

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-517920

(P2022-517920A)

(43)公表日 令和4年3月11日(2022.3.11)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-538762(P2021-538762)	(71)出願人	521288459 北京比洋生物技術有限公司
(86)(22)出願日	令和2年1月9日(2020.1.9)		中華人民共和國北京市大興区亦庄經濟技術開發区西環南路18号匯龍森C座308室
(85)翻訳文提出日	令和3年6月30日(2021.6.30)	(71)出願人	519347650 魯南製藥集團股 分 有限公司
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/071213		中華人民共和國山東省臨沂市紅旗路209号
(87)国際公開番号	WO2020/143720	(74)代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(87)国際公開日	令和2年7月16日(2020.7.16)	(72)発明者	胡品良 中華人民共和國北京市大興区亦庄經濟技術開發区西環南路18号匯龍森C座308室
(31)優先権主張番号	201910023522.6		
(32)優先日	平成31年1月10日(2019.1.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		

最終頁に続く

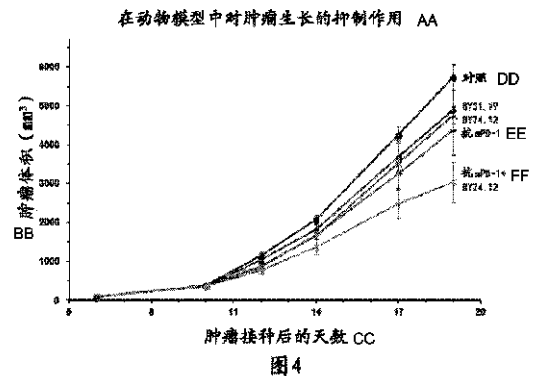
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する多標的融合タンパク質、およびそれを含有する医薬組成物

(57)【要約】

本発明は、血管内皮増殖阻害剤ドメイン(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80細胞外ドメイン(ECD)(iii)を含む、血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する多標的融合タンパク質を提供している。本発明は、前記多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、前記ポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞、及び前記多標的融合タンパク質と抗PD-1抗体とを含む医薬組成物をさらに提供している。本発明の前記多標的融合タンパク質および医薬組成物は、個体における癌性疾患を治療または予防することができる。

【選択図】図4



AA Inhibitory effect on tumor growth in animal model
BB Tumor volume (mm³)
CC Number of days after tumor inoculation
DD Comparison
EE Anti-mPD1
FF Anti-mPD1+

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する多標的融合タンパク質であって、血管内皮増殖阻害剤ドメイン(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80細胞外ドメイン(ECD)(iii)を含む、多標的融合タンパク質。

【請求項 2】

前記(i)は、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片及び/又はVEGFR細胞外受容体機能領域を含み、

好ましくは、前記抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体の抗原結合断片は、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖Fvであり、より好ましくは、前記抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体の抗原結合断片は、配列番号1/2、3/4及び5/6から選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖CDR及び軽鎖CDRの6個全て、又は前記6個全ての重鎖CDR及び軽鎖CDRの1個以上と1、2、3、4、又は5個のアミノ酸変化(例えば、アミノ酸置換又は欠失)を有する配列を含み、さらに好ましくは、前記抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体の抗原結合断片は、配列番号1/2、3/4及び5/6から選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列、又は前記ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含み、最も好ましくは、前記抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体の抗原結合断片は、Bevacizumab、Ranibizumab、又はRamucirumabのFabであり、

好ましくは、VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2およびVEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン3を含み、または、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2、VEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン3およびVEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン4を含み、または、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2を含み、より好ましくは、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、配列番号7~9に示すアミノ酸配列から選択されるもの、または配列番号7~9に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有する任意のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項 3】

前記(ii)は、ヒト免疫グロブリンFcドメインであり、好ましくは、前記(ii)は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFcドメインであり、より好ましくは、前記(ii)は、配列番号10、11または12に示すアミノ酸配列のFcドメインを含み、または配列番号10、11または12に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するFcドメインを含む、請求項1または2に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項 4】

前記(iii)は、ヒトCD80 ECDを含み、好ましくは、前記(iii)は、ヒトCD80 IgVまたはヒトCD80 IgVIgCを含み、より好ましくは、前記(iii)は、配列番号13または14に示すアミノ酸配列、または配列番号13または14に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項1~3のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項 5】

前記(i)、(ii)および/または(iii)の間のペプチドリンカーをさらに含み、好ましくは、前記ペプチドリンカーは、1つ以上のアミノ酸を含み、より好ましくは、少

なくとも5つのアミノ酸を含み、最も好ましくは、配列番号20～46から選択されるペプチドリンカーを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項6】

前記融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、(i)、(ii)、および(iii)の順、(iii)、(i)および(ii)の順、または(iii)、(ii)および(i)の順で有効に連結される、請求項1～5のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項7】

(a) 完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、および前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのC末端において有効に連結されたCD80 ECD、

10

(b) 完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80 ECD、および前記抗体の2つの軽鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80 ECD、

(c) CD80 ECD、CD80 ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、及び前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結された、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片、

又は

20

(d) CD80 ECD、CD80 ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、および前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結されたVEGFR細胞外受容体機能領域を含み、

好ましくは、前記抗体は、IgGクラスの抗体、特にIgG₁サブクラス、IgG₂サブクラス、IgG₄サブクラスの抗体であり、より特にIgG₄サブクラスの抗体であり、さらに好ましくは、前記IgG₄サブクラスの抗体は、Fcドメイン中のS228位にアミノ酸による置換を含み、より好ましくはアミノ酸によるS228P置換であり、さらに好ましくは、前記抗体の軽鎖型は、それぞれ型または型であり、好ましくは型であり、

好ましくは、前記全長抗VEGF抗体は、Bevacizumabであり、前記全長抗VEGFR抗体は、Ramucirumabである請求項6に記載の多標的融合タンパク質。

30

【請求項8】

配列番号80の融合タンパク質の第1のサブユニットおよび配列番号82の融合タンパク質の第2のサブユニットを含む融合タンパク質(1)と、

配列番号84の融合タンパク質の第1のサブユニットおよび配列番号86の融合タンパク質の第2のサブユニットを含む融合タンパク質(2)と、

配列番号88の融合タンパク質サブユニットを含む融合タンパク質(3)とからなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質。

【請求項9】

40

請求項1～8のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項10】

請求項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、好ましくは発現ベクターであり、最も好ましくは二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ発現ベクターである、ベクター。

【請求項11】

請求項9に記載のポリヌクレオチドまたは請求項10に記載のベクターを含む宿主細胞であって、好ましくはCHO、HEK293またはNSO細胞である、宿主細胞。

【請求項12】

50

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質を生成するための方法であって、前記多標的融合タンパク質の発現に適した条件下で、請求項 1 1 に記載の宿主細胞を培養するステップ (i) と、前記融合タンパク質を回収するステップ (i i) とを含む、方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質と、抗 P D - 1 抗体とを含み、好ましくは前記抗 P D - 1 抗体が、配列番号 4 7 / 4 8、4 9 / 5 0、5 1 / 5 2、5 3 / 5 4、5 5 / 5 6、5 7 / 5 8、5 9 / 6 0、6 1 / 6 2、6 3 / 6 4、6 5 / 6 6、6 7 / 6 8、6 9 / 7 0 および 7 1 / 7 2 からなる群より選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R の 6 個全て、又は前記 6 個全ての重鎖 C D R 及び軽鎖 C D R の 1 個以上と 1、2、3、4、又は 5 個のアミノ酸変化 (例えば、アミノ酸置換又は欠失) を有する配列を含み、さらに好ましくは前記抗 P D - 1 抗体が、配列番号 4 7 / 4 8、4 9 / 5 0、5 1 / 5 2、5 3 / 5 4、5 5 / 5 6、5 7 / 5 8、5 9 / 6 0、6 1 / 6 2、6 3 / 6 4、6 5 / 6 6、6 7 / 6 8、6 9 / 7 0 および 7 1 / 7 2 からなる群より選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列、又は前記ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含み、最も好ましくは前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブ、ピズマブ、およびツムマブ (P e m b r o l z u m a b) からなる群より選択される、医薬組成物。

10

20

【請求項 1 4】

個体における癌性疾患 (例えば、固形腫瘍および軟組織腫瘍) の治療または予防のための医薬の製造に使用され、好ましくは、癌性疾患が、黒色腫、乳癌、結腸癌、食道癌、消化管間質性腫瘍 (G I S T)、腎臓癌 (例えば、腎細胞癌)、肝臓癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部腫瘍、胃癌、血液悪性疾患 (例えば、リンパ腫) であり、特に、前記疾患は、結腸癌またはトリプルネガティブ乳癌であり、好ましくは、前記個体は哺乳動物であり、より好ましくはヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の多標的融合タンパク質、請求項 1 3 に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は、概略的に、医薬バイオテクノロジーの分野に関する。具体的には、本発明は、血管内皮増殖阻害剤ドメイン (i)、免疫グロブリン F c ドメイン (i i)、および C D 8 0 細胞外ドメイン (E C D) (i i i) を含む、多標的融合タンパク質、前記多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、前記ポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞、ならびに前記多標的融合タンパク質と抗 P D - 1 抗体とを含む医薬組成物に関する。本発明の前記多標的融合タンパク質および医薬組成物は、個体における癌性疾患を治療または予防することができる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

40

腫瘍微小環境は、腫瘍細胞が生存および進行する複雑な環境であり、細胞成分および非細胞成分からなり、細胞成分には、腫瘍細胞自体、免疫細胞、内皮細胞などが含まれ、非細胞成分には、サイトカイン、ケモカインなどが含まれる。腫瘍に対する研究に伴い、腫瘍の微小環境によって腫瘍の生成、成長、転移が制御されることが認識されている。腫瘍微小環境は、腫瘍細胞が優性に増殖するかどうかを決定する。

【0 0 0 3】

腫瘍微小環境では、T リンパ球活性の阻害は、一般的には存在し、その結果、T リンパ球が腫瘍に対する殺滅効果を効果的に発揮できないことをもたらし (Y a o S , Z h u Y 及び C h e n L . , A d v a n c e s i n t a r g e t i n g c e l l s u r f a c e s i g n a l i n g m o l e c u l e s f o r i m m u n e m o d

50

ulation., Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2): 130-146)、例えば、腫瘍細胞は、正常なヒト組織では発現しないPD-L1を発現することによって、免疫チェックポイントの阻害性信号通路(すなわち、PD-1/PD-L1阻害性信号通路)を利用してTリンパ球活性を阻害する。

【0004】

Tリンパ球活性化の阻害は、PD-1がそのリガンドPD-L1と結合した後にT細胞受容体(TCR)/主要組織適合複合体(MHC)を阻害することによって達成されると以前は考えられていたが、最近のHuiらの研究は、PD-1およびCD28がTリンパ球膜に共局在化され、PD-1によって媒介される免疫抑制作用標的がTCRよりも主にCD28であり、具体的に言えば、PD-1がPD-L1と結合した後にShp2ホスホリパーゼが急速にリクルートされ、Shp2ホスホリパーゼがTCRの脱リン酸化よりも強くCD28を優先的に脱リン酸化し、それによってCD28信号伝達を不活性化することによってT細胞機能を阻害することを示した(Hui E.ら、T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition, Science, 2017, 355(6332): 1428-1433)。

10

【0005】

Kamphorst AOらは、CD28共刺激信号の活性化がT細胞の「再活性化」の重要な条件の1つであることを実証した(Kamphorst AOら、Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent, Science, 2017, 355(6332): 1423-1427)。CD28/B7(すなわち、Tリンパ球表面の共刺激分子CD28とCD86(B7-2とも呼ぶ)またはCD80(B7-1とも呼ぶ)に結合する)共刺激経路の活性化は、担癌マウスおよび慢性ウイルス感染中の抗PD-1抗体の治療効果にとって重要であり、抗B7抗体でB7分子のCD28への結合をブロックする場合、腫瘍に対する抗PD-1抗体の阻害効果は著しく低下する。別の研究は、可溶性CD80がマウス腫瘍系においてインビボ治療効果を有することを示している(Horn LAら、Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Cancer Immunol Res. 2018; 6(1): 59-68)。CD80及びCD86は、腫瘍微小環境において低発現又は非発現であり、これも腫瘍免疫回避をもたらす重要なメカニズムの1つである。

20

30

【0006】

また、T細胞表面に発現しているCTLA-4とT細胞表面の共刺激分子CD28とは、高度の相同性を有しており、同じリガンドCD86(B7-2)またはCD80(B7-1)を保有している。CTLA-4のB7分子への結合は、通常、T細胞の活性化を阻害するので、免疫チェックポイントB7/CTLA-4経路のブロックは、腫瘍特異的T細胞活性化作用を増強することができる。

【0007】

一方、腫瘍微小環境において、腫瘍細胞はまた、血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Cell Growth Factor(VEGF))などの血管新生促進因子の放出によってVEGFの数の激増をもたらし、VEGFはその細胞表面受容体VEGFRとの結合により血管内皮細胞の分裂増殖及び転移を媒介し、血管透過性を増加させ、腫瘍アポトーシスを阻害し、腫瘍の成長及び転移のための良好な微小環境を提供する。

40

【0008】

現在、PD-1/PD-L1阻害性信号通路のブロック、B7/CTLA-4通路のブロック、又はVEGF/VEGFR通路のブロックのための単一標的腫瘍治療薬は販売承認され、それぞれは、例えば、抗PD-1抗体薬、例えば、ブリストル・マイヤーズ スクイブ社のニボルマブ(Nivolumab)及びメルク社のペンブロリズマブ(Pemb

50

rolizumab)、プリストル・マイヤーズ スクイブ社の抗CTLA-4抗体イピリムマブ(Ipilimumab、商品名Yervoy)、Genentech社のヒトネズミキメラ抗VEGF抗体ベパシズマブ(Bevacizumab、商品名Avastin)、Sanofi-aventis社やRegeneron社が開発したVEGF-Trapであるafliberceptなどが挙げられる。しかしながら、腫瘍患者のかなりの部分は、単一標的腫瘍治療に非応答性であるか、又は耐性を示し、例えば、現在の抗PD-1及びPD-L1抗体薬物の平均的な治療有効率はわずか20%程度であり、肺癌の5年生存率はわずか16%である。したがって、多くの場合、単一標的腫瘍治療に対する患者の無応答性又は薬剤耐性の問題を回避するために、多標的療法を採用することが望ましい。

10

【0009】

多標的融合タンパク質は、腫瘍の発生及び進行に關与する様々な信号伝達通路を同時に特異的に標的化することができるため、血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化することによって腫瘍微小環境を改善することができる多標的融合タンパク質を開発し、及び多標的融合タンパク質を他の抗癌剤と併用する必要がある。

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは、鋭意研究により、血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する多標的融合タンパク質であって、血管内皮増殖阻害剤ドメイン(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80細胞外ドメイン(ECD)(iii)を含む、多標的融合タンパク質を開発している。前記多標的融合タンパク質は2つの点から腫瘍微小環境を改善するとともに、腫瘍免疫治療効果を向上させることができ、ここで、腫瘍微小環境の改善の一つは、前記多標的融合タンパク質のCD80細胞外ドメイン(ECD)のCD28、PD-L1、およびCTLA-4に対する特異的結合によって達成され、具体的に言えば、CD80細胞外ドメインがPD-L1という免疫チェックポイントに結合することによって、PD-1/PD-L1阻害性信号通路を緩和し、免疫系に「ブレーキ緩め」を与え、CD80細胞外ドメインがCTLA-4に結合されることによって抗CTLA-4抗体イピリムマブと同じ制御調整性T細胞(Treg)の機能を発揮する。CD80細胞外ドメインをCD28に結合させることによりCD28/B7共刺激経路を活性化し、Tリンパ球を活性化してリンパ球の活性化に「スロットル加え」を行う。腫瘍微小環境の改善のもう一つは、前記多標的融合タンパク質の血管内皮細胞増殖阻害剤ドメインがVEGF/VEGFR通路をブロックすることにより、腫瘍新生血管の生成を抑制し、腫瘍組織血管を正常化し、それにより、より多くのリンパ球が腫瘍組織に浸潤し、VEGFsによる免疫細胞の阻害作用を解除することである。

20

30

【0011】

一実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片及び/又はVEGFR細胞外受容体機能領域を含む(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80細胞外ドメイン(ECD)(iii)を含む。

【0012】

前記多標的融合タンパク質に含まれる抗VEGF抗体から誘導される抗原結合断片は、VEGFに結合し、それによってVEGFのその受容体VEGFRへの結合をブロック又は阻害することができる抗体であれば、任意の抗VEGF抗体から誘導されることができる。前記抗VEGF抗体には、従来技術で知られていた抗VEGF抗体及び将来開発される抗VEGF抗体が含まれる。一実施形態では、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、抗VEGF抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖Fvであり、好ましくは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、配列番号1/2及び3/4から選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖CDR及び軽鎖CDRの6個全て、又は前記6個全ての重鎖CDR及び軽鎖CDRの1個以上と1、2、3、4、又は5個のアミノ酸変化(例えば、アミノ酸置換又は欠失)を有する配列を含み、より好まし

40

50

くは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、配列番号1/2及び3/4から選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列、又は前記ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含み、最も好ましくは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、Bevacizumab又はRanibizumabのFabである。

