

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-525238
(P2022-525238A)

(43)公表日 令和4年5月11日(2022.5.11)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全48頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-560506(P2021-560506)	(71)出願人	521441375 インメタス セラピューティクス, インコーポレイテッド
(86)(22)出願日	令和2年3月31日(2020.3.31)		
(85)翻訳文提出日	令和3年11月30日(2021.11.30)		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/025979		
(87)国際公開番号	WO2020/205875		
(87)国際公開日	令和2年10月8日(2020.10.8)		
(31)優先権主張番号	62/827,381		
(32)優先日	平成31年4月1日(2019.4.1)	(74)代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ワン, ジン
(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,)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07 936, イースト ハノーバー, イーグル ロック アヴェニュー 120, スイート 141, シーノオー インメタス セラピューティクス, インコーポレイ
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍微小環境および免疫チェックポイントタンパク質を標的とする二重特異性結合分子

(57)【要約】

IL-1 または IL-1R およびチェックポイントタンパク質を結合する二重特異性結合タンパク質が、タンパク質を作製する方法とともに提供される。チェックポイントタンパク質は、PD-1 または PD-L1 であってもよい。結合タンパク質は、ヒト Fab ドメインまたは scFv ドメインを含有する免疫グロブリン様構造を有してもよい。新規の二重特異性抗体フォーマットが提供される。結合タンパク質を作製する方法は、タンパク質を含有する医薬組成物とともに提供される。結合タンパク質および医薬組成物は、がんなどの疾患を治療または予防するために使用されてもよい。

【選択図】 図 1

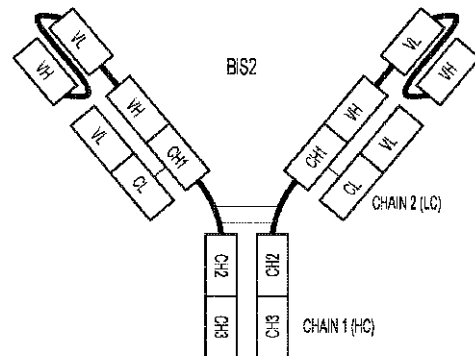


FIG.1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインを含む結合タンパク質であって、前記第一の結合ドメインが、PD-1またはPD-L1を特異的に結合し、かつPD-1またはPD-L1の活性化を阻害し、また前記第二の結合ドメインが、IL- またはIL-1Rを特異的に結合し、かつIL- またはIL-1Rの活性を阻害する、結合タンパク質。

【請求項 2】

前記第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインが、免疫グロブリン結合ドメインを含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

前記免疫グロブリン結合ドメインが、ヒト免疫グロブリン結合ドメインである、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

前記結合タンパク質が、PD-1またはPD-L1を特異的に結合し、かつPD-1またはPD-L1の活性化を阻害する第三の結合ドメイン、およびIL- またはIL-1Rを特異的に結合し、かつIL- またはIL-1Rの活性を阻害する第四の結合ドメインを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

前記第一の結合ドメインおよび前記第三の結合ドメインが、同じCDR領域を含み、かつ前記第二の結合ドメインおよび前記第四の結合ドメインが、同じCDR領域を含む、請求項 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 1 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 2 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 3 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 4 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 5 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 6 の軽鎖CDR3を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 7 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 8 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 9 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 10 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 11 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 12 の軽鎖CDR3を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 13 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 14 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 15 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 16 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 17 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 18 の軽鎖CDR3を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 9】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 19 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 20 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 21 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 22 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 23 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 24 の軽鎖CDR3を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 25 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 26 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 27 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 28 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 29 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 30 の軽鎖CDR3を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

前記第一の結合ドメインが、(a) 配列番号 31 の重鎖CDR1、(b) 配列番号 32 の重鎖CDR2、(c) 配列番号 33 の重鎖CDR3、(d) 配列番号 34 の軽鎖CDR1、(e) 配列番号 35 の軽鎖CDR2、および(f) 配列番号 36 の軽鎖CDR3を含む

10

20

30

40

50

、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 1 2】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 3 7 の前記重鎖可変領域、および配列番号 3 8 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 3 9 の前記重鎖可変領域、および配列番号 4 0 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 4】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 4 1 の前記重鎖可変領域、および配列番号 4 2 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 8 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 1 5】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 4 3 の前記重鎖可変領域、および配列番号 4 4 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 6】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 4 5 の前記重鎖可変領域、および配列番号 4 6 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 1 0 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 7】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 4 7 の前記重鎖可変領域、および配列番号 4 8 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 1 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 8】

前記第二の結合ドメインが、(a) 配列番号 4 9 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 5 0 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 5 1 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 5 2 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 5 3 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 5 4 の軽鎖 C D R 3 を含有する、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の結合タンパク質。

20

【請求項 1 9】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 5 5 の前記重鎖可変領域、および配列番号 5 6 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 1 8 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 0】

前記第二の結合ドメインが、(a) 配列番号 6 2 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 6 3 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 6 4 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 6 5 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 6 6 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 6 7 の軽鎖 C D R 3 を含有する、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の結合タンパク質。

30

【請求項 2 1】

前記第一の結合ドメインが、配列番号 6 8 の前記重鎖可変領域、および配列番号 6 9 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 2 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 2】

前記第一の結合ドメインが、P D - 1 または P D - L 1 を特異的に結合し、かつ P D - 1 または P D - L 1 の活性化を阻害する抗体結合ドメインであり、また前記第二の結合ドメインが、インターロイキン 1 受容体 1 型 (I L - 1 R 1) またはインターロイキン 1 受容体 2 型 (I L - 1 R 2) のインターロイキン 1 - 結合ドメインを含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 2 3】

(c) 免疫グロブリン F c ドメインに連結された P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する (b) 免疫グロブリンの V H ドメインに連結された (a) I L - 1 R 1 のインターロイキン 1 - 結合ドメインを含む第一のタンパク質鎖と、P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する前記免疫グロブリンの V L ドメインを含む第二のタンパク質鎖とを含む、請求項 2 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 4】

(c) 免疫グロブリン F c ドメインに連結された (b) I L - 1 R 1 のインターロイキン 1 - 結合ドメインに連結された (a) P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する

50

免疫グロブリンのVHドメインを含む第一のタンパク質鎖と、PD-1またはPD-L1を結合および阻害する前記免疫グロブリンのVLドメインを含む第二のタンパク質鎖とを含む、請求項22に記載の結合タンパク質。

【請求項25】

二つの同一のタンパク質鎖を含み、各タンパク質鎖が、PD-1またはPD-L1と結合し、かつPD-1またはPD-L1の活性化を阻害する(c)scFVドメインに連結された(b)免疫グロブリンFcドメインに連結された(a)IL-1R1のインターロイキン1-結合ドメインを含む、請求項22に記載の結合タンパク質。

【請求項26】

(c)免疫グロブリンFcドメインに連結されたPD-1またはPD-L1を結合および阻害する(b)免疫グロブリンのVLおよびCLドメインに連結された(a)IL-1R1のインターロイキン1-結合ドメインを含む第一のタンパク質鎖と、PD-1またはPD-L1を結合および阻害する前記免疫グロブリンのVHおよびCH1ドメインを含む第二のタンパク質鎖とを含む、請求項22に記載の結合タンパク質。

10

【請求項27】

(c)免疫グロブリンFcドメインに連結された(b)IL-1R1のインターロイキン1-結合ドメインに連結された(a)PD-1またはPD-L1を結合および阻害する免疫グロブリンのVIおよびCLドメインを含む第一のタンパク質鎖と、PD-1またはPD-L1を結合および阻害する前記免疫グロブリンのVHおよびCH1ドメインを含む第二のタンパク質鎖とを含む、請求項22に記載の結合タンパク質。

20

【請求項28】

IL-1R1の前記インターロイキン1-結合ドメインが、IL-1Rアクセサリータンパク質をさらに含む、請求項22~27のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項29】

a)前記第一の結合ドメインおよび前記第二の結合ドメインをコードする核酸分子を含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換する工程と、b)前記結合タンパク質の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程と、c)前記結合タンパク質を前記培養物から回収する工程とを含む、請求項1~28のいずれか一項に記載の結合タンパク質の調製方法。

【請求項30】

請求項1~28のいずれか一項に記載の前記第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインをコードする核酸分子を含むベクターを含む、宿主細胞。

30

【請求項31】

請求項1~28のいずれか一項に記載の結合タンパク質と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項32】

請求項1~28のいずれかに記載の結合タンパク質、または請求項31に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法。

【請求項33】

前記対象に抗腫瘍剤を投与することをさらに含む、請求項32に記載の方法。

40

【請求項34】

第一のタンパク質鎖、第二のタンパク質鎖、および第三のタンパク質鎖を含む二重特異性結合タンパク質であって、

前記第一のタンパク質鎖が、VHドメイン、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む重鎖を含み、かつ前記CH2ドメインにおいて、または前記CH3ドメインにおいて、または前記CH2ドメインと前記CH3ドメインの前記界面にて溶媒曝露ループにて第一のFabドメイン(Fab1)をさらに含み、

前記第二の鎖が第二のFabドメインを含み、

前記第三の鎖が第三のFabドメインを含み、

前記第二の鎖Fabドメインが、前記第一のタンパク質鎖の前記VHドメインおよびCH

50

1 ドメインと会合して、第一の結合ドメインを形成し、前記第三の鎖 F a b ドメインが、前記第一のタンパク質内の前記溶媒曝露ループにて前記第一の F a b ドメインと会合して、第二の結合ドメインを形成する、二重特異性結合タンパク質。

【請求項 35】

前記溶媒曝露ループが、前記 C H 2 ドメインからのアミノ酸配列を含む、請求項 34 に記載のタンパク質。

【請求項 36】

前記溶媒曝露ループが、アミノ酸配列 I S R T P (配列番号 57) を含む、請求項 35 に記載のタンパク質。

10

【請求項 37】

前記溶媒曝露ループが、前記 C H 3 ドメインからのアミノ酸配列を含む、請求項 34 に記載のタンパク質。

【請求項 38】

前記溶媒曝露ループが、アミノ酸配列 S N G を含む、請求項 37 に記載のタンパク質。

【請求項 39】

前記溶媒曝露ループが、前記 C H 2 ドメインと前記 C H 3 ドメインの界面からのアミノ酸配列を含む、請求項 34 に記載のタンパク質。

【請求項 40】

前記溶媒曝露ループが、アミノ酸配列 A K G Q P (配列番号 58) を含む、請求項 39 に記載のタンパク質。

20

【請求項 41】

前記 C H 1 ドメインが、抗体ヒンジ領域を介して前記 C H 2 ドメインに接続される、請求項 34 に記載のタンパク質。

【請求項 42】

前記 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E、および I g D から F c 領域から成る群から選択される F c 領域を含む、請求項 34 ~ 41 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 43】

前記第一のタンパク質鎖が、前記第一の F a b ドメインの第一の末端と、前記 C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、または前記 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインの界面との間に第一のペプチドリンカーをさらに含む、請求項 34 ~ 41 のいずれかに記載のタンパク質。

30

【請求項 44】

前記第一の F a b ドメインの第二の末端と、前記 C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、または前記 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインの界面との間に第二のペプチドリンカーをさらに含む、請求項 43 に記載のタンパク質。

【請求項 45】

前記第一のペプチドリンカーおよび前記第二のペプチドリンカーが、(G 4 S)₂ (配列番号 59)、(G 4 S)₃ (配列番号 60)、および (G 4 S)₄ (配列番号 61) から成る群から独立して選択される、請求項 43 または請求項 44 に記載のタンパク質。

40

【請求項 46】

前記第一のタンパク質鎖が、N 末端から C 末端まで、以下のポリペプチドドメイン、すなわち、

V H 1 - C H 1 - ヒンジ - C H 2 (N 末端) - F a b 1 - C H 2 (C 末端) - C H 3 を含む、請求項 34 ~ 45 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 47】

前記第一のタンパク質鎖が、N 末端から C 末端まで、以下のポリペプチドドメイン、すなわち、

V H 1 - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 (N - 末端) - F a b 1 - C H 3 (C - 末端)

50

を含む、請求項 34 ~ 45 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 48】

前記第一のタンパク質鎖が、N末端からC末端まで、以下のポリペプチドドメイン、すなわち、

VH1 - CH1 - CH2 - Fab1 - CH3を含む、請求項 34 ~ 45 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 49】

前記第一の結合ドメインが、PD - 1またはPD - L1に特異的に結合し、かつ前記第二の結合ドメインが、IL - 1またはIL - 1Rに特異的に結合する、請求項 34 ~ 48 のいずれかに記載の二重特異性結合タンパク質。

10

【請求項 50】

前記第一の結合ドメインが、IL - 1またはIL - 1Rに特異的に結合し、かつ前記第二の結合ドメインが、PD - 1またはPD - L1に特異的に結合する、請求項 34 ~ 48 のいずれかに記載の二重特異性結合タンパク質。

【請求項 51】

前記第一の結合ドメインの前記CDR領域が、配列番号1 ~ 6の前記CDRドメイン、配列番号7 ~ 12の前記CDRドメイン、配列番号13 ~ 18の前記CDRドメイン、配列番号19 ~ 24の前記CDRドメイン、配列番号25 ~ 30の前記CDRドメイン、および配列番号31 ~ 36の前記CDRドメインから成る群から選択され、かつ前記第二の結合ドメインの前記CDR領域が配列番号49 ~ 54の前記CDRドメインである、請求項 49に記載の二重特異性結合タンパク質。

20

【請求項 52】

前記第一の結合ドメインの前記CDR領域が、配列番号49 ~ 54のCDRドメインであり、かつ前記第二の結合ドメインの前記CDR領域が、配列番号1 ~ 6のCDRドメイン、配列番号7 ~ 12の前記CDRドメイン、配列番号13 ~ 18の前記CDRドメイン、配列番号19 ~ 24の前記CDRドメイン、配列番号25 ~ 30の前記CDRドメイン、および配列番号31 ~ 36の前記CDRドメインから成る群から選択される、請求項 50に記載の二重特異性結合タンパク質。

【請求項 53】

請求項 34 ~ 52 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

30

【請求項 54】

a) 前記第一のタンパク質鎖、前記第二のタンパク質鎖、および第三のタンパク質鎖をコードする核酸分子を含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換する工程と、b) 前記結合タンパク質の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程と、c) 前記結合タンパク質を前記培養物から回収する工程と、を含む、請求項 34 ~ 52 のいずれか一項に記載の結合タンパク質の調製方法。

