳がん、中皮腫、子宮頸がん、子宮内膜がん、リンパ腫及び鼻咽頭がんのうちの1つ又は複数から選択され；好ましくは、肺がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん及び扁平細胞肺がんのうちの1つ又は複数から選択され；

10

20

30

40

50

好ましくは、胃がんが胃腺癌又は胃食道接合部腺癌であり；

好ましくは、腫瘍がMSI-H/dMMR表現型の固形腫瘍であり；好ましくは、腫瘍が、MSI-H/dMMR表現型の以下の腫瘍：

結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、胃がん、中皮腫、肉腫、副腎皮質癌、悪性黒色腫及び卵巣生殖細胞新生物

のうちの1つ又は複数から選択される、

方法に関する。

【0060】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、方法のために、投与は、外科治療の前若しくは後及び／又は放射線療法の前若しくは後に行われる。

【0061】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、方法において、

抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体の単位用量は、体重1kg当たり0.1～100mg、好ましくは1～100mg（例えば、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg又は100mg）であり；代替的に、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体の単位用量は、各対象において10～1000mg（例えば、約100mg、約150mg、約200mg、約250mg、約300mg、約350mg、約400mg、約450mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg又は約1000mg）、好ましくは50～500mg、100～400mg、150～300mg、150～250mg又は200mgであり；

好ましくは、用量は、3日、4日、5日、6日、10日、1週、2週又は3週毎に1回与えられ；

好ましくは、投与の経路は静脈点滴又は静脈注射である。

【0062】

一部の実施形態において、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体の投与は、2週（14日）又は3週（21日）のサイクルで行われ、且つ好ましくは、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体は、各サイクルの1日目（D1）に静脈内に投与される。例えば、抗CTLA4／抗PD-1二重特異性抗体は2週（q2w）又は3週（q3w）毎に1回投与される。

【0063】

腫瘍の予防及び／若しくは治療並びに／又はアジュバント治療及び／若しくは診断における使用のための、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体、コンジュゲート、医薬組成物又は組合せ製品であって；好ましくは、腫瘍が、黒色腫、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、結腸がん、直腸がん、胃がん、肝臓がん、肺がん、卵巣がん、白血病、乳がん、中皮腫、子宮頸がん、子宮内膜がん、リンパ腫及び鼻咽頭がんのうちの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、肺がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん及び扁平細胞肺がんのうちの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、胃がんが胃腺癌又は胃食道接合部腺癌であり；

好ましくは、腫瘍がMSI-H/dMMR表現型の固形腫瘍であり；好ましくは、腫瘍が、MSI-H/dMMR表現型の以下の腫瘍：

結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、胃がん、中皮腫、肉腫、副腎皮質癌、悪性黒色腫及び卵巣生殖細胞新生物

のうちの1つ又は複数から選択される、

前記使用のための、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体、コンジュゲート、医薬組成物又は組合せ製品もまた提供される。

【0064】

PD-L1へのPD-1の結合を遮断すること、

PD-1の活性若しくはレベルを下方調節すること、

生物においてPD-1の免疫抑制を緩和すること、若しくは

10

20

30

40

50

Ｔリンパ球においてＩＦＮ－ γ の発現を上昇させること；

及び／又は

Ｂ７へのＣＴＬＡ４の結合を遮断すること、

ＣＴＬＡ４の活性若しくはレベルを下方調節すること、

生物においてＣＴＬＡ４の免疫抑制を緩和すること、若しくは

Ｔリンパ球においてＩＬ－２の発現を上昇させること

における使用のための、本発明の任意の実施形態による二重特異性抗体又はコンジュゲートが提供される。

【００６５】

抗体薬物、特にモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、様々な疾患の治療において良好な有効性を達成してきた。これらの治療用抗体を獲得するための伝統的な実験方法は、抗原を用いて動物を免疫化し、免疫化された動物において抗原を標的化する抗体を獲得すること、又は親和性成熟により抗原に対するより低い親和性を有するそれらの抗体を向上させることである。

【００６６】

軽鎖及び重鎖の可変領域は抗原の結合を決定し；各鎖の可変領域は３つの超可変領域、即ち、相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む（重鎖（Ｈ）のＣＤＲは、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含み、且つ軽鎖（Ｌ）のＣＤＲは、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含み；これらはKabat et al.により定義される；Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Mdを参照）。

【００６７】

以下の（１）～（１３）におけるモノクローナル抗体のＣＤＲ領域のアミノ酸配列は、当業者に周知の技術的手段により、例えば、ＶＢＡＳＥ２データベースにより、分析され、結果は以下の通りである：

【００６８】

（１）１４Ｃ１２

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号１４に記載され、且つ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号１６に記載される。

重鎖可変領域の３つのＣＤＲ領域のアミノ酸配列は以下の通りである：

ＨＣＤＲ１：ＧＦＡＦＳＳＹＤ（配列番号２７）

ＨＣＤＲ２：ＩＳＧＧＧＲＹＴ（配列番号２８）

ＨＣＤＲ３：ＡＮＲＹＧＥＡＷＦＡＹ（配列番号２９）

軽鎖可変領域の３つのＣＤＲ領域のアミノ酸配列は以下の通りである：

ＬＣＤＲ１：ＱＤＩＮＴＹ（配列番号３０）

ＬＣＤＲ２：ＲＡＮ（配列番号３１）

ＬＣＤＲ３：ＬＱＹＤＥＦＰＬＴ（配列番号３２）

【００６９】

（２）１４Ｃ１２Ｈ１Ｌ１

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号１８に記載され、且つ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号２０に記載される。

重鎖可変領域の３つのＣＤＲ領域のアミノ酸配列は１４Ｃ１２と同じである。

軽鎖可変領域の３つのＣＤＲ領域のアミノ酸配列は１４Ｃ１２と同じである。

【００７０】

（３）４Ｇ１０

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号２に記載され、且つ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号４に記載される。

重鎖可変領域の３つのＣＤＲ領域のアミノ酸配列は以下の通りである：

ＨＣＤＲ１：ＧＹＳＦＴＧＹＴ（配列番号３３）

ＨＣＤＲ２：ＩＮＰＹＮＮＩＴ（配列番号３４）

HCDR3:ARLDYRSY (配列番号35)

軽鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は以下の通りである:

LCDR1:TGAVTTSNF (配列番号36)

LCDR2:GTN (配列番号37)

LCDR3:ALWYSNHWV (配列番号38)

【0071】

(4) 4G10H1L1

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号6に記載され、且つ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号8に記載され;

重鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は4G10と同じである。

10

軽鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は4G10と同じである。

【0072】

(5) 4G10H3L3

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号10に記載され、且つ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号12に記載される。

重鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は4G10と同じである。

軽鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は4G10と同じである。

【0073】

(6) BiAb001 (M)

重鎖可変領域と関連付けられる9つのCDR領域のアミノ酸配列は以下の通りである:

20

HCDR1:GFAFSSYD (配列番号27)

HCDR2:ISGGGRYT (配列番号28)

HCDR3:ANRYGEAWFAY (配列番号29)

HCDR4:GYSFTGYT (配列番号33)

HCDR5:INPYNNIT (配列番号34)

HCDR6:ARLDYRSY (配列番号35)

HCDR7:TGAVTTSNF (配列番号36)

HCDR8:GTN (配列番号37)

HCDR9:ALWYSNHWV (配列番号38)

軽鎖可変領域と関連付けられる3つのCDR領域のアミノ酸配列は以下の通りである:

30

LCDR1:QDINTY (配列番号30)

LCDR2:RAN (配列番号31)

LCDR3:LQYDEFPLT (配列番号32)

【0074】

(7) BiAb002 (M)

重鎖可変領域と関連付けられる9つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)と同じである。

軽鎖可変領域と関連付けられる3つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)と同じである。

【0075】

40

(8) BiAb003 (M)

重鎖可変領域と関連付けられる9つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)と同じである。

軽鎖可変領域と関連付けられる3つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)と同じである。

【0076】

(9) BiAb004 (M)

重鎖可変領域と関連付けられる9つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)と同じである。

軽鎖可変領域と関連付けられる3つのCDR領域のアミノ酸配列はBiAb001 (M)

50

）と同じである。

【0077】

本発明の抗体B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) について、アミノ酸突然変異はB i A b 0 0 4 (M) の非可変領域に導入される。E U ナンバリングシステムにしたがって、アミノ酸突然変異は、位置2 3 4、2 3 5 及び2 3 7 において導入される：

【0078】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、重鎖のヒンジ領域中で位置2 3 4 においてロイシンからアラニンへの点突然変異 (L 2 3 4 A)、位置2 3 5 においてロイシンからアラニンへの点突然変異 (L 2 3 5 A)、及び位置2 3 7 においてグリシンからアラニンへの点突然変異 (G 2 3 7 A) を導入することにより得られる。

【0079】

本発明において、他に定義されなければ、本明細書において使用される科学技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有する。追加的に、本明細書において使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学及び免疫学の実験操作は、対応する分野において広く使用されるルーチンの手順である。本発明をより良好に理解するために、関連する用語の定義及び説明が以下において提供される。

【0080】

本明細書において使用される場合、C T L A 4 タンパク質 (細胞傷害性Tリンパ球抗原4) のアミノ酸配列を参照する場合、それは、C T L A 4 タンパク質の全長、又はC T L A 4 の細胞外断片C T L A 4 E C D 又はC T L A 4 E C D を含む断片を含み；C T L A 4 E C D の融合タンパク質、例えばマウス又はヒトI g G のF c タンパク質断片 (m F c 又はh F c) に融合した断片もまた含まれる。しかしながら、C T L A 4 タンパク質のアミノ酸配列において、その生物学的機能に影響することなく突然変異又はバリエーション (置換、欠失及び／又は付加が挙げられるがこれらに限定されない) が天然に生成され又は人工的に導入され得ることを当業者は理解する。したがって、本発明において、「C T L A 4 タンパク質」という用語は、それらの天然の又は人工的なバリエーションを含めて、全てのそのような配列を含むべきである。追加的に、C T L A 4 タンパク質の配列断片を記載する場合、それはまた、その天然の又は人工的なバリエーション中の対応する配列断片を含む。

【0081】

本明細書において使用される場合、P D - 1 タンパク質のアミノ酸配列 (N C B I G e n B a n k : N M _ 0 0 5 0 1 8) を参照する場合、それは、P D - 1 タンパク質の全長、又はP D - 1 の細胞外断片P D - 1 E C D 又はP D - 1 E C D を含む断片を含み；P D - 1 E C D の融合タンパク質、例えばマウス又はヒトI g G のF c タンパク質断片 (m F c 又はh F c) に融合した断片もまた含まれる。しかしながら、P D - 1 タンパク質のアミノ酸配列において、その生物学的機能に影響することなく突然変異又はバリエーション (置換、欠失及び／又は付加が挙げられるがこれらに限定されない) が天然に生成され又は人工的に導入され得ることを当業者は理解する。したがって、本発明において、「P D - 1 タンパク質」という用語は、それらの天然の又は人工的なバリエーションを含めて、全てのそのような配列を含むべきである。追加的に、P D - 1 タンパク質の配列断片を記載する場合、それはまた、その天然の又は人工的なバリエーション中の対応する配列断片を含む。

【0082】

本明細書において使用される場合、他に指定されなければ、B 7 はB 7 - 1 及び／又はB 7 - 2 であり；その特有の配列は先行技術において公知のものであり、既存の文献又はG e n B a n k において開示される配列に対して参照が為され得る。例えば、B 7 - 1 (C D 8 0、N C B I G e n e I D : 9 4 1) ；B 7 - 2 (C D 8 6、N C B I G e n e I D : 9 4 2) 。

【0083】

本明細書において使用される場合、E C 5 0 という用語は、最大の効果の5 0 % のための濃度、即ち、最大の効果の5 0 % を引き起こすことができる濃度を指す。

【0084】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、一般にポリペプチド鎖の2つのペア（各ペアは1つの「軽」（L）鎖及び1つの「重」（H）鎖を有する）からなる免疫グロブリン分子を指す。一般的意味において、重鎖は、抗体中のより大きい分子量を有するポリペプチド鎖として解釈され得るものであり、軽鎖は、抗体中のより小さい分子量を有するポリペプチド鎖を指す。軽鎖は κ 及び λ 軽鎖として分類される。重鎖は、一般に、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、又は ϵ として分類され、抗体のアイソタイプは、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEとして定義される。軽鎖及び重鎖において、可変領域及び定常領域は、約12個又はそれより多くのアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖はまた、約3個又はそれより多くのアミノ酸の「D」領域を含む。各重鎖は重鎖可変領域（ V_H ）及び重鎖定常領域（ C_H ）からなる。重鎖定常領域は3つのドメイン（ C_{H1} 、 C_{H2} 、及び C_{H3} ）からなる。各軽鎖は軽鎖可変領域（ V_L ）及び軽鎖定常領域（ C_L ）からなる。軽鎖定常領域は1つのドメイン C_L からなる。抗体の定常領域は、古典的補体システムの第1成分（ $C1q$ ）への免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）の結合を含めて、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。 V_H 及び V_L 領域は、その間にフレームワーク領域（FR）と呼ばれる保存的な領域が分布した高度に可変な領域（相補性決定領域（CDR）と呼ばれる）に更に分けられ得る。各 V_H 及び V_L は、アミノ末端からカルボキシル末端へと以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で編成された3つのCDR及び4つのFRからなる。各重鎖／軽鎖ペアの可変領域（ V_H 及び V_L ）は抗体結合性部位をそれぞれ形成する。各領域又はドメインへのアミノ酸の割当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1987 and 1991))、Chothia & Lesk, (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917、又はChothia et al. (1989) Nature, 342:878-883の定義に従う。特に、重鎖はまた、3つより多く、例えば6、9、又は12個のCDRを含んでもよい。例えば、本発明の二重特異性抗体において、重鎖は、IgG抗体の重鎖のC末端が別の抗体に連結されたscFvであってもよく、この場合、重鎖は9つのCDRを含む。「抗体」という用語は、抗体を製造するためのいかなる特有の方法によっても限定されない。例えば、抗体としては、特に、組換え抗体、モノクローナル抗体、及びポリクローナル抗体が挙げられる。抗体は異なるアイソタイプ、例えばIgG（例えば、サブタイプIgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4）、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgMであることができる。

【0085】

抗体の抗原結合性断片（例えば、上記の抗体断片）は、当業者に公知の従来技術（例えば、DNA組換え、又は酵素的若しくは化学的切断）を使用することにより所与の抗体から得ることができ、抗体の抗原結合性断片は、インタクトな抗体と同じやり方で特異性についてスクリーニングされる。