【0013】

前記多標的融合タンパク質に含まれる抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片は、VEGFRに結合し、それによってVEGFのその受容体VEGFRへの結合をブロック又は阻害することができる抗体であれば、任意の抗VEGFR抗体から誘導されることができる。前記抗VEGFR抗体は、従来技術で知られていた抗VEGFR抗体および将来開発される抗VEGFR抗体を含む。一実施形態では、前記抗VEGFR抗体の抗原結合断片は、抗VEGF抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖Fvであり、好ましくは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、配列番号5/6の、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖CDR及び軽鎖CDRの6個全て、又は前記6個全ての重鎖CDR及び軽鎖CDRの1個以上と1、2、3、4、又は5個のアミノ酸変化(例えば、アミノ酸置換又は欠失)を有する配列を含み、より好ましくは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、配列番号5/6の、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列、又は前記ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含み、最も好ましくは、前記抗VEGF抗体の抗原結合断片は、RamucirumabのFabである。

【0014】

前記多標的融合タンパク質に含まれるVEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFに結合し、それによってVEGFのその受容体VEGFRへの結合をブロックまたは阻害することができるVEGFR細胞外受容体機能領域であれば、任意のVEGFR細胞外受容体機能領域であってよい。好ましくは、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2およびVEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン3を含み、または、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2、VEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン3およびVEGFR2の免疫グロブリン様ドメイン4を含み、または、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、VEGFR1の免疫グロブリン様ドメイン2を含み、より好ましくは、前記VEGFR細胞外受容体機能領域は、配列番号7~9に示すアミノ酸配列から選択されるもの、または配列番号7~9に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有する任意のアミノ酸配列を有する。

【0015】

前記多標的融合タンパク質に含まれる免疫グロブリンFcドメイン(ii)は、任意の免疫グロブリンFcドメインであってもよく、特に、前記(ii)は、ヒト免疫グロブリンFcドメインである。一実施形態では、前記免疫グロブリンFcドメインは、IgGクラス4サブクラスの抗体のFcドメインであり、特にIgG₁サブクラス、IgG₂サブクラス、IgG₄サブクラスの抗体のFcドメインである。好ましい実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質に含まれる前記免疫グロブリンFcドメインは、IgG₁サブクラスの抗体のFcドメインであり、特にヒトIgG₁サブクラスの抗体のFcドメインである。好ましい実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質に含まれる前記免疫グロブリンFcドメインは、IgG₄サブクラスの抗体のFcドメインであり、特にヒトIgG₄サブクラスの抗体のFcドメインである。いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質における免疫グロブリンFcドメイン(ii)は、配列番号10、11または12に示すアミノ酸配列のFcドメインを含み、または配列番号10、11または12に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%

10

20

30

40

50

、 98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するFcドメインを含む。

【0016】

前記多標的融合タンパク質に含まれるCD80ECD(iii)は、CD80の細胞外ドメインの一部である。一実施形態では、前記CD80ECDは、CD80免疫グロブリンV(IgV)領域(CD80-IgV)を含む。一実施形態では、前記CD80ECDは、CD80免疫グロブリンV領域及びC領域(CD80-IgVIC)を含む。一実施形態では、前記CD80ECDは、ヒトCD80ECDであり、好ましくは、前記CD80ECDは、ヒトCD80IgVを含む。ある実施形態において、前記CD80-IgVは、配列番号13に示すアミノ酸配列、または配列番号13に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。一実施形態では、前記CD80-IgVICは、配列番号14に示すアミノ酸配列、または配列番号14に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

10

一実施形態では、前記多標的融合タンパク質は、前記(i)、(ii)および/または(iii)の間のペプチドリンカーをさらに含み、好ましくは、前記ペプチドリンカーは、1つ以上のアミノ酸を含み、より好ましくは、少なくとも5つのアミノ酸を含み、最も好ましくは、配列番号20~46から選択されるペプチドリンカーを含む。

【0017】

20

一実施形態では、前記多標的融合タンパク質は、N末端からC末端に向かって、(i)、(ii)、および(iii)の順、(iii)、(i)および(ii)の順、または(iii)、(ii)および(i)の順で有効に連結される。

【0018】

いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、

(a) 完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、および前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのC末端において有効に連結された1つのCD80ECD、

(b) 完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80ECD、および前記抗体の2つの軽鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80ECD、

30

(c) CD80ECD、CD80ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、及び前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結された、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片、

又は

(d) CD80ECD、CD80ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、および前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結されたVEGFR細胞外受容体機能領域を含み、

40

好ましくは、前記抗体は、IgGクラスの抗体、特にIgG₁サブクラス、IgG₂サブクラス、IgG₄サブクラスの抗体であり、より特にIgG₄サブクラスの抗体であり、さらに好ましくは、前記IgG₄サブクラスの抗体は、Fcドメイン中のS228位にアミノ酸による置換を含み、より好ましくはアミノ酸によるS228P置換であり、さらに好ましくは、前記抗体の軽鎖型は、それぞれ型または型であり、好ましくは型であり、

好ましくは、前記全長抗VEGF抗体は、Bevacizumabであり、前記全長抗VEGFR抗体は、Ramucirumabである。

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、

50

配列番号 80 の融合タンパク質の第 1 のサブユニットおよび配列番号 82 の融合タンパク質の第 2 のサブユニットを含む融合タンパク質 (1) と、
配列番号 84 の融合タンパク質の第 1 のサブユニットおよび配列番号 86 の融合タンパク質の第 2 のサブユニットを含む融合タンパク質 (2) と、
配列番号 88 の融合タンパク質サブユニットを含む融合タンパク質 (3) とからなる群から選択される。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、本発明の多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、本発明の多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、好ましくは発現ベクターであり、最も好ましくは二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ発現ベクターを提供する。別の形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞を提供する。一実施形態では、前記宿主細胞は、CHO、HEK293 又は NSO 細胞である。本発明はまた、本発明の多標的融合タンパク質を生成するための方法であって、本発明の多標的融合タンパク質の発現に適した条件下で、本発明の宿主細胞を培養するステップ (i) と、本発明の融合タンパク質を回収するステップ (i i) とを含む、方法。を提供する。

10

【 0 0 2 1 】

別の形態において、本発明はまた、本発明の多標的融合タンパク質と抗 PD - 1 抗体との組み合わせの医薬組成物を提供する。本発明の多標的融合タンパク質は、抗 PD - 1 抗体との併用で優れた相乗性を示し、それによって腫瘍増殖の抑制という目的をより良好に達成することができる。

20

【 0 0 2 2 】

本発明の多標的融合タンパク質と組み合わせて使用する場合、抗 PD - 1 抗体は、PD - 1 のリガンドへの結合を阻害又は低減することができる抗体であれば、いずれの抗 PD - 1 抗体であってもよく、従来技術で知られていた抗 PD - 1 抗体及び将来開発される抗 PD - 1 抗体を含む。いくつかの実施形態において、前記抗 PD - 1 抗体が、配列番号 47 / 48、49 / 50、51 / 52、53 / 54、55 / 56、57 / 58、59 / 60、61 / 62、63 / 64、65 / 66、67 / 68、69 / 70 および 71 / 72 からなる群より選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖 CDR 及び軽鎖 CDR の 6 個全て、又は前記 6 個全ての重鎖 CDR 及び軽鎖 CDR の 1 個以上と 1、2、3、4、又は 5 個のアミノ酸変化 (例えば、アミノ酸置換又は欠失) を有する配列を含み、さらに好ましくは前記抗 PD - 1 抗体が、配列番号 47 / 48、49 / 50、51 / 52、53 / 54、55 / 56、57 / 58、59 / 60、61 / 62、63 / 64、65 / 66、67 / 68、69 / 70 および 71 / 72 からなる群より選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列、又は前記ペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含み、最も好ましくは前記抗 PD - 1 抗体が、ニボルマブ、ピズマブ、およびツムマブからなる群より選択される。

30

【 0 0 2 3 】

さらに別の形態では、本発明は、個体における癌性疾患 (例えば、固形腫瘍および軟組織腫瘍) の治療または予防のための医薬の製造に使用され、好ましくは、癌性疾患が、黒色腫、乳癌、結腸癌、食道癌、消化管間質性腫瘍 (GIST)、腎臓癌 (例えば、腎細胞癌)、肝臓癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部腫瘍、胃癌、血液悪性疾患 (例えば、リンパ腫) であり、特に、前記疾患は、結腸癌またはトリプルネガティブ乳癌であり、好ましくは、前記個体は哺乳動物であり、より好ましくはヒトである、本発明の多標的融合タンパク質、医薬組成物の使用を提供する。

40

【 0 0 2 4 】

特に限定されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で

50

言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参考となるようにその全体が引用形式により本明細書に組み込まれる。さらに、本明細書で説明される材料、方法、および例は、単に例示的なものであり、限定することを意図していない。本発明の他の特徴、目的及び利点は、本明細書及び図面から、並びに添付の特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

以下に詳細に説明する本発明の好ましい実施形態は、以下の図面と併せて読まれるとより良く理解されるであろう。本発明を説明する目的で、現在好ましい実施形態を図中に示す。しかしながら、本発明は、図中に示される実施形態の精確な配置及び手段に限定されないことが理解されるべきである。

10

【図1A - 1B】図1Aおよび図1Bは、本発明の多標的融合タンパク質の概略図を提供し、ここで図1Aは、N末端からC末端に抗体の抗原結合断片、免疫グロブリンFcドメイン、およびCD80 ECDを含む多標的融合タンパク質の構造概略図を示し、図1Bは、N末端からC末端にCD80 ECD、免疫グロブリンFcドメイン、およびVEGFR細胞外受容体機能領域を含む融合タンパク質の構造模式図を示す。

【図2】図2は、実施例2で調製、精製した本発明の各目的タンパク質を還元剤（5 mM 1, 4 - ジチオスレイトール）の存在下、SDS - PAGE電気泳動でクマシーブルー染色した結果を示す。レーン1：タンパク質分子量標準マーカー、レーン2：融合タンパク質BY24.4、レーン3：融合タンパク質BY24.5、レーン4：融合タンパク質BY24.12、レーン5：融合タンパク質BY31.19、レーン6：抗体BY18.1。

20

【図3】図3は、実施例5の混合リンパ球反応（MLR）における、本発明の多標的融合タンパク質、及び抗PD-1抗体と組み合わせた場合のIFN-分泌に対する影響を示す図である。カラム1：BY18.1群、カラム2：BY24.4群、カラム3：BY18.1 + BY24.4群、カラム4：BY24.5群、カラム5：BY18.1 + BY24.5群、カラム6：BY24.12群、カラム7：BY18.1 + BY24.12群。

【図4】図4は、実施例6の動物モデルにおける本発明の多標的融合タンパク質と、抗PD-1抗体と組み合わせた抗腫瘍増殖阻害作用を示す図である。

【発明の詳細】

30

【0026】

本発明は、血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する多標的融合タンパク質、及び前記多標的融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。本発明はまた、前記多標的融合タンパク質を生成するための方法、および個体における癌性疾患の治療または予防における前記多標的融合タンパク質または医薬組成物の使用を提供する。

【0027】

本明細書における用語は、以下で別途定義されない限り、当該技術分野で通常使用されるように使用される。

【0028】

I. 定義

40

「約」という用語は、数字数値と共に使用される場合、指定した数字数値より5%小さい下限及び指定した数字数値より5%大きい上限を有する範囲内の数字数値を包含することを意味する。

【0029】

本明細書で使用される場合、「包含」または「含む」という用語は、述べられた要素、整数、またはステップを含むことを意味するが、任意の他の要素、整数、またはステップを除外しない。

【0030】

「PD-1 / PD-L1 阻害性信号通路」、「PD-1 / PD-L1 信号通路」、「PD-1 / PD-L1 信号伝達経路」、「PD-1 / PD-L1 経路」は、本明細書では交換

50

可能に使用でき、PD-1のPD-L1への結合によって開始される任意の細胞内の信号伝達経路を指す。

【0031】

本明細書で使用されるPD-1/PD-L1阻害信号伝達経路に対する「軽減」、「干渉」、「阻害」又は「ブロック」は、互換的に使用され得、(i)PD-1とPD-L1との間の相互作用を干渉すること、および/または(ii)PD-1/PD-L1信号伝達経路の少なくとも1つの生物学的機能の阻害をもたらすことをいう。本発明の多標的融合タンパク質のPD-L1への特異的結合後によるPD-1/PD-L1信号伝達経路に対する「軽減」、「干渉」、「阻害」、又は「ブロック」は、必ずしも完全な軽減、干渉、阻害、又はブロックである必要はない。

10

【0032】

本明細書において、「CD28/B7信号伝達経路」、「CD28/B7共刺激経路」、「CD28/B7通路」は、互換的に使用され得、(i)CD28がCD80に結合することによって細胞活性化を刺激する信号伝達経路、及び/又は(ii)CD86へのCD28の結合によって細胞活性化を刺激する信号伝達経路をいう。

【0033】

「CD80」および「CD86」は、両方とも、構造的に非常に類似した免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のメンバーである膜貫通糖タンパク質であり、B7分子とも総称される。CD80およびCD86の細胞外領域は、免疫グロブリンV(IgV)領域および免疫グロブリンC(IgC)領域からなる。成熟CD80分子は254個のアミノ酸からなり、そのうち、細胞外領域は208個のアミノ酸、膜貫通領域は25個のアミノ酸、および細胞内領域は21個のアミノ酸からなる。同様に、成熟CD86分子は、303個のアミノ酸からなり、そのうち、細胞外領域は222個のアミノ酸、膜貫通領域は20個のアミノ酸、および細胞内領域は61個のアミノ酸からなる。CD80はB7-1とも呼ばれ、T細胞、B細胞、樹状細胞および単球の表面に発現し、その免疫グロブリンV(IgV)領域を介してCD28、PD-L1およびCTLA-4に低親和力で結合し、なかには、CD80とCD28との結合親和力は4 μ Mである。CD80とPD-L1との結合親和力は \sim 1.7 μ Mであり、CD80とCTLA-4との結合親和力は、0.2 μ Mである(Butte M Jら、Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses, *Immunity*, 2007年7月; 27(1): 111-122)。CD86は、CD28及びCTLA-4に結合するが、PD-L1には結合しない。

20

30

【0034】

可溶性CD80(例えば、CD80-Fc)は、CD28/B7共刺激経路を介してTリンパ球に対する持続的活性作用を生じさせるとともに、インターフェロン産生の刺激を可能にする。試験は、CD80-Fcが、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体よりもさらに効果的にインビトロでのインターフェロン産生を維持することを示した。インビボでの腫瘍成長の阻害において、可溶性CD80(例えば、CD80-Fc)は、抗PD-L1抗体よりも腫瘍抑制効果が高い(Ostrand-Rosenberg Sら、Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells, *Cancer Immunol Immunother.*, 2015年10月; 64(10): 1287-93)。CD80-Fcは、PD-L1に結合することによってPD-1/PD-L1経路によって媒介される免疫抑制を阻害し、CD28/B7共刺激経路によって活性化されるT細胞に共刺激信号を送達し、それによってTリンパ球活性化を増強することができる。要するに、CD80-Fcは、腫瘍免疫反応性T細胞を活性化しながら、PD-1/PD-L1経路の免疫抑制作用を軽減することができる。可溶性CD86(例えば、CD86-Fc)はC

40

50

D28をも活性化することができ、CD80-Fcの3~5倍の活性化効果をさえ生じさせることができるが、CD86はPD-L1に結合しないため、Tリンパ球に対するCD80-Fcの最終的な活性化作用はCD86-Fcよりも強い(Haile STら、Soluble CD80 restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression., J Immunol., 2013年9月1日; 191(5): 2829-36)。CD80-Fcは、以前の研究から、(i)CD80-Fc単独で使用した場合、PD-L1抗体よりも腫瘍抑制効果が優れていること(AACR ANNUAL MEETING、2018年4月14-18日、米国、イリノイ州、シカゴ)、(ii)CD80-Fcは、腫瘍組織へのリンパ球浸潤を促進し、PD-L1抗体よりも効果が優れていること(Horn LAら、Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Cancer Immunol Res., 2018年1月; 6(1): 59-68)、(iii)CD80-Fc単独で使用した場合、PD-1/PD-L1経路の阻害剤よりも腫瘍抑制効果が優れ、PD-1抗体との併用で相乗効果が見られることが示されている。Five Prime Corporationは、CD80-Fcは、GITRL、OX40L及び4-1BBLなどのT細胞アゴニストよりも優れているとさらに認識している。CD80-Fcの良好な免疫治療効果が認められたため、Five Prime Therapeutics, Inc.のCD80-FcプロジェクトFPT155は、最近臨床試験を開発することを計画した。

【0035】

本明細書において「B7/CTLA-4通路」、「B7/CTLA-4信号伝達経路」は、互換的に使用され得、(i)CTLA-4へのCD80の結合によって引き起こされる信号伝達経路、および/または(ii)CTLA-4へのCD86の結合によって引き起こされる信号伝達経路をいう。