【請求項 55】

請求項 34 ~ 52 のいずれか一項に記載の前記第一のタンパク質鎖および第二のタンパク質鎖をコードする核酸分子を含むベクターを含む、宿主細胞。

40

【請求項 56】

請求項 34 ~ 52 のいずれかに記載の結合タンパク質、または請求項 53 に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法。

【請求項 57】

前記対象に抗腫瘍剤を投与することをさらに含む、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記がんが肺がんである、請求項 32 または請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

前記肺がんが小細胞肺がんである、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

50

前記小細胞肺がんが混合型小細胞肺がんである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記肺がんが非小細胞肺がんである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記非小細胞肺がんが扁平上皮細胞肺がん、大細胞肺がん、肺腺がん、肺多形がん、肺カルチノイド腫瘍、唾液腺がん、またはがん腫 N O S (他に特定されない) から成る群から選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記がんが、混合型小細胞肺がん、肺外小細胞がん、肺外小細胞がん、リンパ節に局在している肺外小細胞がん、または前立腺の小細胞がん腫である、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。 10

【請求項 6 4】

前記がんが、マイクロサテライト不安定性を有するがんである、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記対象が以前にがん免疫療法で治療された、または前記療法に抵抗性であることが分かっている、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記対象が以前にがん免疫療法で治療された、または免疫療法に対して難治性であることが分かっている、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。 20

【請求項 6 7】

前記がん免疫療法が、少なくとも一つの免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療である、請求項 6 5 または請求項 6 6 に記載の方法。)

【請求項 6 8】

前記対象に追加的な抗腫瘍療法を投与することをさらに含む、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗腫瘍療法が、化学療法、免疫療法、生物製剤もしくは小分子を用いた治療、ワクチン接種、または細胞療法である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

有効量の、請求項 1 ~ 2 8 または請求項 3 4 ~ 5 2 のいずれかに記載の結合タンパク質または請求項 3 1 または請求項 5 3 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、がんのリスクがある対象におけるそのリスクを予防または低減する方法。 30

【請求項 7 1】

前記がんが肺がんである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記対象が以前にがんと診断され、かつ寛解している、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記対象が以前にがんの治療を受けた、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記対象が、環境曝露、タバコの使用もしくは曝露、遺伝子変異、またはがんの家族歴に起因して、がんのリスクがあると見なされる、請求項 7 0 に記載の方法。 40

【請求項 7 5】

請求項 1 ~ 2 8 または請求項 3 4 ~ 5 2 のいずれかに記載の結合タンパク質の結合ドメインをコードする核酸分子。

【請求項 7 6】

前記がんが食道がん、膵臓がん、肝臓がん、結腸直腸がん、乳がん、および卵巣がん、または多発性骨髄腫もしくは前がん状態から成る群から選択される、請求項 3 2 または請求項 5 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

がんおよび他の疾患の治療のために有用な二重特異性結合分子が提供される。

【背景技術】

【0002】

免疫チェックポイントタンパク質は、免疫系の調節因子として作用し、また自己寛容の機構の重要な一部である。阻害性免疫チェックポイントタンパク質には以下が含まれる：プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、プログラム細胞死リガンド1 (PD-L1)、アデノシンA2A受容体 (A2AR)、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BおよびTリンパ球アテニューエーター (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4、CD152)、インドールアミン2、3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸NADPHオキシダーゼアイソフォーム2 (NOX2)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3 (TIM-3)、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子 (VISTA)、シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン7 (SIGLEC7、CD328)、およびシアル酸結合免疫グロブリン型レクチン9 (SIGLEC9、CD329)。

10

【0003】

プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)は、免疫チェックポイントとして作用するT細胞上に発現される受容体タンパク質である。PD-1発現は、免疫寛容の機序の一部として、活性化T細胞上でアップレギュレートされる。PD-1に対するリガンドは、プログラム細胞死リガンド1 (PD-L1)であり、PD-1へのPD-L1の結合は、リンパ節における抗原特異的T細胞の活性化および増殖を低減させ、かつ制御性T細胞におけるアポトーシスを低減する阻害シグナルを伝達する。腫瘍細胞は多くの場合、免疫監視を回避する機序としてPD-L1を過剰発現する。(リガンドまたは受容体のいずれかを結合させることによる)PD-1とPD-L1の間の結合を阻害するモノクローナル抗体は、多数のがんを有する患者の亜集団において単剤療法または他の薬剤との組み合わせとして有効である一方、多くの他のがんでは効果がない、または難治性であることが示されている。ペムブロリズマブは2014年にアメリカ食品医薬品局(FDA)によって初めて承認されたヒト化抗体であり、腫瘍細胞がPD-L1の上昇を発現する様々ながんの治療のために使用されている。Robert et al., N Engl J Med, 372: 2521-2532 (2015)。ニボルマブは2014年にFDAによって初めて承認された完全ヒト抗体であり、これも様々ながんの治療に使用されている。

20

30

【0004】

腫瘍関連マクロファージ (TAM)は、腫瘍微小環境 (TME)内に高い数で存在する免疫細胞のクラスであり、がん関連炎症と関連付けられている。TAM細胞上のPD-1の発現は、腫瘍細胞のマクロファージの食作用を減少させることが示されていて、腫瘍細胞に「免疫」を付与する。Gordon et al., Nature 545: 495 (2017)。

【0005】

インターロイキン1 (IL-1)は、慢性および急性炎症と関連付けられている炎症誘発性サイトカインであり、複数の炎症関連疾患において重要な役割を果たす。IL-1のレベルの上昇はまた、TMEにTAM細胞および骨髄由来抑制細胞 (MDSC)をリクルートすること、および乳がんにおける腫瘍の増殖および転移を促進することが示されている。Guo et al., Sci Rep, 6, 36107; doi: 10.1038/srep36107 (2016)。他の研究において、肺病変は、NLRP3インフラマソームの活性化およびIL-1の放出によって腫瘍誘発活性がアップレギュレートされているTAMを有することが示されている。(Terlizzi et al., Oncotarget 7: 58181 (2016))。最後に、IL-1は、TAM細胞の腫瘍誘発表現型を促進することが示されていて、またサイトカインのレベルは、腎

40

50

細胞がん腫における腫瘍サイズおよび病期と相関している (Chittezhath et al., *Immunity* 41: 815 (2014))。

【0006】

IL-1 を欠損したマウスにおいて、より少数の動物が腫瘍を発現し、また腫瘍の発生がより遅かった。Apte, et al., *European Journal of Cancer*, 42: 751 (2006)。さらに、肺がんリスクの遺伝子型 IL-1-31TT は、IL-1 の発現の増加をもたらし、炎症刺激の上昇を伴う微小環境を提供し、かつ肺がんリスクを増大させることが示された。Bhat et al., *Metastasis Gene* 2: 123 (2014)。IL-1 受容体拮抗薬は、VEGF および IL-8 などの血管新生因子を阻害することによって、転移および腫瘍増殖を抑制することが示された。Konishi et al., *Oncology* 68: 138 (2005) ; Lewis et al., *J. Transl. Med.* 4: 48 (2006)。IL-1 活性を阻害するモノクローナル抗体であるカナキヌマブは、肺がんの発症および肺がんの死亡率を低減することが示されている。Ridker et al., *Lancet*, 390: P1833-1842, (2017)。

10

【0007】

操作された二重特異性モノクローナル抗体は、二つの異なるタイプの抗原に同時に結合することができる免疫グロブリンドメインを含有する非自然発生タンパク質である。二重特異性抗体は様々なフォーマットで作製することができ、例えばがん免疫療法および薬物送達のために使用されてきた。例えば、Fan et al., *J. Hemat. Oncol.* 8: 130 (2015) ; Brinkmann and Kontermann, *mAbs* 9: 182 (2017)、および Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67: 95-106 (2015) を参照のこと。

20

【発明の概要】

【0008】

第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインを含有する結合タンパク質であって、第一の結合ドメインが、免疫チェックポイントタンパク質を特異的に結合し、かつその活性化を阻害し、また第二の結合ドメインが、IL- または IL-1R を特異的に結合し、かつその活性を阻害する、結合タンパク質が提供される。免疫チェックポイントタンパク質は、例えば PD-1 または PD-L1 であってもよい。第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインは、ヒト免疫グロブリン結合ドメインなどの免疫グロブリン結合ドメインを含有してもよい。これらの結合タンパク質は、PD-1 または PD-L1 などの免疫チェックポイントタンパク質を特異的に結合し、かつその活性化を阻害する第三の結合ドメインと、IL- または IL-1R を特異的に結合し、その活性を阻害する第四の結合ドメインとをさらに含有する。第一の結合ドメインおよび第三の結合ドメインは、同じ CDR 領域を含有してもよく、また第二の結合ドメインおよび第四の結合ドメインは、同じ CDR 領域を含有してもよい。

30

【0009】

一実施形態のこれらのタンパク質において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 1 の重鎖 CDR 1、(b) 配列番号 2 の重鎖 CDR 2、(c) 配列番号 3 の重鎖 CDR 3、(d) 配列番号 4 の軽鎖 CDR 1、(e) 配列番号 5 の軽鎖 CDR 2、および (f) 配列番号 6 の軽鎖 CDR 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 37 の重鎖可変領域、および配列番号 38 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

40

【0010】

別の実施形態において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 7 の重鎖 CDR 1、(b) 配列番号 8 の重鎖 CDR 2、(c) 配列番号 9 の重鎖 CDR 3、(d) 配列番号 10 の軽鎖 CDR 1、(e) 配列番号 11 の軽鎖 CDR 2、および (f) 配列番号 12 の軽鎖 CDR 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 39 の重鎖可変領域、および配列番号 40 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

50

【 0 0 1 1 】

さらなる一実施形態において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 1 3 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 1 5 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 1 5 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 1 6 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 1 7 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 1 8 の軽鎖 C D R 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 4 1 の重鎖可変領域、および配列番号 4 2 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

【 0 0 1 2 】

なおさらなる一実施形態において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 1 9 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 2 0 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 2 1 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 2 2 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 2 3 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 2 4 の軽鎖 C D R 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 4 3 の重鎖可変領域、および配列番号 4 4 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

10

【 0 0 1 3 】

またさらなる一実施形態において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 2 5 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 2 6 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 2 7 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 2 8 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 2 9 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 3 0 の軽鎖 C D R 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 4 5 の重鎖可変領域、および配列番号 4 6 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

20

【 0 0 1 4 】

さらなる一実施形態において、第一の結合ドメインは、(a) 配列番号 3 1 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 3 2 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 3 3 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 3 4 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 3 5 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 3 6 の軽鎖 C D R 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 4 7 の重鎖可変領域、および配列番号 4 8 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

【 0 0 1 5 】

これらの結合タンパク質のうちいずれかにおいて、第二の結合ドメインは、(a) 配列番号 4 9 の重鎖 C D R 1、(b) 配列番号 5 0 の重鎖 C D R 2、(c) 配列番号 5 1 の重鎖 C D R 3、(d) 配列番号 5 2 の軽鎖 C D R 1、(e) 配列番号 5 3 の軽鎖 C D R 2、および(f) 配列番号 5 4 の軽鎖 C D R 3 を含有してもよい。この結合タンパク質において、第一の結合ドメインは、配列番号 5 5 の重鎖可変領域、および配列番号 5 6 の軽鎖可変領域を含有してもよい。

30

【 0 0 1 6 】

第一の結合ドメインが、P D - 1 または P D - L 1 を特異的に結合し、かつその活性化を阻害する抗体結合ドメインであり、また第二の結合ドメインが、インターロイキン 1 受容体 1 型 (I L - 1 R 1) またはインターロイキン 1 受容体 2 型 (I L - 1 R 2) からのインターロイキン 1 - 結合ドメインを含有し、I L - 1 R アクセサリータンパク質からのリガンド結合ドメインに任意選択的に連結された、結合タンパク質がさらに提供される。例えば、こうした結合タンパク質は、(c) 免疫グロブリン F c ドメインに連結された P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する (b) 免疫グロブリンの V H ドメインに連結された (a) I L - 1 R 1 のインターロイキン 1 - 結合ドメインを含有する第一のタンパク質鎖と、P D - 1 または P D - L 1 を結合する免疫グロブリンの V L ドメインを含有する第二のタンパク質鎖とを含有してもよい。別の実施例において、結合タンパク質は、(c) 免疫グロブリン F c ドメインに連結された (b) I L - 1 R 1 のインターロイキン 1 - 結合ドメインに連結された P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する (a) 免疫グロブリンの V H ドメインを含有する第一のタンパク質鎖と、P D - 1 または P D - L 1 を結合および阻害する免疫グロブリンの V L ドメインを含有する第二のタンパク質

40

50

鎖とを含有してもよい。なお別の実施例において、結合タンパク質は、各タンパク質鎖が、PD-1またはPD-L1を結合し、かつPD-1またはPD-L1の活性化を阻害する(c) s c F Vドメインに連結された(b) 免疫グロブリンFcドメインに連結された(a) IL-1R1のインターロイキン1 - 結合ドメインを含有する、二つの同一のタンパク質鎖を含有してもよい。さらなる一実施例において、結合タンパク質は、(c) 免疫グロブリンFcドメインに連結されたPD-1またはPD-L1を結合および阻害する(b) 免疫グロブリンのVLおよびCLドメインに連結された(a) IL-1R1のインターロイキン1 - 結合ドメインを含有する第一のタンパク質鎖と、PD-1またはPD-L1を結合および阻害する免疫グロブリンのVHおよびCH1ドメインを含有する第二のタンパク質鎖とを含有してもよい。また別の実施例において、結合タンパク質は、(c) 免疫グロブリンFcドメインに連結された(b) IL-1R1のインターロイキン1 - 結合ドメインに連結されたPD-1またはPD-L1を結合および阻害する(a) 免疫グロブリンのVLおよびCLドメインを含有する第一のタンパク質鎖と、PD-1またはPD-L1を結合および阻害する免疫グロブリンのVHおよびCH1ドメインを含有する第二のタンパク質鎖とを含有してもよい。

10

【0017】

上述のタンパク質鎖をコードする核酸分子は、これらの核酸分子を含有する発現ベクターを含むベクターとともに提供される。

【0018】

上述の通りの結合タンパク質の調製のための方法も提供され、方法は、a) 第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインをコードする核酸分子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する工程と、b) 結合タンパク質の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程と、c) 結合タンパク質を培養物から回収する工程とを含む。宿主細胞は、第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインをコードする核酸分子を含有するベクターを含有してもよい。