【0086】

本明細書において使用される場合、文脈において他に明確に定義されなければ、「抗体」という用語を言及する場合、それはインタクトな抗体だけでなく、抗体の抗原結合性断片もまた含む。

【0087】

本明細書において使用される場合、「mAb」及び「モノクローナル抗体」という用語は、高度に相同的な抗体の群に由来する、即ち、自然発生的に起こり得る天然の突然変異を除いて、同一の抗体分子の群に由来する、抗体又はその断片を指す。モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対して高度に特異的である。モノクローナル抗体に対して、ポリクローナル抗体は、抗原上の異なるエピトープを一般に同定する少なくとも2つ又はそれより多くの異なる抗体を一般に含む。モノクローナル抗体は、Kohler et al. (Kohler et al., Nature, 256:495, 1975) により最初に報告されたハイブリドーマ技術を使用して一般に得ることができるが、DNA組換えを使用して得ることもできる（例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照）。

【0088】

本明細書において使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン（レセプター抗体）のCDR領域の全体又は部分が非ヒト抗体（ドナー抗体）のCDR領域により置き換えられた場合に得られる抗体又は抗体断片を指し、ドナー抗体は、期待される特異性、親和性又は反応性を有する非ヒト（例えば、マウス、ラット又はウサギ）抗体であってもよい。追加的に、レセプター抗体のフレームワーク領域（FR）中の一部のアミノ酸残基はまた、抗体の性能を更に向上させ又は最適化するために、対応する非ヒト抗体のアミノ酸残基により又は他の抗体のアミノ酸残基により置き換えられ得る。ヒト化抗体に関するより詳細について、例えば、Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); 及びClark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000)を参照。

10

【0089】

本明細書において使用される場合、「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン又は抗体が特異的に結合する抗原上の部位を指す。「エピトープ」はまた、当該分野において「抗原決定基」と呼ばれる。エピトープ又は抗原決定基は、一般に、分子の化学的に活性の表面基、例えばアミノ酸、炭水化物又は糖側鎖からなり、通常、特有の三次元構造的特徴及び特有の電荷の特徴を有する。例えば、エピトープは、一般に、「リニア」又は「コンホメーションナル」であり得る独特の空間的配座において少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個の連続的又は非連続的なアミノ酸を含む。例えば、Epitope Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照。リニアエピトープにおいて、タンパク質及び相互作用分子（例えば、抗体）の間の全ての相互作用部位は、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って線状に位置する。コンホメーションナルエピトープにおいて、相互作用部位は、互いに分離したタンパク質のアミノ酸残基にわたり位置する。

20

【0090】

本明細書において使用される場合、「単離された」という用語は、天然の状態から人工的な手段により得られたことを指す。ある特定の「単離された」物質又は成分が天然に見られる場合、それは、変化がその天然の環境において起こること、若しくはそれが天然の環境から単離されること、又は両方が該当し得る。例えば、ある特定の単離されたものではないポリヌクレオチド又はポリペプチドがある特定の生きた動物中に天然に存在し、またそのような天然の状態から単離された高い純度を有する同じポリヌクレオチド又はポリペプチドは、単離されたポリヌクレオチド又はポリペプチドと呼ばれる。「単離された」という用語は、物質の活性に影響しない人工的な若しくは合成の物質又は他の不純物の存在を除外しない。

30

【0091】

本明細書において使用される場合、「大腸菌発現系」という用語は、大腸菌（*E. coli*）（株）及びベクターからなる発現系を指し、大腸菌（株）は、商業的に入手可能な株、以下に限定されないが例えば、GI698、ER2566、BL21（DE3）、B834（DE3）、及びBLR（DE3）に由来する。

【0092】

本明細書において使用される場合、「ベクター」という用語は、ポリヌクレオチドが挿入され得る核酸媒体を指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の発現を可能とする場合、ベクターは発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、ベクターにより運ばれる遺伝物質要素が宿主細胞中で発現され得るように形質転換、形質導入、又はトランスフェクションにより宿主細胞に導入され得る。ベクターは当業者に周知であり、プラスミド；ファージミド；コスミド；人工染色体、例えば酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、又はP1由来人工染色体（PAC）；ファージ、例えばラムダファージ又はM13ファージ；及び動物ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ベクターとして使用され得る動物ウイルスとしては、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス

40

50

、及びパポバウイルス（例えばSV40）が挙げられるがこれらに限定されない。ベクターは、発現を制御する様々なエレメントを含んでもよく、これには、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、及びレポーター遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。追加的に、ベクターは複製開始部位を更にも含む。

【0093】

本明細書において使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクターが導入され得る細胞を指し、これには、原核細胞、例えば大腸菌若しくは枯草菌（*bacillus subtilis*）、真菌細胞、例えば酵母細胞若しくはアスペルギルス（*aspergillus*）、昆虫細胞、例えばS2ショウジョウバエ細胞若しくはSf9、又は動物細胞、例えば線維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞、若しくはヒト細胞が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0094】

本明細書において使用される場合、「特異的に結合する」という用語は、2つの分子の間のランダムでない結合反応、例えば抗体及びそれが標的化する抗原の間の反応を指す。一部の実施形態において、抗原（又は抗原に特異的な抗体）に特異的に結合する抗体は、抗体が、約 10^{-5} Mより低い、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M若しくは 10^{-10} Mより低い又はより低い親和性（ K_D ）で抗原に結合することを指す。本発明の一部の実施形態において、「標的化する」という用語は特異的結合を指す。

【0095】

本明細書において使用される場合、「 K_D 」という用語は、特異的な抗体-抗原相互作用についての解離平衡定数を指し、これは抗体及び抗原の間の結合親和性を記載するために使用される。平衡解離定数が小さくなればなる程、抗体-抗原結合はより堅固なものとなり、抗体及び抗原の間の親和性はより高くなる。一般に、例えば、BIACORE表面プラズモン共鳴（SPR）機器又はFortebio Octetシステムにより測定された場合に、抗体は、約 10^{-5} Mより低い、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M若しくは 10^{-10} Mより低い又はより低い解離平衡定数（ K_D ）で抗原に結合する。

20

【0096】

本明細書において使用される場合、「モノクローナル抗体」及び「mAb」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用することができ；「ポリクローナル抗体」及び「pAb」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用することができ；「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用することができる。また、本明細書において、アミノ酸は、一般に、当該技術分野において公知の1文字及び3文字での略記により表される。例えば、アラニンはA又はAlaにより表され得る。

30

【0097】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤」という用語は、対象及び活性成分と薬理的及び／又は生理学的に適合性の担体及び／又は賦形剤を指し、これは当該技術分野において周知であり（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, edited by Gennaro AR, 19th ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995を参照）、pH調節剤、界面活性剤、アジュバント、及びイオン強度増強剤が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、pH調節剤としてはリン酸緩衝液が挙げられるがこれに限定されず；界面活性剤としては、陽イオン性、陰イオン性、又は非イオン性界面活性剤、例えばTween-80が挙げられるがこれらに限定されず；イオン強度増強剤としては塩化ナトリウムが挙げられるがこれに限定されない。

40

【0098】

本明細書において使用される場合、「アジュバント」という用語は、抗原と共に生物に送達された場合又は事前に生物に送達された場合に抗原に対する生物の免疫応答を増強し又は免疫応答の種類を変化させることができる、非特異的な免疫増強剤を指す。様々なアジュバントがあり、これには、アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント（例えば、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント）、コリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium*

50

parvum)、リポ多糖、サイトカイン等が含まれるがこれらに限定されない。フロイントアジュバントは、動物実験において最も一般的に使用されるアジュバントである。水酸化アルミニウムアジュバントは、臨床試験においてより使用される。

【0099】

本明細書において使用される場合、「有効量」という用語は、所望の効果を得る又は少なくとも部分的に得るために十分な量を指す。例えば、（例えば、B7へのCTLA4の結合又はCTLA4過剰活性と関連付けられる疾患、例えば腫瘍のための）予防有効量は、疾患（例えば、B7へのCTLA4の結合又はCTLA4過剰活性と関連付けられる疾患、例えば腫瘍）の開始を予防し、停止させ、又は遅延させるために十分な量であり；治療有効量は、疾患を患う患者において疾患及びその合併症を治癒し又は少なくとも部分的に停止させるために十分な量である。そのような有効量を決定することは、疑いなく当業者の能力の範囲内である。例えば、治療目的のために有効な量は、治療されるべき疾患の重症度、患者自身の免疫系の全体的な状態、患者の一般的条件、例えば年齢、体重及び性別、投与の経路、並びに並行して与えられる他の治療等に依存する。

10

【0100】

「再発性」がんは、以前の治療（例えば、手術）に対する応答の後に元々の部位又は遠位の部位において再生するがんである。「局所再発性」がんは、以前に治療されたがんと同じ部位において治療後に起こるがんである。

【0101】

「転移性」がんは、身体の1つの部分（例えば、肺）から別の部分へと広がるがんを指す。

20

【0102】

本明細書において使用される場合、「完全に排除された」という用語は、既存の計測手段（例えば、Fortebio Octetシステム）により検出された場合の結合シグナルの非存在又は極めて弱い結合シグナルを指す。本発明の1つの実施形態において、結合シグナルの非存在又は極めて弱い結合シグナルは、0.1nmより低い結合シグナル（即ち、応答）を指す。

【0103】

本発明において、「第1」（例えば、第1のタンパク質機能性領域、第1のリンカー断片又は第1の製品）及び「第2」（例えば、第2のタンパク質機能性領域、第2のリンカー断片又は第2の製品）という用語は、他に指定されなければ、区別するため又は表現における明確性のために使用され、典型的な順次的な意味を持たない。

30

【0104】

本発明において、「約」又は「おおよそ」は、定義される値又は物理的量が、他に指定されなければ、10%、20%又は30%の範囲内で増減することを指す。例えば、約100分又はおおよそ100分は、90分～110分、80分～120分又は70分～130分であり得る。

【0105】

本発明の利点：

本発明は、以下の技術的な効果（1）～（3）のうちの1つ又は複数を達成する：

40

（1）本発明者による本発明の抗体のFc断片の改変は、FcγRI、FcγRIIa__H131、FcγRIIa__V158及び／又はFcγRIIa__F158に対するBiAb004（hG1TM）の結合活性を完全に排除し、それによりADCC活性及び／又はADCP活性を排除する。

（2）本発明者による本発明の抗体のFc断片の改変は、補体C1qに対する結合活性を完全に排除し、それによりCDC活性を排除する。

（3）本発明の抗体は、腫瘍を予防及び治療するための医薬の調製における使用のための潜在能力を有する。

【図面の簡単な説明】

【0106】

50

【図1】FcγRIに対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ50nM、25nM、12.5nM、6.25nM及び3.12nMである。

【図2】FcγRIに対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ50nM、25nM、12.5nM、6.25nM及び3.12nMである。

【図3】FcγRIIIa__V158に対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ500nM、250nM、125nM、62.5nM及び31.25nMである。

【図4】FcγRIIIa__V158に対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ500nM、250nM、125nM、62.5nM及び31.25nMである。

【図5】FcγRIIIa__F158に対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ500nM、250nM、125nM、62.5nM及び31.25nMである。

【図6】FcγRIIIa__F158に対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ500nM、250nM、125nM、62.5nM及び31.25nMである。

【図7】FcγRIIIa__H131に対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図8】FcγRIIIa__H131に対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図9】FcγRIIIa__R131に対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図10】FcγRIIIa__R131に対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図11】FcγRIIbに対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図12】FcγRIIbに対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ200nM、100nM、50nM、25nM及び12.5nMである。

【図13】C1qに対するBiAb004(hG1TM)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗体濃度は、それぞれ20nM、10nM、5nM、2.5nM及び1.25nMである。

【図14】C1qに対するBiAb004(hG1WT)の親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗原濃度は、それぞれ20nM、10nM、5nM、2.5nM及び1.25nMである。

【図15】C1qに対する5C10H2L2-IgG1mtの親和性定数アッセイ。上から下への曲線ペアについての抗原濃度は、それぞれ20nM、10nM、5nM、2.5nM及び1.25nMである。

【図16】CTLA-4及びPD-1抗原を発現する293T-CTLA4-PD1細胞に対するBiAb004(hG1WT)及びBiAb004(hG1TM)のADCC活性アッセイ。

【図17】レンバチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)による皮下ヒト肺癌HCC827細胞腫瘍異種移植片の阻害。

10

20

30

40

50

【図18】C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73マウスにおけるBiAb004(hG1TM)による皮下結腸がんMC38-hPDL1/hCD73腫瘍移植片の阻害。

【図19】CHO-K1-PD1に対するBiAb004(hG1TM)の抗体媒介性貪食活性。

【図20】BiAb004(hG1TM)によるヒト胃がんKATO III細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図21】BiAb004(hG1TM)によるヒト子宮頸がんHeLa細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図22】BiAb004(hG1TM)によるヒトT細胞リンパ腫Jurkat細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

10

【図23】BiAb004(hG1TM)によるヒト鼻咽頭がんCNE-2Z細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図24】BiAb004(hG1TM)によるヒト乳がんMDA-MB-231細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図25】BiAb004(hG1TM)によるヒト中皮腫NCI-H2452細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図26】アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)によるヒト非小細胞肺癌(ヒト肺腺癌)A549細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図27】アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)によるヒト小細胞肺癌NCI-H446細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

20

【図28】アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)によるヒト扁平細胞肺癌NCI-H226細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図29】BiAb004(hG1TM)によるMSI-H/dMMR表現型のヒト結腸直腸がんSW48細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【図30】BiAb004(hG1TM)による非MSI-H/dMMR表現型のヒト結腸直腸がんSW837細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答。

【発明を実施するための形態】

【0107】

詳細な説明

30

本発明の実施形態が、実施例を参照して以下において詳細に記載される。以下の実施例は、本発明の実例を示すためにのみ使用され、本発明の範囲を限定するものとみなされるべきではないことを当業者は理解する。技術又は条件が指定されない場合、実施例は、当該技術分野における文献(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., Third Edition, Science Pressを参照)に記載の技術若しくは条件にしたがって又は製品マニュアルにしたがって実行された。使用された試薬又は機器は、その製造者が指定されない場合、商業的に入手可能な従来の製品である。