【0036】

本明細書において、「VEGF/VEGFR通路」、「VEGF/VEGFR信号伝達経路」は、互換的に使用され得、細胞表面受容体VEGFRファミリーの1つ以上とのVEGFファミリーの1つ以上の結合によって媒介される信号伝達経路をいう。VEGFファミリーは、6個の密接に関連したポリペプチドを含み、それぞれは、6個のサブタイプ：VEGF-A、-B、-C、-D、-E、及び胎盤成長因子(PLGF)を有する高度に保存されたホモ二量体糖タンパク質であり、分子量は、35~44kDaで等しくない。VEGF-A(そのスプライシング、例えば、VEGF165を含む)の発現は、いくつかの固形腫瘍の微小血管密度と相関し、組織中のVEGF-Aの濃度は、乳癌、肺癌、前立腺癌、及び結腸癌などの固形腫瘍の予後と相関する。各VEGFファミリーメンバーの生物学的活性は、細胞表面VEGF受容体(VEGFR)ファミリーの1つ以上によって媒介され、前記VEGFRファミリーは、VEGFR1(Flt-1ともいう)、VEGFR2(KDR、Flk-1ともいう)、VEGFR3(Flt-4ともいう)などを含み、ここで、VEGFR1、VEGFR2は血管の生成と密接に関連し、VEGF-C/D/VEGFR3はリンパ管の生成と密接に関連する。VEGFファミリーの主要な生物学的機能には、(1)血管内皮細胞の有糸分裂を選択的に促進し、内皮細胞増殖を刺激し、血管形成を促進し、(2)血管、特に微小血管の透過性を増大させ、血漿高分子を血管外マトリックスにアウトソーシングさせ、腫瘍細胞の増殖および新生毛細血管網の構築に栄養を提供し、(3)腫瘍の増殖および転移を促進し、前記腫瘍の増殖および転移は、VEGFファミリーに依存しており、血管内皮細胞がコラゲナーゼやプラスミノゲンを分泌することで血管基底膜が分解され、また腫瘍組織内部に新たに形成される微小血管基底膜が不完全であり、この性質により腫瘍が血液循環に入りやすく、(4)VEGFは、身体の免疫応答を阻害し、悪性腫瘍の浸潤および転移を促進する免疫抑制分子としてもよく(Lapeyre-Prost Aら、Immunomodulatory Activ

ity of VEGF in Cancer, *Int Rev Cell Mol Biol.*, 2017; 330: 295 - 342)、(5)他の効果: VEGFファミリーは、上皮細胞のギャップ及び窓開き現象を誘導でき、上皮細胞の細胞質小胞及び細胞小器官を活性化でき、VEGFファミリーが内皮細胞を直接刺激してタンパク質分解酵素を放出し、マトリックスを分解し、より多くのVEGFファミリー分子を放出し、腫瘍の進行を加速し、細胞外プロテアーゼがまた、細胞外基質の結合性及びVEGFファミリーの放出を活性化することができ、VEGFファミリーは、血管透過性を増加させることによって、フィブリノーゲンを含む血漿タンパク質を放出して、セルロースネットワークを形成し、腫瘍の成長、進行、及び転移のための良好な基質を提供し、VEGFファミリーは、異常な血管の生成を促進し、免疫細胞の浸潤を阻害するなどの効果を有する。

10

【0037】

臨床研究は、抗VEGFモノクローナル抗体、抗VEGFRモノクローナル抗体、又は可溶性VEGFRの使用が、VEGFファミリーのその受容体への結合をブロックし、VEGFファミリー信号通路の伝導を阻害することができることを示している。Genentech社が開発したベバシズマブ(Bevacizumab、商品名Avastin)は、VEGF-AとVEGFRとの結合をブロックすることによりVEGFRを活性化不能にして抗血管新生作用を発揮する組み換えヒトネズミキメラ抗VEGF抗体である。ベバシズマブは、転移性結腸直腸癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌等の治療に現在用いられている。Sanofi-aventis及びRegeneronが開発したafliberceptは、VEGFR1細胞外第2ドメインとVEGFR2細胞外第3ドメインとヒトIgG1定常領域とを融合した融合タンパク質であるVEGF-Trapであり、血管新生を阻害することにより、腫瘍患者の一部に対して抗腫瘍作用を発揮することができる。

20

【0038】

本明細書で使用されたように、「特異的に結合する」という用語は、抗原または目的分子の結合に選択性があり、望ましくないまたは非特異的な相互作用と区別され得ることを意味する。前記特異的結合は、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)または表面プラズモン共鳴(SPR)技術(BIACore装置での分析)などの当業者に公知の他の技術によって測定することができる(Liljebladら、Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance, *Glyco J.*, 2000, 17, 323 - 329)。

30

【0039】

「血管内皮増殖阻害剤ドメイン」という用語は、VEGF/VEGFR信号伝達をブロックする血管内皮増殖阻害剤の部分の指し、前記部分は血管内皮増殖の阻害を発揮する領域である。血管内皮増殖阻害剤ドメインは、例えば、1つ以上の抗VEGF抗体の可変ドメイン(抗体可変領域とも呼ぶ)、1つ以上の抗VEGFR抗体の可変ドメイン、またはVEGFR細胞外受容体機能領域によって提供され得る。

【0040】

「制御性T細胞(Treg)」という用語は、自己寛容の維持に重要なTリンパ球の特定の亜集団を表す。サプレッサー機能を有するTreg細胞は、転写因子FOX P3、及びCD127低、CTLA-4+、LAP、CD39+、PD-1+、GAR P等の他の細胞マーカーを細胞内で発現させることによって他のTリンパ球と区別することができる。

40

【0041】

「親和力」または「結合親和力」は、結合対のメンバー間の相互作用を反映する固有の結合親和力を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和力は、一般に、解離定数(K_D)によって表すことができ、解離定数は、解離速度定数と会合速度定数の比(それぞれk_{off}およびk_{on})である。親和力は、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。親和力を測定するための具体的な方法の1つは、表面プラズモン共鳴法(SPR)である。

【0042】

50

「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を含むが、これらに限定されない。抗体は、任意のタイプおよびサブタイプ（例えば、I g M、I g D、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g E、I g A 1 および I g A 2）の無傷の抗体（例えば、2つの完全長の軽鎖および2つの完全長の重鎖を有する）であり得る。

【0043】

「全抗体」、「全長抗体」、「完全抗体」、及び「インタクト抗体」という用語は、本明細書で交換可能に1つの抗体を指すように使用され得、前記抗体は天然の抗体と実質的に類似の構造を有する。

【0044】

「抗体重鎖」という用語は、天然に存在する立体配座で抗体分子中に存在するポリペプチド鎖の2つのタイプのうちの大きい方を指し、通常、抗体が属するクラスを決定する。

【0045】

「抗体軽鎖」という用語は、その天然に存在する立体配座で抗体分子中に存在する2種類のポリペプチド鎖のうちの小さい方を指す。軽鎖および重鎖は、2つの主要な抗体軽鎖クラスを指す。

【0046】

「二重特異性抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖ペアを有し、2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマ融合または F a b ' 断片の連結を含む様々な方法によって調製することができる。

【0047】

抗体の「抗原結合断片」という用語は、インタクト抗体、完全抗体または抗体鎖より少ないアミノ酸残基の抗体または抗体鎖の一部または断片であり、抗原に結合するか、またはインタクト抗体（すなわち、抗原結合断片が由来するインタクト抗体）と競合して抗原に結合することができる。抗原結合断片は、組換えDNA技術によって、または酵素もしくは化学的にインタクト抗体を切断することによって調製され得る。抗原結合断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、単鎖 F v を含むが、これらに限定されない。前記 F a b 断片は、V_L、V_H、C_L 及び C_H1 ドメインからなる一価の断片であり、例えば、完全抗体をパインで消化することによって得ることができる。さらに、F (a b')₂ は、ヒンジ領域のジスルフィド結合の下で完全抗体をペプシン消化することによって生成され、二価フラグメントである F a b' の二量体である。F (a b')₂ は、中性条件下でヒンジ領域のジスルフィド結合を破壊することによって還元され得、したがって F (a b')₂ 二量体を F a b' 単量体に変換する。F a b' 単量体は本質的にヒンジ領域を有する F a b 断片である（他の断片のより詳細な記載は、基礎免疫学（Fundamental Immunology）, W. E. Paul 編集, Raven Press, N. Y. (1993) を参照されたい）。前記 F v 断片は、抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなる。また、F v 断片の両ドメイン V_L と V_H は、独立の遺伝子にコードされるが、それらを、組換え法を用いることにより両ドメインを単一のタンパク質鎖として生成する合成リンカーで連結することができ、前記単一のタンパク質鎖のうち、V_L 領域と V_H 領域がペアになって単鎖 F v を形成する。前記抗体断片は、化学的方法、組換えDNA法、又はプロテアーゼ消化法によって得ることができる。

【0048】

「免疫グロブリン」という用語は、天然に存在する抗体の構造を有するタンパク質を指す。例えば、I g G クラスの免疫グロブリンは、ジスルフィド結合した2つの軽鎖及び2つの重鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各免疫グロブリン重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V_H）を有し、続いて、重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン（C_H1、C_H2 および C_H3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各免疫グロブリン軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V_L

10

20

30

40

50

を有し、続いて、軽鎖定常領域とも呼ばれる定常軽鎖（C L）ドメインを有する。免疫グロブリンの重鎖は、（I g A）、（I g D）、（I g E）、（I g G）または μ （I g M）と呼ばれる5つのクラスのうち1つに帰属することができ、ここで、あるクラスは、さらにサブクラス、例えば、1（I g G 1）、2（I g G 2）、3（I g G 3）、4（I g G 4）、1（I g A 1）及び2（I g A 2）に分類することができる。免疫グロブリンの軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、及びと呼ばれる2つのタイプのうちの1つに分類することができる。免疫グロブリンは、本質的に、免疫グロブリンヒンジ領域によって連結された2つのF a b分子と1つのF cドメインとからなる。

【0049】

10

「F cドメイン」または「F c領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために本明細書で使用される。この用語は、天然配列F c領域および変異体F c領域を含む。天然の免疫グロブリン「F cドメイン」は、2つまたは3つの定常ドメイン、すなわちC H 2ドメイン、C H 3ドメイン、および任意選択可能なC H 4ドメインを含む。例えば、天然抗体では、免疫グロブリンF cドメインは、I g G、I g AおよびI g Dクラスの抗体の2つの重鎖に由来する第2および第3の定常ドメイン（C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン）を含み、またはI g MおよびI g Eクラスの抗体の2本の重鎖に由来する第2、第3および第4の定常ドメイン（C H 2ドメイン、C H 3ドメインおよびC H 4ドメイン）を含む。本明細書において特別な説明がない限り、F c領域または重鎖定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、K a b a t r a , Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載のE Uインデックスとも呼ばれるE U番号付けシステムに従ってなされる。

20

【0050】

「ヒト免疫グロブリン」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生される免疫グロブリンに対応するアミノ酸配列を有するか、またはヒト免疫グロブリンのレパートリーもしくはヒト免疫グロブリンをコードする他の配列を利用する非ヒト起源から誘導される免疫グロブリンである。

【0051】

30

アミノ酸配列の「同一性パーセント（％）」とは、候補配列と本明細書に示す具体的なアミノ酸配列とを比較し、必要に応じて最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後、配列同一性の一部として如何なる保存的置換を考慮しない場合、本明細書に示す具体的なアミノ酸配列のアミノ酸残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基のパーセントを意味する。

【0052】

「有効に連結される」という用語は、特定の各成分が、それらが意図された方法で機能することを可能にする関係にあることを意味する。

【0053】

「N末端」という用語は、N末端の最後のアミノ酸を指し、用語「C末端」は、C末端の最後のアミノ酸を指す。

40

【0054】

「融合」という用語は、2つ以上の成分が、ペプチド結合によって直接的に連結されるか、または1つ以上のペプチドリンカーを介して有効に連結されることを意味する。

【0055】

「宿主細胞」という用語は、なかに外来性ポリヌクレオチドが導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫が含まれる。宿主細胞は、一次形質転換細胞およびそれから誘導される子孫を含む「形質転換体」および「形質転換細胞」を含む。宿主細胞は、本発明の多標的融合タンパク質を生成するために使用され得る任意のタイプの細胞系である。宿主細胞は、培養した細胞を含み、またトランスジェニック動物、トランスジェニック植物、また

50

は培養した植物組織もしくは動物組織内の細胞も含む。

【0056】

「個体」または「被験者」という用語は、互換的に使用され得、哺乳動物を指す。哺乳動物は、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）が含まれるが、これらに限定されない。特に、個体はヒトである。

【0057】

「治療」という用語は、治療を受けている個体における疾患の自然経過を変化させることを目的とする臨床的介入を指す。所望の治療効果としては、疾患の発生又は再発の予防、症状の軽減、疾患の低減による如何なる直接的又は間接的病理学的結果、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の寛解又は緩和、及び予後の寛解又は緩和が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質または医薬組成物は、疾患の進行を遅延させるか、または疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0058】

「抗腫瘍効果」という用語は、様々な手段によって示され得る生物学的効果を指し、例えば、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、腫瘍細胞増殖の減少、または腫瘍細胞生存の減少を含むが、これらに限定されない。「腫瘍」、「癌」および「癌性疾患」という用語は、本明細書において互換的に使用され得、固形腫瘍および液体腫瘍を包含する。

【0059】

II. 多標的融合タンパク質

本発明は、血管内皮増殖阻害剤ドメイン(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80細胞外ドメイン(ECD)(iii)を含む、新規な多標的融合タンパク質を提供する。

【0060】

いくつかの実施形態では、前記(i)、(ii)、および/または(iii)は、ペプチドリンカーによって有効に連結されていてもい。

【0061】

いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、ジスルフィド結合により結合された2つの融合タンパク質第1サブユニットと2つの融合タンパク質第2サブユニットからなるヘテロ四量体糖タンパク質である。

【0062】

いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、ジスルフィド結合により結合されたホモ二量体またはヘテロ二量体糖タンパク質である。

【0063】

本発明の多標的融合タンパク質は、血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する。この多標的融合タンパク質は、VEGF/VEGFR通路をブロックすることによって血管内皮細胞の増殖をブロックすることができる一方、CD28/B7共刺激経路を活性化し、PD-1/PD-L1阻害性信号通路を阻害し、B7/CTLA-4信号伝達経路によって制御性T細胞(Treg)機能を阻害することによってTリンパ球を活性化し、それによって腫瘍微小環境を改善し、腫瘍免疫治療効果を向上することができる。

【0064】

いくつかの実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質は、 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-9} M~ 10^{-12} Mの解離定数(K_D)でVEGFまたはVEGFRと結合し、CD28、PD-L1およびCTLA-4に特異的に結合する。

【0065】

以下、本発明の多標的融合タンパク質の各成分について説明する。

【0066】

- 血管内皮増殖阻害剤ドメイン

本発明の多標的融合タンパク質中の「血管内皮増殖阻害剤ドメイン」は、VEGF及び/

又は VEGFR に特異的に結合することができ、抗 VEGF 抗体及び / 又は抗 VEGFR 抗体から誘導される抗原結合断片及び / 又は VEGFR 細胞外受容体機能領域を含むが、これらに限定されない。

【0067】

一実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質に含まれる抗 VEGF 抗体及び / 又は抗 VEGFR 抗体から誘導される抗原結合断片は、本発明の多標的融合タンパク質が高い親和力、例えば 10^{-8} M 以下、好ましくは 10^{-9} M ~ 10^{-12} M の K_D で VEGF 及び / 又は VEGFR に特異的に結合することを可能にし、それにより、VEGF のその受容体 VEGFR への結合によって媒介される信号伝達経路をブロックすることができる。

【0068】

本発明の多標的融合タンパク質に含まれる抗 VEGF 抗体又は抗 VEGFR 抗体の抗原結合断片における、ペアとなる重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) の例を、以下の表 1 に提供する。いくつかの実施形態において、本発明の多標的融合タンパク質における抗原結合断片は、表 1 の抗 VEGF 抗体及び / 又は抗 VEGFR 抗体の重鎖可変領域 (VH) 及び / 又は軽鎖可変領域 (VL) のアミノ酸配列と実質的に同一な配列、例えば、表 1 に示すペアとなる重鎖可変領域配列 / 軽鎖可変領域配列と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

表1. 抗VEGF抗体又は抗VEGFR抗体の抗原結合断片における重鎖可変領域及び軽鎖可変領域配列の例

可変領域	アミノ酸配列	配列番号 (SEQ ID NO.)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPYAADFRRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AKYPHYYGSSHWYFDVWGQG	1
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL I YFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQG	2
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPYAADFRRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AKYPYYYGTSHWYFDVWGQG	3
VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL I YFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQG	4
VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARVTDADFDIWGQG	5
VL	DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCR ASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLL I	6

YDASNLDTGVP SRFSGSGSGTYFT LTISLQAEDFAVYFCQQA KAFPP TFGGG
--

【0069】

一実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質中の抗原結合断片は、配列番号1/2、3/4および5/6から選択される、ペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列に

10

20

30

40

50

含まれる6つの重鎖相補性決定領域(CDR)および軽鎖CDRの全てを含む。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列中のCDRを同定するための方法および技術は、当技術分野において公知であり、かつ、本明細書に開示される特定の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のアミノ酸配列中のCDRを同定するために使用することができる。CDR境界を同定するために使用することができる例示的な周知の技術としては、例えば、Kabat定義法、Chothia定義法、及びAbM定義法が挙げられる。例えば、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikaniら, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 及びMartin ACら, Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)を参照されたい。

10

【0070】

本発明の多標的融合タンパク質中の抗原結合断片の供給源である抗VEGF抗体又は抗VEGFR抗体は、その軽鎖定常領域のアミノ酸配列に基づいてκ型又はλ型に分類することができ、好ましくはκ型である。

20

【0071】

抗VEGF抗体又は抗VEGFR抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列の例を、以下の表2に提供する。

表2. 抗体の軽鎖定常領域配列の例

軽鎖タイプ	定常領域アミノ酸配列
κ型	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号15)
λ型	TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 16)

30

40

【0072】

本発明の多標的融合タンパク質中の抗原結合断片の供給源である抗VEGF抗体又は抗VEGFR抗体は、その重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づいて、好ましくはIgGクラス抗体、特にIgG₁サブクラス、IgG₂サブクラス、IgG₄サブクラスの抗体であり、より特にIgG₄サブクラスの抗体である。好ましくは、前記IgG₄サブクラスの抗体は、Fcドメイン中のS228位にアーム交換(arm-exchange)の発生を防止するアミノ酸による置換を含み、より好ましくはアミノ酸によるS228P置換である。