20

【0019】

薬学的に許容可能な賦形剤とともに、上述の通りの結合タンパク質を含有する医薬組成物も提供される。

【0020】

また、第一のタンパク質鎖、第二のタンパク質鎖、および第三のタンパク質鎖を含有する二重特異性結合タンパク質(「FAT」結合タンパク質)も提供され、第一のタンパク質鎖は、VH、CH1、CH2、およびCH3ドメインを有する重鎖、ならびにCH2ドメインにおいて、またはCH3ドメインにおいて、またはCH2ドメインとCH3ドメインの界面にて溶媒曝露ループにて第一のFabドメイン(Fab1)を含有し、第二の鎖は第二のFabドメインを含有し、また第三の鎖は第三のFabドメインを含有する。これらの結合タンパク質において、第二の鎖Fabドメインは、第一のタンパク質鎖のVHドメインおよびCH1ドメインと会合して、第一の結合ドメインを形成し、第三の鎖Fabドメインは、第一のタンパク質における溶媒曝露ループにて第一のFabドメインと会合して、第二の結合ドメインを形成する。これらの結合タンパク質において、溶媒曝露ループは、IS RTP(配列番号57)などのCH2ドメインからのアミノ酸配列を含有してもよい。溶媒曝露ループは、SNGなどのCH3ドメインからのアミノ酸配列を含有してもよい。溶媒曝露ループは、CH2ドメインの界面からのアミノ酸配列、およびAKGQP(配列番号58)などのCH3ドメインを含有してもよい。CH1ドメインは、抗体ヒンジ領域を介してCH2ドメインに接続されてもよい。CH2ドメインおよびCH3ドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、およびIgDからのFc領域などのFc領域を含有してもよい。第一のタンパク質鎖は、第一のFabドメインの第一の末端と、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはCH2ドメインおよびCH3ドメインの界面との間の第一のペプチドリンカー、および/または第一のFabドメインの第二の末端と、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはCH2ドメインおよびCH3ドメインの界面との間の第二のペプチドリンカーをさらに含有してもよい。

30

40

50

第一のペプチドリンカーおよび第二のペプチドリンカーは、例えば (G4S)₂ (配列番号59)、(G4S)₃ (配列番号60)、および (G4S)₄ (配列番号61) であってもよい。第一の実施形態において、第一のタンパク質鎖は、N末端からC末端まで、以下のポリペプチドドメイン：VH1 - CH1 - ヒンジ - CH2 (N - 末端) - Fab1 - CH2 (C - 末端) - CH3 を含有してもよく、または第二の実施形態において、N末端からC末端まで、以下のポリペプチドドメイン：VH1 - CH1 - ヒンジ - CH2 - CH3 (N - 末端) - Fab1 - CH3 (C - 末端) を含有してもよい。第三の実施形態において、第一のタンパク質鎖は、N末端からC末端まで、以下のポリペプチドドメイン：VH1 - CH1 - CH2 - Fab1 - CH3 を含有してもよい。第一の結合ドメインは、PD - 1 または PD - L1 に特異的に結合してもよく、また第二の結合ドメインは、IL - 1 または IL - 1R に特異的に結合してもよく、または第一の結合ドメインは、IL - 1 または IL - 1R に特異的に結合してもよく、また第二の結合ドメインは、PD - 1 または PD - L1 に特異的に結合してもよい。

10

【0021】

FAT結合タンパク質の一部の実施形態において、第一の結合ドメインのCDR領域は、配列番号1～6のCDRドメイン、配列番号7～12のCDRドメイン、配列番号13～18のCDRドメイン、配列番号19～24のCDRドメイン、配列番号25～30のCDRドメイン、および配列番号31～36のCDRドメインから成る群から選択されてもよく、また第二の結合ドメインのCDR領域は、配列番号49～54のCDRドメインであってもよい。

20

【0022】

FAT結合タンパク質のさらなる実施形態において、第一の結合ドメインのCDR領域は、配列番号49～54のCDRドメインであってもよく、また第二の結合ドメインのCDR領域は、配列番号1～6のCDRドメイン、配列番号7～12のCDRドメイン、配列番号13～18のCDRドメイン、配列番号19～24のCDRドメイン、配列番号25～30のCDRドメイン、および配列番号31～36のCDRドメインから成る群から選択されてもよい。

【0023】

上述のFAT結合タンパク質鎖をコードする核酸分子は、これらの核酸分子を含有する発現ベクターを含むベクターとともに提供される。

30

【0024】

一つ以上のFAT結合タンパク質および薬学的に許容可能な担体を含有する医薬組成物も提供される。

【0025】

a) 第一のタンパク質鎖、第二のタンパク質鎖、および第三のタンパク質鎖をコードする核酸分子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する工程と、b) 結合タンパク質の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程と、c) FAT結合タンパク質を培養物から回収する工程とを含む、FAT結合タンパク質の調製のための方法が提供される。ベクターは、FATタンパク質の第一、第二、およびタンパク質鎖をコードする核酸分子を含有してもよい。

40

【0026】

上述の通りの結合タンパク質または医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法が提供される。これらの方法は任意選択的に、結合タンパク質に加えて抗腫瘍剤を対象に投与することを含む。

【0027】

がんを治療するこれらの方法において、対象は以前に、がん免疫療法で治療されたことがある、または療法に対して抵抗性であることが分かっている場合がある。対象は以前に、がん免疫療法で治療されたことがある、またはがん免疫療法に対して難治性であることが分かっている場合がある。がん免疫療法は、例えば少なくとも一つの免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療であってもよい。

50

【 0 0 2 8 】

がんを治療する方法はまた、化学療法、免疫療法、生物製剤または小分子を用いた治療、ワクチン接種、および/または細胞療法などの追加の抗腫瘍療法を対象に投与することを含んでもよい。

【 0 0 2 9 】

有効量の上述の通りの結合タンパク質または医薬組成物を対象に投与することを含む、がんのリスクがある対象におけるそのリスクを予防または低減する方法も提供される。対象は以前に、がんを有すると診断されていて、かつ寛解状態にあるか、または以前にがんの治療を受けたことがある場合がある。対象は、環境曝露、タバコの使用もしくは曝露、遺伝子変異、またはがんの家族歴に起因して、がんのリスクがあると見なされる場合がある。

10

【 0 0 3 0 】

がん治療のこれらの方法において、がんは小細胞肺がん、混合型小細胞肺がん、および/または非小細胞肺がんなどの肺がんである場合がある。非小細胞肺がんは、例えば扁平上皮細胞肺がん、大細胞肺がん、肺腺がん、肺多形がん、肺カルチノイド腫瘍、唾液腺がん、またはがん腫 N O S (他に特定されない)である場合がある。がんは、混合型小細胞肺がん、肺外小細胞がん、リンパ節に局在している肺外小細胞がん、または前立腺の小細胞がん腫、もしくはマイクロサテライト不安定性を有するがんである場合がある。

【 0 0 3 1 】

本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態から明らかとなるであろう。しかし当然のことながら、本開示の趣旨および範囲内の様々な変更および修正は、この発明を実施するための形態から当業者に明らかとなるため、発明を実施するための形態および具体的な実施例は、例示のためにのみ与えられる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 図 1 は、 B i S 2 二重特異性抗体の鎖構造を示す。

【 図 2 A 】 図 2 A は、 B i S 3 二重特異性抗体の鎖構造を示す。

【 図 2 B 】 図 2 B は、 (a) I L - 1 R 1 および I L - 1 R アクセサリータンパク質に由来する I L - 1 結合ドメインと、 (b) 抗体結合ドメインとを含有する結合分子の鎖構造を示す。

30

【 図 3 A 】 図 3 A は、 F I T - I g 二重特異性抗体の鎖構造を示す。

【 図 3 B - 3 E 】 図 3 B ~ 図 3 E は、 (a) I L - 1 R 1 および I L - 1 R アクセサリータンパク質に由来する I L - 1 結合ドメインと、 (b) 抗体結合ドメインとを含有する四つの結合分子の鎖構造を示す。

【 図 4 】 図 4 は、 F A T - I g 二重特異性抗体の鎖構造を示す。

【 図 5 】 図 5 は、 I L - 1 および P D - 1 を結合する二重特異性抗体のアミノ酸配列を示す。

【 図 6 A - 6 B 】 図 6 A および 図 6 B は、 I L - 1 、 I L - 1 R 、 P D - 1 、 または P D - L 1 を結合する公知の抗体および結合分子の表を示す。

40

【 図 7 】 図 7 は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける、細胞膜結合 P D - 1 および可溶性 I L - 1 への二重特異性抗体の同時の結合を示す。 I T A シリーズの二重特異性抗体の可変結合親和性が実証され、またすべての結合親和性は実質的に対照ヒト I g G よりも高い。

【 図 8 】 図 8 は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける、細胞膜結合 P D - 1 および可溶性 I L - 1 への二重特異性抗体の同時の結合を示す。 I T C シリーズ、 I T D シリーズ、および I T E シリーズの二重特異性抗体の可変結合親和性が実証され、またすべての結合親和性は実質的に対照ヒト I g G よりも高い。

【 図 9 A - 9 C 】 図 9 A ~ 図 9 C は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、

50

複数用量サンドイッチアッセイにおける細胞膜結合PD-1への二重特異性抗体の結合を示す。ITBシリーズおよびITFシリーズの二重特異性抗体の可変結合親和性が実証され、またすべての結合親和性は実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【図10】図10は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける、細胞膜結合PD-1および可溶性IL-1への二重特異性抗体の同時の結合を示す。ITBシリーズおよびITFシリーズの二重特異性抗体の可変結合親和性が実証されている。すべての結合親和性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【図11】図11は、二重特異性抗体が、PD-1/D-L1レポーターアッセイにおいてPD-1活性を遮断することを示す。可変遮断活性は、ITAシリーズの二重特異性抗体に対して実証される。すべての遮断活性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【図12A-12B】図12Aおよび図12Bは、二重特異性抗体がIL-1機能アッセイにおいてIL-1活性を遮断することを示す。可変遮断活性は、ITAシリーズの二重特異性抗体を実証する。すべての遮断活性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【発明を実施するための形態】

【0033】

免疫チェックポイントタンパク質を特異的に結合する少なくとも一つの第一の結合ドメインと、IL-1を結合する少なくとも一つの第二の結合タンパク質とを含有する二重特異性結合タンパク質が提供される。免疫チェックポイントタンパク質は、例えばPD-1、PD-L1、A2AR、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、BTLA、CTLA-4(CD152)、IDO、KIR、LAG3、NOX2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、(CD328)、またはSIGLEC9(CD329)であってもよい。有利なことに、チェックポイントタンパク質はPD-1またはPD-L1である。

【0034】

結合タンパク質は、チェックポイントタンパク質PD-1またはPD-L1と、IL-1またはIL-1Rとを同時に結合し、これによってCD8 T細胞上のPD-1と、腫瘍細胞などの標的細胞上のPD-L1との間の結合、およびIL-1活性を阻害する。この様式でのIL-1活性およびPD-1/PD-L1結合の同時阻害は、がん治療のための改善された方法を提供する。第一の結合ドメインおよび第二の結合ドメインは有利なことに、ヒト抗体可変ドメインである。チェックポイントタンパク質およびIL-1などのサイトカインを含むがこれに限定されない、二つの抗原の特異的結合を可能にする、新規の二重特異性結合タンパク質形式も提供される。がんなどの疾患を治療するための二重特異性結合タンパク質を使用する方法も提供される。

【0035】

結合ドメイン

本明細書に記載の通りの結合タンパク質で使用されてもよい結合ドメインは、標的タンパク質を特異的に結合する任意のフォーマットであってもよい。例えば、IL-1を結合するために、インターロイキンI型またはII型受容体のリガンド結合ドメインを使用してもよく、リロナセプトにおける通り、IL-1受容体アクセサリタンパク質からの配列に任意選択的に融合される。しかしながら、有利なことに結合ドメインは、ヒト免疫グロブリン分子の可変ドメインに由来する。具体的には、結合ドメインは、チェックポイントタンパク質を結合する抗体、およびIL-1またはIL-1Rを結合する抗体に由来してもよい。予め選択された抗原を結合する完全ヒト抗体を作製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、ヒト抗体は、フィラメント状ファージ上に表示される抗体の大きいライブラリと、周知の方法によって特定される選択された抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域とから選択することができる。例えば、Winter et al., Annual Review of Immunology 12: 433-455 (1994)を参照のこと。次いで、これらの可変領域をコードする核酸は、本明細書に記載の二重特異性結合タンパク質をコードする遺伝子を構築するために使用されている。別の方法

10

20

30

40

50

として、公知の抗体由来の抗体可変ドメインが使用されてもよい。特に、IL-1、PD-1、およびPD-L1に対するヒト抗体は、ヒトにおける様々な病態の治療に使用するために承認されていて、またこれらの抗体からの可変領域を使用して、本明細書に記載の二重特異性結合タンパク質を構築することができる。好適な抗体の実施例を、以下の表1および表6に示す。

【0036】

別の方法として、IL-1、IL-1R、PD-1、またはPD-L1に対する特異性が公知の抗体由来のCDR領域を、当技術分野で周知のCDR移植の方法を使用して、公知のヒトフレームワーク領域の中に挿入することができる。例えば、Antibody Engineering (KontermannおよびDubel, Eds.) pp 319-339 (Springer, 2010)に掲載のWilliamsおよびMatthews著『Humanising Antibodies by CDR Grafting』を参照のこと。これらのCDR領域は、図1に示すCDR領域に由来してもよく、または表6に記載の抗体のCDR領域に由来してもよい。当業者は、IL-1、IL-1R、PD-1、またはPD-L1を特異的に結合する他の抗体が、本明細書に記載の通りの抗体に加えて存在することと、それらの抗体のCDR領域が、本明細書に記載の通りの結合タンパク質の構築に使用されてもよいこととを認識するであろう。

【0037】

IL-1に関して、カナキマブは、IL-1を結合するFDA承認のヒト抗体であり、また重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は周知である。Rondeau et al., MAbs 7:1151(2015)を参照のこと。カナキマブの重鎖可変領域および軽鎖可変領域全体を使用して、本明細書に記載の通りの二重特異性タンパク質を構築することができ、別の方法として、当技術分野で周知のCDR移植方法を使用して、カナキマブのCDR領域を代替的なヒト可変フレームワーク配列に挿入することができる。例えば、WinterおよびHarris著『Trends in Pharmacological Sciences』14:139-143(1993)を参照のこと。代替的なIL-1結合抗体は、国際公開第1995/01997号に記載のヒト化SK48-E26抗体である。