【0108】

本発明の以下の実施例において：

40

BALB/cマウスは、Guangdong Medical Laboratory Animal Centerから購入した。

ヒト末梢血単核細胞は、ドナーのインフォームドコンセントと共に、Akeso Biopharma, Inc.において単離及び調製した。

Raji-PDL1は、Akeso BiopharmaによりヒトB細胞Rajiに基づいてトランスフェクションを介して構築されたヒトPD-L1を発現する細胞である。

Ficoll-Paque™ PLUS(又はFicoll-Paque PLUS)はGE Healthcareから購入した。

Human IL-2 ELISA kitはDakewe Biotech Co., Ltdから購入した。

RPMI 1640培地、DMEM培地、トリプシン-EDTA(0.25%)フェノールレッド及びBlastidinはいずれもGibcoから購入した。

50

スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) エンテロトキシン B (SEB) はDianotechから購入した。

FBSはExcell bioから購入した。

ミトマイシンC (MMC) はStressmarqから購入した。

アイソタイプ対照、ヒト抗鶏卵リゾチームIgG (抗HEL抗体、又はhIgGと略記されるヒトIgG) の配列は、「Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies」というタイトルでAcierno et al.により報告された研究 (Acierno et al., J Mol Biol., 2007; 374(1):130-146) におけるFab F10.6.6配列の可変領域配列に由来する。

実施例において使用されたアンロチニブは、商標名Fukewei (登録商標) 及び一般名塩酸アンロチニブ (anlodini b hydrochloride) の下でのアンロチニブの塩酸塩であり、CTTQ Pharmaから購入した。

実施例において使用されたレンバチニブは、商標名Lenvima (登録商標) の下でのレンバチニブメシル酸塩であり、Eisai (中国) から購入した。

【0109】

調製例1：抗CTLA4抗体の配列設計

抗CTLA4抗体4G10並びにそのヒト化抗体4G10H1L1及び4G10H3L3の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列及びコーディングヌクレオチド配列は、中国特許公開公報第106967172 (A) 号におけるそれぞれ4G10、4G10H1L1及び4G10H3L3のものと同一である。

【0110】

(1) 4G10の重鎖及び軽鎖可変領域配列

重鎖可変領域のヌクレオチド配列：(372bp)

CAGGTC AAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGC
CTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTA
CTCATTCACCTGGCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGC
CATGGAAAGAACCTTGAATGGATTGGACTTATTAATCCTT
ACAATAATAATTAATACTAACAACCAGAAGTTTCATGGGGCAA
GGCCACATTTACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTAC
ATGGAACTCCTCAGACTGACATCTGAAGACTCTGGAGTCT
ATTTCTGTGCAAGACTCGACTATAGGTCTTATTGGGGCCA
AGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAAGCCAAACGACACCC
CCATCTGTCTAT (配列番号1)

コードされるアミノ酸配列：(124aa)

QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQS
HGKNLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAY
MELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGLVTVSAAKTTP
PSVY (配列番号2)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列：(378bp)

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCCACATCAC
CTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTGCTCAAGTACTGG
GGCTGTTACAACCTAGTAACCTTTGCCAACTGGGTCCAAGAA
AAACCAGATCATTTATTCAGTCTAATAGGTGGTACCA
ACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCTCAGATTCTCAGGCTC
CCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCA
CAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGT
ACAGCAACCATTTGGGTGTTCTGGTGGAGGAACCAAACCTGAC
TGTCTTAGGCCAGCCCAAGTCTTTCGCCATCAGTCACCCCTG
TTTCAAGGGCAATTCTGC (配列番号3)

コードされるアミノ酸配列：(126aa)

10

20

30

40

50

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSSTGAVTTTSNFWVQE
KPDHLFTSLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGA
QTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTL
FQQQFC (配列番号4)

【0111】

(2) ヒト化モノクローナル抗体4G10H1L1の重鎖及び軽鎖可変領域配列

重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (4G10H1V) : (345bp)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCCGAGCTGGTGAAGC
CCGGCGCCTCCATGAAGATCTCTTGCAAGGCCAGCGGATA
CAGTTTCACTGGCTATACCATGAAGTGGGTCAAACAGGCT
CCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGGCTGATTAATCCTT
ACAACAACATCAACCAACTACAACCAGAAAGTTTCATGGGAAA
AGCAACCTTTACAGTGGACAAGAGCATTTCCACAGCCTAC
ATGGAAGTGAAGCCGGCTGACTTCAGACGATAGCGGGGGTCT
ATTTTTGTGCAAGGCTGGATTATCGCTCTTACTGGGGGCA
GGGAAGTCTGGTCACTGTCTCCGCT (配列番号5)

コードされるアミノ酸配列: (115aa)

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWVKQA
PGQGLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSI STAY
MEL SRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGT LVT VSA (配列番号
6)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (4G10L1V) : (327bp)

CAGGCTGTCTCACTCAGGAACCTTCACTGACTGTGAGCC
CAGGAGGAAGTGTCAACCTGACATGCGGAAGCTCCACCGG
AGCAGTGACCACATCCAACCTTCGCCAATTGGGTCCAGGAA
AAGCCAGGCCAGGCATTTTCGATCCCTGATCGGAGGCACAA
ACAATCGGGCTTCTTGGGTGCCCGCAAGATTCTCAGGAAG
CCTGCTGGGGGGGAAAAGCCGCTCTGACCATTAGTGGCGCT
CAGCCTGAGGACGAAGCCGAGTACTTCTGCGCTCTGTGGT
ATAGCAACCACTGGGTGTTTGGCGGGGGGAACAAAGCTGAC
TGTGCTG (配列番号7)

コードされるアミノ酸配列: (109aa)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTTSNFWVQE
KPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLLGKKAALTI SGA
QPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL (配列番号8)

【0112】

(3) ヒト化モノクローナル抗体4G10H3L3の重鎖及び軽鎖可変領域配列

重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (4G10H3V) : (345bp)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAAC
CCGGCGCCTCAGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGGTA
CAGTTTCACTGGATATACCATGAAGTGGGTCCGACAGGCC
CCTGGCCAGGGGGCTGGAGTGGATCGGCCCTGATTAACCTT
ACAACAACATCACTAACTACGCACAGAAAGTTCCAGGGGAG
AGTGACCTTTTACAGTGGACACCAGCATTTCCACAGCCTAC
ATGGAAGTGTCCCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGT
ACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAGCTATTGGGGACA
GGGCACACTGGTGAAGTGTGAGCGCA (配列番号9)

コードされるアミノ酸配列 (4G10H3V) : (115aa)

QVQLVESGAELVKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVRQA
PGQGLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSI STAY

10

20

30

40

50

M E L S R L R S D D T G V Y F C A R L D Y R S Y W G Q G T L V T V S A (配列番号 10)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (4 G 1 0 L 3 V) : (3 2 7 b p)

C A G G C T G T C G T C A C T C A G G A A C C T T C A C T G A C C G T G T C T C
C T G G C G G G A C T G T C A C C C T G A C A T G C G G C A G C T C C A C A G G
G G C C G T G A C C A C A A G T A A C T T C C C A A A T T G G G T C C A G C A G
A A G C C A G G A C A G G C T C C C C G G A G T C T G A T C G G A G G C A C C A
A C A A C A A G G C C A G C T G G A C A C C C G C A C G G T T C A G C G G C A G
C C T G C T G G G C G G C A A G G C C G C T C T G A C A A T T A G C G G A G C C
C A G C C T G A G G A C G A A G C C G A G T A C T A T T G C G C T C T G T G G T
A C T C C A A C C A C T G G G T G T T C G G C G G C G G C A C C A A G C T G A C
T G T G C T G (配列番号 11)

10

コードされるアミノ酸配列 (4 G 1 0 L 3 V) : (1 0 9 a a)

Q A V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N F P N W V Q Q
K P G Q A P R S L I G G T N N K A S W T P A R F S G S L L G G K A A L T I S G A
Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N H W V F G G G T K L T V L (配列番号 12)

[0 1 1 3]

調製例 2 : 抗 P D - 1 抗体 1 4 C 1 2 及びそのヒト化抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 の配列設計

抗 P D - 1 抗体 1 4 C 1 2 及びそのヒト化抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 の重鎖及び軽鎖のア
ミノ酸配列及びコーディングヌクレオチド配列は、中国特許公開公報第 C N 1 0 6 9 6 7
1 7 2 (A) 号におけるそれぞれ 1 4 C 1 2 及び 1 4 C 1 2 H 1 L 1 のものと同一である。

20

[0 1 1 4]

(1) 1 4 C 1 2 の重鎖及び軽鎖可変領域配列

重鎖可変領域のヌクレオチド配列 : (3 5 4 b p)

G A G G T C A A A C T G G T G G A G A G C G G C G G C G G G C T G G T G A A G C
C C G G C G G G T C A C T G A A A C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T T
C G C C T T T A G C T C C T A C G A C A T G T C A T G G G T G A G G C A G A C C
C C T G A G A A G C G C C T G G A A T G G G T C G C T A C T A T C A G C G G A G
G C G G G C G A T A C A C C T A C T A T C C T G A C T C T G T C A A A G G G A G
A T T C A C A A T T A G T C G G G A T A A C G C C A G A A A T A C T C T G T A T
C T G C A G A T G T C T A G T C T G C G G T C C G A G G A T A C A G C T C T G T
A C T A T T G T G C A A A C C G G T A C G G C G A A G C A T G G T T T G C C T A
T T G G G G A C A G G G C A C C C T G G T G A C A G T C T C T G C C (配列番号 13)

30

コードされるアミノ酸配列 : (1 1 8 a a)

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q T
P E K R L E W V A T I S G G G R Y T Y P D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y
L Q M S S L R S E D T A L Y Y C A N R Y G E A W F A Y W G Q G T L V T V S A (配
列番号 14)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 : (3 2 1 b p)

40

G A C A T T A A G A T G A C A C A G T C C C C T T C C T C A A T G T A C G C T A
G C C T G G G C G A G C G A G T G A C C T T C A C A T G C A A A G C A T C C C A
G G A C A T C A A C A C A T A C C T G T C T T G G T T T C A G C A G A A G C C A
G G C A A A A G C C C C A A G A C C C T G A T C T A C C G G G C C A A T A G A C
T G G T G G A C G G G G T C C C C A G C A G A T T C T C C G G A T C T G G C A G
T G G G C A G G A T T A C T C C C T G A C C A T C A G C T C C C T G G A G T A T
G A A G A C A T G G G C A T C T A C T A T T G C C T G C A G T A T G A T G A G T
T C C C T C T G A C C T T T G G A G C A G G C A C A A A A C T G G A A C T G A A
G (配列番号 15)

コードされるアミノ酸配列 : (1 0 7 a a)

50

DIKMTQSPSSMYASLGERTVFTCKASQDINTYLSWFQQKP
GKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFS GSGSGQDYSLTISSEY
EDMGIIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (配列番号16)

【0115】

(2) ヒト化モノクローナル抗体14C12H1L1の重鎖及び軽鎖可変領域並びに重鎖及び軽鎖配列

重鎖可変領域のヌクレオチド配列：(354bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATT
CGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCA
CCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCG
GTTCAACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTAT
CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGT
ACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGGAAGCATGGTTTGCCTA
TTGGGGGCGAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGT (配列番号17)

コードされるアミノ酸配列：(118aa)

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQA
PGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLY
LQMNSLR AEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT LVT VSS (配列番号18)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列：(321bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCATGTCCGCCCT
CTGTGGGCGACAGGGTCACTTTCACATGCCGCGCTAGTCA
GGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCA
GGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGAC
TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAG
CGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCT
GAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGT
TCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAA
G (配列番号19)

コードされるアミノ酸配列：(107aa)

DIQMTQSPSSSMSASVGDRTVFTCRASQDINTYLSWFQQKP
GKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFS GSGSGQDYTLTISSLQP
EDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (配列番号20)

14C12H1L1重鎖のDNA配列(14C12H1)：(1344bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATT
CGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCA
CCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCG
GTTCAACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTAT
CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGT
ACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGGAAGCATGGTTTGCCTA
TTGGGGGCGAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGC
ACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCA
AAAGCACCAAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGT
GAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCAACCGTGAGCTGGAAT
AGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTG

TGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGACCCAGACCTACATC
TGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTG
TCCCCCCTGTCTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGGCCCTAGC
GTCTTCTCTTTCTCTCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGA
TCAGCAGAACCCTGAAGTCACTGTGTGTCGTGGATGT
CAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTC
GATGGCGTTCGAGGTGCACAACGCCAAACCAAGCCCAGGG
AGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT
GACAGTCTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTTG
AGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCC
CCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACC
AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTT
ATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACA
GCCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCTCCTGTCCTCGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG
ACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAG
CGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAA
AGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA A (配列番号 21)

10

20

コードされるアミノ酸配列：(448aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQA
PGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLY
LQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT LVT VSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTV P SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCP PCPAP ELLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTP E VTCV VVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号 22)

30

40

14C12H1L1 軽鎖の DNA 配列 (14C12L1) : (642bp)

GACATT CAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCATGTCCGCCCT
CTGTGGGCGACAGGGTCACCTT CACATGCCGCGCTAGTCA
GGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAAGCCA
GGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGAC
TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTT CAGTGGCTCAGGGAG
CGGACAGGACTACA CTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCT
GAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGT
TCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAA ACTGGAGCTGAA
GCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCA TTTTCTCCCCCT
TCTGACGAACAGCTGAAATCAGGGCACAGCCAGCGTGGTCT
GTCTGCTGAACAATTTCTACCCCTAGAGAGGGCAAAAGTGCA
GTGGAAAGGT CGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAG
GAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATT
CCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA
GAAGCACAAAGTGATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGA

50

CTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (配列番号23)

コードされるアミノ酸配列：(214aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWVQQKP
GKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQP
EDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIIPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (配列番号24)

【0116】

調製例3：二機能性抗体BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)及びBiAb004(M)の配列設計

二機能性抗体BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)及びBiAb004(M)の構造パターンはMorrisonフォーマット(IgG-scFv)であり、即ち、1つのIgG抗体の2つの重鎖のC末端は、リンカー断片を介して別の抗体のscFv断片に別々に連結されている。重鎖及び軽鎖の設計のための構成要素が以下の表Aに示される。

【表1】

表A：BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)及びBiAb004(M)の配列設計

二機能性抗体	免疫グロブリン部分		リンカー断片	scFv部分
	重鎖	軽鎖		
BiAb001(M)	14C12H1	14C12L1	リンカー1	4G10H1V(M)－リンカー2－4G10L1V(M)
BiAb002(M)	14C12H1	14C12L1	リンカー2	4G10H1V(M)－リンカー2－4G10L1V(M)
BiAb003(M)	14C12H1	14C12L1	リンカー1	4G10H3V(M)－リンカー2－4G10L3V(M)
BiAb004(M)	14C12H1	14C12L1	リンカー2	4G10H3V(M)－リンカー2－4G10L3V(M)