50

	S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G 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 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G K (配列番号19)
--	---

10

【0074】

一実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質に含まれる V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R の細胞外ドメインの一部またはその組み合わせである。V E G F R 受容体は、細胞表面に位置するチロシンキナーゼ型受容体であり、その細胞外領域は7個の免疫グロブリン(Ig)様ドメインからなる。例えば、ヒト V E G F R 1 は、番号が1、2、3、4、5、6および7である7つのIg様ドメインを含み、Ig様ドメイン1は細胞外ドメインのN末端に位置し、Ig様ドメイン7は細胞外ドメインのC末端に位置する。Ig様ドメインは、本明細書において特に指示がない限り、V E G F R タンパク質のN末端からC末端まで順番に番号付けされる。いくつかの実施形態では、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R 1、V E G F R 2 および V E G F R 3 から選択される1種以上のV E G F R の少なくとも一つのIg様ドメインを含む。いくつかの形態では、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R のIg様ドメインを少なくとも1、2、3、4、5、6個含むが、ただし7個を超えない。別の形態では、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R の1~7、1~6、1~5、1~4、1~3または1~2のIg様ドメインを含む。

20

30

【0075】

2つ以上のV E G F R の少なくとも一つのIg様ドメインを含むV E G F R 細胞外受容体機能領域も、本明細書において考慮される。いくつかの実施形態では、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R 1、V E G F R 2 および V E G F R 3 から選択される2つ以上のV E G F R からの少なくとも一つのIg様ドメインを含む。各V E G F R の7つのIg様ドメインの任意の組み合わせを含むV E G F R 細胞外受容体機能領域が、本明細書において考慮される。例えば、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R 1 (例えば、ヒト V E G F R 1) のIg様ドメイン2およびV E G F R 2 (例えば、ヒト V E G F R 2) のIg様ドメイン3を含み得る。別の実施形態では、V E G F R 細胞外受容体機能領域は、V E G F R 1 (例えば、ヒト V E G F R 1) のIg様ドメイン1-3、V E G F R 1 (例えば、ヒト V E G F R 1) のIg様ドメイン2-3、V E G F R 2 (例えば、ヒト V E G F R 2) のIg様ドメイン1-3、V E G F R 1 (例えば、ヒト V E G F R 1) のIg様ドメイン2およびV E G F R 2 (例えば、ヒト V E G F R 2) のIg様ドメイン3-4、またはV E G F R 1 (例えば、ヒト V E G F R 1) のIg様ドメイン2およびV E G F R 3 (例えば、ヒト V E G F R 3) のIg様ドメイン3を含み得る。これらのIg様ドメインおよびV E G F R 細胞外受容体機能領域の一部として使用され得る他のIg様ドメインのより詳細な説明は、米国特許第7531173号、Yu DCら、Soluble vascular endothelial growth factor de

40

50

coy receptor FP3 exerts potent antiangiogenic effects, Mol. Ther., 2012, 20(3): 938-947 及び Holash, J. ら, VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects, PNAS, 2002, 99(17): 11393-11398 を参照されたく、全ての文献は、参考となるようにその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、VEGFR細胞外受容体機能性領域は、表4における配列番号7~9に示すアミノ酸配列から選択されるもの、又は配列番号7~9に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性を有する任意のアミノ酸配列を有する。

10

表4 多標的融合タンパク質におけるVEGFR細胞外受容体機能領域アミノ酸配列の例

VEGFR細胞外受容体機能領域	アミノ酸配列
VEGFR1-D2/VEGFR2-D3	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRV TSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHR QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSG SEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (配列番号7)
VEGFR1-D2/VEGFR2-D3-D4	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRV TSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHR QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSG SEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIK AGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVVYVPPGPGD (配列番号8)
VEGFR1-D2	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRV TSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHR QTNT (配列番号9)

20

30

40

【0076】

本発明の多標的融合タンパク質におけるVEGFR細胞外受容体機能領域は、高い親和力

50

で、例えば、 10^{-8} M以下、好ましくは 10^{-9} M ~ 10^{-12} Mの K_D で、VEGFファミリーに特異的に結合することができ、これにより、細胞表面VEGFRへのVEGFファミリーの結合と、それに続く信号伝達を阻害することができる。

【0077】

- 免疫グロブリンFcドメイン

本発明の多標的融合タンパク質における「免疫グロブリンFcドメイン」は、天然に存在する免疫グロブリンFcドメインの全てのアミノ酸残基を含むか、または天然に存在する免疫グロブリンFcドメインの一部のアミノ酸残基を含む。免疫グロブリンFcドメインは、本発明の多標的融合タンパク質に有利な薬物動態特性を提供し、長い血清半減期を含むが、これに限定されない。さらに、免疫グロブリンFcドメインはまた、例えば、タンパク質Aによって本発明の多標的融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー、精製を可能にする。

10

【0078】

免疫グロブリンFcドメインは、通常、二量体分子である。CH2ドメイン、CH3ドメイン、及び選択可能なCH4ドメインを含む免疫グロブリンFcドメインは、パパイン又はトリプシンによってインタクト（全長）免疫グロブリンを消化することによって調製することができるか、又は組換えによって調製することもできる。

【0079】

一実施形態では、IgG Fc領域は、IgG CH2ドメイン及びIgG CH3ドメインを含む。好ましくは、免疫グロブリンFcドメインは、表5の配列番号10 ~ 12に示すアミノ酸配列を有するか、または配列番号10 ~ 12に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

20

30

40

50

表5 多標的融合タンパク質中の免疫グロブリンFcドメインアミノ酸配列の例

名称	アミノ酸配列
IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号10)
IgG2 Fc	DKTVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号11)
IgG4 Fc	DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号12)

10

20

30

40

【0080】

配列番号10～12に定義された配列に加えて、IgG Fc領域は、配列番号10～12に示す配列をさらに修飾したペプチド配列、例えば、配列番号10～12のアミノ酸残基に対して1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または誘導体した後に得られたペプチド配列を含んでもよい。一実施形態では、IgG Fc領域中のS228位に、アーム交換(arm-exchange)の発生を防止するアミノ酸による置換が含まれ、特にアミノ酸によるS228P置換が含まれる。一実施形態では、IgG4 Fc領域は、アミノ酸によるS228P置換を含む。

【0081】

50

- CD80の細胞外ドメイン (ECD)

本発明の多標的融合タンパク質における「CD80の細胞外ドメイン (ECD)」は、天然に存在するCD80 ECDの全てのアミノ酸残基を含むか、または天然に存在するCD80 ECDの一部のアミノ酸残基を含む。ある実施形態において、前記CD80 ECDは、CD80 IgVを含み、好ましくはヒトCD80 IgVを含み、より好ましくは、表6における配列番号13または14に示すアミノ酸配列を有する。

表6 多標的融合タンパク質中のCD80 ECDアミノ酸配列の例

名称	アミノ酸配列
CD80-IgV	V I H V T K E V K E V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K M V L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V I L A L R P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V T L S V K A D F P T P S (配列番号13)
CD80-IgVIC	V I H V T K E V K E V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K M V L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V I L A L R P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V T L S V K A D F P T P S I S D F E I P T S N I R R I I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E E L N A I N T T V S Q D P E T E L Y A V S S K L D F N M T T N H S F M C L I K Y G H L R V N Q T F N W N T T K Q E H F P D N (配列番号14)

10

20

【0082】

配列番号13および14に定義された配列に加えて、CD80 ECDは、非修飾ペプチジルと実質的に同じ活性または機能を有すれば、配列番号13および14に示す配列をさらに修飾したペプチド配列、例えば、配列番号13および14のアミノ酸残基に対して1つまたは複数の保存的置換、欠失、または誘導体した後に得られたペプチド配列を含んでもよい。修飾されたペプチドは、未修飾ペプチドと関連する活性または機能を保持する。修飾されたペプチドは、典型的には、非修飾配列のアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列、例えば、配列番号13または14に示すアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

30

【0083】

- ペプチドリンカー

本発明の多標的融合タンパク質において、血管内皮増殖阻害剤ドメイン (i)、免疫グロブリンFcドメイン (ii)、およびCD80 ECD (iii)が、有効に連結されていてもよい「ペプチドリンカー」は、1個または複数のアミノ酸、典型的には約2~20個のアミノ酸からなるペプチドである。ペプチドリンカーは、当該技術分野で公知であるか、または本明細書に記載されている。

40

【0084】

いくつかの実施形態において、前記ペプチドリンカーは、少なくとも5個のアミノ酸を含み、好ましくはAKTTPKLEEGEFSEAR (配列番号20)、AKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号21)、AKTTPKLG (配列番号22)、SAKT

50

TPKLG G (配列番号23)、SAKTTP (配列番号24)、RADAAP (配列番号25)、RADAAPTVS (配列番号26)、RADAAAAGGPGS (配列番号27)、RADAAA (配列番号28)、SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号29)、ADAA P (配列番号30)、DAAPT V S I F P P (配列番号31)、TVAA P (配列番号32)、TVAA P S V F I F P P (配列番号33)、QPKAAP (配列番号34)、QPKAAPSVTLFP P (配列番号35)、AKTTP P (配列番号36)、AKTTPPSVTLAP (配列番号37)、AKTTAP (配列番号38)、AKTTAPSVYPLAP (配列番号39)、ASTKGP (配列番号40)、ASTKGPSVFLAP (配列番号41)、GGGGSGGGGSGGGGGG S (配列番号42)、GENKVEYAPALMALS (配列番号43)、GPAKEL TPLKEAKVS (配列番号44)、GHEAAAVMQVQYPAS (配列番号45)、GGGGSGGGGSGGGGSA (配列番号46)から選ばれるペプチドリンカーを含む。

10

【0085】

- 多標的融合タンパク質

本明細書において、血管内皮増殖阻害剤ドメイン(i)、免疫グロブリンFcドメイン(ii)、およびCD80 ECD(iii)を任意の順で含む、多標的融合タンパク質を提供し、多標的融合タンパク質がN末端からC末端に向かって、(i)、(ii)、および(iii)の順、(iii)、(i)および(ii)の順、または(iii)、(ii)および(i)の順で有効に連結されることを含むが、これに限定されない。

20

【0086】

一実施形態では、前記多標的融合タンパク質は、N末端からC末端に、完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、および前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのC末端において有効に連結された1つのCD80 ECDを含む。

【0087】

別の実施形態では、前記多標的融合タンパク質は、完全長抗VEGF抗体、完全長抗VEGFR抗体、又は完全長抗VEGF及びVEGFR二重特異性抗体、前記抗体の2本の重鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80 ECD、および前記抗体の2つの軽鎖のそれぞれのN末端において有効に連結された1つのCD80 ECDを含む。

30

【0088】

さらに別の形態では、前記多標的融合タンパク質は、N末端からC末端に、CD80 ECD、CD80 ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、及び前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結された、抗VEGF抗体及び/又は抗VEGFR抗体から誘導される抗原結合断片を含む。

【0089】

さらに別の形態では、前記多標的融合タンパク質は、N末端からC末端に、CD80 ECD、CD80 ECDのC末端において有効に連結された二量体形態の免疫グロブリンFcドメイン、および前記二量体形態の免疫グロブリンFcドメインのC末端において有効に連結されたVEGFR細胞外受容体機能領域を含む。

40

【0090】

III. 本発明の多標的融合タンパク質の製造および精製

本発明の多標的融合タンパク質は、例えば、固体ペプチド合成(例えば、Merrifield固相合成)または組換え生産によって得ることができる。組換え生産のために、前記多標的融合タンパク質の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを分離し、宿主細胞内でさらにクローニングおよび/または発現させるために1つまたは複数のベクターに挿入する。前記ポリヌクレオチドは、従来の方法を用いて容易に分離および配列決定され得る。一実施形態では、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクター、好まし

50

くは発現ベクターが提供される。

【0091】

発現ベクターは、当業者に周知の方法を用いて構築することができる。発現ベクターには、ウイルス、プラスミド、コスミド、ラムダファージ、または酵母人工染色体(YAC)が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ高効率発現ベクターが使用される。

【0092】

発現するための本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクターが調製されたら、発現ベクターは、適切な宿主細胞にトランスフェクトまたは導入され得る。この目的を達成するために、種々の技術、例えば、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、レトロウイルスの形質導入、ウイルストランスフェクション、遺伝子銃、リボソームに基づくトランスフェクション、または他の従来技術を使用することができる。

10

【0093】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを1種以上含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本発明の多標的融合タンパク質を産生するように操作され得る任意の種類の種類細胞系を指す。本発明の多標的融合タンパク質の複製および発現の支援に好適な宿主細胞は、当技術分野において周知である。そのような細胞は、必要に応じて、特定の発現ベクターでトランスフェクトまたは形質導入され得、大規模発酵槽への播種のために大量のベクター含有細胞を培養することによって、臨床用途のための十分な量の本発明の多標的融合タンパク質を得ることができる。適切な宿主細胞としては、大腸菌などの原核微生物、糸状菌または酵母などの真核微生物、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの様々な真核細胞、昆虫細胞などが挙げられる。懸濁培養に適した哺乳動物細胞株を使用することができる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、SV40形質転換サル腎臓CV1株(COS-7)、ヒト胎児腎臓系(HEK293または293F細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカーシア・グリーンサル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、パッファローラット肝臓細胞(BRL3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(Hep G2)、CHO細胞、NSO細胞、骨髄腫細胞系、例えばYO、NS0、P3X63およびSp2/0などを含むが、これらに限定されない。タンパク質を産生するのに適した哺乳動物宿主細胞株の概説は、例えば、Yazaki及びWu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo編集, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁(2003)を参照されたい。好ましい実施形態において、前記宿主細胞は、CHO、HEK293またはNSO細胞である。

20

30

【0094】

これらの宿主細胞系における外来遺伝子の発現のための標準的な技術は、当技術分野において公知である。一実施形態では、本発明の多標的融合タンパク質を生成する方法が提供され、ここで、前記方法は、前記多標的融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む本明細書に提供される宿主細胞を、前記多標的融合タンパク質の発現に適した条件下で培養するとともに、および宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から前記多標的融合タンパク質を回収することを含む。

40

【0095】

本明細書に記載されるように調製された多標的融合タンパク質は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの公知の技術によって精製することができる。特定のタンパク質を精製するための実際の条件は、正味の電荷、疎水性、親水性などの要因にも依存し、これらは当業者には明らかであろう。

【0096】

50

本発明の多標的融合タンパク質の純度は、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィーなどを含む、様々な周知の分析方法のいずれかによって決定することができる。本明細書に提供される多標的融合タンパク質の物理的/化学的特性および/または生物学的活性は、当該技術分野で公知の様々な測定方法によって同定、スクリーニング、または特徴付けることができる。

【0097】

IV. 併用療法

PD-1は、2つのリガンド、それぞれPD-L1およびPD-L2を有する免疫抑制タンパク質である。PD-1とPD-L1との間の相互作用は、例えば、腫瘍浸潤リンパ球の減少及び/又は癌細胞の免疫回避をもたらすことが知られている。PD-1とPD-L1またはPD-L2との局所相互作用を阻害することにより免疫抑制を逆転させることができる。PD-1とPD-L2との相互作用も阻止される場合、この効果は相加的である (Iwai Y.ら、Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、2002、99:12293-7)。免疫応答調節における免疫チェックポイントPD-1の信号伝達の重要性を考慮して、本発明は、本発明の多標的融合タンパク質と抗PD-1抗体とを含む、併用療法のための医薬組成物を開発している。

10

【0098】

本明細書に記載の併用療法のための医薬組成物は、本発明の多標的融合タンパク質を用いた単独療法又は抗PD-1抗体を用いた単独療法と比較して、例えば、増強された抗癌効果、毒性の低下、及び/又は副作用の減少などの優れている有益効果を提供することができる。例えば、医薬組成物中の本発明の多標的融合タンパク質及び/または抗PD-1抗体は、単独療法投与と比較して、同じ治療効果を達成するのに必要とされる投与量よりも少ない投与量または短い投与時間で投与され得る。したがって、本発明はまた、併用療法のための医薬組成物を使用して癌を治療することを開示している。上記の医薬組成物の有効性は、当該技術分野において公知の細胞モデルおよび動物モデルにおいて試験することができる。

20

【0099】

上記併用療法に含まれる抗PD-1抗体は、PD-1のリガンドへの結合を阻害又は低減することができる抗体であれば、いずれの抗PD-1抗体であってもよく、従来で知られている抗PD-1抗体及び将来開発される抗PD-1抗体を含む。抗PD-1抗体は、高い親和力で、例えば、 10^{-8} M以下、好ましくは 10^{-9} M ~ 10^{-12} Mの K_D で、PD-1に特異的に結合することができ、それによって、リガンドPD-L1及び/又はPD-L2へのPD-1の結合によって媒介される信号伝達経路をブロックすることができる。

30

【0100】

本発明の併用療法に含まれる抗PD-1抗体のペアとなる重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の例を、以下の表7に提供する。いくつかの実施形態では、本発明の併用療法における抗PD-1抗体は、表7に示すアミノ酸配列と実質的に同一の配列、例えば、表7に示すペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有する配列を含む。

40

表7. 併用療法における抗PD-1抗体の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列の例

可変領域	アミノ酸配列	配列番号 (配列番号)
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGI TFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD GSKRYADSVKGRFTISRDN SKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG	47
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQSSNWPRTFGQG	48
VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGY TFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS NGGTNFNEKFKNRVTLT TDSSTTTAYM ELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFD YWGQG	49
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK GVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL ASYLESGV PARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG	50
VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKI SCKASGY TFTNYGMNWVRQAPGQLQWGWINTD SGESTYAE EFKGRFVFSLDTSVNTAYL QITSLTAEDTGM YFCVRVGYDALDYWG QG	51
VL	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARS SVSYMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLA SGVPSRFSGSGSGT SYCLTINSLQPED FATYYCQQRSSFPLTFGGG	52
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGF TFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISGG	53