【0038】

IL-1Rに関して、アナキンラは、FDA承認の、ヒトインターロイキン-1受容体拮抗薬(IL-1Ra)の組み換え非グリコシル化形態である。天然のヒトIL-1Raと比較して、アナキンラは余分なN末端メチオニン残基を含有する。アナキンラはIL-1受容体1型へのIL-1およびIL-1の結合を競合的に阻害する。このIL-1R1結合ドメインは、IL-1受容体へのIL-1の結合を阻害する二重特異性タンパク質の構築に使用することができる。好適な結合ドメインとして使用されうるアナキンラのIL-1R1結合部分の配列は以下の通りである。

MRPSGRKSSSKMQAFRIWDV NQKTFYLRNNQLVAGYLQGP N
VNLEEKIDVVP IEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETR LQ
LEAVNITD LSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACP GW
FLCTAMEADQPVS LTNMPDEGVMVTKFYFQEDEE (配列番号72)

【0039】

PD-1に関して、ペムプロリズマブは2014年にFDAによって初めて承認されたヒト化抗体であり、腫瘍細胞が上昇したPD-1を発現する様々ながんの治療に使用されている。ニボルマブは2014年にFDAによって初めて承認された完全ヒト抗体であり、これもまた様々ながんの治療に使用されている。セミプリマブは転移性皮膚扁平上皮がんの治療のために2018年に初めて承認されたヒト抗体である。ペムプロリズマブ、ニボルマブ、およびセミプリマブの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、CDR領域の配列であるとして公知である。

【0040】

10

20

30

40

50

PD-L1に関して、デュルバルマブは転移性尿路上皮がんの治療のために2017年に初めて承認されたヒト抗体である。アテゾリズマブは2016年に初めて承認され、肺がんの治療のために使用されている。デュルバルマブおよびアテゾリズマブの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、CDR領域の配列であるとして公知である。

【0041】

ペムプロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、およびカナキヌマブの可変ドメインおよびCDR領域の配列を下記の表1に示す。IL-1、PD-1、およびPD-L1に対するその他の公知の抗体のリストを図6に示す。

表1：

抗体	ドメイン	配列	3配列番号
ペムプロリズマブ	VH CD R1	NYYYMY	1
	VH CD R2	GINPSNGGTFNFNEKFKN	2
	VH CD R3	RDYRFDMGFDY	3
	VL CD R1	RASKGVSTSGYSYLH	4
	VL CD R2	LASYL	5
	VL CD R3	QHSRDLPLT	6
	VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYYMYWVRQA PGQGLEWMGGINPSNGGTFN NEKFKNRVTLLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRD YRFDMGFDYWGQGTTVTVSS	37
	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASKGVSTSGYSYLHWY QQKPGQAPRLLIYLA SYLES GVPARFSGSGGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQHSRDLPL TFGGGTKVEIK	38
ニボルマブ	VH CD R1	NSGMH	7
	VH CD R2	VIWYDGSKRYYADSVKG	8
	VH CD R3	NDDY	9
	VL CD R1	RASQSVSSYLA	10
	VL CD R2	DASNRAT	11
	VL CD R3	QQSSNWPRT	12
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL DCKASGITFSNSGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWIWYDGSKRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND DYWGQGTLLVTVSS	39
	VL	s	40
セミプリマブ	VH CD R1	GFTFSNFG	13
	VH CD R2	ISGGGRDT	14

10

20

30

40

50

抗体	ドメイン	配列	3配列番号
	VH CD R 3	VKWGNIYFDY	1 5
	VL CD R 1	LSINTF	1 6
	VL CD R 2	AAS	1 7
	VL CD R 3	QQSSNTPFT	1 8
	VH	EVQLLESQGGVLRVQPGGSLRL SCAASGFTFSNFGMTWVRQA PGKGLEWVSGISGGGRDTYF ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLKGEDTAVYYCVKWG NIYFDYWGGGTLVTVSS	4 1
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDSTIT ITCRASLSINTFLNWFYQQKP GKAPNLLIYAASSLHGGVPS RFSGSGSGTDFTLTIRTLQP EDFATYYCQQSSNTPFTFGP GTVVDFR	4 2
SK48-E 26	VH CD R 1	SYDMS	6 2
	VH CD R 2	YISSGGGGTYYPDTVKG	6 3
	VH CD R 3	GGVRRGYFDV	6 4
	VL CD R 1	RASGNIHNYLT	6 5
	VL CD R 2	NAKTLAD	6 6
	VL CD R 3	QHFWSIPYT	6 7
	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSSSGFIFSSYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISSGGGGTYYP PDTVKGRFTISRDNKNTLF LQMDSLRLPEDTGVYFCARGG VRRGYFDVWGQGTPTVTVSS	6 8
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV ITCRASGNIHNYLTYWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFITISLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQIT	6 9
アテゾリズマ ブ	VH CD R 1	GFTFSDSWIH	1 9
	VH CD R 2	AWISPYGGST	2 0
	VH CD	RHWPGGFDY	2 1

10

20

30

40

50

抗体	ドメイン	配列	3配列番号
	R 3		
	VL CD R 1	RASQDVSTAVA	2 2
	VL CD R 2	SASFLYS	2 3
	VL CD R 3	QQYLYHPAT	2 4
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTTFSDSWIHWVRQA PGKGLEWVAWISPYGGSTYY ADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARRH WPGGFDYWGQGTLVTVSS	4 3
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQK PKAPKLLIYSASFVLYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQ PQEDFATYYCQQYLYHPAT FGQGTKVEIK	4 4
アベルマブ	VH CD R 1	SYIM	2 5
	VH CD R 2	SIYPSGGITFYADTVKG	2 6
	VH CD R 3	IKLGTVTTVDY	2 7
	VL CD R 1	TGTSSDVGGYNYVS	2 8
	VL CD R 2	DVSNRPS	2 9
	VL CD R 3	SSYTSSSTRV	3 0
	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFTTFSSYIMMWVRQA PGKGLEWVSSIYPSGGITFY ADTVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAR IKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSS	4 5
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	4 6
デュルバルマブ	VH CD R 1	RYWMS	3 1
	VH CD R 2	NIKQDGSEKYYVDSVKG	3 2
	VH CD R 3	EGGWFGELAFDY	3 3

10

20

30

40

50

抗体	ドメイン	配列	3配列番号
	VL CD R1	RASQRVSSSYLA	34
	VL CD R2	DASSRAT	35
	VL CD R3	QQYGSLPWT	36
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSRYWMSWVRQA PGKGLEWVANIKQDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGEIAFDYWGQGTLVTVS S	47
	VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSLPWTFG QGTKVEIK	48
カナキヌマブ	VH CD R1	VYGMN	49
	VH CD R2	I IWYDGDNQYYADSVKG	50
	VH CD R3	DLRTGP	51
	VL CD R1	RASQSIGSSLH	52
	VL CD R2	ASQSFS	53
	VL CD R3	HQSSSLP	54
	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSVYGMNWVRQA PGKGLEWVAI IWYDGDNQYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDL RTGPFIDYWGQGTLVTVSS	55
	VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVT ITCRASQSIGSSLHWYQQK DQSPKLLIKYASQSFSGVPS RFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAAAYYCHQSSSLPFTFGP GTKVDIK	56

10

20

30

40

50

【0042】

IL-1受容体タイプは、以下の配列を有する結合ドメインを有する。

KCKEREEKIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTITWYKDD
SKTPVSTEQASRIHQHKEKLWFPKVEDSGHYVCVVRNS
SYCLRIKISAKFVENEPNLCYNAQAIFKQKLPVAGDGGGLV
CPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCKPLLLDNIHFSGVKDR
IVMNVAEKHRGNYTCHASytyLGKQYPITRVIEFITLEEN
KPTRPVIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVTGQLSDIAYWK
WNGSVI DEDDPVLGEDYYSVENPANKRRSTLITVLNISEI

ESRFYKHPFTCF AKNTHGIDAAYIQ LIY PVTN (配列番号70)
【0043】

リロナセプトは免疫グロブリン融合タンパク質であり、結合ドメインは、I型IL-1受容体に融合されたIL-1受容体アクセサリタンパク質(IL-1RAP)を含有する。好適な結合ドメインとして使用されてもよいリロナセプトのIL-1結合部分の配列は以下の通りである。

S E R C D D W G L D T M R Q I Q V F E D E P A R I K C P L F E H F L K F N Y S T
A H S A G L T L I W Y W T R Q D R D L E E P I N F R L P E N R I S K E K D V L W
F R P T L L N D T G N Y T C M L R N T T Y C S K V A F P L E V V Q K D S C F N S
P M K L P V H K L Y I E Y G I Q R I T C P N V D G Y F P S S V K P T I T W Y M G 10
C Y K I Q N F N N V I P E G M N L S F L I A L I S N N G N Y T C V V T Y P E N G
R T F H L T R T L T V K V V G S P K N A V P P V I H S P N D H V V Y E K E P G E
E L L I P C T V Y F S F L M D S R N E V W W T I D G K K P D D I T I D V T I N E
S I S H S R T E D E T R T Q I L S I K K V T S E D L K R S Y V C H A R S A K G E
V A K A A K V K Q K V P A P R Y T V E K C K E R E E K I I L V S S A N E I D V R
P C P L N P N E H K G T I T W Y K D D S K T P V S T E Q A S R I H Q H K E K L W
F V P A K V E D S G H Y Y C V V R N S S Y C L R I K I S A K F V E N E P N L C Y
N A Q A I F K Q K L P V A G D G G L V C P Y M E F F K N E N N E L P K L Q W Y K
D C K P L L L D N I H F S G V K D R L I V M N V A E K H R G N Y T C H A S Y T Y
L G K Q Y P I T R V I E F I T L E E N K P T R P V I V S P A N E T M E V D L G S 20
Q I Q L I C N V T G Q L S D I A Y W K W N G S V I D E D D P V L G E D Y Y S V E
N P A N K R R S T L I T V L N I S E I E S R F Y K H P F T C F A K N T H G I D A
A Y I Q L I Y P V T N (配列番号71)

【0044】

二重特異性結合タンパク質構造

適切な結合ドメインは選択されると、IL-1またはIL-1Rを特異的に結合する少なくとも一つの結合ドメインと、チェックポイントタンパク質を特異的に結合する少なくとも一つのドメインとを含有するフォーマットに組み込まれる。有利なことに、結合タンパク質のフォーマットは、二価または多価の二重特異性抗体のフォーマットであり、二価であるが単一特異性のヒト抗体の自然発生的なホモ二量体構造とは対照的に、二つの異なる結合ドメインを含有するように配置された免疫グロブリン可変ドメインおよび定常鎖ドメインを含有する。 30

【0045】

二重特異性抗体を作製する方法は当技術分野で周知であり、例えばBrinkmann and Kontermann, mAbs 9:182(2017)およびSpiess et al., Molecular Immunology, 67:95-106(2015)に記載されている。本明細書に記載の二重特異性結合タンパク質は、安定であり、対象に投与するために好適であり、かつIL-1またはIL-1Rを結合する少なくとも一つの結合ドメイン、およびチェックポイントタンパク質を結合する少なくとも一つの結合ドメインを含有する、当技術分野で公知の任意のフォーマットとすることができる。 40

【0046】

当技術分野で公知の好適な二重特異性結合タンパク質フォーマットの例としては以下が挙げられる。

Fcなし二重特異性抗体フォーマット、リンカーによって結合された二つのscFv分子(Kontermann, Acta Pharmacol Sin 26:1-9(2005));二重特異性単一ドメイン抗体融合タンパク質(Weidle et al., Cancer Genomics Proteomics 10:155-68(2013);)およびダイアボディ(Atwell et al., Mol Immunol 33:1301-12(1996));Fab融合タンパク質(Schoonjans et al., J Immunol; 165:7050-7(2000));ならびにミニ 50

抗体 (Pluckthun and Pack, Immunotechnology 3 : 83 - 105 (1997) および Muller et al., FEBS Lett 432 : 45 - 49 (1998)) を含む、

二つの異なる抗体由来の重鎖および軽鎖を有する非対称な IgG (Suresh et al, Methods Enzymol ; 121 : 210 - 28 (1986)) ならびに、例えば、「ノブイントゥーホール (knobs into holes)」を使用する非対称な Fc 領域を有する二重特異性 IgG 方法 (Ridgway et al., Protein Eng ; 9 : 617 - 21 (1996)、Shatz et al., MAbs ; 5 : 872 - 81 (2013)、Sampei et al., PLoS One ; 8 : e57479 (2013)、Spiess et al., Biotechnol ; 31 : 753 - 8 (20130 ; Juntilla et al., Cancer Res . 74 : 5561 - 71 (2014)、および Sun et al., J Clin Invest . 125) : 4077 - 4090 (2015))。

10

【0047】

当業者は、上述の特定のフォーマットに加えて多数の二重特異性抗体フォーマットを使用して、IL-1 または IL-1R およびチェックポイントタンパク質を結合する二重特異性抗体を構築することができることを認識するであろう。有利なことに、二重特異性抗体は、以下により詳細に記載の通り、2 + 2 scFv ベースの構造または 2 + 2 Fab ベースの構造のいずれかである。

【0048】

20

2 + 2 scFv ベースの構造

第一の 2 + 2 scFv ベースの構造は、図 1 に示す構造であり、本明細書において Bis2 と呼ばれる。図 1 に示す通り、Bis2 フォーマットは二つのタンパク質鎖を含有する：

(1) 第一の VH ドメインと第一の VL ドメイン (VH - VL または VL - VH で配置される、すなわちドメインは、いずれの順序にもすることができる) を含有する単鎖 Fv (N 末端から C 末端まで) であって、この scFv が、第一の標的 (それぞれ IL-1、IL-1R、またはチェックポイントタンパク質) を結合する単鎖 Fv と、第二の VH ドメインと、CH1、CH2、および CH3 ドメインとを含有する重鎖、および

(2) 第二の VL ドメインおよび CL ドメインを含有する (N 末端から C 末端まで) 軽鎖

30

【0049】

Bis2 タンパク質は、CH3 ドメインおよび CH2 ドメインの非共有性ホモ二量体結合を介して、ならびに重鎖上の CH1 ドメインおよび CL ドメインと、軽鎖上の第二の VH ドメインおよび VL ドメインとの間のヘテロ二量体結合を介して構築される。CH1 ドメインおよび CL ドメインと、VH ドメインおよび VL ドメインとの間の結合は、第二の標的 (それぞれ、チェックポイントタンパク質または IL-1 / IL-1R) を結合する Fab ドメインを形成する。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、ヒンジ領域間、および CH1 ドメインと CL ドメインの間に、自然発生の IgG 分子に見られるのと同じ状態で形成される。