上記の表Aにおいて：

リンカー1のアミノ酸配列は(GGGGS)₃(配列番号25)であり、且つ

リンカー2のアミノ酸配列は(GGGGS)₄(配列番号26)である。

【0117】

上記の表Aにおいて、BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)及びBiAb004(M)抗体のscFv断片4G10H1V(M)、4G10L1V(M)、4G10H3V(M)及び4G10L3V(M)は、それぞれ4G10H1V、4G10L1V、4G10H3V及び4G10L3Vに基づくフレームワーク領域の個々のアミノ酸における突然変異を含んでおり、これは、抗体の構造を有効に最適化し、それらの有効性を向上させた。

【0118】

(1) 4G10H1V(M)：(115aa、4G10H1Vに基づくアミノ酸配列中で突然変異の位置に下線を引いている)

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSTFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSIISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGGQGTLVTVSA (配列番号

10

20

30

40

50

41)

(2) 4G10L1V (M) : (110aa、4G10L1Vに基づくアミノ酸配列中で突然変異の位置に下線を引いている)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTTTSNFFANWVQE
KPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLLGKKAALTISGA
QPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR (配列番号42)

(3) 4G10H3V (M) : (115aa、4G10H3Vに基づくアミノ酸配列中で突然変異の位置に下線を引いている)

QVQLVESGAENVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQA
PGQCLEWIGLINPNYNNITNYAQKFQGRVTFITVDTSISTAY
MELSLRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGGQGTLVTVSA (配列番号
43)

(4) 4G10L3V (M) : (110aa、4G10L3Vに基づくアミノ酸配列中で突然変異の位置に下線を引いている)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTTTSNFFPNWVQQ
KPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGKKAALTISGA
QPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR (配列番号44)

【0119】

突然変異させた抗体からの区別のために、以後、BiAb004 (M) はこの実施例においてBiAb004 (hG1WT) とも称する。上記のBiAb004 (M) は、重鎖定常領域としてIgガンマー1鎖C領域 (アクセッション: P01857) 及び軽鎖定常領域としてIgカッパ鎖C領域 (アクセッション: P01834) を含む、「野生型」である。

【0120】

調製例4: ヒト化二機能性抗体BiAb004に基づく非可変領域アミノ酸突然変異設計

調製例3において得られたBiAb004 (hG1WT) に基づいて、重鎖中の位置234におけるロイシンからアラニンへの点突然変異 (L234A)、位置235におけるロイシンからアラニンへの点突然変異 (L235A)、及び位置237におけるグリシンからアラニンへの点突然変異 (G237A) を導入することによりBiAb004 (hG1TM) を得た。

【0121】

BiAb004 (hG1TM) 中の免疫グロブリン部分の重鎖のDNA配列: (1344bp、突然変異の位置に下線を引いている)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATT
CGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCA
CCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCG
GTTCAACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAAATCTGTAT
CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGT
ACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGGAAGCATGGTTTGCCTA
TTGGGGGGCAGGGGAACCTGGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGC
ACCAAAGGGGCCAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCA
AAAGCACCAAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGT
GAAGGACTACTTCCCTGAACCCGCTCACCGTGAGCTGGAAT
AGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTG
TGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
CACAGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCAACCCAGACCTACATC
TGTAACGTCAACCAACAAGCCCTCCAACCAAGGTGGACA
AGAAAGTGGAGCCCAAAATCCTGCGACAAGACACACACCTG

T C C C C C C T G T C C T G C T C C C G A A G C T G C T G G A G C C C C T A G C
G T C T T C C T C T T T C C T C C C A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A
T C A G C A G A A C C C C T G A A G T C A C C T G T G T C G T C G T G G A T G T
C A G C C A T G A G G A C C C C G A G G T G A A A T T C A A C T G G T A T G T C
G A T G G C G T C G A G G T G C A C A A C G C C A A A A C C A A G C C C A G G G
A G G A A C A G T A C A A C T C C A C C T A C A G G G T G G T G T C C G T G C T
G A C A G T C C T C C A C C A G G A C T G G C T G A A C G G C A A G G A G T A C
A A G T G C A A G G T G T C C A A C A A G G C T C T C C C T G C C C C C A T T G
A G A A G A C C A T C A G C A A G G C C A A A G G C C A A C C C A G G G A G C C
C C A G G T C T A T A C A C T G C C T C C C T C C A G G G A C G A A C T C A C C
A A G A A C C A G G T G T C C C T G A C C T G C C T G G T C A A G G G C T T T T
A T C C C A G C G A C A T C G C C G T C G A G T G G G A G T C C A A C G G A C A
G C C C G A G A A T A A C T A C A A G A C C A C C C C T C C T G T C C T C G A C
T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T G T A C A G C A A G C T G A C C G T G G
A C A A A A G C A G G T G G C A G C A G G G A A A C G T G T T C T C C T G C A G
C G T G A T G C A C G A A G C C C T C C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A A
A G C C T G T C C C T G A G C C C C G G C A A A (配列番号39)

【0122】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) 中の免疫グロブリン部分の重鎖のアミノ酸配列：(448aa、突然変異の位置に下線を引いている)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q A
P G K G L D W V A T I S G G G R Y T Y P D S V K G R F T I S R D N S K N N L Y
L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A N R Y G E A W F A Y W G Q G T L V T V S S A S
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A A G A P S
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
S L S L S P G K (配列番号40)

【0123】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) 及び B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) は、軽鎖の同じ D N A 配列及び同じコードされるアミノ酸配列を共有する。特有の配列を調製例3に示す。

【0124】

実験例1：受容体 F c γ R I に対する B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) 及び B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) の親和性アッセイ

C D 6 4 としても公知の F c 受容体 F c γ R I は、I g G 抗体の F c 断片に結合することができ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (A D C C) に関与する。F c 受容体に対する治療用モノクローナル抗体の結合能力は抗体の安全性及び有効性に影響を及ぼす。

【0125】

F o r t e b i o O c t e t システムを使用して F c γ R I に対する B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) 及び B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) の親和性定数をこの実験において測定して、抗体の潜在的な A D C C 及び A D C P 活性を評価した。

【0126】

F o r t e b i o O c t e t システムにより F c γ R I に対する抗体の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される：試料希釈緩衝液は、P B S、0.02%の T w e e n - 2 0 及び 0.1%の B S A、p H 7.4 の溶液であった。1 μ g / m L の F c γ R I 溶液 (S i n o b i o) を H I S 1 K センサーに加えて、センサー表面上

にFcγRIを50s間固定化した。3.12～50nM（段階2倍希釈）の抗体濃度を用いて緩衝液中でFcγRIに対する抗体の会合定数及び解離定数の両方を決定した。抗原が固定化されたセンサーを緩衝液中で60s間平衡化し、次に抗体に対するセンサー上の固定化されたFcγRIの結合を120s間決定し；抗体からのFcγRIの解離を120sで決定した。温度は30℃、周波数は0.3Hzであった。データをフィッティングさせ、1：1モデルを用いて分析して抗体についてのFcγRIに対する親和性定数を得た。

【0127】

FcγRIに対するBiAb004（hG1TM）及びBiAb004（hG1WT）の親和性定数アッセイの結果を以下の表1並びに図1及び図2に示す。

【表2】

表1： FcγRIに対するBiAb004（hG1WT）及びBiAb004（hG1TM）の結合についての速度論

試料ID	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	S E (k _{on})	k _{dis} (1/s)	S E (k _{dis})	R _{max} (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	5.92E-09	3.06E+05	8.35E+03	1.81E-03	5.75E-05	0.53～0.62

BiAb004（hG1WT）は、5.92E-09Mの親和性定数でFcγRIに結合したが；BiAb004（hG1TM）について、対応するデータは得られず、FcγRIに対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、FcγRIに対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

【0128】

FcγRIに対するBiAb004（hG1TM）の結合活性はBiAb004（hG1WT）と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

【0129】

実験例2：FcγRIIIa__V158に対するBiAb004（hG1WT）及びBiAb004（hG1TM）の親和性定数アッセイ

Fc受容体FcγRIIIa__V158（CD16a__V158としても公知）は、IgG抗体のFc断片に結合し、ADCC効果を媒介することができる。

【0130】

Fortebio Octetシステムを使用してFcγRIIIa__V158に対するBiAb004（hG1WT）及びBiAb004（hG1TM）の親和性定数をこの実験において測定して、抗体のADCC活性を評価した。

【0131】

Fortebio OctetシステムによりFcγRIIIa__V158に対する抗体の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される：試料希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であった。5μg/mLのFcγRIIIa__V158をHIS1Kセンサー上に120s間固定化した。センサーを緩衝液中で60s間平衡化させ、31.25～500nM（段階2倍希釈）の濃度において抗体に対するセンサー上の固定化されたFcγRIIIa__V158の結合を60s間決定した。抗体を緩衝液中で60s間解離させた。センサーを10mMのグリシン（pH1.5）中で4回、各5s間再生させた。温度は30℃、周波数は0.3Hzであった。データを1：1モデルへのフィッティングにより分析して親和性

10

20

30

40

50

定数を得た。

【0132】

FcγRIIIa__V158に対するBiAb004 (hG1TM) 及びBiAb004 (hG1WT) の親和性定数アッセイの結果を以下の表2並びに図3及び図4に示す。

【表3】

表2: FcγRIIIa__V158に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の結合についての速度論

試料ID	K _D (M)	k _{on} (1/ Ms)	S E (k on)	k _{dis} (1/s)	S E (k dis)	R _{max} (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	1.77E-07	1.21E+05	1.64E+04	2.14E-02	3.71E-03	1.56~1.61

BiAb004 (hG1WT) は1.77E-07Mの親和性定数でFcγRIIIa__V158に結合したが; BiAb004 (hG1TM) について、対応するデータは得られず、FcγRIIIa__V158に対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、FcγRIIIa__V158に対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

【0133】

FcγRIIIa__V158に対するBiAb004 (hG1TM) の結合活性は、BiAb004 (hG1WT) と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

【0134】

実験例3: FcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数アッセイ

Fc受容体FcγRIIIa__F158 (CD16a__F158としても公知) は、IgG抗体のFc断片に結合し、ADCC効果を媒介することができる。

【0135】

Fortebio Octetシステムを使用してFcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数をこの実験において測定して、抗体のADCC活性を評価した。

【0136】

Fortebio OctetシステムによりFcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される: 試料希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であった。5µg/mLのFcγRIIIa__F158をHIS1Kセンサー上に120s間固定化した。センサーを緩衝液中で60s間平衡化させ、31.25~500nM (段階2倍希釈) の濃度において抗体に対するセンサー上の固定化されたFcγRIIIa__F158の結合を60s間決定した。抗体を緩衝液中で60s間解離させた。センサーを10mMのグリシン (pH 1.5) 中で4回、各5s間再生させた。温度は30℃、周波数は0.3Hzであった。データを1:1モデルへのフィッティングにより分析して親和性定数を得た。

【0137】

FcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1TM) 及びBiAb004 (hG1WT) の親和性定数アッセイの結果を以下の表3並びに図5及び図6に示す。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3 : FcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の結合についての速度論

試料ID	K _D (M)	k _{on} (1/ Ms)	S E (k _{on})	k _{dis} (1/s)	S E (k _{dis})	R _{max} (n m)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	2.21E-07	1.12E+05	1.39E+04	2.47E-02	3.43E-03	0.39~0.64

10

BiAb004 (hG1WT) は2.21E-07Mの親和性定数でFcγRIIIa__F158に結合したが；BiAb004 (hG1TM) について、対応するデータは得られず、FcγRIIIa__F158に対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、FcγRIIIa__F158に対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

【0138】

FcγRIIIa__F158に対するBiAb004 (hG1TM) の結合活性は、BiAb004 (hG1WT) と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

20

【0139】

実験例4：FcγRIIIa__H131に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数アッセイ

Fc受容体FcγRIIIa__H131 (CD32a__H131としても公知) は、IgG抗体のFc断片に結合し、ADCC効果を媒介することができる。

【0140】

Fortebio Octetシステムを使用してFcγRIIIa__H131に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数をこの実験において測定して、抗体のADCC活性を評価した。

30

【0141】

Fortebio OctetシステムによりFcγRIIIa__H131に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される：固定化希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であり、アナライト希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20、0.02%のカゼイン及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であった。5μg/mLのFcγRIIIa__H131を約1.0nmの固定化高さにおいてNTAセンサー上に固定化した。センサーをPBS、0.02%のTween-20、0.02%のカゼイン及び0.1%のBSA、pH 7.4の緩衝液中、300sのブロッキングで平衡化させ、12.5~200nM (段階2倍希釈) の濃度において抗体に対するセンサー上の固定化されたFcγRIIIa__H131の結合を60s間決定した。抗体を緩衝液中で60s間解離させた。センサーを10mMのグリシン (pH 1.7) 及び10nMの硫酸ニッケル中で再生させた。温度は30℃、周波数は0.6Hzであった。データを1:1モデルへのフィッティングにより分析して親和性定数を得た。

40

【0142】

FcγRIIIa__H131に対するBiAb004 (hG1TM) 及びBiAb004 (hG1WT) の親和性定数アッセイの結果を以下の表4並びに図7及び図8に示す。

50

【表 5】

表 4 : FcγRIIa__H131 に対する BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の結合についての速度論

試料 ID	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	$S E$ (kon)	k_{dis} (1/s)	$S E$ (kdis)	R_{max} (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	$2.22E-08$	$3.83E+05$	$4.03E+04$	$8.49E-03$	$7.44E-04$	$0.96 \sim 1.63$

BiAb004 (hG1WT) は $2.22E-08$ M の親和性定数で FcγRIIa__H131 に結合したが; BiAb004 (hG1TM) について、対応するデータは得られず、FcγRIIa__H131 に対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、FcγRIIa__H131 に対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

【0143】

FcγRIIa__H131 に対する BiAb004 (hG1TM) の結合活性は、BiAb004 (hG1WT) と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

【0144】

実験例 5 : FcγRIIa__R131 に対する BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の親和性定数アッセイ

Fc 受容体 FcγRIIa__R131 (CD32a__R131 としても公知) は、IgG 抗体の Fc 断片に結合し、ADCC 効果を媒介することができる。