10

20

30

40

50

	GANTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDYWGQ G		
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQ TIGTWL TWYQQKPGKAPKLLIYTATSL ADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQVYSIPWTFGGG	5 4	10
VH	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGF SLSTSGTCVSWIRQPPGKALEWLATIC WEDSKGYNPSLKSRLTISKDTSKNQAV LTMTNMDPVDTATYYCARREDSGYFWF PYWGQG	5 5	
VL	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQ NVNNYLAWYQQKPGKAPKVLIFNANSL QTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYNSWTTFFGGG	5 6	20
VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGF SLTSYGVHWIRQPPGKGLEWLGVIWAG GSTNYNPSLKSRLTISKDNSKSQVSLK MSSVTAADTAVYYCARAYGNYWYIDVW GGG	5 7	
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQ SVSNDVAWYQQKPGQPPKLLINYAFHR FTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCHQAYSSPYTFGGG	5 8	30
VH	VQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGIT FSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYDS SRKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQ MNSLRAEDTAVYYCATNNDYWGQG	5 9	
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SVSNYLDWYQQKPGKAPKLLIYDASTR	6 0	40

	ATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQNMQLPLTFGQG	
VH	DLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTF TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARGRGYSYGIDAFD IWGQG	6 1
VL	LSYVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDA LPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSER PSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAE DEADYYCQSADSSGTYVVFSGG	6 2
VH	QQQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGY TFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESE TGGTAYNQKFQGRVTLTADKSSSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTREGITTVATTY YWFYFDVWGQG	6 3
VL	DVVMTQSPLSLPLVTLGQPASISCRSSQ SIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQG	6 4
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATISGG GSDTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARQLNYAWFAYW GQG	6 5
VL	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASE SVDNYGISFMNWYQQKPGQPPKLLIYT SSNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINP MEAEDTAVYYCQQSKEVPWTFGGG	6 6
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGG TFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIPM	6 7

10

20

30

40

50

	FDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSSTGTFD YWGQG		
VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQANHLPTFTFGGG	68	10
VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLTLTCTVSAD SISSTTYWVWIRQPPGKGLEWIGSIS YSGSTYYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFS LKLNSVAATDTALYYCARHLGYNGRYL PFDYWGQG	69	
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGIFYNYVSWYQQHPGKAPELMIYDVS NRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSLTNIISTWVFGGG	70	20
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLTCKASGL TFSSSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD GSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFL QMNSLR AEDTAVYYCATNNDYWGQG	71	30
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQYSNWPRTFGQG	72	

【0101】

一実施形態では、本発明の併用療法における抗PD-1抗体は、配列番号47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70、及び71/72からなる群から選択されるペアとなる重鎖可変領域配列/軽鎖可変領域配列に含まれる重鎖CDR及び軽鎖CDRの全てを含む。重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域のアミノ酸配列中のCDRを同定するための方法および技術は、当技術分野において公知であり、かつ、本明細書に開示される特定の重鎖可変領域配列および/または軽鎖可変領域のアミノ酸配列中のCDRを同定するために使用することができる。CDR境界を同定するために使用することができる例示的な周知の技術としては、例えば、Kabata定義法、Chothia定義法、及びAbM定義法が挙げられる。例えば、Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National

40

50

Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins., J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); および Martin AC, Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989) を参照されたい。

【0102】

一実施形態では、本発明の併用療法における抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ピディリズマブ及びペンプロリズマブからなる群から選択される。

10

【0103】

本発明の医薬組成物は、「治療有効量」又は「予防有効量」の本発明に記載の多標的融合タンパク質及び抗PD-1抗体を含み得る。「治療有効量」は、所望の用量でかつ所望の期間にわたって所望の治療結果を達成するのに有効な量を指す。治療有効量は、疾患状態、個体の年齢、性別、体重などの様々な要因に応じて変動させることができる。治療有効量は、任意の毒性または有害作用が治療上有益な効果に及ばさない量を指す。「治療有効量」は、治療を受けない被験者に対して、抑制測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍増殖速度）は、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、なおより好ましくは少なくとも約80%である。本発明の医薬組成物の抑制測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍体積）の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価することができる。

20

【0104】

「予防有効量」は、所望の用量でかつ所望の期間にわたって所望の予防結果を効果的に達成する量を指す。一般に、予防有効量は、疾患の初期段階より前または疾患の初期段階で被験者に使用されるため、予防有効量は、治療有効量よりも少ない。

【0105】

腫瘍免疫において、本発明の併用療法における多標的融合タンパク質及び抗PD-1抗体の治療方法は、実施例で実証したように、互いに相乗的であり得るため、本発明の医薬組成物は、腫瘍免疫のエスケープを防止するのに有利である。本発明の多標的融合タンパク質及び抗PD-1抗体を含む医薬組成物の共投与は、多標的融合タンパク質又は抗PD-1抗体を別々に投与することによって行うことができ、多標的融合タンパク質と抗PD-1抗体との併用製剤を単回投与することもできる。本発明の併用療法における、多標的融合タンパク質及び抗PD-1抗体の投与は、投与量及び投与期間の柔軟性を可能にする。

30

【0106】

V. 多標的融合タンパク質および医薬組成物の使用

本明細書に開示される多標的融合タンパク質および医薬組成物は、癌の治療的および予防的使用を有する。例えば、多標的融合タンパク質、及び抗PD-1抗体とのその組成物は、種々のがん性疾患を治療及び/又は予防するために、インビトロ若しくはエクスピボ培養細胞に、又は被験者、例えばヒト被験者に投与することができる。

【0107】

一形態では、本発明は、多標的融合タンパク質又は本発明の医薬組成物を使用してインビボで被験者における血管内皮細胞の増殖をブロックし、T細胞を活性化する必要がある疾患を治療または予防し、それによって癌性腫瘍などの関連疾患の増殖もしくは発症、転移、または再発を阻害または低減することに関する。多標的融合タンパク質は、癌性腫瘍の増殖を阻害するか、またはその出現を予防するために単独で使用され得る。あるいは、多標的融合タンパク質は、他のがん治療剤/予防剤（例えば、抗PD-1抗体）と組み合わせ投与され得る。本発明の多標的融合タンパク質を抗PD-1抗体と投与する場合、この組合せは、任意の順序で又は同時に投与することができる。

40

【0108】

したがって、一実施形態では、本発明は、被験者における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法

50

であって、治療有効量の本明細書に記載の多標的融合タンパク質または医薬組成物を被験者に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、被験者における腫瘍細胞の発生若しくは転移又は再発を予防する方法であって、予防有効量の本明細書に記載の多標的融合タンパク質又は医薬組成物を被験者に投与することを含む方法を提供する。

【0109】

いくつかの実施形態では、多標的融合タンパク質または医薬組成物で治療及び/または予防される癌は、固形腫瘍、血液癌（例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、例えば多発性骨髄腫）、及び転移性病巣が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、癌は固形腫瘍である。固形腫瘍の例としては、悪性腫瘍、例えば、肺、乳房、卵巣、リンパ系、消化管（例えば、結腸）、肛門、生殖器および尿生殖路（例えば、腎臓、膀胱上皮、膀胱細胞、前立腺）、咽頭、CNS（例えば、脳、神経またはグリア細胞）、頭頸部、皮膚（例えば、黒色腫）、鼻咽頭（例えば、分化または未分化転移性または局所再発性鼻咽頭癌）および膵臓を侵入する癌などの多様な器官系の肉腫および癌、ならびに結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌および食道癌などの悪性腫瘍を含む腺癌が挙げられる。癌は、初期、中期、もしくは後期、または転移性癌であり得る。

10

【0110】

いくつかの実施形態では、癌は、黒色腫、乳癌、結腸癌、食道癌、消化管間質性腫瘍（GIST）、腎臓癌（例えば腎細胞癌）、肝臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部腫瘍、胃癌、造血器腫瘍（例えばリンパ腫）からなる群から選択される。

20

【0111】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために記載される。実施例は、本発明の保護範囲を制限するものとして決して解釈されるべきではない。

【0112】

実施例

実施例 1、目的遺伝子を含むグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターの構築

(1) 抗PD1抗体BY18.1のコードヌクレオチドの合成及び発現ベクターの構築
International Nonproprietary Name (INN) データベース中の9623番のニボルマブのアミノ酸配列データに従い、チャイニーズハムスター卵巣癌細胞 (CHO) での発現に適した下記のヌクレオチド配列に最適化し、このヌクレオチド配列の合成を上海捷瑞生物工程有限公司に委託した。前記ヌクレオチド配列の発現後に産生される抗PD1抗体は、本明細書では抗体BY18.1として示される。

30

【0113】

抗PD1抗体BY18.1の軽鎖 (BY18.1L) ヌクレオチド配列 (配列番号73) :

C T C G A G G C C A C C A T G G A G A C C G A C A C A C T C C T C C T G T G G G
T G C T G C T G C T G T G G G T G C C T G G C T C C A C T G G C G A G A T T G T
G C T G A C A C A G T C C C C G C T A C T C T G A G C C T G A G C C C T G G C
G A G A G G G C T A C A C T G T C T T G C A G A G C T T C T C A G T C C G T G T
C T T C T T A C C T C G C T T G G T A T C A G C A G A A G C C C G G C C A G G C
T C C A A G A C T G C T G A T C T A T G A C G C T T C T A A C C G C G C T A C A
G G C A T T C C T G C T A G G T T C A G C G G C A G C G G C T C T G G C A C C G
A C T T C A C A C T C A C A A T T A G C T C T C T T G A A C C T G A G G A C T T
C G C C G T G T A C T A C T G C C A G C A G T C T A G C A A C T G G C C T A G A
A C A T T C G G C C A G G G C A C T A A G G T G G A G A T T A A G A G A A C C G
T G G C C G C C C C A G C G T G T T C A T C T T C C C T C C C A G C G A C G A
G C A G C T G A A G T C T G G C A C C G C C A G C G T G G T G T G C C T G C T G
A A C A A C T T C T A C C C C G C G A G G C C A A G G T G C A G T G G A A G G
T G G A C A A C G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A G G A G A G C G T

40

50

G A C C G A G C A G G A C T C C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T G A G C
 A G C A C C C T G A C C C T G A G C A A G G C C G A C T A C G A G A A G C A C A
 A G G T G T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G A C T G T C T A G
 C C C C G T G A C C A A G A G C T T C A A C C G G G G C G A G T G C T A A G A A
 T T C

【 0 1 1 4 】

抗 P D 1 抗体 B Y 1 8 . 1 の軽鎖 (B Y 1 8 . 1 L) アミノ酸配列 (配列番号 7 4) :

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

10

【 0 1 1 5 】

抗 P D 1 抗体 B Y 1 8 . 1 の重鎖 (B Y 1 8 . 1 H) ヌクレオチド配列 (配列番号 7 5) :

T C T A G A G C C A C C A T G G A G A C C G A C A C C C T G C T G C T G T G G G
 T G C T G C T C C T G T G G G T G C C T G G C T C C A C A G G C C A G G T G C A
 G C T C G T G G A G T C C G G C G G C G G C G T G G T G C A G C C C G G C A G A
 T C C C T C A G A C T G G A C T G C A A G G C A T C C G G C A T T A C A T T C T
 C T A A C T C T G G A A T G C A C T G G G T G A G A C A G G C T C C T G G C A A
 G G G C C T G G A A T G G G T G G C C G T G A T T T G G T A C G A C G G C T C T
 A A G A G A T A C T A C G C T G A C T C C G T G A A G G G C C G G T T C A C A A
 T T A G C A G A G A C A A C T C C A A G A A C A C T C T G T T C C T C C A G A T
 G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C T G T G T A C T A C T G C
 G C C A C C A A C G A C G A C T A C T G G G G C C A G G G C A C C C T C G T G A
 C A G T G T C T T C C G C C T C C A C C A A G G G C C C T T C C G T G T T C C C
 T C T G G C C C C T T G C T C C C G C T C C A C C T C C G A G T C C A C C G C C
 G C C C T G G G C T G C C T G G T G A A G G A C T A C T T C C C T G A G C C T G
 T G A C C G T G T C C T G G A A C T C C G G C G C C C T G A C C T C C G G C G T
 G C A C A C C T T C C C T G C C G T G C T G C A G T C C T C C G G C C T G T A C
 T C C C T G T C C T C C G T G G T G A C C G T G C C T T C C T C C T C C C T G G
 G C A C C A A G A C C T A C A C C T G C A A C G T G G A C C A C A A G C C T T C
 C A A C A C C A A G G T G G A C A A G C G C G T G G A G T C C A A G T A C G G C
 C C T C C T T G C C C T C C T T G C C C T G C C C C T G A G T T C C T G G G C G
 G C C C T T C C G T G T T C C T G T T C C C T C C T A A G C C T A A G G A C A C
 C C T G A T G A T C T C C G C A C C C C T G A G G T G A C C T G C G T G G T G
 G T G G A C G T G T C C C A G G A G G A C C C T G A G G T G C A G T T C A A C T
 G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A C A A C G C C A A G A C C A A
 G C C T C G C G A G G A G C A G T T C A A C T C C A C C T A C C G C G T G G T G
 T C C G T G C T G A C C G T G C T G 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 G C C T G C C T T C
 C T C C A T C G A G A A G A C C A T C T C C A A G G C C A A G G G C C A G C C T
 C G C G A G C C T C A G G T G T A C A C C C T G C C T C C T T C C C A G G A G G
 A G A T G 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 G A A
 G G G C T T C T A C C C T T C C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G T C C
 A A C G G C C A G C C T G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C C C C T C C T G
 T G C T G 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 T C C C G C C T
 G A C C G T G G A C A A G T C C C G C T G G C A G G A G G G C A A C G T G T T C
 T C C T G C T C C G T G A T G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C A

20

30

40

50

C C C A G A A G T C C C T G T C C C T G T C C C T G G G C A A G T A A G T C G
A C

【 0 1 1 6 】

抗 P D 1 抗体 B Y 1 8 . 1 の重鎖 (B Y 1 8 . 1 H) アミノ酸配列 (配列番号 7 6) :

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
D C K A S G I T F S N S G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S K R Y Y
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L F L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T N D
D 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 C S R S T S E S 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 K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P 10
P C P A P E F L G G 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
Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q
V Y T L P P S Q E E M 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G K

【 0 1 1 7 】

下線を付けた部分「M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G」は信号ペプチド配列である。

【 0 1 1 8 】

上海捷瑞生物工程有限公司は、前記 B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチド配列及び B Y 1 8 . 1 H コードヌクレオチド配列を合成した。それぞれ、B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドを X h o I - E c o R I で二重酵素で切断し、二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクター（特許登録番号 C N 1 0 4 1 9 5 1 7 3 B、北京比洋生物技術有限公司から入手）を X h o I - E c o R I で二重酵素切断し、X h o I - E c o R I で二重酵素切断された B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドを、X h o I - E c o R I で二重酵素切断された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターにリガーゼで連結して B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドが導入された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターを得た。次に、それぞれ、B Y 1 8 . 1 H コードヌクレオチドを X b a I - S a l I で二重酵素切断し、B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドが導入された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターを X b a I - S a l I で二重酵素切断し、さらに、X b a I - S a l I で二重酵素切断された B Y 1 8 . 1 H コードヌクレオチドを、X b a I - S a l I で二重酵素切断された B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドが導入された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターにリガーゼで連結することにより、B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチド及び B Y 1 8 . 1 H コードヌクレオチドが導入された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターを得、配列決定により正確さを検証した後、発現させ、抗 P D 1 抗体 B Y 1 8 . 1 を得た。

【 0 1 1 9 】

あるいは、B Y 1 8 . 1 H コードヌクレオチドが導入された二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクターに B Y 1 8 . 1 L コードヌクレオチドを連結し、発現させて抗体 B Y 1 8 . 1 を得ることもできる。

【 0 1 2 0 】

(2) C D 8 0 細胞外ドメインと免疫グロブリン F c 領域とを含む融合タンパク質のコードヌクレオチドの合成および発現ベクターの構築

表 1 の C D 8 0 細胞外ドメインの配列および表 6 の I g G 4 F c 配列に従って、チャイニーズハムスター卵巣癌細胞 (C H O) での発現に適したヌクレオチド配列に最適化し、以下の配列番号 7 7 のポリヌクレオチド配列の合成を、上海捷瑞生物工程有限公司に委託した。前記ヌクレオチド配列の発現後に産生される C D 8 0 - F c 融合タンパク質は、本明細書では融合タンパク質 B Y 3 1 . 1 9 としても表される。

10

20

30

40

50

【0121】

融合タンパク質BY31.19 (CD80 - Fc、IgG4) のヌクレオチド配列 (配列番号77)

```

CTCGAGGCCACCATGGAGACCAGACACACTCCTCCTGTGGG
TGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGCTCCACTGGCGTCAATCCA
TGTGACCAAAGAGGTCAAAGAAGTGCACAACCTCTGTCTTGC
GGACACAACGTCTCCGTGGAAGAAGTGCAGGAGACTAGAA
TATATTGGCAGAAAGGAAAAGAAGATGGTGTCTACCATGAT
GTC CGGCGATATGAACATTTGGCCTGAGTACAAGAACC GG
ACAATCTTCGATATTAATAACCTGAGTATCGTGTATT C 10
TCGCTCTGCGCCCTAGCGACGAGGGCACATACGAGTGTGT
GGTGTGTAAGTACGAGAAGGATGCATTCAGAAGCGGGAGCAC
CTCGCAGAGGTGACACTCTCCGTGAAGGCCGACTTCCCAA
CCCCATCTGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCC
TTGCCCTCCTTGCCCTGCCCCCTGAGTTCTCTGGGCGGCCCT
TCCGTGTTCTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCTCCCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGGA
CGTGTCCCAGGAGGACCCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTC
GCAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACC GCGTGGTGTCCGT 20
GCTGACCGTGTGCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAG
TACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCTCCA
TCGAGAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGA
GCCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCAGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCTGTGAAGGGCT
TCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGG
CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCTCCTGTGTCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCCGCCTGACCG
TGGACAAGTCCC GCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTG
CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG 30
AAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCTAAGAAATTC

```

【0122】

融合タンパク質BY31.19 (CD80 - Fc、IgG4) のアミノ酸配列 (配列番号78)

```

METDTLLLWVLLLWVPGSTGV I H V T K E V K E V A T L S C G H N V
S V E E L A Q T R I Y W Q K E K M V L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D
I T N N L S I V I L A L R P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V
T L S V K A D F P T P S D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G 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 D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V
E V H N A K T K P R E E Q F 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 40
V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G

```

ここで、アミノ酸配列「METDTLLLWVLLLWVPGSTG」は信号ペプチドである。

【0123】

二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクター (特許登録番号CN104195173B、北京比洋生物技術有限公司から入手) に、前記実施例1(1)と同様の方法を用いて、BY31.19コードヌクレオチドがXhoI-EcoRI二重 50

酵素切断で連結された。配列決定により組換えベクターの正確さを検証した後、CD80-Fc融合タンパク質発現に用いられる。発現されたCD80-Fc融合タンパク質は、融合タンパク質BY31.19と名付けられた。

【0124】

(3) 抗VEGF抗体とCD80細胞外ドメインとを含む融合タンパク質BY24.4の、コードヌクレオチドの合成及び発現ベクターの構築

表1のCD80細胞外ドメインの配列、表2の抗VEGF抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列、表3の抗体の重鎖定常領域の配列、表4の抗体の軽鎖定常領域の配列、及び配列番号20~46のペプチドリンカー配列に従って、チャイニーズハムスター卵巣癌細胞(CHO)での発現に適したヌクレオチド配列に最適化し、配列番号79、81に示すポリヌクレオチド配列の合成を、上海捷瑞生物工程有限公司に委託した。前記ヌクレオチド配列の発現後に産生される抗VEGF抗体-CD80融合タンパク質は、本明細書では融合タンパク質BY24.4として示される。

10

【0125】

融合タンパク質BY24.4(、IgG4)の第1のサブユニット(BY24.4L)ヌクレオチド配列(配列番号79):

CTCGAGGCCACCATGGAGACAGATACTCTGCTGCTCTGGG
TCCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACAGGCAGCATCCA
GATGACCCAGTCCCTTCTCTCCCTGTCTGCCCTCCGTGGGC
GACAGGGGTGACCATCACCTGTTCGCAATCCCAGGATATCT
CCA ACTA CCTGA ACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGC
CCCCAAGGTGCTGATCTACTTTACTTCTTCCCTGCATTCC
GGCGTGCCTCCAGGTTCCTCTGGCTCCGGGGTCTGGAAACCG
ACTTTACACTGACAAATCTCTCTCTG CAGCCAGAAAGACTT
TGCCACCTAATTACTGCCAGCAGTACTCCACTGTCCCCTGG
ACCTTCGGGCAAGGAACCA AAGTGGAAATCAAGAGGACCG
TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCC CAGCGACGA
GCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGG
TGGACAACGCCCTGCAAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT
GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC
AGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAAGCACA
AGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAG
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGTCTAAGAA
TTC

20

30

【0126】

融合タンパク質BY24.4(、IgG4)の第1のサブユニット(BY24.4L)アミノ酸配列(配列番号80):

METD T L L L W V L L L W V P G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
ITCSASQDISNYLNWYQQKPKKAPKVL IYFTSSLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FN R G E C

40

【0127】

融合タンパク質BY24.4(、IgG4)の第2のサブユニット(BY24.4H)ヌクレオチド配列(配列番号81):

TCTAGAGCCACCATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGG
TCCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCCTCTACAGGCAGAGTGC
GCTGGT CGAATCTGGCGGCGGACTGGTGC AAC CAGGGGGC

50

A G C C T G A G G C T G T C C T G C G C C G C T T C T G G A T A C A C C T T T A
 C C A A T T A C G G C A T G A A T T G G G T G A G G C A G G C T C C T G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G G T G G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C
 G A G C C C A C C T A C G C C G C T G A C T T T A A G A G G A G G T T C A C C T
 T C T C T C T G G A C A C C T C C A A G T C C A C C G C T T A C C T G C A A A T
 G A A C T C T C T G A G G G C T G A A G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C
 G C C A A G T A C C C C A T T A C T A C G G G T C C T C C C A C T G G T A C T
 T C G A C G T G T G G G G C C A G G G C A C C C T C G T G A C A G T G T C T T C
 C G C C T C C A C C A A G G G C C C T T C C G T G T T C C C T C T G G C C C C T
 T G C T C C C G C T C C A C C T C C G A G T C C A C C G C C G C C C T G G G C T 10
 G C C T G G T G A A G G A C T A C T T C C C T G A G C C T G T G A C C G T G T C
 C T G G A A C T C C G G C G C C C T G A C C T C C G G C G T G C A C A C C T T C
 C C T G C C G T G C T G C A G T C C T C C G G C C T G T A C T C C C T G T C C T
 C C G T G G T G A C C G T G C C T T C C T C C C T G G G C A C C A A G A C
 C T A C A C C T G C A A C G T G G A C C A C A A G C C T T C C A A C A C C A A G
 G T G G A C A A G C G C G T G G A G T C C A A G T A C G G C C C T C C T T G C C
 C T C C T T G C C C T G C C C C T G A G T T C C T G G G C G G C C C T T C C G T
 G T T C C T G T T C C C T C C T A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C
 T C C C G C A C C C C T G A G G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A C G T G T
 C C C A G G A G G A C C C T G A G G T G C A G T T C A A C T G G T A C G T G G A 20
 C G G C G T G G A G G T G C A C A A C G C C A A G A C C A A G C C T C G C G A G
 G A G C A G T T C A A C T C C A C C T A C C G C G T G G T G T C C G T G C T G A
 C C G T G C T G 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 G C C T G C C T T C C T C C A T C G A G
 A A G A C C A T C T C C A A G G C C A A G G G C C A G C C T C G C G A G C C T C
 A G G T G T A C A C C C T G C C T C C T T C C C A G G A G G A G A T G 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 G A A G G G C T T C T A C
 C C T T C C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G T C C A A C G G C C A G C
 C T G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C C C C T C C T G T G C T G 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 T C C C G C C T G A C C G T G G A C 30
 A A G T C C C G C T G G C A G G A G G G C A A C G T G T T C T C C T G C T C C G
 T G A T G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G T C
 C C T G T C C C T G T C C C T G G G C G G C G G A G G A T C T G G C G G C G G A
 G G C A G T G G A G G C G G C G G A A G T G T G A T C C A T G T A A C A A A A G
 A A G T G A A G G A A G T G G C T A C A C T C T C T T G C G G C C A C A A C G T
 G T C C G T G G A G G A A C T A G C T C A G A C C C G G A T C T A T T G G C A G
 A A A G A A A A G A A G A T G G T G C T G A C C A T G A T G T C C G G C G A C A
 T G A A C A T T T G G C C A G A G T A C A A G A A C C G C A C A A T T T T C G A
 C A T T A C A A A C A A C C T C T C T A T T G T G A T T C T G G C T C T C A G G
 C C T A G C G A C G A G G G C A C A T A C G A G T G C G T G G T G C T C A A G T 40
 A C G A G A A G G A C G C T T T C A A G C G G G A G C A C C T C G C T G A G G T
 G A C C C T G T C C G T G A A G G C C G A C T T C C C T A C T C C A T C T T A A
 G T C G A C

【 0 1 2 8 】

融合タンパク質BY24.4 (、 I g G 4) の第2のサブユニット (B Y 2 4 . 4 H)
アミノ酸配列 (配列番号 8 2) :

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G 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 Y T F T N Y G M N W V R Q A P G K G L E W V G W I N T Y T G E P T Y
 A A D F K R R F T F S L D T S K S T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K Y P
 H Y Y G S S H W Y F D V W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S 50

T S E S 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 K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R
 V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G 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 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M 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 R L T V D K S R W
 Q E 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 L G G G G S G G G G S G G
 G G S V I H V T K E V K E V A T L S C G H N V S V E E L A Q T R I Y W Q K E K K
 M V L T M M S G D M N I W P E Y K N R T I F D I T N N L S I V I L A L R P S D E 10
 G T Y E C V V L K Y E K D A F K R E H L A E V T L S V K A D F P T P S

【0129】

ここで、アミノ酸配列「M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G」は信号ペプチドである。

【0130】

二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ高効率発現ベクター（特許登録番号 C N 1 0 4 1 9 5 1 7 3 B、北京比洋生物技術有限公司から入手）に、前記実施例 1（1）と同様の方法を用いて、B Y 2 4 . 4 L コードヌクレオチドが X h o I - E c o R I 二重酵素切断で連結され、さらに、B Y 2 4 . 4 L コードヌクレオチドが連結された二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ高効率発現ベクターに、B Y 2 4 . 4 H コードヌクレオチドが X b a I - S a l I 二重酵素切断によりクロニングされ、あるいは、その逆も同様である。配列決定により組換えベクターの正確さを検証した後、発現に用いられる。発現された抗 V E G F 抗体 - C D 8 0 融合タンパク質は、融合タンパク質 B Y 2 4 . 4 と名付けられた。

【0131】

（4）抗 V E G F R 抗体と C D 8 0 細胞外ドメインとを含む融合タンパク質 B Y 2 4 . 5 の、コードヌクレオチドの合成および発現ベクターの構築
 表 1 の C D 8 0 細胞外ドメインの配列、表 2 の抗 V E G F R 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域配列、表 3 の抗体の重鎖定常領域配列、表 4 の抗体の軽鎖定常領域配列、及び配列番号 2 0 ~ 4 6 のペプチドリンカー配列に従って、チャイニーズハムスター卵巣癌細胞（C H O）での発現に適したヌクレオチド配列として最適化し、配列番号 8 3、8 5 に示すポリヌクレオチド配列の合成を、上海捷瑞生物工程有限公司に委託した。前記ヌクレオチド配列の発現後に産生される抗 V E G F R 抗体 - C D 8 0 融合タンパク質は、本明細書では融合タンパク質 B Y 2 4 . 5 として示される。

【0132】

融合タンパク質 B Y 2 4 . 5（、I g G 4）の第 1 のサブユニット（B Y 2 4 . 5 L）ヌクレオチド配列（配列番号 8 3）：

C T C G A G G C C A C C A T G G A G A C A G A T A C T C T G C T G C T C T G G G
 T C C T G C T G C T G T G G G T G C C A G G C A G C A C A G G C G A C A T C C A
 G A T G A C C C A G T C T C C T A G C T C C G T G A G C G C C T C T A T C G G C 40
 G A C A G A G T G A C C A T C A C A T G C A G A G C T T C T C A G G G C A T C G
 A C A A C T G G C T C G G C T G G T A C C A G C A G A A G C C T G G C A A G G C
 C C C A A A G C T G C T G A T C T A C G A C G C C T C T A A C C T G G A C A C C
 G G C G T G C C A T C C C G G T T C A G C G G C T C T G G C T C C G G C A C A T
 A C T T C A C A C T C A C A A T C T C T T C C C T G C A G G C C G A G G A C T T
 C G C T G T G T A C T T C T G C C A G C A G G C T A A G G C T T T C C C A C C T
 A C A T T C G G C G G C G G A A C C A A A G T G G A A A T C A A G A G G A C C G
 T G G C C G C C C C A G C G T G T T C A T C T T C C C T C C C A G C G A C G A
 G C A G C T G A A G T C T G G C A C C G C C A g C G T G G T G T G C C T G C T G
 A A C A A C T T C T A C C C C C G C G A G G C C A A G G T G C A G T G G A A G G 50

T G G A C A A C G C C C T G C A g A G C G G C A A C A G C C A G G A G A G C G T
 G A C C G A G C A G G A C T C C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T G A G C
 A G C A C C C T G A C C C T G A G C A A G G C C G A C T A C G A G A A G C A C A
 A G G T G T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G A C T G T C T A G
 C C C C G T G A C C A A G A G C T T C A A C C G G G G C G A G T G C T A A G A A
 T T C

【 0 1 3 3 】

融合タンパク質 B Y 2 4 . 5 (、 I g G 4) の第 1 のサブユニット (B Y 2 4 . 5 L)
 アミノ酸配列 (配列番号 8 4) :

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D I Q M T Q S P S S V S A S I G D R V T 10
 I T C R A S Q G I D N W L G W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S N L D T G V P S
 R F S G S G S G T Y F T L T I S S L Q A E D F A V Y F C Q Q A K A F P P T F G G
 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【 0 1 3 4 】

融合タンパク質 B Y 2 4 . 5 (、 I g G 4) の第 2 のサブユニット (B Y 2 4 . 5 H)
 ヌクレオチド配列 (配列番号 8 5) :

T C T A G A G C C A C C A T G G A A A C C G A C A C A C T G C T G C T G T G G G
 T C C T G C T G C T G T G G G T G C C A G G C T C T A C A G G C G A G G T G C A 20
 G C T C G T G C A G T C T G G C G G C G G C C T C G T G A A G C C A G G C G G C
 T C C C T C A G A C T G T C T T G C G C T G C T A G C G G C T T C A C A T T C T
 C T T C C T A C T C T A T G A A C T G G G T G A G A C A G G C T C C C G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G G T G T C C A G C A T C T C T T C C T C T A G C T C T
 T A C A T C T A C T A C G C C G A C T C C G T G A A G G G C A G A T T C A C A A
 T C A G C C G G G A C A A C G C C A A G A A C T C C C T G T A C C T G C A G A T
 G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C T G T G T A C T A C T G C
 G C T A G A G T G A C C G A C G C T T T C G A C A T C T G G G G C C A G G G C A
 C T C T C G T G A C A G T G T C T T C C G C C T C C A C C A A G G G C C C T T C
 C G T G T T C C C T C T G G C C C C T T G C T C C C G C T C C A C C T C C G A G 30
 T C C A C C G C C G C C C T G G G C T G C C T G G T G A A G G A C T A C T T C C
 C T G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A C T C C G G C G C C C T G A C
 C T C C G G C G T G C A C A C C T T C C C T G C C G T G C T G C A G T C C T C C
 G G C C T G T A C T C C C T G T C C T C C G T G G T G A C C G T G C C T T C C T
 C C T C C C T G G G C A C C A A G A C C T A C A C C T G C A A C G T G G A C C A
 C A A G C C T T C C A A C A C C A A G G T G G A C A A G C G C G T G G A G T C C
 A A G T A C G G C C C T C C T T G C C C T C C T T G C C C T G C C C C T G A G T
 T C C T G G G C G G C C C T T C C G T G T T C C T G T T C C C T C C T A A G C C
 T A A G G A C A C C C T G A T G A T C T C C C G C A C C C C T G A G G T G A C C
 T G C G T G G T G G T G G A C G T G T C C C A G G A G G A C C C T G A G G T G C 40
 A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A C A A C G C
 C A A G A C C A A G C C T C G C G A G G A G C A G T T C A A C T C C A C C T A C
 C G C G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G C T G 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 G
 C C T G C C T T C C T C C A T C G A G A A G A C C A T C T C C A A G G C C A A G
 G G C C A G C C T C G C G A G C C T C A G G T G T A C A C C C T G C C T C C T T
 C C C A G G A G G A G A T G 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 G A A G G G C T T C T A C C C T T C C G A C A T C G C C G T G G A G
 T G G G A G T C C A A C G G C C A G C C T G A G A A C A A C T A C A A G A C C A
 C C C C T C C T G T G C T G 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 50

C T C C C G C C T G A C C G T G G A C A A G T C C C G C T G G C A G G A G G G C
 A A C G T G T T C T C C T G C T C C G T G A T G C A C G A G G C C C T G C A C A
 A C C A C T A C A C C C A G A A G T C C C T G T C C C T G T C C C T G G G C G G
 C G G A G G A T C T G G C G G C G G A G G C A G T G G A G G C G G C G G A A G T
 G T G A T C C A T G T A A C A A A A G A A G T G A A G G A A G T G G C T A C A C
 T C T C T T G C G G C C A C A A C G T G T C C G T G G A G G A A C T A G C T C A
 G A C C C G G A T C T A T T G G C A G A A A G A A A A G A A G A T G G T G C T G
 A C C A T G A T G T C C G G C G A C A T G A A C A T T T G G C C A G A G T A C A
 A G A A C C G C A C A A T T T T C G A C A T T A C A A A C A A C C T C T C T A T
 T G T G A T T C T G G C T C T C A G G C C T A G C G A C G A G G G C A C A T A C
 G A G T G C G T G G T G C T C A A G T A C G A G A A G G A C G C T T T C A A G C
 G G G A G C A C C T C G C T G A G G T G A C C C T G T C C G T G A A G G C C G A
 C T T C C C T A C T C C A T C T T A A G T C G A C