40

【0050】

第二の 2 + 2 scFv ベースの構造は、図 2 A に示す構造であり、本明細書において Bis3 と呼ばれる。図 2 A に示す通り、Bis3 フォーマットも以下の二つのタンパク質鎖を含有する：

(1) 第一の VH ドメイン、CH1、CH2、および CH3 ドメイン、ならびに第二の VH ドメインと第二の VL ドメインを含有する単鎖 Fv (ここで、VH ドメインおよび VL ドメインは、いずれの順序とすることもできる) を含有する (N 末端から C 末端まで) 重鎖であって、scFv は第一の標的 (それぞれ IL-1 またはチェックポイントタンパク質) を結合する、重鎖と、

(2) 第二の VL ドメインおよび CL ドメインを含有する (N 末端から C 末端まで) 軽鎖

50

。

【0051】

B i S 3 タンパク質も、C H 3 ドメインおよびC H 2 ドメインのホモ二量体結合を介して、ならびに重鎖上のC H 1 ドメインおよびC L ドメインと、軽鎖上のV H ドメインおよびV L ドメインとの間のヘテロ二量体結合を介して構築される。C H 1 ドメインおよびC L ドメインと、V H ドメインおよびV L ドメインとの間の結合は、第二の標的（それぞれ、チェックポイントタンパク質またはI L - 1 / I L - 1 R）を結合するF a b ドメインを形成する。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、C H 2 ドメイン間、およびC H 1 ドメインとC L ドメインの間にも、自然発生のI g G 分子に見られるのと同じ様態で形成される。

10

【0052】

代替的結合タンパク質構造は、図2Bに示すホモ二量体構造であり、この構造において、重鎖V H およびC H 1 ドメインが、インターロイキン-1受容体の細胞外リガンド結合ドメインに由来する結合ドメインによって置き換えられる。この結合ドメインは、1型または2型のI L - 1 R 由来の細胞外結合ドメインのすべてまたは一部を含有し、任意選択的にインターロイキン-1アクセサリタンパク質（I L - 1 R A c P）由来の細胞外タンパク質結合ドメインにコンジュゲートされる。I L - 1 R A c P は、機能的I L - 1 受容体の受容体サブユニットであり、I L - 1 R I との受容体ヘテロ二量体を形成する。図2Bに示す構造において、結合タンパク質は、C H 3 ドメインおよびC H 2 ドメインの非共有性ホモ二量体結合を介して構築される。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、C H 2 ドメイン間、およびヒンジドメイン間にも、自然発生のI g G 分子に見られるのと同じ様態で形成される。

20

【0053】

2 + 2 F a b ベースの構造

第一の2 + 2 F a b ベースの構造は、図3Aに示す構造であり、本明細書においてF I T - I g と呼ばれる（G o n g e t a l . , M A B S , 2 0 1 7 , 9 : 1 1 1 8 - 1 1 2 8 (2 0 1 7) を参照のこと）。図3Aに示す通り、F I T - I g フォーマットは以下の三つのタンパク質鎖を含有する：

- (1) 第一のV L ドメイン、第一のC L ドメイン、第一のV H ドメイン、第一のC H 1 ドメイン、およびC H 2 ドメインとC H 3 ドメインを含有する（N末端からC末端まで）重鎖；
- (2) 第二のV L ドメインおよび第二のC L ドメインを含有する（N末端からC末端まで）軽鎖；および
- (3) 第二のV H ドメインおよび第二のC H 1 ドメインを含有する（N末端からC末端まで）F d 鎖。

30

【0054】

重鎖において、第一のC L ドメインは、例えば配列（G G G G S）_x（式中、xは1～5）を有する可撓性親水性リンカーなどのペプチドリナーを介して第一のV H ドメインに連結されてもよい。しかしながら、有利なことに、リンカーは不在である。

【0055】

F I T - I g タンパク質は、C H 3 ドメインおよびC H 2 ドメインの非共有性ホモ二量体結合を介して、および重鎖上の第一のV H ドメインおよびC H 1 ドメインと、軽鎖上の第二のV L ドメインおよびC L ドメインとの間のヘテロ二量体結合を介して、および第一のV L ドメインおよびC L ドメインと、F d 鎖上の第二のV H ドメインおよびC H 1 ドメインとの間のヘテロ二量体結合を介して構築される。二つの同一のF a b 結合ドメインは、軽鎖への重鎖の結合によって形成され、別個であるが同一の二つのF a b ドメインは、図3に示す通り、F d 鎖への重鎖の結合によって形成される。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、C H 2 ドメイン間、およびヒンジドメイン間にも、自然発生のI g G 分子に見られるのと同じ様態で形成される。

40

【0056】

50

代替的な 2 + 2 結合タンパク質は図 3 B ~ 図 3 E に示され、ここで、抗体 F a b 結合ドメインのうちの一つは、インターロイキン - 1 受容体の細胞外リガンド結合ドメインに由来する結合ドメインによって置き換えられる。この結合ドメインは、1 型または 2 型の I L - 1 R 由来の細胞外結合ドメインのすべてまたは一部を含有し、任意選択的にインターロイキン - 1 アクセサリータンパク質 (I L - 1 R A c P) 由来の細胞外タンパク質結合ドメインにコンジュゲートされる。I L - 1 R A c P は、機能的 I L - 1 受容体の受容体サブユニットであり、I L - 1 R I との受容体ヘテロ二量体を形成する。図 3 B ~ 図 3 E に示す構造において、結合タンパク質は、C H 3 ドメインおよび C H 2 ドメインの非共有性ホモ二量体結合を介して、および一つの鎖上の V H ドメインおよび C H 1 ドメインと、第二のタンパク質鎖上の V L ドメインおよび C L ドメインとの間のヘテロ二量体結合を介して構築される。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、C H 1 ドメインと C L ドメインの間、C H 2 ドメイン間、およびヒンジドメイン間にも、自然発生の I g G 分子に見られるのと同じ様態で形成される。

10

【 0 0 5 7 】

第二の 2 + 2 F a b ベースの構造は、図 4 に示す新規の構造であり、本明細書において F A T - I g と呼ばれる。図 4 に示す通り、F A T - I g フォーマットは以下の三つのタンパク質鎖を含有する：

(1) 第一の V H ドメイン、第一の C H 1 ドメイン、ならびに C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインに加えて、第一の V L ドメインおよび第一の C L ドメインを含有する (N 末端から C 末端まで) 重鎖であって、第一の V L ドメインおよび第一の C L ドメインが、C H 2 ドメインにおいて、または C H 3 ドメインにおいて、または C H 2 ドメインと C H 3 ドメインの界面にて溶媒曝露ループにて配置される、重鎖。有利なことに、第一の C L ドメインおよび第一の C L ドメインは、C H 3 ドメインにおける溶媒曝露ループに配置される。

20

(2) 第二の V L ドメインおよび第二の C L ドメインを含有する (N 末端から C 末端まで) 軽鎖；および

(3) 第二の V H ドメインおよび第二の C H 1 ドメインを含有する (N 末端から C 末端まで) F d 鎖。

【 0 0 5 8 】

重鎖において、溶媒曝露ループに配置される第一の V L および C L は、C H 2 ドメイン、または C H 3 ドメイン、または C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインの界面に、可撓性ペプチドリッカーを介して接続される。リンカーは、4 ~ 25 個のアミノ酸を有することができ、また有利なことに (G G G G S)_x 単位 (式中、x = 1 ~ 5) を含む。以下でより詳細に説明する通り、他のリンカーも使用されてもよい。

30

【 0 0 5 9 】

F A T - I g タンパク質は、C H 3 ドメインおよび C H 2 ドメインの非共有性ホモ二量体結合を介して、および軽鎖 C L ドメインおよび V L ドメインとの重鎖 C H 1 ドメインおよび V H ドメインのヘテロ二量体結合、ならびに F d 鎖 C H 1 ドメインおよび V H ドメインとの重鎖 C L ドメインおよび V L ドメインのヘテロ二量体結合を介して、図 4 に示す通りに構築される。図 4 に示す通り、二つの同一の F a b 結合ドメインは、重鎖の軽鎖への結合によって形成され、また別個であるが同一の二つの F a b ドメインは、F d 鎖への重鎖の結合によって形成される。有利なことに、ジスルフィド結合はまた、ヒンジドメイン間、および C H 1 ドメインと C L ドメインの間にも、自然発生の I g G 分子に見られるのと同じ様態で形成される。当業者であれば、新規の F A T - I g 抗体フォーマットを使用して、任意の二つの所望の抗原を結合することができ、新規の F A T - I g 抗体フォーマットは I L - 1 / I L - 1 R およびチェックポイントタンパク質に限定されないことを認識するであろう。

40

【 0 0 6 0 】

上述の四つの特異的結合タンパク質の各々において、I L - 1 / I L - 1 R とチェックポイントタンパク質とを特異的に結合する結合ドメインは、結合タンパク質内に非対称に

50

配置される。すなわち、結合タンパク質の構造は、第一の結合ドメインが I L - 1 / I L - 1 R を結合し、かつ第二の結合ドメインがチェックポイントタンパク質を結合する時と、第一の結合ドメインがチェックポイントタンパク質を結合し、かつ第二の結合ドメインが I L - 1 / I L - 1 R を結合する時と比較して、異なる。従って、四つの特異的結合タンパク質の各々は、任意の所与の結合ドメインの対に対して二つの代替的な形態で存在することができる。

【 0 0 6 1 】

ポリペプチドリinker

本明細書に記載の二重特異性結合タンパク質のドメインは、リンカーを使用して連続タンパク質鎖に結合されてもよい。リンカーは、例えば s c F v の可変重鎖と軽鎖を接続するために、または C L / V L ドメインを F A T - I g フォーマットの重鎖定常ドメインに接続するために使用されてもよい。

10

【 0 0 6 2 】

好適なリンカーは当技術分野で周知であり、存在する場合、有利なことに少なくとも四つのアミノ酸を含有するが、より長いまたはより短いリンカーも使用されてもよい。リンカーは有利なことに、可撓性で、親水性であり、かつそれ自体の二次構造がほとんどまたは全くない。リンカーは、およそ 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、またはおよそ 50 残基の長さであってもよい。本明細書に記載の通りの二重特異性タンパク質の部分を相互接続するために複数のリンカーが使用される場合、リンカーは同一であってもよく、または異なる長さおよび/またはアミノ酸配列を有してもよい。

20

【 0 0 6 3 】

リンカー（複数可）は、所望の二重特異性結合タンパク質構造の形成を容易にする。リンカーは、(G l y - S e r)_x ユニット（式中、x = 1 ~ 5）を含有してもよい。グルタミン酸残基またはリジン残基も、必要に応じて、溶解度を増加させるために、リンカー配列中に定置されてもよい。タンパク質の畳み込み、標的の結合、および/または発現を容易にするために、リンカーの長さを変化させてもよい。例えば、(G l y - S e r)_x 単位の異なる倍数を使用して、当技術分野で周知の方法を使用して、タンパク質の畳み込み、標的の結合、および/または発現を改善または最適化してもよい。

30

【 0 0 6 4 】

二重特異性結合タンパク質の調製

F c なし二重特異性抗体、二つの異なる抗体からの重鎖および軽鎖を有する非対称 I g G、ならびに非対称 F c 領域を有する二重特異性 I g G などの二重特異性結合タンパク質を作製する方法は、当技術分野で周知であり、また上記に提供された参考文献に記載されている。

【 0 0 6 5 】

上述の特定の 2 + 2 二重特異性抗体は、組み換え宿主細胞中の好適な発現構築物を使用して各々産生されてもよい。重鎖、軽鎖、および F d 鎖をコードする核酸は、例えば T h e r m o F i s h e r（米国カリフォルニア州カールスバッド）などの市販の遺伝子合成ベンダーを使用して、合成的に調製することができる。有利なことに、宿主細胞は真核細胞であり、また各鎖の遺伝子は有利なことに、宿主細胞から翻訳されたタンパク質の分泌を引き起こす N 末端シグナル配列をコードする配列を用いて合成される。各鎖の遺伝子は、好適な発現ベクター、例えば p T T 5 ベクター（D u r o c h e r e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 3 0 : E 9 (2 0 0 2)）に挿入され、得られた発現構築物は次いで、一過性発現のために好適な宿主細胞の培養物にトランスフェクトされる。発現ベクターを宿主細胞に効率的にトランスフェクトする方法は、例えばカチオン性脂質を使用する当技術分野で周知である。F e l g n e r e t a l . , P r o c . N a t ' l A c a d . S c i U S A 8 4 : 7 4 1 3 (1 9 8 7) を参照のこと。発現ベクターを細胞内に送達する他の方法も、当技術分野で周知である。発現構築物を好適な宿主細胞のゲノムへと統合することによって所望のタンパク質の安定的な発現を提供す

40

50

る宿主細胞を作製する方法も周知であり、宿主細胞の核において染色体外要素として作用する哺乳動物の複製起点を含有するエピソームベクターを使用する安定的な発現の方法も周知である。

【0066】

宿主細胞は有利なことに、真核細胞、例えば単一細胞真核生物（例えば、酵母または他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコまたはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、または昆虫細胞）、またはハイブリドームである。宿主細胞の例としては、COS-7サル腎細胞株（ATCC CRL 1651）（Gluzman et al., 1981, Cell 23:175を参照のこと）、L細胞、C127細胞、3T3細胞（ATCC CCL 163）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはVeggie CHOなどのそれらの誘導体、ならびに無血清培地中で成長する関連細胞株（Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31を参照のこと）またはDHFRを欠損したCHO株DX-B11（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20を参照のこと）、HeLa細胞、BHK（ATCC CRL 10）細胞株、アフリカミドリザル腎細胞株CV1（ATCC CCL 70）由来CV1/EBNA細胞株、（McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821を参照のこと）、293、293 EBNA、またはMSR 293などのヒト胚性腎臓細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養由来の細胞株、一次外植片、HL-60細胞、U937細胞、HaK細胞、またはJurkat細胞が挙げられる。有利なことに、宿主細胞は、CHO-3E7などの細胞CHO細胞である。