【0145】

Fortebio Octet システムを使用して FcγRIIa__R131 に対する BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の親和性定数をこの実験において測定して、抗体の ADCC 活性を評価した。

【0146】

Fortebio Octet システムにより BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される: 固定化希釈緩衝液は、PBS、0.02% の Tween-20 及び 0.1% の BSA、pH 7.4 の溶液であり、アナライト希釈緩衝液は、PBS、0.02% の Tween-20、0.02% の カゼイン 及び 0.1% の BSA、pH 7.4 の溶液であった。5 μg/mL の FcγRIIa__R131 を約 1.0 nm の固定化高さにおいて NTA センサー上に固定化した。センサーを PBS、0.02% の Tween-20、0.02% の カゼイン 及び 0.1% の BSA、pH 7.4 の緩衝液中、300 s のブロッキングで平衡化させ、12.5 ~ 200 nM (段階 2 倍希釈) の濃度において抗体に対するセンサー上の固定化された FcγRIIa__R131 の結合を 60 s 間決定した。抗体を緩衝液中で 60 s 間解離させた。センサーを 10 mM のグリシン (pH 1.7) 及び 10 nM の硫酸ニッケル中で再生させた。温度は 30℃、周波数は 0.6 Hz であった。データを 1:1 モデルへのフィッティングにより分析して親和性定数を得た。

【0147】

FcγRIIa__R131 に対する BiAb004 (hG1TM) 及び BiAb004 (hG1WT) の親和性定数アッセイの結果を以下の表 5 並びに図 9 及び図 10 に示す。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5 : FcγRIIa__R131に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の結合についての速度論

試料ID	K_D (M)	k_{on} (1/ Ms)	$S E$ (k_{on})	k_{dis} (1/s)	$S E$ (k dis)	R_{max} (n m)
BiAb004 (hG1TM)	$4.20E-08$	$3.72E+05$	$4.19E+04$	$1.56E-02$	$8.99E-04$	$0.16 \sim 0.36$
BiAb004 (hG1WT)	$1.43E-08$	$3.58E+05$	$3.13E+04$	$5.10E-03$	$5.87E-04$	$0.66 \sim 1.34$

10

BiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の両方はそれぞれ $1.43E-08M$ 及び $4.20E-08M$ の親和性定数で FcγRIIa__R131 に結合することを結果は示した。

【0148】

BiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の両方は FcγRIIa__R131 に対する結合活性を有することを結果は示唆する。しかしながら、BiAb004 (hG1WT) は、BiAb004 (hG1TM) よりも強い結合シグナル及びそのためより高い親和性を有することを図9及び図10における結果は示した。

20

【0149】

実験例6：FcγRIIbに対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数アッセイ

Fc受容体FcγRIIb (CD32bとしても公知) は、IgG抗体のFc断片に結合し、免疫細胞の機能を下方調節し、免疫細胞の活性化及び増殖を阻害し、且つサイトカインの分泌を阻害することができる。

【0150】

Fortebio Octetシステムを使用してFcγRIIbに対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数をこの実験において測定して、Fc受容体に対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の結合能力を評価した。

30

【0151】

Fortebio OctetシステムによりFcγRIIbに対するBiAb004 (hG1WT) 及びBiAb004 (hG1TM) の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される：固定化希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であり、アナライト希釈緩衝液は、PBS、0.02%のTween-20、0.02%のカゼイン及び0.1%のBSA、pH 7.4の溶液であった。5μg/mLのFcγRIIbを約1.0nmの固定化高さにおいてNTAセンサー上に固定化した。センサーをPBS、0.02%のTween-20、0.02%のカゼイン及び0.1%のBSA、pH 7.4の緩衝液中、300sのブロッキングで平衡化させ、12.5~200nM (段階2倍希釈) の濃度において抗体に対するセンサー上の固定化されたFcγRIIbの結合を60s間決定した。抗体を緩衝液中で60s間解離させた。センサーを10mMのグリシン (pH 1.7) 及び10nMの硫酸ニッケル中で再生させた。温度は30℃、周波数は0.6Hzであった。データを1:1モデルへのフィッティングにより分析して親和性定数を得た。

40

【0152】

FcγRIIbに対するBiAb004 (hG1TM) 及びBiAb004 (hG1WT) の親和性定数アッセイの結果を以下の表6並びに図11及び図12に示す。

50

【表 7】

表 6 : $Fc\gamma RIIb$ に対する $BiAb004$ (hG1WT) 及び $BiAb004$ (hG1TM) の結合についての速度論

試料 ID	K_D (M)	k_{on} (1/ Ms)	$S E$ (k_{on})	k_{dis} (1/s)	$S E$ (k dis)	R_{max} (nm)
$BiAb004$ (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
$BiAb004$ (hG1WT)	5.61 $E-08$	$2.07E+$ 05	$1.54E$ $+04$	$1.16E$ -02	$4.33E-$ 04	$0.68\sim$ 0.83

10

$BiAb004$ (hG1WT) は $5.61E-08M$ の親和性定数で $Fc\gamma RIIb$ に結合したが; $BiAb004$ (hG1TM) について、対応するデータは得られず、 $Fc\gamma RIIb$ に対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、 $Fc\gamma RIIb$ に対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

$Fc\gamma RIIb$ に対する $BiAb004$ (hG1TM) の結合活性は、 $BiAb004$ (hG1WT) と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

【0153】

実験例 7 : $C1q$ に対する $BiAb004$ (hG1WT) 及び $BiAb004$ (hG1TM) の親和性アッセイ

20

血清補体 $C1q$ は、 IgG 抗体の Fc 断片に結合し、 CDC 効果を媒介することができる。 $C1q$ に対する治療用モノクローナル抗体の結合は、抗体の安全性及び有効性に影響を及ぼす。

【0154】

Fortebio Octet システムを使用して $C1q$ に対する $BiAb004$ (hG1WT) 及び $BiAb004$ (hG1TM) の親和性定数をこの実験において測定して、抗体の CDC 活性を評価した。この実験例において、抗 $PDL1$ 抗体 $5C10H2L2-IgG1mt$ を対照として使用し、その調製は PCT 国際公開第 2017148424 (A1) 号パンフレットに記載される。

30

【0155】

Fortebio Octet システムにより $C1q$ に対する抗体の親和性定数を決定する方法は簡単には以下のように記載される：試料希釈緩衝液は、 PBS 、 0.02% の $Tween-20$ 及び 0.1% の BSA 、 $pH 7.4$ の溶液であった。 $50\mu g/mL$ の抗体を約 $2.0nm$ の固定化高さにおいて $FAB2G$ センサー上に固定化した。センサーを緩衝液中でブロッキングのために $60s$ 間平衡化させ、 $1.25\sim 20nM$ (段階 2 倍希釈) の濃度において抗原 $C1q$ に対するセンサー上の固定化された抗体の結合を $60s$ 間決定した。抗原及び抗体を緩衝液中で $60s$ 間解離させた。センサーを $10mM$ のグリシン ($pH 1.7$) 中で 4 回、各 $5s$ 間再生させた。試料プレートの振盪速度は $1000rpm$ 、温度は $30^\circ C$ 、周波数は $0.6Hz$ であった。データを 1:1 モデルへのフ

40

ィッティングにより分析して親和性定数を得た。データ取得ソフトウェアは *Fortebio Data Acquisition 7.0* であり、データ解析ソフトウェアは *Fortebio Data Analysis 7.0* であった。

【0156】

$C1q$ に対する $BiAb004$ (hG1TM)、 $BiAb004$ (hG1WT) 及び $5C10H2L2-IgG1mt$ の親和性定数アッセイの結果を以下の表 7 並びに図 13、図 14 及び図 15 に示す。

50

【表 8】

表 7 : C1q に対する BiAb004 (hG1WT)、BiAb004 (hG1TM) 及び 5C10H2L2-IgG1mt の結合についての速度論

試料 ID	K_D (M)	k_{on} (1/ Ms)	$S E (k_{on})$	k_{dis} (1/s)	$S E (k_{dis})$	R_{max} (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	2.53 E-09	2.05E+ 06	2.10E +05	5.17E -03	5.81E- 04	0.05~ 0.23
5C10H2L2-IgG1mt	4.43 E-09	2.38E+ 06	4.21E +05	1.05E -02	1.10E- 03	0.19~ 0.26

BiAb004 (hG1WT) は $2.53E-09M$ の親和性定数で C1q に結合したが; BiAb004 (hG1TM) について、対応するデータは得られず、C1q に対する結合シグナルは検出されなかったか、又は極めて弱いシグナルが検出され、C1q に対する結合がないことを指し示すことを結果は示した。

【0157】

C1q に対する BiAb004 (hG1TM) の結合活性は、BiAb004 (hG1WT) と比較して有効に排除されることを結果は示唆する。

【0158】

実験例 8 : CTLA4 及び PD-1 抗原を発現する 293T-CTLA4-PD1 細胞における BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の ADCC 活性アッセイ

ADCC 効果は、殺傷活性を有するエフェクター免疫細胞が、それらの表面上に発現された Fc 受容体 (FcR) を通じて標的細胞の抗原に結合した抗体の Fc 断片を認識し、標的細胞を直接的に殺傷することを指す。抗 CTLA4/抗 PD-1 二機能性抗体 BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の ADCC 効果を試験するために、本発明者らは、PD-1 及び CTLA4 抗原を発現する 293T-CTLA4-PD1 細胞及び初代 PBMC の共培養システムを構築して、抗体の ADCC 活性を試験した。

【0159】

CTLA4 及び PD-1 抗原を発現する 293T-CTLA4-PD1 細胞における BiAb004 (hG1WT) 及び BiAb004 (hG1TM) の ADCC 活性アッセイの方法は以下の通りである：

Ficoll 末梢血単核細胞単離の使用説明書にしたがって正常なヒト PBMC を単離した。単離された PBMC を RPMI-1640 完全培地に再懸濁し、AO/PI を用いて染色し、カウントし、凍結した。実験の 1 日前に、PBMC を解凍し、カウントし、生存を決定した。5% の CO_2 及び 37℃ において二酸化炭素インキュベーター中で細胞を overnight インキュベートした。実験の日に、293T-CTLA4-PD1 細胞及び PBMC を収集し、800rpm 又は 1200rpm で 5 分間遠心分離し、RPMI-1640 (1% の FBS を含有する；以下、培地と称する) に再懸濁し、2 回洗浄した。細胞をカウントし、生存を決定した。培地を使用して細胞密度を適切な範囲に調整した。実験の設計にしたがって 100 μL の 293T-CTLA4-PD1 細胞を $3.0E+04$ 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに加えた。50 μL の抗体を加え、細胞を室温で 1 h プレインキュベートし；1 h 後に、50 μL の PBMC を $9.0E+05$ 細胞/ウェルで加え、混合物をよく混合し、5% の CO_2 において二酸化炭素インキュベーター中 37℃ で 4 h

インキュベートした。細胞を $250 \times g$ で5分間遠心分離した。 $100 \mu L$ の上清を新たな96ウェル平底マイクロプレートに移した（細胞沈殿物をピペティングしない）。Cytotoxicity Detection Kitの使用説明書にしたがって $100 \mu L$ の新たに調製された反応溶液を各ウェルに加えた。細胞を暗所中室温で30分間インキュベートした。 $490 nm$ 及び $650 nm$ におけるOD値を測定した。式 $ADCC(\%) = (\text{処理群} - \text{陰性対照群}) / (\text{標的細胞における最大LDH放出} - \text{標的細胞における自発的LDH放出}) \times 100\%$ にしたがってADCCパーセンテージを各群について算出した。

【0160】

CTLA4及びPD-1抗原を発現する293T-CTLA4-PD1細胞におけるBiAb004(hG1WT)及びBiAb004(hG1TM)のADCC活性をADCCパーセンテージとして表し、結果を図16に示す。

10

【0161】

PBMC及び293T-CTLA4-PD1の混合培養系において、BiAb004(hG1TM)により誘導されるADCCパーセンテージは、同じレベルのBiAb004(hG1WT)により誘導されるものよりも有意に低いことを結果は示した。

【0162】

BiAb004(hG1TM)はADCC活性を有しないことを結果は示唆する。

【0163】

実験例9：レンバチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)によるマウスにおける結腸直腸がんMC38細胞移植片の成長阻害

20

マウスMC38細胞系はマウス結腸直腸がん細胞系である。MC38細胞系は、ヒトMSI-H/dMMR腫瘍を研究するための有用なモデルであることが実証されている(Efrimova M et al., Nat Commun., 2018; 9(1):32)。

【0164】

MC-38細胞(Shanghai Ruilu Biotech Co., Ltd.から購入)を収集し、500万細胞/mLの密度に調整し、PD-1トランスジェニックマウス(Shanghai Model Organisms Center, Inc.から購入)の右脇腹の皮下に $200 \mu L$ /マウスの体積で移植した。12匹のマウスに移植を行い、それぞれは 1×10^6 個の細胞を保有した。腫瘍体積が約 $60 \sim 150 mm^3$ に達した時に、マウスを腫瘍体積(約 $94 mm^3$ の類似した平均体積を有する)により、6匹のマウスをそれぞれ含有する2つの群、モデル群及びBiAb004(hG1TM)/レンバチニブ処置群に分けた。グループ分けの日をD0と設定した。6用量の抗体をそれぞれD0、D4、D7、D10、D13及びD17に腹腔内に投与し；レンバチニブを経口胃管栄養法により1日毎に20日間投与した。腫瘍体積をノギスにより測定した。グループ分け後にノギスを使用して腫瘍寸法を週毎に2回測定し、式 $TV = 0.5 \times a \times b^2$ (aは腫瘍の最長の直径であり、bは腫瘍の最短の直径であり、TVは腫瘍の体積である)にしたがって腫瘍体積を算出した。特有のプロトコルを表8に示す。

30

【表9】

表8：研究設計

群	動物の数	モデルの確立	レジメン
モデル群	6	MC-38細胞を100万細胞/200 μL /マウスの用量で皮下に移植した。	1mg/kgの抗HEL抗体(即ち、アイソタイプ対照抗体)を計6用量で週毎に2回腹腔内に注射した。
BiAb004(hG1TM)+レンバチニブ群	6		1.33mg/kgのBiAb004(hG1TM)を計6用量で週毎に2回腹腔内に注射し；5mg/kgのレンバチニブを1日1回で20用量、経口胃管栄養法により投与した。