【0135】

融合タンパク質BY24.5(、IgG4)の第2のサブユニット(BY24.5H)アミノ酸配列(配列番号86)：

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

【0136】

ここで、アミノ酸配列「M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G」は信号ペプチドである。

【0137】

二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ高効率発現ベクター(特許登録番号CN104195173B、北京比洋生物技術有限公司から入手)に、前記実施例1(1)と同様の方法を用いて、BY24.5LコードヌクレオチドがXhoI-EcoRI二重酵素切断で連結され、さらに、BY24.5Lコードヌクレオチドが連結された二重発現カセットを有するグルタミンシンテターゼ高効率発現ベクターに、BY24.5HコードヌクレオチドがXbaI-SalI二重酵素切断によりクローニングされ、あるいは、その逆も同様である。配列決定により組換えベクターの正確さを検証した後、発現に用いられる。発現された抗VEGFR抗体-CD80融合タンパク質は、融合タンパク質BY24.5と名付けられた。

【0138】

(5)CD80細胞外ドメイン、免疫グロブリンFc領域、およびVEGFR細胞外受容体機能領域を含む融合タンパク質のコードヌクレオチドの合成および発現ベクターの構築表1のCD80細胞外ドメインの配列、表6のIgG4Fc配列、および表5のVEGFR機能性領域配列(VEGFR1-D2/VEGFR2-D3)に従って、チャイニーズハムスター卵巣癌細胞(CHO)での発現に適したヌクレオチド配列に最適化し、配列

10

20

30

40

50

番号 87 に示すポリヌクレオチド配列の合成を、上海捷瑞生物工程有限公司に委託した。前記ヌクレオチド配列の発現後に産生される CD80 - Fc - VEGFR 融合タンパク質は、本明細書では融合タンパク質 BY24.12 として示される。

【 0 1 3 9 】

融合タンパク質 BY24.12 (CD80 - Fc - VEGFR) のヌクレオチド配列 (配列番号 87)

CTCGAGGCCACCGCCACCATGGAGACCAGACACACTCCTCC
 TGTGGGTGCTGCTGCTGTTGGGTGCCTGGCTCCACTGGCGT
 CATCCATGTGACCAAGAAGGTCAGAAGAGTCCGCAACTCTG
 TCTTGC GGACACAACGTCTCCGTCGAAGAAGTCCGCCAGA 10
 CTAGAATAATAATTGGCAGAAAGGAAAGAAGATGGTGTCTCAC
 CATGATGTC CGGC GATATGAACATTTGGCCTGAGTACAAG
 AACCGGACAATCTTCGATATTAATAAACCCTGAGTATCG
 TGATTCCTCGCTCTGCGCCCTAGCGACGAGGGGCACATACGA
 GTGTGTGGTGTGCTGAAGTACGAGAAAGGATGCATTCAGAAGCGG
 GAGCACCTTCGCAGAGGTGACACTCTCCGTGAAGGCCGACT
 TCCCAACCCCATCTGACAAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGG
 CCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCCCTGAGTTCCTGGGC
 GGCCCTTCCGTGTTCTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACA
 CCTGATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGT 20
 GGTGACGTGTCCAGGAGGACCCCTGAGGTGCAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAACGCCAAGACCA
 AGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACC GCGTGGT
 GTCCGTGCTGACCGTGTGCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGC
 AAGGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCCTGCTT
 CCTCCAATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCC
 TCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCTCTCTTCCAGGAG
 GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCTGGTGA
 AGGGCTTCTACCCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT
 CAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCT 30
 GTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTA CTCCCGCC
 TGACC GTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTT
 CTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAACCACTAC
 ACCCAGAAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGGCGGCGGAGGAT
 CTGGCGGGCGGAGGCAGTGGAGGCGGCGGAAGTGTCTCCGA
 CACC GGCCGCCTTTCTGTGGAGATGTACTCCGAGATCCCT
 GAGATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCC
 CTTGCCGCGTGA CCTCCCTAACAATCACCGTGA CCTGA
 GAAGTTCCCTCTGGACACCCTGATCCCTGACGGCAAGCGC
 ATCATCTGGGACTCCCGCAAGGGCTTCAATCATCTCCAACG 40
 CCACTACAAGGAGATCGGCCTGTGACTGCGAGGCCAC
 CGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCACA ACTACCTGACCCAC
 CGCCAGACCAACAACAATCATCGACGTGGTGTCTCCCTT
 CCCACGGCATCGAGCTGTCCGTGGGGCGAGAAAGCTGGTGT
 GAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGAC
 TTCAACTGGGAGTACCCTTCTCTCCAAGCACCAAGAA
 AGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCAGTCCGGCTCCGA
 GATGAAGAAAGTTCTCTGTCCACCCTGACCATCGACGGCGTG
 ACCCGCTCCGACCAAGGGCCTGTACACCCTGCGCCGCTCCT
 CCGGCCTGATGACCAAGAAGAAACTCCAACCTTCTGTGCGCGT 50

10
20
30
40
50

G C A C G A G T A A G A A T T C

【0140】

融合タンパク質BY24.12(CD80-Fc-VEGFR)のアミノ酸配列(配列番号88)

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

10

20

【0141】

二重発現カセットを有するグルタミンシンターゼ高効率発現ベクター(特許登録番号CN104195173B、北京比洋生物技術有限公司から入手)に、前記実施例1(1)と同様の方法を用いて、BY24.12コードヌクレオチドがXhoI-EcoRI二重酵素切断で連結された。配列決定により組換えベクターの正確さを検証した後、発現に用いられる。発現された融合タンパク質は、融合タンパク質BY24.12と名付けられた。

【0142】

実施例2、目的タンパク質の発現および精製

(1)目的タンパク質の一過性発現

293F(Invitrogenから入手可能、カタログ番号11625-019)細胞を、無血清CD293培養液(Invitrogenから入手可能、カタログ番号11913-019)中で懸濁培養した。トランスフェクション前の細胞培養物を遠心分離して細胞ペレットを得、細胞濃度が 1×10^6 細胞/mlとなるように新鮮な無血清CD293培養液に細胞を懸濁した。細胞懸濁液を振盪フラスコに入れた。実施例1で調製した目的遺伝子を含む組換え発現ベクタープラスミドの各DNA250ugとポリエチレンイミン(PEI)(Sigma、カタログ番号408727)500ugをそれぞれ、細胞懸濁液100mlを例に、無血清CD293培養液1mlに加えて混合し、室温で8分間静置した後、PEI/DNA懸濁液を、細胞懸濁液100mlを入れた振盪フラスコに滴下した。穏やかに混合し、5%のCO₂、37℃の振盪に置いて培養した(120回転/分)。5日後に培養上清を採取した。

30

40

【0143】

(2)発現タンパク質の精製

上記の実施例2(1)で回収した培養上清中に存在する目的タンパク質を、pH7.4のPBS溶液で平衡化したHiTrap MabSelect SuRe 1mlカラム(GE Healthcare Life Sciences製品、カタログ番号:11-0034-93)を用いて精製した。手短に述べると、HiTrap MabSelect SuRe 1mlカラムを、pH7.4のPBS溶液を用いて0.5ml/分の流速で、10カラム床体積で平衡化した。上記実施例2(1)で回収した培養上清を、0.45μmろ過膜を用いてろ過した後、pH7.4のPBS溶液で平衡化したHiTrap MabSelect SuRe 1mlカラムにローディングし、上清をロードした後、

50

該カラムをまず pH 7.4 の PBS 溶液で流速 0.5 ml / 分で 5 ~ 10 個のカラム床の体積を洗浄し、その後に 100 mM のクエン酸緩衝液 (pH 4.0) で流速 0.5 ml / 分で溶出する。溶出ピークを収集し、目的タンパク質 BY 18.1、BY 31.19、BY 24.4、BY 24.5、BY 24.12 がそれぞれ溶出ピークに存在する。

【 0 1 4 4 】

それぞれの目的タンパク質 BY 18.1、BY 31.19、BY 24.4、BY 24.5、BY 24.12 の純度および分子量を、還元剤 (5 mM の 1, 4 - ジチオトレイトール) の存在下で SDS - PAGE 電気泳動およびクマシーブルーによる染色によって分析した。その結果を、分子量理論予測値と実測値とを合わせて、下記の表 8 に示す。真核生物発現系ではタンパク質に対するグリコシル化作用があるため、分子量実測値は理論予測値よりも若干高い値となる。

10

表 8 精製された発現タンパク質の分子量サイズ

タンパク質名称	サブユニット	理論的な予測分子量 (kDa)	実際の分子量サイズ (kDa)
融合タンパク質 BY 2 4.4	第 1 サブユニット	23	27
	第 2 サブユニット	62	70
融合タンパク質 BY 2 4.5	第 1 サブユニット	23	27
	第 2 サブユニット	74	70
融合タンパク質 BY 2 4.12	いずれかのサブユ ニット	63	72
融合タンパク質 BY 3 1.19	いずれかのサブユ ニット	40	45
抗体 BY 18.1	軽鎖	23	27
	重鎖	48	50

20

30

【 0 1 4 5 】

実施例 3、ELISA 法を用いた特異的結合効果の検出

組換えヒト CD 28 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号 : 50103 - M08H)、組換えヒト PD - L 1 (北京百普賽斯生物技術有限公司、カタログ番号 : PD1 - H5229)、組換えヒト CTLA - 4 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号 : 11159 - H08H) をそれぞれ 0.5 μg / ml、0.25 μg / ml、1.0 μg / ml に希釈し、96 ウェル ELISA プレート (Corning 社、品番 : 42592) でコーティングした。上記実施例 2 (2) で精製した融合タンパク質 BY 24.4、BY 24.5、BY 24.12、BY 31.19 を 2000 μg / ml に希釈し、次に 3 倍のシリーズ希釈を行い、合計 16 個の勾配を希釈し、各濃度勾配に対して複穴検出を行った。希釈試料 50 μL を、上記の組み換えヒト CD 28、組み換えヒト CTLA - 4、または組み換えヒト PD - L 1 でコーティングした 96 ウェルプレートにそれぞれ加え、37 °C で 2 時間インキュベートした。3 回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト二次抗体 (北京中衫金橋公司製、品番 ZDR - 5301) を加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) 基質発色液 (北京康偉世紀生物技術有限公司、製品番号 : CW0050) 50 μL

40

50

1 / ウェルを加えた。10分後、2NのH₂SO₄を加えて発色を終了した。ELISAリーダーを用いて、450nmで各ウェルの吸光度OD値を決定した。

【0146】

GraphPad Prism 5ソフトウェアを用いて、吸光度OD値に対する融合タンパク質BY24.4、BY24.5、BY24.12、およびBY31.19のタンパク質濃度をプロットし、データをフィッティングして、融合タンパク質によって媒介される特異的結合効果の半分最大有効濃度EC50値を得た。結果を下記表9に示す。

表9 各融合タンパク質のヒトPD-L1、ヒトCD28およびヒトCTLA-4に対する結合効果

タンパク質名	hPD-L1の結合EC50 (μg/mL)	hCD28の結合EC50 (μg/mL)	hCTLA-4の結合EC50 (μg/mL)
融合タンパク質BY24.4	6.352	23.05	2.270
融合タンパク質BY24.5	5.167	35.07	3.751
融合タンパク質BY24.12	3.748	13.16	2.890
融合タンパク質BY31.19	2.20	24.33	1.924

【0147】

ELISAの結果は、本発明の多標的融合タンパク質BY24.4、BY24.5、BY24.12および陽性対照としてのBY31.19のいずれもが、組み換えヒトPD-L1、組み換えヒトCD28およびCTLA-4に結合できることを示す。CTLA-4に対する結合能は、各融合タンパク質が最も強く、PD-L1がその次で、CD28が最も弱い。

【0148】

実施例4、Biacore T100を用いて本発明の目的タンパク質のターゲットへの親和力の測定

表面プラズモン共鳴測定は、Biacore (登録商標) T100装置 (GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン) で25℃で行った。

【0149】

まず、抗IgG抗体 (GE Healthcare Life Sciences, カタログ番号: BR-1008-39) をアミドカップリングによりCM5チップ上に共有結合で固定化した。60μlのN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び60μlのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) でC

10

20

30

40

50

M5チップを活性化し、次に、5 μ lの抗IgG抗体に95 μ lの希釈緩衝液HBST (0.1 M HEPES、1.5 M NaCl、pH 7.4、0.005% tween 20)を加えて0.2 μ mのフィルターで濾過した後、アミドカップリングによって抗IgG抗体をCM5チップ上に共有固定化して、約9000 - 14000共鳴単位(RU)の捕捉系を得た。CM5チップを120 μ lのエタノールアミンでブロックした。

【0150】

次に、実施例2で調製した本発明の各目的タンパク質をそれぞれ5 μ g/mlに希釈し、この希釈液を流速10 μ L/分で2分間注射し、実施例2で調製した本発明の各目的タンパク質をそれぞれのFc領域を通じてCM5チップ表面に非共有結合的に捕捉した。得られた複合体は、測定及び再生中のベースラインのドリフトを回避するためにEDC/NHSでの架橋によって安定化された。

10

【0151】

結合抗原PD-1 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号: 10377-H08H)、VEGF165 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号: 11066-HNAH)、マウスVEGF164 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号: 50159-MNAB)及びVEGFR2 (北京義翹神州生物技術有限公司製、カタログ番号: 10012-H02H1)を、それぞれ、濃度勾配: 7 nM、22 nM、66 nM、200 nM、600 nMとなるように調製した。1回当たり180秒間の流速30 μ l/分で注入し、600秒間の解離時間で、結合を測定した。3MのMgCl₂溶液で30秒間、流量10 μ L/分で洗浄することにより、表面を再生した。BIA評価ソフトウェア (BIA evaluation 4.1 software、GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン)を用いてデータ分析を行い、下記表10に示すアフィニティデータを得た。

20

表10 各標的タンパク質とターゲットとの結合

目的タンパク質名	ターゲット	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
融合タンパク質BY24.4	VEGF-A	$2.221E+6$	$3.407E-5$	$1.534E-11$
融合タンパク質BY24.5	VEGF-R2	$6.82E+5$	$5.57E-5$	$8.17E-11$
融合タンパク質BY24.12	VEGF-A (ヒト)	$3.15E+6$	$1.25E-4$	$3.98E-11$
融合タンパク質BY24.12	VEGF-A (マウス)	$9.18E+5$	$3.13E-5$	$3.41E-11$
抗体BY18.1	PD-1	$6.66E+5$	$1.58E-3$	$2.37E-9$

30

40

【0152】

融合タンパク質BY24.4、BY24.5、BY24.12は、各々のターゲットとのKD (M)が 10^{-9} M未満であることから、各々のターゲットとの高い親和力を示し、

50

特に融合タンパク質 B Y 2 4 . 1 2 は、マウスおよびヒト V E G F - A の両方に高親和力で結合してもよく、それほど大きくは異なることが分かる。

【 0 1 5 3 】

実施例 5、混合リンパ球反応 (M L R) における I F N - 分泌に対する本発明の目的タンパク質およびその組成物の影響

異なる健康ヒトに由来する C D 4 + T リンパ球及び樹状細胞 (D C) は、北京時合生科学技術株式会社から購入した。C D 4 + T リンパ球及び樹状細胞 (D C) を、それぞれ、96 ウェル細胞培養プレートに 1×10^5 細胞 / ウェル及び 1×10^4 細胞 / ウェルで播種した。試験を、それぞれ B Y 1 8 . 1 群 ($1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$)、B Y 2 4 . 4 群 ($1.14 \mu\text{g} / \text{mL}$)、B Y 2 4 . 4 ($1.14 \mu\text{g} / \text{mL}$) + B Y 1 8 . 1 ($1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$)、B Y 2 4 . 5 ($1.14 \mu\text{g} / \text{mL}$) + B Y 1 8 . 1 ($1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$)、B Y 2 4 . 1 2 ($0.84 \mu\text{g} / \text{mL}$)、および B Y 2 4 . 1 2 ($0.84 \mu\text{g} / \text{mL}$) + B Y 1 8 . 1 ($1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$) の 7 群に分けた。各群の 3 つのウェルに対して、要求に従って、抗体 B Y 1 8 . 1、融合タンパク質 B Y 2 4 . 4、B Y 2 4 . 5、B Y 2 4 . 1 2、または抗体 B Y 1 8 . 1 と各融合タンパク質 B Y 2 4 . 4、B Y 2 4 . 5、B Y 2 4 . 1 2 との組合せを、示される最終濃度まで添加する。最終的に 10 % の牛胎児血清を含む 1640 培地を最終容量が $200 \mu\text{l}$ となるように添加した。37、5 % の C O ₂ で培養する。

10

【 0 1 5 4 】

培養 5 日後、これらの 7 つの試験群のいずれにおいても、ペレット化細胞が多く、シャトル細胞および接着細胞のかなりの部分が出現した。培養上清を採取し、各組の I F N - の発現レベルを、依科賽生物科技有限公司製の I F N - キット (品番 : E H 0 0 8 - 9 6 E L I S A) を用いて測定した。