【0067】

典型的に、宿主細胞は、ポリペプチドをコードする核酸を用いて形質転換またはトランスフェクトすることができる培養細胞であり、これはその後、宿主細胞中で発現することができる。「組み換え宿主細胞」という用語は、発現される核酸で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を示すために使用することができる。宿主細胞はまた、核酸を含むが、調節配列が宿主細胞に導入されて、それが核酸と動作可能に連結されるようにされない限り、所望のレベルで発現しない細胞とすることができる。本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫を指す。ある特定の修飾は、例えば突然変異または環境の影響に起因して、後続の世代において生じる場合があるため、こうした子孫は、実際には親細胞と同一ではない場合があるが、本明細書で使用される通り、依然として用語の範囲内に含まれる。真核宿主細胞の増殖に好適な細胞培養培地は、当技術分野において周知であり、例えばThermo Fisher（米国ニューヨーク州グランドアイランド）から市販されている。

【0068】

宿主細胞を好適な条件下で培養し、宿主細胞の小胞体におけるタンパク質鎖の構築を可能にし、続いて細胞培養上清への二重特異性結合タンパク質の分泌を可能にする。結合タンパク質の正しい構造の構築は（例えば、不活性タンパク質の形成につながる鎖の非特異的な対合とは対照的に）、宿主細胞をトランスフェクトするために使用される発現ベクターの相対比を変更することによって改善することができる。ベクター比におけるこの変動はまた、例えば異なる鎖と比較して、鎖のうちの一つの効率がより低い産生に対抗するために使用することができる。当業者は、ベクター比（複数可）を最適化する方法が当技術分野で周知であることを認識するであろう。

【0069】

宿主細胞を好適な長さの時間の間、適切な発現培地中で培養した後、二重特異性結合タンパク質を含有する馴化培地を収集し、二重特異性結合タンパク質を、当技術分野で周知の方法を使用して精製する。例えば、結合タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびタンパク質A親和性クロマトグラフィーなどの親

10

20

30

40

50

和性クロマトグラフィーを含んでもよい方法を使用して精製することができる。タンパク質精製の方法は、例えばBurgessおよびDeutscher (Eds) 著『Guide to Protein Purification, Volume 436 (Methods in Enzymology) 2nd Edition (2009)』に記載されている。タンパク質の純度は、当技術分野で周知の方法 (RT-HPLC、SDS-PAGEおよびこれに類するもの) を使用して確認することができる。

【0070】

多重鎖結合タンパク質の正しい構築は、結合タンパク質が予想分子量を有することを示すために、例えば非変性ゲル電気泳動によって示すことができる。SDS-PAGEを使用して、予想されるタンパク質鎖の各々が存在し、予想される分子量を有することができる。好適な抗ヒトIgG抗体を使用するウェスタンブロッティングは、測定されたタンパク質が免疫グロブリン鎖であることをさらに示すことができる。

10

【0071】

医薬組成物および投与方法

二重特異性結合分子を、それを必要とする対象に調製および投与方法は、当業者に周知である、または当業者によって容易に決定される。結合分子の投与経路は、例えば経口、非経口、吸入または局所的とすることができる。本明細書で使用される非経口という用語は、例えば静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸内、または腔内投与を含む。しかしながら、本明細書の教示に適合する他の方法において、結合分子は、有害な細胞集団の部位に直接送達されてもよく、これによって、治療剤に対する罹患した組織の曝露が増加する。

20

【0072】

結合分子は、ある特定のタイプのがんなどの疾患の治療のために薬学的に有効な量で投与されてもよい。医薬組成物としては、例えば水、イオン交換体、タンパク質、緩衝物質、および塩を含む、薬学的に許容可能な担体を含むことができる。保存剤および他の添加剤も存在することができる。担体は、溶媒または分散媒体とすることができる。本明細書に開示の治療方法における使用のために好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980) に開示されている。

【0073】

いずれの場合においても、滅菌注射剤溶液は、結合分子 (複数可) を単独で、または適切な溶媒中に有効量で他の活性物質と組み合わせて組み込むことによって調製し、その後に濾過滅菌することができる。調製物はまた、キットの形態で包装され、販売されてもよい。こうした製造物品は、疾患または障害を患う、またはこれらに罹患しやすい素因を有する対象を治療するために関連する組成物が有用であることを示すラベルまたは添付文書を有することができる。

30

【0074】

非経口製剤は、単回ボラス用量、点滴、または維持用量に続くボラス用量の投入とすることができる。これらの組成物は、特定の一定の間隔または変動する間隔、例えば週に1回または毎月、または「必要に応じて」投与することができる。

40

【0075】

組成物は、単一用量、複数用量、または確立された期間にわたって点滴で投与することができる。投与レジメンは、最適な所望の応答 (例えば、治療的または予防的な応答) を提供するように調節することもできる。

【0076】

組成物は、例えば骨がん、膵臓がん、頭頸部がん、皮膚または眼内黒色腫、子宮がん、中枢神経系 (CNS) のがん、卵巣がん、直腸がん、肛門部のがん、胃がん、結腸がん、乳がん、黒色腫、結腸直腸がん、精巣がん、ホジキン病、食道がん、小腸のがん、内分泌系のがん、軟組織の肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、慢性または急性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱がん、腎臓または尿路のがん、副腎皮質がん、A

50

I D S 関連がん、小児小脳星細胞腫、小児大脳星細胞腫、基底細胞がん、肝外胆管がん、骨肉腫 / 悪性線維性組織球腫の骨がん、脳腫瘍、気管支腺腫 / カルチノイド、カルチノイド腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫 / 悪性神経膠腫、子宮頸がん、小児がん、C M M L、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、上衣腫、ユーイング腫瘍ファミリー、頭蓋外生殖細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管がん、胆嚢がん、消化管カルチノイド腫瘍、生殖細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、肝細胞がん、下咽頭がん、視床下部および視経路膠腫、膵島細胞がん、カボジ肉腫、喉頭がん、白血病、口唇および口腔がん、非小細胞肺癌（扁平上皮細胞肺癌、大細胞肺癌、肺腺がん、肺多形がん、肺カルチノイド腫瘍、唾液腺がんを含む）、小細胞肺癌（混合型小細胞がんを含む）、「他に特定されない」（N O S）肺癌、肺外小細胞がん（リンパ節に局在した肺外小細胞がんおよび前立腺の小細胞がんを含む）、リンパ腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、髄芽腫、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫 / 血漿細胞新生物、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成 / 骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔がん、上咽頭がん、神経芽腫、口腔がん、口腔咽頭がん、卵巣上皮がん、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、島細胞膵がん、副甲状腺がん、褐色細胞腫、松果体芽細胞腫、脳下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、尿路移行細胞がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、セザリー症候群、皮膚がん、非黒色腫皮膚がん、メルケル細胞皮膚がん、扁平上皮がん、精巣がん、胸腺腫、妊娠性絨毛腫瘍、ウィルムス腫瘍、マイクロサテライト不安定性を含むある特定のタイプのがんなどの細胞媒介性疾患の治療のために使用されてもよい。

10

20

【0077】

食道がんに関して、がんは、例えば食道扁平上皮がん（E S C C）または食道腺がん（E A C）であってもよい。膵がんに関して、がんは、例えば外分泌がん、膵腺がん、膵管がん、膵臓の腺房細胞がん、嚢胞腺がん、膵芽腫、腺扁平上皮がん、未分化がん、膵粘液嚢胞性新生物、神経内分泌、または膵神経内分泌腫瘍（P a n N E T）であってもよい。肝臓に関して、がんは、例えば肝細胞がん（H C C）、肝芽細胞腫、胆管がん、胆管細胞性嚢胞腺がん、血管肉腫、または平滑筋肉腫であってもよい。結腸直腸がんに関して、がんは、腺がん、カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（G I S T）、リンパ腫、肉腫、腺扁平上皮がん（A d - S C C）、または扁平上皮がん（S C C）であってもよい。乳がんに関して、がんは、i n s i t u、非浸潤性乳管がん（D C I S）、浸潤性、浸潤性管がん（I D C）、浸潤性小葉がん（I L C）、三重陰性乳がん、炎症性乳がん、血管肉腫、または乳房のパジェット病であってもよい。卵巣がんに関して、がんは、上皮腫瘍、良性上皮卵巣腫瘍、境界上皮卵巣腫瘍、悪性上皮卵巣腫瘍、生殖細胞腫瘍、奇形腫、未分化胚細胞腫、内胚葉洞腫瘍、および絨毛がん、原発性腹膜がん、卵管がん、または卵巣間質腫瘍であってもよい。多発性骨髄腫および前がん状態に関して、がんは、軽鎖骨髄腫、非分泌性骨髄腫、孤立性形質細胞腫、髄外形質細胞腫、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（M G U S）、くすぶり型多発性骨髄腫（S M M）、免疫グロブリン D（I g D）骨髄腫、または免疫グロブリン E（I g E）骨髄腫であってもよい。

30

【0078】

これらの疾患を治療するための組成物の治療有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与されたその他の医薬、および治療が予防的であるか治療的であるかを含む、多くの異なる要因に応じて変化する。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類を含む非ヒト哺乳類も治療することができる。治療投与量は、安全性および有効性を最適化するために、当業者に公知の日常的方法を使用して滴定することができる。

40

【0079】

投与される少なくとも一つの結合分子の量は、過度の実験なく、当業者によって容易に決定することができる。投与モードおよび少なくとも一つの結合分子のそれぞれの量に影響を与える要因としては、疾患の重症度、病歴、ならびに療法を受ける個体の年齢、身長、体重、健康状態、および身体状態が挙げられるがこれらに限定されない。同様に、投与さ

50

れる結合分子の量は、投与モードと、対象がこの薬剤の単一用量または複数用量を受けるかどうかとに依存する。

【0080】

結合分子はまた、例えば上記に列挙されたがんを含む、がんのタイプを治療するための医薬の製造に使用されてもよい。

【0081】

本明細書に記載の組成物で治療される対象は、治療未経験であってもよく、または結合分子を含む医薬を受ける前に、一つ以上の他の療法（例えば、少なくとも一つの他の抗がん療法）で前治療されていてもよい。対象が、以前の療法（複数可）を用いた前治療に対するレスポンドである必要はない。それ故に、結合分子を含む医薬を受ける対象は、以前の療法に、または前治療が複数の療法を含む場合は以前の療法のうちの一つ以上を用いた前治療に应答した、良好に应答しなかった、当初は应答したが、その後は应答しなかった、または前治療に应答しなかった可能性がある。従って、本開示は、本明細書に記載の結合分子を投与することを含む他の療法に対して不良なレスポンド、または非レスポンドである患者を治療する方法を提供する。また、がん療法に対する抵抗性を克服もしくは防止する方法、または再発を予防もしくは遅延する方法も提供され、本明細書に開示の通りの結合分子、または本明細書に記載の通りの組成物を投与することを含む。

10

【0082】

たとえ患者が以前に抗がん剤で治療されていた場合でさえも、当業者は、その医薬に対して人が应答を示さなかったのかどうか、または難治性であったのかどうかを判定することができる。例えば、抗がん剤に対する非应答は、転移の形成（または増加）におけるがんの罹患の増加（がん/腫瘍の成長の増大および/もしくは腫瘍のサイズの増大など）、または転移の数もしくはサイズの増大に反映される場合がある。非应答はまた、例えば腫瘍の切除後、疾患進行までの時間の短縮において、または例えばネオアジュバント療法における腫瘍（複数可）および/または転移（複数可）のサイズの増大において、腫瘍または転移の発生である場合がある。これらのパラメータ、または当技術分野で公知の他のパラメータに基づいて、抗がん剤による治療に应答しない患者群を特定することができ、次いでこの患者の群を、本明細書に記載の結合分子で治療してもよい。

20

【0083】

結合分子、および結合分子を含有する組成物はまた、例えば別の療法に対して不良なレスポンドまたは非レスポンドである患者を治療するために使用されてもよい。本明細書で使用される「非レスポンド」という用語は、抗がん剤を使用する治療に対して应答する可能性が低い個体/患者/対象を指すことができる。本明細書で使用される「应答する可能性が低い」とは、抗がん剤で治療された患者に病理学的完全应答が生じる可能性が減少していることを指す。一部の態様において、患者は当初、良好なレスポンドである可能性があり、治療に対する抵抗性が、こうした抗がん剤を用いた治療中に発生し、治療に対する不良な应答または非应答につながる可能性がある。

30

【0084】

本明細書で使用される「良好なレスポンド」という用語は、抗がん剤を使用する治療中または治療後に、その腫瘍が増殖、転移、転移の数または大きさの増大等を示さない個体を指し、例えば一連の撮像研究に基づいて、腫瘍の増殖、転移、転移の数または大きさの増大等を、ある期間（例えば、当初の診断後約1年）にわたって経験しない個体であり、および/または、ある特定の生存期間（例えば、当初の診断後約2年以上）を経験する個体である。

40

【0085】

本明細書で使用される「不良なレスポンド」という用語は、例えば抗がん剤を使用する標準的な療法中またはそのすぐ後に腫瘍が増殖または転移する個体、または腫瘍に起因する有害な臨床効果を経験する個体を指す。「不良なレスポンド」という用語はまた、抗がん剤を用いた治療中に、「良好なレスポンド」から「不良なレスポンド」に移行した個体を含む。

50

【0086】

対象が（例えば、がん細胞中のある特定のバイオマーカの存在に基づいて）「非レスポonder」、「不良なレスポonder」、または「応答する可能性が低い」と評価される場合、対象は本明細書に開示の結合分子で治療される可能性がある。

【0087】

方法はまた、本明細書に記載の通りの結合分子と、少なくとも一つの他の療法との同時投与のためにも提供される。結合分子、および少なくとも一つの他の療法は、単一の組成物中で一緒に同時投与することができ、または別個の組成物中で同時にまたは重複した時間に一緒に同時投与することができる。一部の態様において、結合分子をアジュバント療法として使用することができる。

10

【0088】

結合分子はまた、がんを患う対象を治療するための医薬の製造に使用されてもよく、結合分子は、対象が少なくとも一つの他の療法で治療される前に投与される。

【0089】

結合分子はまた、有効量の結合タンパク質、または結合タンパク質を含有する組成物を対象に投与することによって、対象におけるがんのリスクを予防または低減する方法にも使用することができる。がんは、肺がんであってもよく、また患者は、以前に診断された、および/または以前に治療されたがんからの寛解状態にあってもよい。患者は、環境曝露、タバコの使用もしくは曝露、遺伝子変異、またはがんの家族歴に起因して、がんのリスクがあると見なされる場合がある。