40

50

この実験におけるアイソタイプ対照、ヒト抗鶏卵リゾチーム I g G（抗 H E L 抗体、又は h I g G と略記されるヒト I g G）の配列は、「Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies」というタイトルで Acierno et al. により報告された研究（Acierno et al., J Mol Biol., 2007; 374(1):130-46）における F a b F 1 0 . 6 . 6 配列の可変領域配列に由来する。

【0165】

実験結果を図 17 に示す。

【0166】

レンバチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4（h G 1 T M）は M C 3 8 腫瘍の成長を有意に阻害し；レンバチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4（h G 1 T M）は M S I - H / d M M R 表現型の直腸及び／又は結腸がんに対して有意に有効性を実証したことを結果は示した。

【0167】

実験例 10：C 5 7 B L / 6 - h P D 1 / h P D L 1 / h C D 7 3 マウス結腸がん M C 3 8 - h P D L 1 / h C D 7 3 皮下移植片腫瘍モデルにおける B i A b 0 0 4（h G 1 T M）の薬力学的評価

雌 C 5 7 B L / 6 - h P D 1 / h P D L 1 / h C D 7 3 マウス（Nanjing GemPharmatech Co., Ltd. から購入）を 8 つの群に分け、右前肢の皮下に結腸がん M C 3 8 - h P D L 1 / h C D 7 3 細胞（Nanjing GemPharmatech Co., Ltd. から購入）（ 2×10^6 細胞 / $100 \mu\text{L}$ / マウス）を移植した。移植の日を D 0 と定義した。投薬体積は体重にしたがって調整し、マウスの体重 1 g 当たり $10 \mu\text{L}$ とした。アイソタイプ対照抗体（調製及び供給元は実験例 9 のものと同じである）又は B i A b 0 0 4（h G 1 T M）を腹腔内に週毎に 2 回で 3 週間、計 6 用量で投与した。腫瘍を実験中に連続的に測定し、以下の式：腫瘍体積（ mm^3 ）=（腫瘍長さ ×（腫瘍幅）²）／2 として体積を算出した。

【0168】

結果を図 18 及び以下の表 9 に示す。

【表 10】

表 9：プロトコール及びグループ分け

群	用量（ mg / kg ）	経路	頻度	サイクル
アイソタイプ対照	10	腹腔内注射	週毎に 2 回で 計 3 週間	計 6 用量
B i A b 0 0 4（h G 1 T M）	1			

B i A b 0 0 4（h G 1 T M）群における腫瘍体積の増加はアイソタイプ対照抗体群と比べて阻害されたことを結果は示し、B i A b 0 0 4（h G 1 T M）はマウス M C 3 8 細胞の増殖を有意に阻害し、結腸がん及び／又は直腸がんを有効に治療できることを指し示した。

【0169】

実験例 11：C H O - K 1 - P D 1 における B i A b 0 0 4（h G 1 W T）及び B i A b 0 0 4（h G 1 T M）の抗体媒介性貪食活性の研究

Zhang et al.（Zhang T et al, Cancer Immunol Immunother., 2018; 67(7):1079-1090.）及び Dahan et al.（Dahan R et al., Cancer cell, 2015, 28(3):285-95.）は、F c 受容体に対する、免疫チェックポイント、例えば P D - 1 及び C T L A - 4 を標的化する抗体の F c 断片の結合は、抗体依存性細胞貪食（A D C P）が免疫細胞損傷に繋がる重要な機序である F c 依存性エフェクター機能誘導性免疫細胞損傷に可能性としては起因して、抗体媒介性抗がん活性に負に影響することを報告した。

【0170】

B i A b 0 0 4（h G 1 T M）の A D C P 活性を試験するために、マウスマクロファーク

ジをエフェクター細胞として使用し、対応する抗原を過剰発現する細胞系を標的細胞として使用した。細胞により媒介されるADCP効果を試験した。C57BL/6マウス（Guangdong Medical Laboratory Animal Centerから購入）の大腿骨髄を最初に無菌的に収集し、赤血球溶解緩衝液により氷上で5分間溶解させた。DMEM完全培地（10%のFBSを含有する）を用いて溶解を終了させ、溶解液を1000rpmで遠心分離し、2回洗浄した。細胞ペレットを10mLのDMEM完全培地に再懸濁し、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）を100ng/mLの作用濃度で加えた。誘導のために細胞培養チャンバー中37℃及び5%のCO₂で細胞を7日間培養した。3及び5日目に培地の半分を交換し、M-CSFを加えた。細胞の誘導を7日目に完了した。0.25%のトリプシンを用いて細胞を消化させた。マクロファージを収集し、170×gで5分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞をDMEM完全培地に懸濁し、カウントした。細胞を適切な密度に調整し、更なる使用のために無菌EPチューブに充填した。

【0171】

対数期のCHO-K1-CTLA4-PD1細胞（Akeso Biopharma, Inc.により構築された、ヒトCTLA4及びPD1抗原の両方を過剰発現するCHO-K1細胞に基づく細胞系）を収集し、170×gで5分間遠心分離し、PBSを用いて洗浄し、再懸濁し、カウントし、生存を決定した。PBSを用いてカルボキシフルオレセインジアセテートクシンイミジルエステル（CFSE）を2.5μMに希釈し、細胞を再懸濁した（染色密度：1000万細胞/mL）。細胞を細胞インキュベーター中で20分間インキュベートした。6mLのDMEM完全培地を加えて染色を停止させた。細胞を170×gで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。1mLのDMEM完全培地を再懸濁のために加えた。細胞をインキュベーター中で10分間インキュベートし、実験密度に調整した。細胞をCHO-K1-PD1-CTLA4-CFSEとしてコード化した。試験抗体をDMEM完全培地中に希釈した。アイソタイプ対照抗体抗HEL抗体及び培地をアイソタイプ対照群及びブランク対照群として使用した。研究設計にしたがって、希釈された抗体及びCHO-K1-PD1-CTLA4-CFSE細胞を、マクロファージを含有する1.5mL EPチューブに加えた（最終体積は100μLであり、エフェクター対標的比は50,000:150,000であり、抗体の作用濃度は50、5及び0.5nMであった）。混合物を再懸濁し、均一に混合し、インキュベーター中37℃で2hインキュベートした。1%のウシ血清アルブミン（BSA）を含有する800μLのPBSを室温で各チューブに加えた。混合物を1200×gで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。800μLの1%のPBSAを用いて細胞を1回洗浄した。APC抗マウス/ヒトCD11b抗体（Biolegend、商品番号：101212）を1%のPBSAを用いて400倍に希釈し、対応する試料に100μL/試料で加えた。混合物をよく混合し、氷上で30分間インキュベートし、800μLの1%のPBSAを用いて1回洗浄し、1200×gで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。200μLの1%のPBSAを各チューブに加えて細胞を再懸濁した。細胞をローディングチューブに移し、BD FACSCaliburフローサイトメーターにより分析した。系中のマクロファージはAPC⁺陽性であり、貪食に参与するマクロファージはAPC及びCFSE二重陽性であった。APC陽性細胞の数に対する二重陽性細胞の数の比として貪食率を決定し、抗体媒介性ADCP活性を評価した。

【0172】

P%として表される各群のADCP活性を以下のように算出した：

【数1】

$$P\% = \frac{\text{貪食に参与するマクロファージの数}}{\text{マクロファージの総数}} \times 100\%$$

結果を図19に示す。

【0173】

貪食活性の媒介についての抗体検証システムにおいて、B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)により媒介されるマクロファージによるC H O - K 1 - P D 1 - C T L A 4細胞の貪食活性は、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T)と比較してアイソタイプ対照抗体抗H E L抗体のものと有意な差異を有しないことを結果は示し、B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)はA D C P活性を有しないことを指し示した。

【0174】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)により導入されたアミノ酸突然変異はA D C P効果を有効に排除することができ、驚くべき技術的效果が得られることを結果は示唆する。

【0175】

実験例12：B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)によるヒト胃がんKATO III細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus試薬の使用説明書にしたがってP B M Cを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたP B M Cをカウントし、凍結した。Raji-PDL1及びKATO III細胞 (Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bankから購入)をDMEM + 10% FBS完全培地中で培養した。P B M Cを解凍し、0.5 μ g/mLのS E Bを用いて2日間活性化させた。実験の日に、2 μ g/mLのミトマイシンC (MMC)を用いてRaji-PDL1細胞を1h処理した。S E B活性化P B M C及びMMC処理Raji-PDL1細胞を収集し、P B Sを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びP B M C細胞を96ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のKATO III細胞を収集し、96ウェルプレート上に 5×10^4 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のCO₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってI L - 2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0176】

結果を図20に示す。

【0177】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)は、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T)と比較して有意に増加したI L - 2の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト胃がん細胞KATO IIIに対する免疫細胞の免疫応答をより有意に増強し、そのためB i A b 0 0 4 (h G 1 T M)は胃がんを治療するために有望であることを結果は示した。

【0178】

実験例13：B i A b 0 0 4 (h G 1 T M)によるヒト子宮頸がんH e l a細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus試薬の使用説明書にしたがってP B M Cを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたP B M Cをカウントし、凍結した。Raji-PDL1及びH e l a細胞 (Chinese Academy of Sciences Cell Bankから購入)をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養した。P B M Cを解凍し、0.5 μ g/mLのS E Bを用いて2日間活性化させた。実験の日に、2 μ g/mLのMMCを用いてRaji-PDL1細胞を1h処理した。S E B活性化P B M C及びMMC処理Raji-PDL1細胞を収集し、P B Sを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びP B M C細胞を96ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のH e l a細胞を収集し、96ウェルプレート上に 5×10^4 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のCO₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってI L - 2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0179】

結果を図21に示す。

【0180】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して有意に増加した I L - 2 の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト子宮頸がん H e l a 細胞に対する免疫細胞の免疫応答をより有意に増強し、そのため B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は子宮頸がんを治療するために有望であることを結果は示した。

【 0 1 8 1 】

実験例 1 4 : B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) によるヒト T 細胞リンパ腫 J u r k a t 細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus 試薬の使用説明書にしたがって P B M C を健常なヒト末梢血から単離し、単離された P B M C をカウントし、凍結した。Raji-PDL1 及びヒト T 細胞リンパ腫 J u r k a t 細胞 (Chinese Academy of Sciences Cell Bank から購入) を RPMI 1 6 4 0 + 1 0 % FBS 完全培地中で培養した。P B M C を解凍し、0 . 5 μ g / m L の S E B を用いて 2 日間活性化させた。実験の日に、2 μ g / m L の M M C を用いて Raji-PDL1 細胞を 1 h 処理した。S E B 活性化 P B M C 及び M M C 処理 Raji-PDL1 細胞を収集し、P B S を用いて 2 回洗浄し、RPMI 1 6 4 0 + 1 0 % FBS 完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1 及び P B M C 細胞を 9 6 ウェルプレート上に $1 \times 1 0^5$ 細胞 / ウェルで播種した。対数増殖期の J u r k a t 細胞を収集し、9 6 ウェルプレート上に $1 \times 1 0^5$ 細胞 / ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5 % の C O ₂ インキュベーター中 3 7 ° C で 3 日間インキュベートした。3 日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA K I T の使用説明書にしたがって I L - 2 について試験した。この実験における培地は全て、1 0 % FBS + RPMI 1 6 4 0 であった。

【 0 1 8 2 】

結果を図 2 2 に示す。

【 0 1 8 3 】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、A D C C 及び C D C (即ち、A D C P) を排除しながら、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して有意に増加した I L - 2 の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト T 細胞リンパ腫 J u r k a t 細胞に対する免疫細胞の免疫応答を有意に増強し；抗体は B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して 1 . 3 4 n M 及び 2 0 n M の用量で同等の又はより高い薬理活性を有し、子宮頸がんを治療するために有望である。

【 0 1 8 4 】

実験例 1 5 : B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) によるヒト鼻咽頭がん C N E - 2 Z 細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus 試薬の使用説明書にしたがって P B M C を健常なヒト末梢血から単離し、単離された P B M C をカウントし、凍結した。Raji-PDL1 及び C N E - 2 Z 細胞 (GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd. から購入) を RPMI 1 6 4 0 + 1 0 % FBS 完全培地中で培養した。P B M C を解凍し、0 . 5 μ g / m L の S E B を用いて 2 日間活性化させた。実験の日に、2 μ g / m L の M M C を用いて Raji-PDL1 細胞を 1 h 処理した。S E B 活性化 P B M C 及び M M C 処理 Raji-PDL1 細胞を収集し、P B S を用いて 2 回洗浄し、RPMI 1 6 4 0 + 1 0 % FBS 完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1 及び P B M C 細胞を 9 6 ウェルプレート上に $1 \times 1 0^5$ 細胞 / ウェルで播種した。対数増殖期の C N E - 2 Z 細胞を収集し、9 6 ウェルプレート上に $3 \times 1 0^4$ 細胞 / ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5 % の C O ₂ インキュベーター中 3 7 ° C で 3 日間インキュベートした。3 日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA K I T の使用説明書にしたがって I L - 2 について試験した。この実験における培地は全て、1 0 % FBS + RPMI 1 6 4 0 であった。

【 0 1 8 5 】

結果を図 2 3 に示す。

【 0 1 8 6 】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して有意に増加した I L - 2 の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト鼻咽頭がん細胞 C N E - 2

Zに対する免疫細胞の免疫応答を同等且つ／又はより有意に増強したこと、及びBiAb004(hG1TM)は20nMにおいて有意な優位性を特に有したことを結果は示した。
【0187】

BiAb004(hG1TM)は、ADCC、CDC及びADCP効果の有効な排除に基づいてBiAb004(hG1WT)と比べてより良好な又は同等の薬理活性を有し、ヒト鼻咽頭がんを治療するための潜在能力を指し示すことを上記の結果は示した。

【0188】

実験例16: BiAb004(hG1TM)によるヒト乳がんMDA-MB-231細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus試薬の使用説明書にしたがってPBMCを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたPBMCをカウントし、凍結した。Raji-PDL1及びMDA-MB-231細胞(Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd.から購入)をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養した。PBMCを解凍し、0.5 µg/mLのSEBを用いて2日間活性化させた。実験の日に、2 µg/mLのMMCを用いてRaji-PDL1細胞を1 h処理した。SEB活性化PBMC及びMMC処理Raji-PDL1細胞を収集し、PBSを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びPBMC細胞を96ウェルプレート上に1 × 10⁵細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のMDA-MB-231細胞を収集し、96ウェルプレート上に3 × 10⁴細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のCO₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってIL-2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0189】