20

【 0 1 5 5 】

検出結果は、抗体 B Y 1 8 . 1 群 ($2221.8 \pm 364.5 \text{ pg} / \text{ml}$) と比較して、単独した融合タンパク質群 ($924.1 \pm 221.9 \text{ pg} / \text{ml}$)、融合タンパク質群 ($760.1 \pm 286.8 \text{ pg} / \text{ml}$) 及び融合タンパク質群 ($793.4 \pm 139.2 \text{ pg} / \text{ml}$) のいずれもが抗体 B Y 1 8 . 1 群 ($P < 0.01$) よりも顕著に低い I F N - 分泌であったが、融合タンパク質 B Y 2 4 . 4、融合タンパク質 B Y 2 4 . 5 及び融合タンパク質 B Y 2 4 . 1 2 に B Y 1 8 . 1 がそれぞれ添加されると、各群の I F N - 分泌はいずれも顕著に向上し、各群の I F N - 分泌がそれぞれ、B Y 2 4 . 4 + B Y 1 8 . 1 群 ($3494.2 \pm 364.5 \text{ pg} / \text{ml}$)、B Y 2 4 . 5 + B Y 1 8 . 1 群 ($3523.8 \pm 465.1 \text{ pg} / \text{ml}$) 及び B Y 2 4 . 1 2 + B Y 1 8 . 1 群 ($3801.8 \pm 702.2 \text{ pg} / \text{ml}$) であった。このことから、融合タンパク質 B Y 2 4 . 4、B Y 2 4 . 5 および B Y 2 4 . 1 2 と B Y 1 8 . 1 とのそれぞれの組合せは、I F N - 分泌の顕著な増加 ($P < 0.01$) をもたらすことができ、抗体 B Y 1 8 . 1 (P D - 1 抗体) と本発明の多標的化融合タンパク質 B Y 2 4 . 4、B Y 2 4 . 5 および B Y 2 4 . 1 2 との組合せが、I F N - 分泌に対する顕著な相乗効果を有することが示された。

30

【 0 1 5 6 】

実施例 6、本発明の多標的融合タンパク質と P D - 1 抗体との相乗効果

40

本実施例の主な目的は、本発明の多標的化融合タンパク質と P D - 1 抗体とのインビボ抗腫瘍における相乗効果を検討することであり、従って、P D - 1 抗体及び各融合タンパク質の用量は、いずれも低用量であり、高用量では腫瘍抑制効果が良好で P D - 1 抗体及び各融合タンパク質相互間の相乗効果は見られない可能性がある。

【 0 1 5 7 】

R P M I - 1640 培地中のマウス由来結腸癌細胞 C T 2 6 (A T C C) を、 1×10^6 細胞 / マウスの量で、約 18 g の 6 週齢の雌 B A L B / c マウスの右側前腹部皮下に $100 \mu\text{l}$ / マウスで播種した。マウス由来結腸癌細胞を、0 日目に C T 2 6 接種を行った。平均腫瘍体積が約 93 mm^3 に達したら、担癌マウスを、各 6 匹ずつ、合計 5 群にランダムにグループ化した。モル量は分子量の大きさから計算し、融合タンパク質 B Y 3 1 . 1

50

9、BY24.12及び抗mPD-1抗体は同等のモル量で投与した。具体的には、グループ分け及び投与量はそれぞれ、ピヒクル(PBS)対照群、融合タンパク質BY31.19(1.6mg/kg)群、融合タンパク質BY24.12(2.5mg/kg)群、抗mPD-1(3.0mg/kg、BioXcellから入手可能、クローン番号:RMP1-14、製品番号:BE0146)群、融合タンパク質BY24.12(2.5mg/kg)+抗mPD-1(3mg/kg)群。1週間に2回投与した。腫瘍体積の測定は週に3回行い、腫瘍体積の測定と同時にマウスの体重を秤量し、マウスの体重及び腫瘍体積の変化と投与時間との関係を記録した。試験の最後に、マウスを安楽死させ、血清及び腫瘍を採取し、血清を-80℃まで凍結保存し、腫瘍を、秤量写真の後、ホルマリン固定及びパラフィン包埋(FFPE)を経て組織サンプルとして調製した。各データを統計学的に分析し、各治療群とピヒクル対照群の相対腫瘍体積比(T/C)% (すなわち、(投与群腫瘍体積変化の平均値/PBSピヒクル対照群腫瘍体積変化の平均)×100%)及び腫瘍成長阻害率(Tumor Growth Inhibition%)を(1-T/C)%として計算した。

10

【0158】

試験終了時点で、BY31.19群、BY24.12群、PD-1群、BY24.12+抗mPD-1群の腫瘍増殖抑制率(TGI%)は腫瘍体積基準で、それぞれ、15%、17%、24%、47%と異なった抑制効果であった。免疫融合タンパク質BY24.12とPD-1抗体との併用は、BY24.12とPD-1を単独で使用する場合よりも腫瘍に対する阻害効果が著しく良好であり、したがって、両者間に相乗効果が存在する。

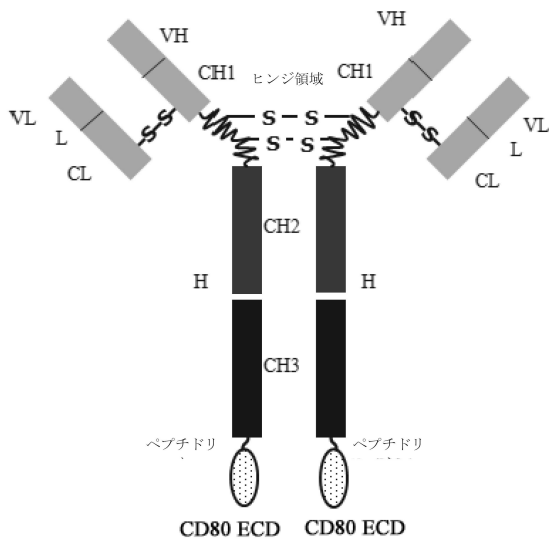
20

【0159】

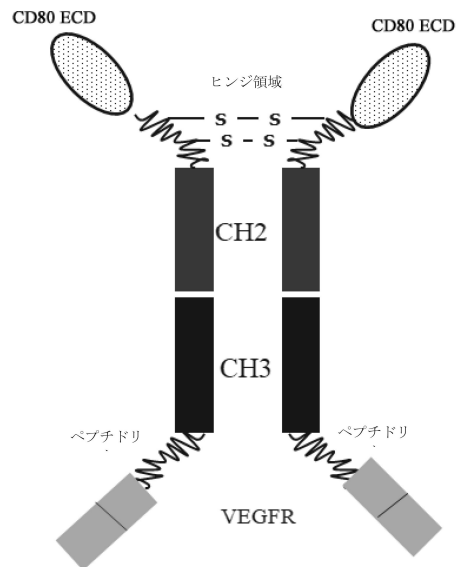
各群の動物は投与後体重増加が続き、全体の状態は良好で顕著な異常は見られず、顕著な薬物停止や動物の死亡は認められなかった。

【図面】

【図1A】



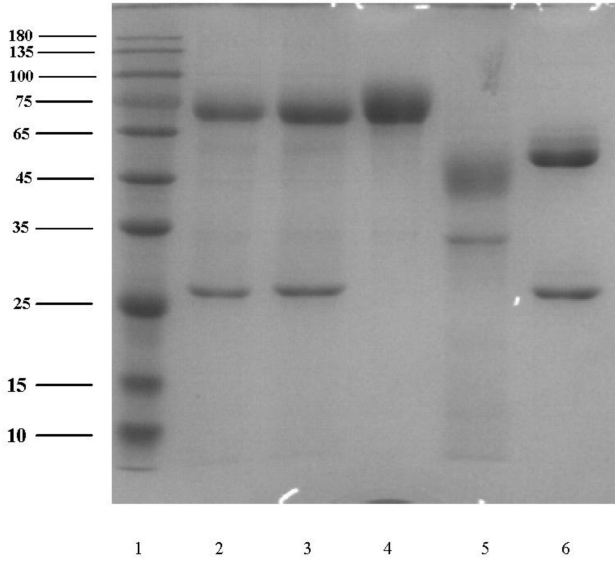
【図1B】



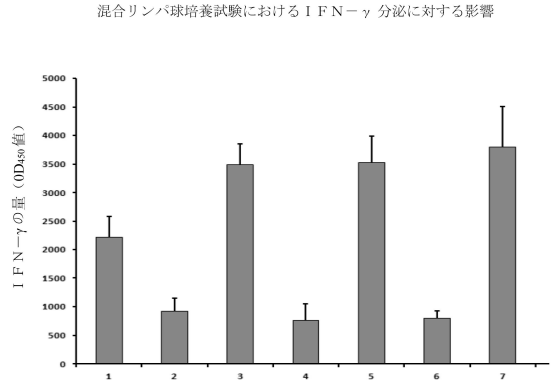
30

40

【 図 2 】

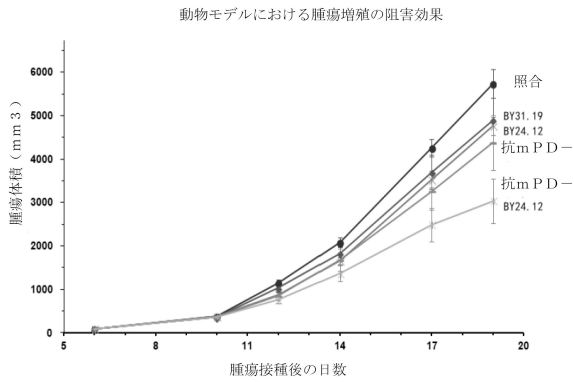


【 図 3 】



10

【 図 4 】



20

30

【 配列表 】

2022517920000001.app

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/071213
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; C12P; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) 数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: vegf, 血管内皮生长因子, cd80, fc, 抗体, 融合蛋白, 胞外结构域, B7-1, PD-1, vascular endothelial cell growth factor, antibody, fusion protein, extracellular domain, ecd, SEQ ID NOS: 1-88		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD et al.) 02 December 2010 (2010-12-02) see description, page 1, line 30 to page 2, line 16, page 7, line 1 to page 22, line 41, embodiments, claims	1-14
Y	CN 108884139 A (FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.) 23 November 2018 (2018-11-23) see description, paragraphs 0054-0179, claims	1-14
Y	CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 09 October 2018 (2018-10-09) see description, paragraphs 0007-0050, claims, SEQ ID NOS: 1-26, 40-41	2-14
Y	WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC. et al.) 21 December 2017 (2017-12-21) see SEQ ID NOS: 1-2, 5-6	2-14
Y	WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 18 October 2018 (2018-10-18) see SEQ ID NOS: 9, 11	2-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 February 2020		Date of mailing of the international search report 23 March 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/071213

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2010136480	A1	02 December 2010	JP	2012527875	A	12 November 2012
				US	2012070436	A1	22 March 2012
				CA	2763439	A1	02 December 2010
				EP	2435477	A1	04 April 2012
CN	108884139	A	23 November 2018	IL	258725	D0	28 June 2018
				BR	112018008865	A2	06 November 2018
				CL	2018001172	A1	21 September 2018
				US	2017145071	A1	25 May 2017
				US	10273281	B2	30 April 2019
				EA	201891106	A1	28 December 2018
				CA	3001131	A1	11 May 2017
				SG	11201803009V	A	30 May 2018
				CR	06.03.2018	A	16 October 2018
				PE	20181300	A1	09 August 2018
				PE	13002018	A1	09 August 2018
				JP	2018535204	A	29 November 2018
				MX	2018005517	A	09 November 2018
				US	2019202889	A1	04 July 2019
				TW	201722985	A	01 July 2017
				US	2019194288	A1	27 June 2019
				WO	2017079117	A1	11 May 2017
				BR	112018008865	A8	26 February 2019
				KR	20180069903	A	25 June 2018
EP	3371208	A1	12 September 2018				
CO	2018004132	A2	30 November 2018				
PH	12018500933	A1	19 November 2018				
AU	2016350701	A1	31 May 2018				
CN	108623691	A	09 October 2018	WO	2018166468	A1	20 September 2018
WO	2017218977	A2	21 December 2017	AU	2017286676	A1	13 December 2018
				SG	11201810777 W	A	28 December 2018
				IL	263690	D0	31 January 2019
				BR	112018075516	A2	01 October 2019
				KR	20190039929	A	16 April 2019
				AU	2017286676	A8	20 December 2018
				MX	2018015173	A	04 July 2019
				TW	201803902	A	01 February 2018
				CN	109563124	A	02 April 2019
				JP	2019521986	A	08 August 2019
				WO	2017218977	A3	18 January 2018
				CA	3026518	A1	21 December 2017
				AR	108800	A1	26 September 2018
				EP	3472177	A2	24 April 2019
US	2019256556	A1	22 August 2019				
WO	2017218977	A8	28 March 2019				
WO	2018191438	A1	18 October 2018	US	2019010242	A1	10 January 2019
				TW	201843177	A	16 December 2018
				AU	2018250641	A1	31 October 2019
				CA	3058477	A1	18 October 2018
				SG	11201909160 W	A	30 October 2019
				IL	269826	D0	28 November 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/071213

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/071213
A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; C12P; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: vegf, 血管内皮生长因子, cd80, fc, 抗体, 融合蛋白, 胞外结构域, B7-1, PD-1, vascular endothelial cell growth factor, antibody, fusion protein, extracellular domain, ecd, SEQ ID NOS:1-88		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第1页第30行-第2页第16行, 第7页第1行-22页第41行, 实施例, 权利要求书	1-14
Y	CN 108884139 A (戊瑞治疗有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见说明书第0054-0179段, 权利要求书	1-14
Y	CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2018年 10月 9日 (2018 - 10 - 09) 参见说明书第0007-0050段, 权利要求书, SEQ ID NOS:1-26, 40-41	2-14
Y	WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC等) 2017年 12月 21日 (2017 - 12 - 21) 参见SEQ ID NOS:1-2, 5-6	2-14
Y	WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 2018年 10月 18日 (2018 - 10 - 18) 参见SEQ ID NOS:9, 11	2-14
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 2月 27日		国际检索报告邮寄日期 2020年 3月 23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 马岚 电话号码 86-(10)-62412181

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/071213

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2010136480	A1	2010年 12月 2日	JP	2012527875	A	2012年 11月 12日
				US	2012070436	A1	2012年 3月 22日
				CA	2763439	A1	2010年 12月 2日
				EP	2435477	A1	2012年 4月 4日

CN	108884139	A	2018年 11月 23日	IL	258725	DO	2018年 6月 28日
				BR	112018008865	A2	2018年 11月 6日
				CL	2018001172	A1	2018年 9月 21日
				US	2017145071	A1	2017年 5月 25日
				US	10273281	B2	2019年 4月 30日
				EA	201891106	A1	2018年 12月 28日
				CA	3001131	A1	2017年 5月 11日
				SG	11201803009V	A	2018年 5月 30日
				CR	20180306	A	2018年 10月 16日
				PE	20181300	A1	2018年 8月 9日
				PE	13002018	A1	2018年 8月 9日
				JP	2018535204	A	2018年 11月 29日
				MX	2018005517	A	2018年 11月 9日
				US	2019202889	A1	2019年 7月 4日
				TW	201722985	A	2017年 7月 1日
				US	2019194288	A1	2019年 6月 27日
				WO	2017079117	A1	2017年 5月 11日
				BR	112018008865	A8	2019年 2月 26日
				KR	20180069903	A	2018年 6月 25日
				EP	3371208	A1	2018年 9月 12日
CO	2018004132	A2	2018年 11月 30日				
PH	12018500933	A1	2018年 11月 19日				
AU	2016350701	A1	2018年 5月 31日				

CN	108623691	A	2018年 10月 9日	WO	2018166468	A1	2018年 9月 20日

WO	2017218977	A2	2017年 12月 21日	AU	2017286676	A1	2018年 12月 13日
				SG	11201810777W	A	2018年 12月 28日
				IL	263690	DO	2019年 1月 31日
				BR	112018075516	A2	2019年 10月 1日
				KR	20190039929	A	2019年 4月 16日
				AU	2017286676	A8	2018年 12月 20日
				MX	2018015173	A	2019年 7月 4日
				TW	201803902	A	2018年 2月 1日
				CN	109563124	A	2019年 4月 2日
				JP	2019521986	A	2019年 8月 8日
				WO	2017218977	A3	2018年 1月 18日
				CA	3026518	A1	2017年 12月 21日
				AR	108800	A1	2018年 9月 26日
				EP	3472177	A2	2019年 4月 24日
				US	2019256556	A1	2019年 8月 22日
				WO	2017218977	A8	2019年 3月 28日

WO	2018191438	A1	2018年 10月 18日	US	2019010242	A1	2019年 1月 10日
				TW	201843177	A	2018年 12月 16日
				AU	2018250641	A1	2019年 10月 31日
				CA	3058477	A1	2018年 10月 18日
				SG	11201909160W	A	2019年 10月 30日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/071213

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
<p style="text-align: center;">IL 269826 D0 2019年 11月 28日</p>			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 2 1</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 1 1</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/22 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>D</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/705 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>E</i>
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/28 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>T</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/12 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>N</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/13 (2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>16/22</i>	
		<i>C 0 7 K</i>	<i>14/705</i>	
		<i>C 0 7 K</i>	<i>16/28</i>	
		<i>C 1 2 N</i>	<i>15/12</i>	
		<i>C 1 2 N</i>	<i>15/13</i>	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (72)発明者 鄒敬
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 洪偉東
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 何芸
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 白潔
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 宋凌云
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 楊文第
中華人民共和国北京市大興区亦庄経済技術開発区西環南路 1 8 号匯竜森 C 座 3 0 8 室
- (72)発明者 張貴民
中華人民共和国山東省臨沂市紅旗路 2 0 9 号
- (72)発明者 趙麗麗
中華人民共和国山東省臨沂市紅旗路 2 0 9 号
- (72)発明者 劉忠
中華人民共和国山東省臨沂市紅旗路 2 0 9 号
- (72)発明者 李振宇
中華人民共和国山東省臨沂市紅旗路 2 0 9 号
- (72)発明者 朱中松
中華人民共和国山東省臨沂市紅旗路 2 0 9 号

F ターム (参考) 4B064 AG01 AG20 AG26 AG27 BJ12 CA02 CA05 CA08 CA09 CA10
CA11 CA19 CC24

4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA91X AA93X
AA93Y AB01 AC14 CA24 CA25 CA44 CA46

F ターム (参考)

4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC22 CC23 DD62
EE03

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76
EA20 EA50 FA74