結果を図24に示す。

【0190】

BiAb004(hG1TM)は、BiAb004(hG1WT)と比較して有意に増加したIL-2の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト乳がんMDA-MB-231細胞に対する免疫細胞の免疫応答を同等又はより有意に増強した。

【0191】

BiAb004(hG1TM)は、ADCC、CDC及びADCP効果の有効な排除に基づいてBiAb004(hG1WT)と比べてより良好な又は同等の薬理活性を有し、ヒト乳がんを治療するための潜在能力を指し示すことを上記の結果は示した。

【0192】

実験例17: BiAb004(hG1TM)によるヒト中皮腫NCI-H2452細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus試薬の使用説明書にしたがってPBMCを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたPBMCをカウントし、凍結した。Raji-PDL1及びNCI-H2452細胞(Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bankから購入)をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養した。PBMCを解凍し、0.5 µg/mLのSEBを用いて2日間活性化させた。実験の日に、2 µg/mLのMMCを用いてRaji-PDL1細胞を1 h処理した。SEB活性化PBMC及びMMC処理Raji-PDL1細胞を収集し、PBSを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びPBMC細胞を96ウェルプレート上に1 × 10⁵細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のNCI-H2452細胞を収集し、96ウェルプレート上に3 × 10⁴細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のCO₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってIL-2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0193】

結果を図25に示す。

【0194】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して有意に増加した I L - 2 の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト中皮腫細胞 N C I - H 2 4 5 2 に対する免疫細胞の免疫応答をより有意に増強し、そのため B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は中皮腫を治療するために有望であることを結果は示した。

【0195】

実験例 18：アンロチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) によるヒト非小細胞肺がん（ヒト肺腺癌）A 5 4 9 細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus 試薬の使用説明書にしたがって P B M C を健常なヒト末梢血から単離し、単離された P B M C をカウントし、凍結した。Raji-PDL1 細胞を RPMI 1640 + 10% FBS 完全培地中で培養し、A 5 4 9 細胞を DMEM + 10% FBS 完全培地中で培養した。P B M C を解凍し、0.5 μ g/mL の S E B を用いて 2 日間活性化させた。実験の日に、2 μ g/mL の M M C を用いて Raji-PDL1 細胞を 1 h 処理した。S E B 活性化 P B M C 及び M M C 処理 Raji-PDL1 細胞を収集し、P B S を用いて 2 回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS 完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1 及び P B M C 細胞を 96 ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期の A 5 4 9 細胞 (Chinese Academy of Sciences Cell Bank から購入) を収集し、96 ウェルプレート上に 5×10^4 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5% の C O₂ インキュベーター中 37 °C で 3 日間インキュベートした。3 日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KIT の使用説明書にしたがって I L - 2 について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640 であった。

【0196】

図 26 に示されるように、塩酸アンロチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) 単剤療法、B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) 単剤療法及び塩酸アンロチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比較して有意に増加した I L - 2 の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト非小細胞肺がん（ヒト肺腺癌）A 5 4 9 細胞に対する免疫細胞の免疫応答をより有意に増強し、そのため塩酸アンロチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) はヒト非小細胞肺がん又はヒト肺腺癌を治療するために有望である。

【0197】

実験例 19：アンロチニブと組み合わせた B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) によるヒト小細胞肺がん N C I - H 4 4 6 細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-PaqueTM Plus 試薬の使用説明書にしたがって P B M C を健常なヒト末梢血から単離し、単離された P B M C をカウントし、凍結した。Raji-PDL1 及び N C I - H 4 4 6 細胞 (Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences から購入) を RPMI 1640 + 10% FBS 完全培地中で培養した。P B M C を解凍し、0.5 μ g/mL の S E B を用いて 2 日間活性化させた。実験の日に、2 μ g/mL の M M C を用いて Raji-PDL1 細胞を 1 h 処理した。S E B 活性化 P B M C 及び M M C 処理 Raji-PDL1 細胞を収集し、P B S を用いて 2 回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS 完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1 及び P B M C 細胞を 96 ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期の N C I - H 4 4 6 細胞 (Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences から購入) を収集し、96 ウェルプレート上に 8×10^4 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体及びアンロチニブを研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5% の C O₂ インキュベーター中 37 °C で 3 日間インキュベートした。3 日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KIT の使用説明書にしたがって I L - 2 について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640 であった。

【0198】

結果を図 27 に示す。

【0199】

塩酸アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)は、BiAb004(hG1MT)単剤療法、BiAb004(hG1WT)単剤療法及び塩酸アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1WT)と比較して有意に増加したIL-2の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト小細胞肺癌NCI-H446細胞に対する免疫細胞の免疫応答を有意に増強し、そのため塩酸アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)はヒト小細胞肺癌を治療するために有望である。

【0200】

実験例20：アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)によるヒト扁平細胞肺癌NCI-H226細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

Ficoll-Paque™ Plus試薬の使用説明書にしたがってPBMCを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたPBMCをカウントし、凍結した。Raji-PDL1及びNCI-H226細胞(Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciencesから購入)をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養した。PBMCを解凍し、0.5 µg/mLのSEBを用いて2日間活性化させた。実験の日に、2 µg/mLのMMCを用いてRaji-PDL1細胞を1h処理した。SEB活性化PBMC及びMMC処理Raji-PDL1細胞を収集し、PBSを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びPBMC細胞を96ウェルプレート上に1×10⁵細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のNCI-H226細胞を収集し、96ウェルプレート上に5×10⁴細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体及びアンロチニブを研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のCO₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってIL-2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0201】

結果を図28に示す。

【0202】

BiAb004(hG1TM)単剤療法は、BiAb004(hG1WT)単剤療法と比較して有意に増加したIL-2の分泌レベルにより特徴付けられるようにヒト扁平細胞肺癌NCI-H226細胞に対する免疫細胞の免疫応答をより有効且つ有意に増強した。

【0203】

塩酸アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1TM)は、BiAb004(hG1WT)単剤療法及びBiAb004(hG1TM)単剤療法と比較してヒト扁平細胞肺癌NCI-H226細胞に対する免疫細胞の免疫応答をより有意に増強し、アンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1WT)と同等の薬理活性を実証した。

【0204】

BiAb004(hG1TM)は、ADCC、CDC及びADCP効果の有効な排除に基づいてBiAb004(hG1WT)単剤療法又はアンロチニブと組み合わせたBiAb004(hG1WT)と比べてより良好な又は同等の薬理活性を示し、ヒト扁平細胞肺癌を治療するためのより良好な有効性を指し示すことを上記の結果は示した。

【0205】

実験例21：BiAb004(hG1TM)によるMSI-H/dMMR表現型のヒト結腸直腸がんSW48細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

SW48はヒト結腸直腸がん細胞系であり、MSI-H/dMMR表現型と共に同定される(Branch P et al., (1995), Cancer Res, 55(11): 2304-2309.)。BiAb004(hG1TM)によるMSI-H/dMMR表現型の腫瘍に対する増強された免疫細胞応答を検出するためにそれを使用した。

【0206】

実験において、Ficoll-Paque™ Plus試薬の使用説明書にしたがってPBMCを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたPBMCをカウントし、凍結した。Raji-PDL1細胞をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養し、SW48細胞(GuangZhou Jennio Biot

10

20

30

40

50

ech Co., Ltd.から購入)をDMEM + 10% FBS完全培地中で培養した。P B M Cを解凍し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のS E Bを用いて2日間活性化させた。実験の日に、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ のM M Cを用いてRaji-PDL1細胞を1 h処理した。S E B活性化P B M C及びM M C処理Raji-PDL1細胞を収集し、P B Sを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びP B M C細胞を96ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のS W 4 8細胞を収集し、96ウェルプレート上に 2×10^5 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のC O₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってI L - 2について試験した。この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

10

【0207】

結果を図29に示す。

【0208】

B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) 及び B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) の両方は、抗 H E L 抗体と比較して有意に増加したI L - 2の分泌レベルにより特徴付けられるようにM S I - H / d M M R 表現型のヒト結腸直腸がん細胞S W 4 8細胞に対する免疫細胞の免疫応答を有意に増強した。

【0209】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、A D C C、C D C 及び A D C P 効果の有効な排除に基づいてB i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比べてより良好な又は同等の薬理活性を有し、M S I - H / d M M R 表現型の固形腫瘍、特にM S I - H / d M M R 表現型の結腸がん及び/又は直腸がんを治療するための潜在能力を指し示すことを上記の結果は示した。

20

【0210】

実験例22: B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) によるM S I - H / d M M R 表現型のヒト結腸直腸がんS W 8 3 7細胞に対する免疫細胞の有意に増強された免疫応答

S W 8 3 7 は非M S I - H / d M M R (即ち、M S S) 表現型のヒト結腸直腸がん細胞系 (Guo J et al., Cancer Res., 2011;71(8):2978-2987.) であり、この実施例においてB i A b 0 0 4 (h G 1 T M) による非M S I - H / d M M R 表現型の腫瘍に対する増強した免疫細胞応答を検出するためにそれを使用した。

【0211】

Ficoll-Paque™ Plus試薬の使用説明書にしたがってP B M Cを健常なヒト末梢血から単離し、単離されたP B M Cをカウントし、凍結した。Raji-PDL1細胞をRPMI 1640 + 10% FBS完全培地中で培養し、S W 8 3 7細胞 (Shanghai Honsun Biological Technology Co., Ltdから購入)を10% FBS + LeibovitzのL-15 (Gibcoから購入)完全培地中で培養した。P B M Cを解凍し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のS E Bを用いて2日間活性化させた。実験の日に、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ のM M Cを用いてRaji-PDL1細胞を1 h処理した。S E B活性化P B M C及びM M C処理Raji-PDL1細胞を収集し、P B Sを用いて2回洗浄し、RPMI 1640 + 10% FBS完全培地中に再懸濁し、カウントした。Raji-PDL1及びP B M C細胞を96ウェルプレート上に 1×10^5 細胞/ウェルで播種した。対数増殖期のS W 8 3 7細胞を収集し、96ウェルプレート上に 5×10^4 細胞/ウェルで播種した。希釈された抗体を研究設計にしたがって加えた。混合物を均一に混合し、5%のC O₂インキュベーター中37℃で3日間インキュベートした。3日後に、細胞培養上清を収集し、ELISA KITの使用説明書にしたがってI L - 2について試験した。

30

40

【0212】

この実験における培地は全て、10% FBS + RPMI 1640であった。

【0213】

結果を図30に示す。

【0214】

B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) 及び B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) の両方は、抗 H E L 抗体と比較して非M S I - H / d M M R 表現型のヒト結腸直腸がん細胞S W 8 3 7細胞に

50

対する免疫細胞の免疫応答を有意に増強した。高用量群における B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) の薬理活性は、 I L - 2 の有意に増加した分泌レベルにより特徴付けられるように、 B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) のそれよりも優位であった。

【 0 2 1 5 】

B i A b 0 0 4 (h G 1 T M) は、 A D C C 、 C D C 又は A D C P 効果の有効な排除に基づいて B i A b 0 0 4 (h G 1 W T) と比べてより良好な又は同等の薬理活性を有し、非 M S I - H / d M M R 表現型の固形腫瘍、特に非 M S I - H / d M M R 表現型の結腸がん及び／又は直腸がんを治療するための潜在能力を指し示すことを上記の結果は示した。

【 0 2 1 6 】

本発明の特有の実施形態を詳細に記載したが、開示された全ての教示にしたがってそれらの詳細に対して様々な改変及び置換が為され得ること、並びにこれらの変更は全て本発明の保護範囲内であることを当業者は理解する。本発明の全範囲は、添付の請求項及びそのあらゆる均等により与えられる。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

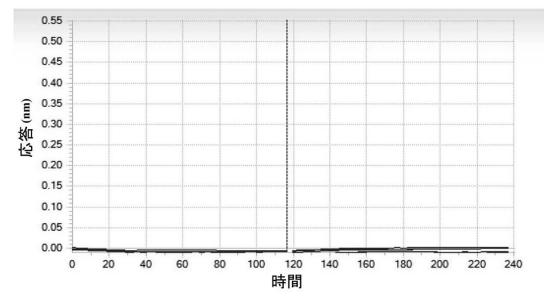


FIG. 1

【図 2】

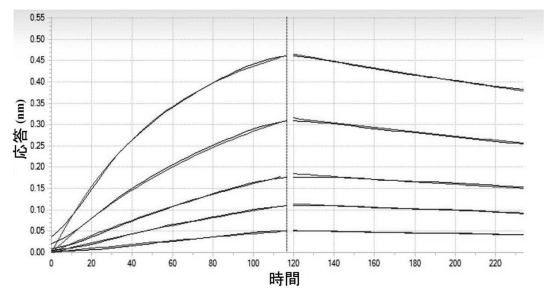


FIG. 2

10

【図 3】

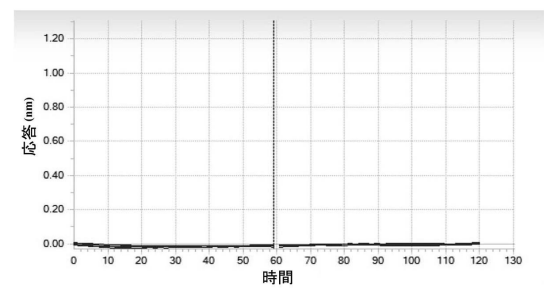


FIG. 3

【図 4】

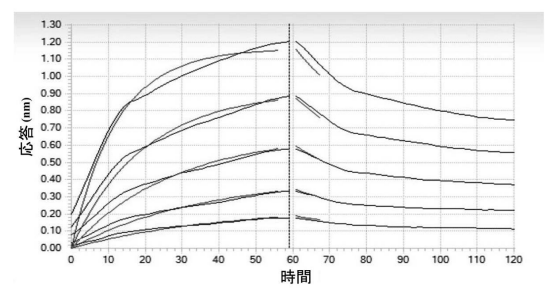


FIG. 4

20

【図 5】

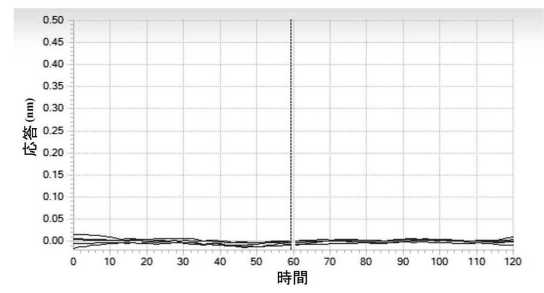


FIG. 5

【図 6】

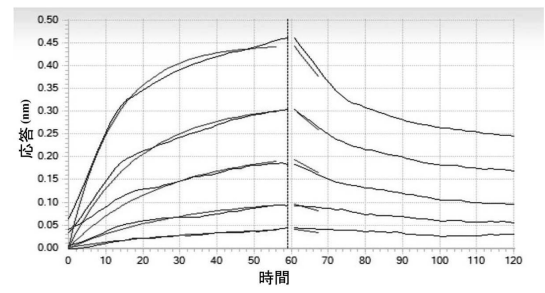


FIG. 6

30

40

50

【図 7】

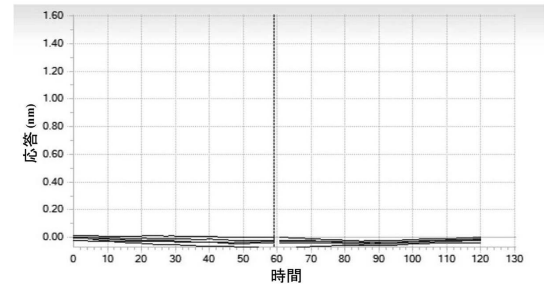


FIG. 7

【図 8】

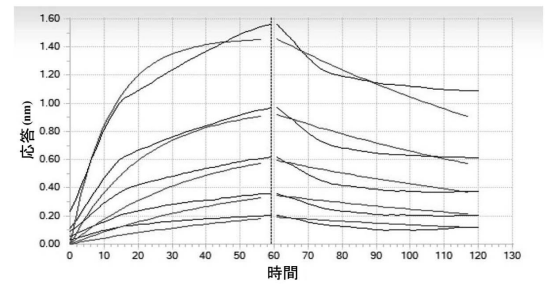


FIG. 8

10

【図 9】

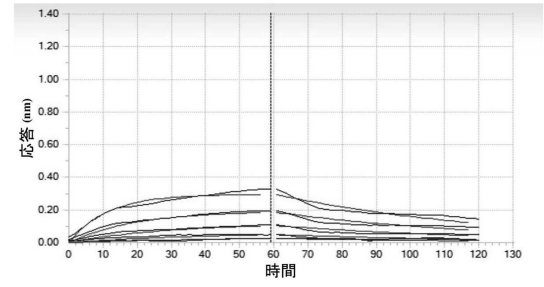


FIG. 9

【図 10】

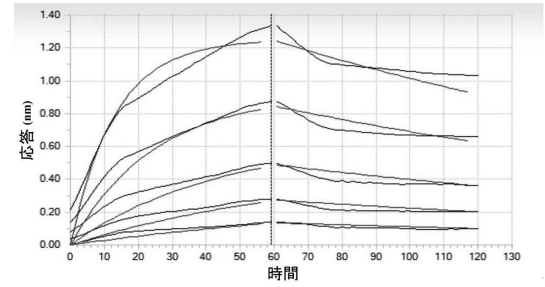


FIG. 10

20

【図 11】

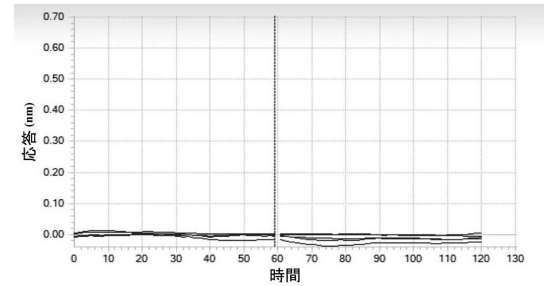


FIG. 11

【図 12】

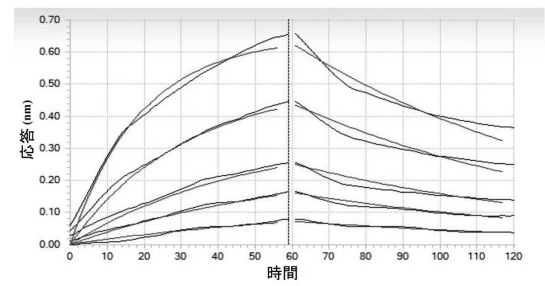


FIG. 12

30

40

50

【図 1 3】

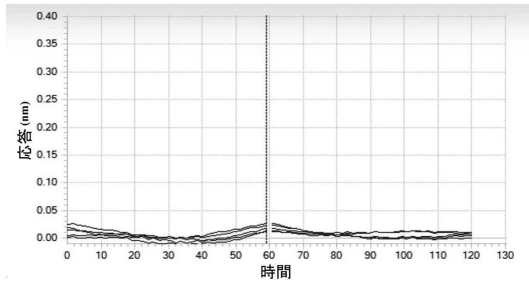


FIG. 13

【図 1 4】

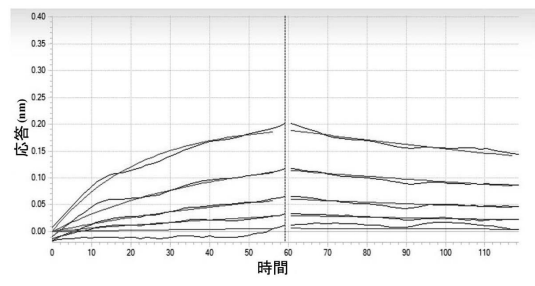


FIG. 14

10

【図 1 5】

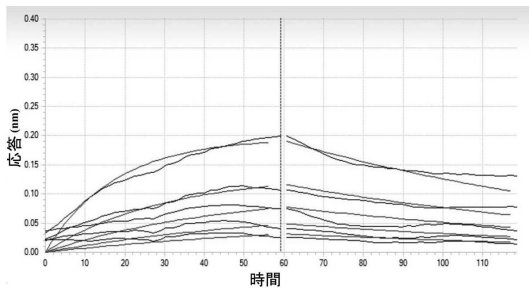


FIG. 15

【図 1 6】

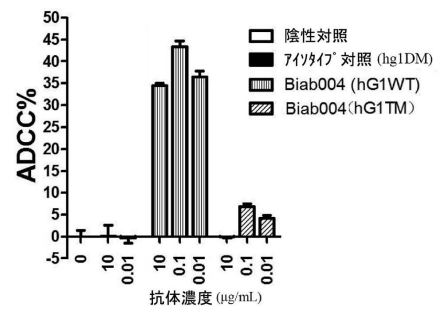


FIG. 16

20

【図 1 7】

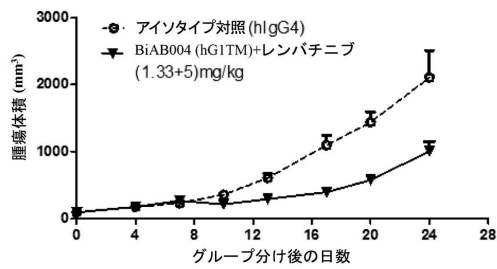


FIG. 17

【図 1 8】

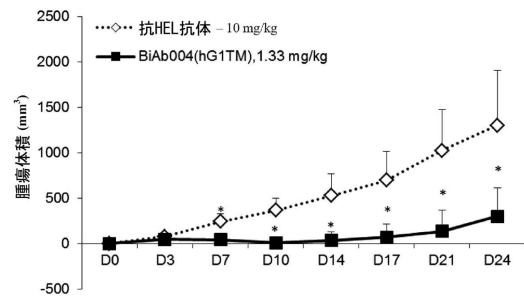


FIG. 18

30

40

50

【図 19】

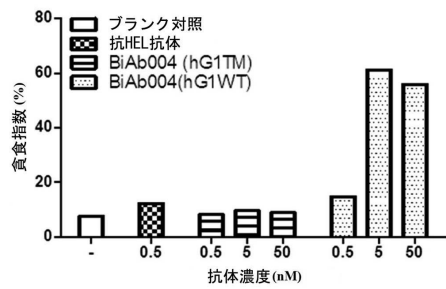


FIG. 19

【図 20】

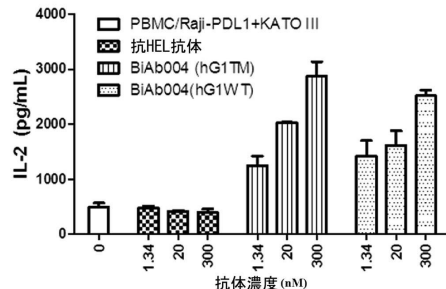


FIG. 20

10

【図 21】

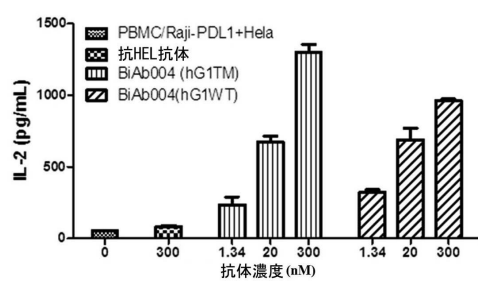


FIG. 21

【図 22】

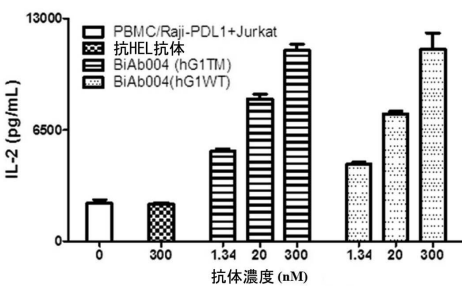


FIG. 22

20

【図 23】

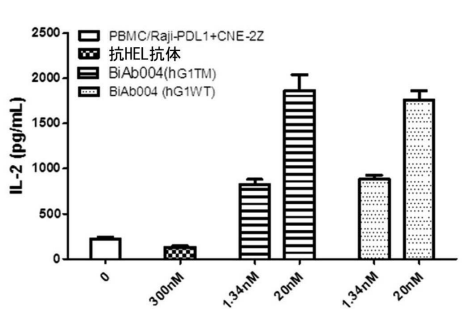


FIG. 23

【図 24】

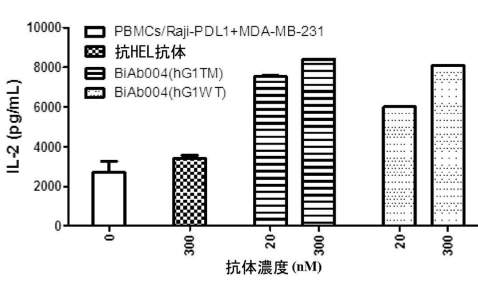


FIG. 24

30

40

50

【図 25】

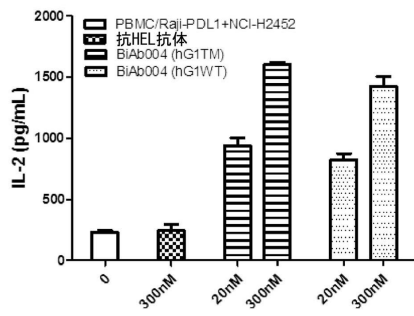


FIG. 25

【図 26】

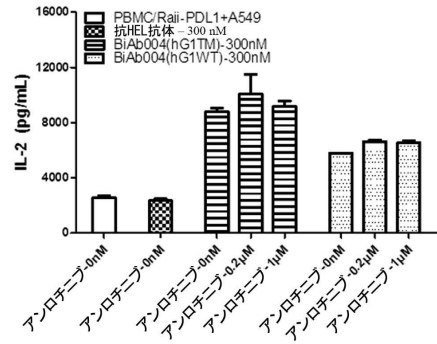


FIG. 26

10

【図 27】

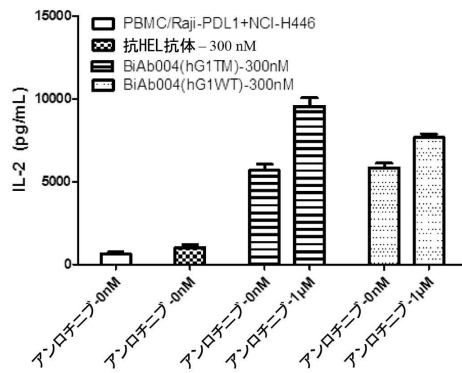


FIG. 27

【図 28】

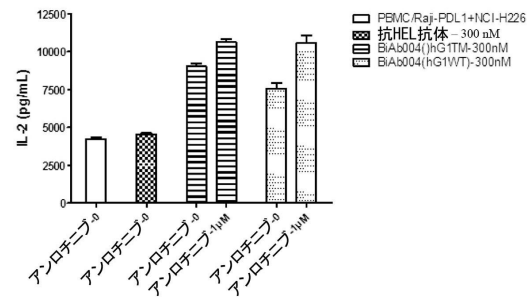


FIG. 28

20

【図 29】

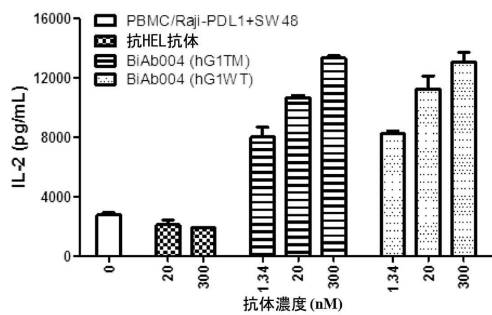


FIG. 29

【図 30】

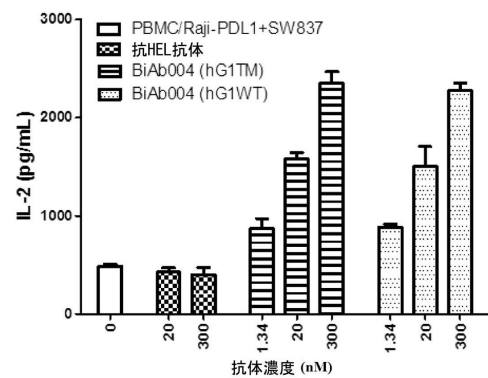


FIG. 30

30

40

50

【配列表】
0007655896000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 7/06 (2006.01)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 P 7/06
G 0 1 N 33/53 D

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 シア ユイ

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン, シェンノン ロード 6

(72)発明者 ワン チョンミン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン, シェンノン ロード 6

(72)発明者 チャン ポン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン, シェンノン ロード 6

(72)発明者 リー パイヨン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン, シェンノン ロード 6

審査官 西 賢二

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 1 8 5 5 6 9 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 1 7 4 6 4 (WO, A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 2 0 5 1 2 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 2 6 6 0 0 (WO, A 1)

特開 2 0 1 5 - 2 2 1 8 2 9 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

CAplus/REGISTRY (STN)