20

【実施例】

【0090】

以下の実施例において、結合ドメインは、ヒトにおける使用に対する規制の承認を受けているヒト抗体からの重鎖可変領域および軽鎖可変領域に基づく。「O」、「E」、および「K」はIL-1を結合するドメインを示し、一方で「M」および「B」はPD-1を結合する結合ドメインを示す。結合タンパク質の鎖のアミノ酸配列を図5に示す。

【0091】

実施例1：二重特異性抗体の発現

1. プラスミドの調製

結合タンパク質をコードする標的DNA配列を合成し、CHO-3E7細胞での発現のためにpTT5ベクター(Durocher et al., Nucleic Acids Res. 30: E9 (2002))へとサブクローニングした。コード配列のアミノ酸配列を図5に示す。

30

【0092】

2. 細胞培養および一過性トランスフェクション

CHO-3E7細胞を、無血清のFreeStyle(商標)CHO発現培地(Life Technologies、米国カリフォルニア州カールスバッド)中で増殖させた。細胞を、オービタルシェーカー(VWR Scientific、米国ペンシルベニア州チェスター)上で、5%のCO₂を用いて37にて三角フラスコ(Corning Inc.、米国マサチューセッツ州アクトン)中で維持した。トランスフェクションの1日前に、細胞をCorningの三角フラスコ内に播種した。トランスフェクションの当日、DNAおよびトランスフェクション試薬を混合し、次いで細胞培養物の中へと添加し、その間に標的抗体をコードする組み換えプラスミドを、CHO-3E7細胞へと一過的にトランスフェクトした。6日目に採取した細胞培養上清を精製に使用した。表2は、各抗体の重鎖、軽鎖、およびFd鎖の組み合わせ、ならびにスクリーニングされたプラスミド比の各々を列挙する。

40

表2. 各抗体の重鎖(HC)、軽鎖(LC)、およびFd鎖(Fd)の組み合わせとプラスミド比の概要。

抗体名	抗体フォーマット	HC名	LC名	Fd	比1		比2		比3		比4	
					HC:LC:Fd	HC:LC:Fd	HC:LC:Fd	HC:LC:Fd	HC:LC:Fd	HC:LC:Fd		
ITA101	BiS2-OB	BscFv-OHC	OLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA102	BiS2-OM	MscFv-OHC	OLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA103	BiS2-PC	OscFv-BHC	BLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA104	BiS2-MO	OscFv-MHC	MLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA201	BiS3-OB	OHC-BscFv	OLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA202	BiS3-OM	OHC-MscFv	OLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA203	BiS3-B0	BHC-OscFv	BLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA204	BiS3-MO	MHC-OscFv	MLC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/				
ITA301	FiT-OB	BLC-OHC	OLC	BFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1	1:1:3	1:1:3	1:3:1	1:3:1
ITA302	FiT-OM	MLC-OHC	OLC	MFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1	1:1:3	1:1:3	1:3:1	1:3:1
ITA303	FiT-B0	OLC-BHC	BLC	OFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1	1:1:3	1:1:3	1:3:1	1:3:1
ITA304	FiT-MO	OLC-MHC	MLC	OFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1	1:1:3	1:1:3	1:3:1	1:3:1
ITA401	FAT-OB	OHC-BLC	OLC	BFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1	1:1:3	1:1:3	1:3:1	1:3:1

10

20

30

40

50

ITA402	FAT-OM	OHC-MLC	OLC	MFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITA403	FAT-B0	BHC-OLC	BLC	OFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITA404	FAT-M0	MHC-OLC	MLC	OFd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITB101	FP2-BK	K BHC	B LC	/	1:1			
ITB102	FP2-MK	K MHC	M LC	/	1:1			
ITB103	FPP1 (FIT) - KM	MFd-K-G4P	M LC	/	1:1			
ITB104	FPP1 (FIT) -KB	BFd-K-G4P	B LC	/	1:1			
ITB105	FPP3-KM	K-G4P-MscFv	/	/	該当せず			
ITB106	FP1- (クロスマ ブ) BK	K-BLC-Fc	/	B Fd	1:1			
ITB107	FP1- (クロスマ ブ) MK	K-MLC-Fc	/	M Fd	1:1			
ITB108	FPP2-KM	MLC-KG4P	/	M Fd	1:1			
ITB109	FPP2-KB	BLC-K-G4P	/	B Fd	1:1			
ITC401	FAT-0/B 1+5	0 HC-B LC 1+5	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITC402	FAT-0/B 3+3	0 HC-B LC 3+3	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITC403	FAT-0/B 4+2	0 HC-B LC 4+2	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1

10

20

30

40

50

ITC404	FAT-0/B 5+1	0 HC-B LC 5+1	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITC405	FAT-0/B 4+4	0 HC-B LC 4+4	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITC406	FAT-0/B 2+2	0 HC-B LC 2+2	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITD401	FAT-0/B 5+5	FAT-0/B 5+5	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITD402	FAT-0/B 4+5	FAT-0/B 4+5	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITD403	FAT-0/B 5+4	FAT-0/B 5+4	0 LC	B Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITE101	BiS2-0/M VH/VL DSB	M scFv-0 HC VH/VL DSB	0 LC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/
ITE102	BiS2-0/M VL/VH DSB	M scFv-0 HC VL/VH DSB	0 LC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	/
ITE201	BiS3-M/0 VH/VL DSB	M HC-0 scFv- VH/VL DSB	M LC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	
ITE202	BiS3-M/0 VL/VH DSB	M HC-0 scFv- VL/VH DSB	M LC	/	1:1:0	3:1:0	1:3:0	
ITE301	FIT-B/0-L3	0 LC-B HC-L3	B LC	0 Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITE302	FIT-B/0-L7	0 LC-B HC-L7	B LC	0 Fd	1:1:1	1:3:3	1:1:3	1:3:1
ITF101	BiS2-E/M VL/VH DSB	BiS2-E /M VL/VH DSB	E13 LC	/	1:1:0,	1:3:0	3:1:0	

10

20

30

40

50

ITF102	BiS2-M/E VL/VH DSB	BiS2-M/E VL/VH DSB	M LC	/	1:1:0, 1:1:0,	1:3:0	3:1:0	
ITF103	BiS2-M/E VH/VL DSB	BiS2-M/E VH/VL DSB	M LC	/	1:1:0, 1:1:0,	1:3:0	3:1:0	
ITF201	BiS3-M/E VL/VH DSB	BiS3-M/E VL/VH DSB	M LC	/	1:1:0, 1:1:0,	1:3:0	3:1:0	
ITF202	BiS3-M/E VH/VL DSB	BiS3-M/E VH/VL DSB	M LC	/	1:1:0, 1:1:0,	1:3:0	3:1:0	
ITF301	FIT-B/E L3	FIT-B/E-L3	B LC	E Fd	1:1:1	1:1:1,	1:1:1,	1:1:1,
ITF302	FIT-B/E L7	FIT-B/ E-L7	B LC	E Fd	1:1:1	1:1:1,	1:1:1,	1:1:1,
ITF401	FAT-E/B	FAT-E/B	E13LC	B Fd	1:1:1	1:1:1,	1:1:1,	1:1:1,
ITF402	FAT-B/E	FAT-B/E	B LC	E Fd	1:1:1	1:1:1,	1:1:1,	1:1:1,
ITF403	FAT-M/E	FAT-M/E	M LC	E Fd	1:1:1	1:1:1,	1:1:1,	1:1:1,

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

3 . 精製および結果

細胞培養上清を遠心分離し、続いて濾過した。濾過された上清を、1.0 ml / 分で、Mono finity A Resin Prepacked Column 1ml (GenScript、カタログ番号 L00433-11) にロードした。洗浄工程後、抗体を溶出し、次いで緩衝液を PBS、pH 7.2 に交換した。標準的な技法によって抗体をさらに精製した。例えば、Superdex 200 Increase 10/300 GL カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって、または CHT (商標) セラミックヒドロキシアパタイトカラム (Bio-Rad) を使用するセラミッ

50

クヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによって、一部のサンプルをさらに精製した。他のタンパク質については、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを初期精製に使用し、その後必要に応じてSECを使用した。

【0094】

発現したタンパク質の各々を、還元条件および非還元条件下、ならびにウェスタンブロット分析下（ヤギ抗ヒトIgG-HRP（GenScript、カタログ番号A00166）でSDS-PAGEによって分析し、タンパク質および構成要素鎖が所望の分子量を有することが示された。タンパク質の純度を、サイズ排除HPLCを使用して評価した

【0095】

実施例 2

細胞表面上のPD-1への結合について、実施例1に記載の16個の異なる二重特異性抗体のうち9個をフローサイトメトリーを使用して分析した。使用した細胞株は、CHO-K1細胞（陰性対照）およびCHO-K1/PD-1発現であった。使用した抗体は、無関係なヒトIgG（陰性対照）、および市販の抗PD-1（陽性対照）であった。使用した二次抗体は、ヤギ抗ヒトIgG（H+L）iFluor 647（1μg/ml）であった（データは示さず）。PD1およびIL-1への二重特異性分子の同時結合を実証するために、サンドイッチFACSアッセイを実施した。結合曲線を図7に示す。PD1を発現するCHO細胞は、示された濃度で二重特異性抗体によって結合された。結合していない抗体を洗浄し、ビオチン化IL-1（2ug/ml）、続いてSA-iFluor 647（1ug/ml）を使用して検出を実施した。蛍光強度は、PD1+細胞上のBiSAb固定化と、IL-1を同時結合する能力の両方を示す。抗PD-1 VH/VL結合ドメインの二つの異なる対との抗IL-1 VH/VL結合ドメインの様々な組み合わせを、BiS2、BiS3、FIT-IG、またはFAT-IG分子としてフォーマットした。試験した構築物のうち、配列番号1~6の配列によって定義されるCDR領域を含有する抗PD-1 VH/VL結合領域を有する四つの結合分子はすべて、配列番号6~12の配列によって定義されるCDR領域を含有する抗PD-1 VH/VL結合領域を有する五つの結合分子と比較して、より高い平均蛍光強度を達成した。

【0096】

図8~図12は、追加の結合タンパク質についての追加の結合データを示す。図8は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける、細胞膜結合PD-1および可溶性IL-1への二重特異性抗体の結合の結合曲線を同時に示す。ITCシリーズ、ITDシリーズ、およびITEシリーズの二重特異性抗体の可変結合親和性が示されている。すべての結合親和性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【0097】

図9は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける細胞膜結合PD-1への結合の結合曲線を示す。二重特異性抗体のITBシリーズおよびITFシリーズの可変結合親和性を示す。すべての結合親和性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【0098】

図10は、フローサイトメトリーによって検出される通りの、複数用量サンドイッチアッセイにおける、細胞膜結合PD-1および可溶性IL-1への結合の結合曲線を同時に示す。二重特異性抗体のITBシリーズおよびITFシリーズの可変結合親和性を示す。すべての結合親和性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【0099】

図11は、二重特異性抗体が、PD-1/PD-L1レポーターアッセイにおいてPD-1活性を遮断することを示す。可変遮断活性を、ITAシリーズの二重特異性抗体に対して示す。すべての遮断活性は、実質的に対照ヒトIgGよりも高い。

【0100】

図12は、二重特異性抗体がIL-1機能アッセイにおいてIL-1活性を遮断する

10

20

30

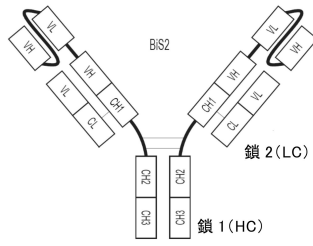
40

50

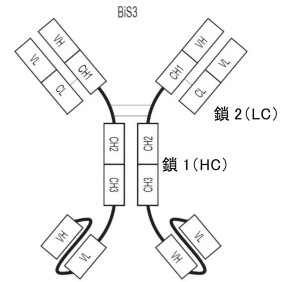
ことを示す。可変遮断活性は、I T Aシリーズの二重特異性抗体を実証する。すべての遮断活性は、実質的に対照ヒト I g G よりも高い。

【図面】

【図 1】

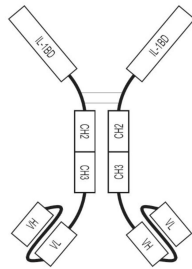


【図 2 A】

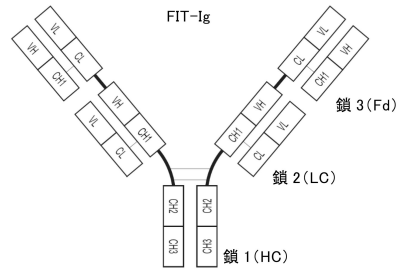


10

【図 2 B】

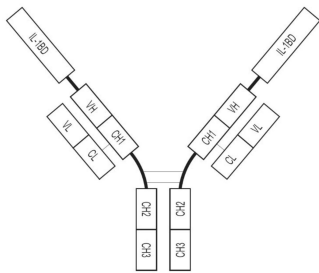


【図 3 A】

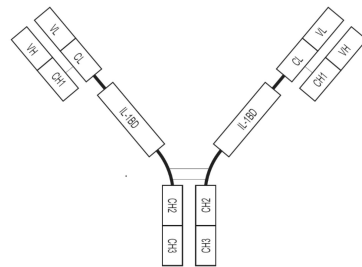


20

【図 3 B】



【図 3 C】

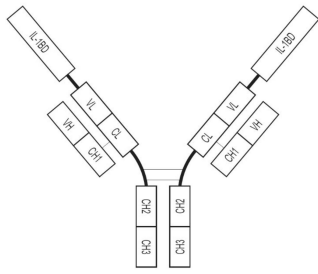


30

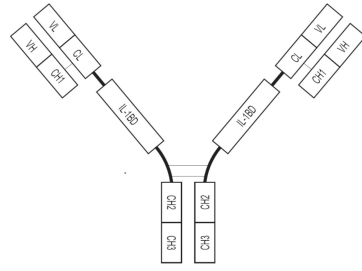
40

50

【 図 3 D 】

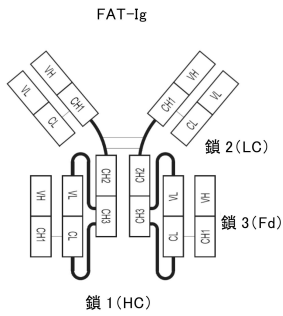


【 図 3 E 】



10

【 図 4 】



【 図 5 - 1 】

図 5: 結合タンパク質のアミノ酸配列:

ITA101

鎖 1

```

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYW
VRQAPGQGLEWVGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTDDSSTTAYMELKSLQFDDTA
VYYCARRDYRFDMGFYWGQGTITVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQS
PATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPA
RFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKGGGSGGGGSGQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWRQAPGKGLEWVAIIWYDGD
NQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP
REPVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGLG

```

20

鎖 2

```

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQK
PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGTDFLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTF
GPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

```

ITA102

鎖 1

```

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWV
RQAPGKGLEWVAIIWYDGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTA
VYYCATNDYWGQGTITVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSP
GERATLSCRASQSVSYLAHWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGTDFLT
TISLLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGVQLVESGGGVV
QPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFYWGQGTITVSSASTKG
PSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVF
LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPVYITLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGLG

```

30

40

50

【 図 5 - 6 】

鎖 2 は ITA101 の鎖 2 と同じ

鎖 3:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQGRSLRLDCKASGIFTSNSGMHWV
RQAPGKLEWVAIWIYDQSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNLSRAEDTA
VYYCATNDDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNK
VDKRVPEKSC

ITA303

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQK
PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSSSLPFTF
GPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EQCVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYMYWVVRQAPGQGLEWVGGIN
PSNGGTNFKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFD
YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPKSNKVDKRVESKY
GPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYD
GVVEHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSIEKTS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA103 の鎖 2 と同じ

鎖 3:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAAASGFTFSVYGMNWV
RQAPGKLEWVAIWIYDGDNQYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNGLRAEDTA
VYYCARDLRTGPFDFYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP
KSNKVDKRVPEKSC

ITA304

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQK
PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSSSLPFTF
GPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EQCVQLVESGGGVVQGRSLRLDCKASGIFTSNSGMHWVVRQAPGKLEWVAIWIY

【 図 5 - 8 】

ITA402

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAAASGFTFSVYGMNWV
RQAPGKLEWVAIWIYDGDNQYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNGLRAEDTA
VYYCARDLRTGPFDFYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPK
SNKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQ
EDPEVFQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWSNGGGGSGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQKPDQSPK
APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSSSLPFTFGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GGGSGGGGSGGGGSGGQPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEGN
VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA101 の鎖 2 と同じ

鎖 3 は ITA302 の鎖 3 と同じ

TA403

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYMYW
VRQAPGQGLEWVGGINPSNGGTNFKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTA
VYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSDQEDPEVFQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGGGGSGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQKPD
QSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSSSLPFTFG
PGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
GNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
CGGGSGGGGSGGGGSGGQPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA103 の鎖 2 と同じ

鎖 3 は ITA303 の鎖 3 と同じ

【 図 5 - 7 】

DGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNLSRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLL
VTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHIT
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPKSNKVDKRVESKYGPPCPAP
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYDGVVEHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA104 の鎖 2 と同じ

鎖 3 は ITA303 の鎖 3 と同じ

ITA401: X=2, Y=4; ITC401: X=1, Y=5; ITC402: X=3, Y=3; ITC403: X=4, Y=2;

ITC404: X=5, Y=1; ITC405: X=4, Y=4; ITC406: X=2, Y=2; ITD401: X=5, Y=5;

ITD402: X=4, Y=5; ITD403: X=5, Y=4

鎖 1:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAAASGFTFSVYGMNWV
RQAPGKLEWVAIWIYDGDNQYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNGLRAEDTA
VYYCARDLRTGPFDFYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPK
SNKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSD
QEDPEVFQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSNGKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQKPDQ
QAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSRDLPTFGG
GTYEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(GGGGS); QPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHN
HYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA101 の鎖 2 と同じ

鎖 3

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTFTNYMYW
VRQAPGQGLEWVGGINPSNGGTNFKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTA
VYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVPEKSC

【 図 5 - 9 】

ITA404

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVESGGGVVQGRSLRLDCKASGIFTSNSGMHWV
RQAPGKLEWVAIWIYDQSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNLSRAEDTA
VYYCATNDDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVGHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPKSNK
VDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQED
PEVFQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGGGGSGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSLHWYQKPDQSPK
LLIKYASQSFSGVPSRFSGSGGDFTLTINSLEAEDAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVD
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSYSLSSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG
SGGGGSGGGGSGGQPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSLRVTVDKSRWQEGNVFSC
VMHEALHNHYTQKLSLSLQK

鎖 2 は ITA104 の鎖 2 と同じ

鎖 3 は ITA303 の鎖 3 と同じ

ITB101

鎖 1

MGWSCILFLVATATGVHSSERCDDWGLDMRQIQVFEDEPARIKPLFEHFLKFN
STAHSAGLTIWIYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDLVWFRPRLTNDTGNYTCM
LRNTTYCSKVAFLEVVQKDSFCNSPMKLPVHKLYIEGIQRTICPNVDYGFSSV
KPTITWYMGYKIQNFNNVIEGMINLSLIALISNNNGYTCVVTYENGRTHLTRLTV
KVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKEPEGELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKK
PDDITIDVTINESISHRTEDETRITQLSIKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKA
KVKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCLNPNNEHKGTTWYKDDSKTP
VTEQASRIHQHKEKLVFPAKVEDSGHYVCVVRNSYCLRIKISAKFVENEPLCY
NAQIFKQLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLDNIHFSGVKDR
LIVMNAEKHGRNYTHASYTYLQKQYPIRVIJEFITLLENKPTRPVIVSPANETME
VDLGSQIQLICNVTGQSLDIAWFKWNGSVIDEDDPLVEDYYSVENPANKRRSTLTV
LNISEHSRYKHPFTCFKANTHIGDAAYIQLYVPTVNGGGGGGGGQVQLVQSGVE
VKKPGASVKVCKASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWVGGINPSNGGTNFK
KRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTV
SASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHITPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHPKSNKVDKRVESKYGPPCPAPPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYDGVVEHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKG
QPREPQV

10

20

30

40

50

【 図 5 - 1 0 】

YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
LYSRLTYDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA103 の図 2 と同じ

ITB102

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
STAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGN
YTCMLRNTTYCSKVAFPLEVYQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV
DGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISNNGNYTCV
VYTPENGRTHFLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKPEGE
ELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISH
SRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPN
NEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLVFVPAK
VEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVENENPLCYNAQAIFK
QKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLD
NIHFSGVKDR LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI
TRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQJQLIC
NVTGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENP
ANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA
AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFLGGPSV
FLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA104 の図 2 と同じ

ITB103

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSQVQLVESGGGVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHW
RQAPGKLEWVAVIWDGSKRYVADSVKGRFTISRDN
SKNTLFLQMNLSRAEDTAVYCATNDYWGQGLTVVSS
ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSNVSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSS
LGTITVTCNVDHKSNTKVDKRVESKYGGGSGG
GERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
STAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEK
DVLFWRPTLLNDTGN YTCMLRNTTYCSKVAFPLEV
YQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV DGYFP
SSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISN
NGNYTCV VYTPENGRTHFLTRTLTVKVVGPSKNA
VPPVHSPNDHVVEKPEGEELLIPCTVYFSLMDSR
NEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETR
TQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPL
NPNNEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKE
KLVFVPAKVEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVE
NENPLCYNAQAIFKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKN
ENNELPKLQWYKDCPKLLDNIHFSGVKDR LIVM
NVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI TRVIEFIT
LEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQJQLICNV
TGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVEN
PANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKN
THGIDA AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFL
GGPSVFLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVSVLTVLHQDWLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSRLTYDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHY
TQKSLSLGLK

【 図 5 - 1 2 】

ITB105

MGWSCILFLV ATATGVHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
STAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGN
YTCMLRNTTYCSKVAFPLEVYQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV
DGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISNNGNYTCV
VYTPENGRTHFLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKPEGE
ELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISH
SRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPN
NEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLVFVPAK
VEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVENENPLCYNAQAIFK
QKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLD
NIHFSGVKDR LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI
TRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQJQLIC
NVTGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENP
ANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA
AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFLGGPSV
FLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

ITB106

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
STAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGN
YTCMLRNTTYCSKVAFPLEVYQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV
DGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISNNGNYTCV
VYTPENGRTHFLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKPEGE
ELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISH
SRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPN
NEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLVFVPAK
VEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVENENPLCYNAQAIFK
QKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLD
NIHFSGVKDR LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI
TRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQJQLIC
NVTGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENP
ANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA
AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFLGGPSV
FLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

【 図 5 - 1 1 】

PDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPNNEHKGTTITWYKDDSKTPVS
TEQASRIHQHKEKLVFVPAKVEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVENENPLCYNA
QAIFKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLDNIHFSGVKDR
LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI TRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEV
DLGSQJQLICNV TGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENPANKRRSTLITV
LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFLGGPSV
FLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVSVLTVLHQDWLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TYDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA104 の図 2 と同じ

ITB104

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSQVQLVESGGGVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHW
RQAPGQGLEWGGINPNNGGTNFNEKFNKRVTLTDSSTTAYMELKSLQFDDTA
VYCYARRDYRDFMDFYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSNVSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSLGTITVTCN
VDHKSNTKVDKRVESKYGGGSGGGERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPL
FEHFLKFNSTAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLND
TGN YTCMLRNTTYCSKVAFPLEVYQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV
DGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISNNGNYTCV VYTPENGR
THFLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKPEGEELLIPCTVYFSLMDSRNEV
WWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGE
VAKAAKV KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPNNEHKGTTITWY
KDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLVFVPAKVEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVE
NENPLCYNAQAIFKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLD
NIHFSGVKDR LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI TRVIEFITLEENKPTRPV
IVSPANETMEVDLGSQJQLICNV TGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENP
ANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCC
PPAPEFLGGPSVFLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTYDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA103 の図 2 と同じ

【 図 5 - 1 3 】

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEGCPCPPAPEFLGGPSVFLFPFK
PKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VSVLTVLHQDWLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSR
WQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA301 の図 2 と同じ

ITB107

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN
STAHSAGLTLIWWYTRQDRDLLEEPINFRLENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGN
YTCMLRNTTYCSKVAFPLEVYQKDFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNV
DGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNVPEGMNLSFLIALISNNGNYTCV
VYTPENGRTHFLTRTLTVKVVGPSKNAVPPVHSPNDHVVEKPEGE
ELLIPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISH
SRTEDETRTQLSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAGEVAKAAKV
KQKVPAPRYTVEKCKEREKILVSSANEIDVRPCPLNPN
NEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLVFVPAK
VEDSGHYCYVVRNSSYCLRIKIAKVENENPLCYNAQAIFK
QKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCPKLLD
NIHFSGVKDR LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLKGQYPI
TRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQJQLIC
NVTGQLSDIAYWKWNGSVIEDDDPVLGEDYYSVENP
ANKRRSTLITV LNISEIESRFYKHPFTCF AKNTHGIDA
AAYIQLIYPTVNSGDKTHTCCPPAPEFLGGPSV
FLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQD
WLNKGEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRWQEG
NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

図 2 は ITA302 の図 2 と同じ

ITB108

図 1

MGWSCILFLV ATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSYLAWYQK
PGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDEAVYCYQSSNWPRFT
GGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWV
DVALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEGCPCPPAPEFLGGPSVFLFPFKDPTLMISRTEPEVTCVVVDVSDQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNKGEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS
LGLK

10

20

30

40

50

【 図 5 - 2 2 】

ITF403

鎖 1

MGWSCIIIFLVATATGVHVSQVLVESGGVVQPRGRSLRDLCKASGFTFSNSGMHWV
RQAPGKGLWEVAVIWIYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTA
VYYCATNDDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVVSSSLGKTYTCNVDPKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSOEDP
EVQFNWYVDGVVHNAKTKPREQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSIEKISKAKGQPREPQVYVLPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASGNHIN
YLTWYQQTPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSDTYFTTISLQPEDATYYCQ
HFWSIPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQPENNYKTPPVLDSDSGF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNYTKSLSLSLGK

鎖 2 は ITA104 の鎖 2 と同じ

鎖 3 は ITF402 の鎖 3 と同じ

【 図 6 A 】

Table with 2 columns: 結合タンパク質 (Binding Protein) and 概要 (Summary). Rows include ABT-981 (Abbvie), アナキトラ (Biovitrum), アベルマブ (Merck KGaA), BCD-100 (Biocad), ベルメキマブ (XBiotech), BGB-A333 (BeiGene), カムレリズマブ (Jiangsu Hengrui Medicine), and カナキヌマブ (Novartis).

10

20

30

40

50

【 図 6 B 】

Table with 2 columns: 抗体名 (Antibody Name) and 概要 (Summary). Rows include セミプリマブ (Regeneron), CS-1001 (CStone Pharmaceuticals), デュルバルマブ (MedImmune), エンバフォリマブ (Alphamab), グボキズマブ (Xoma), JNJ-3283 (Johnson & Johnson), M-7824 (Merck KGaA), MEDI-0680 (MedImmune), MGA-012 (MacroGenics), ニボルマブ (BMS), and リロナセプト (Regeneron).

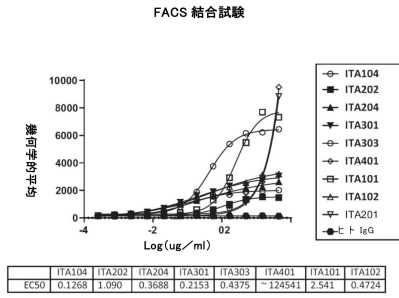
【 図 6 C 】

Table with 2 columns: 抗体名 (Antibody Name) and 概要 (Summary). Rows include シンチリマブ (Innovent Biologics), SOBI-006 (Afbibody), and スバルタリズマブ (Novartis).

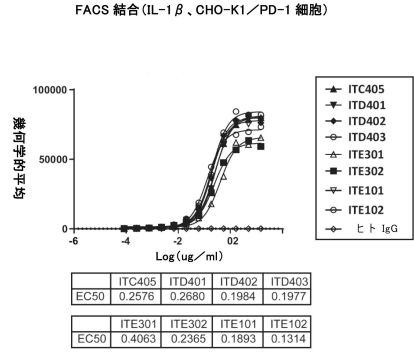
30

40

【 図 7 】

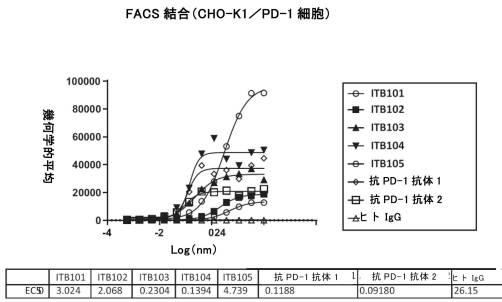


【 図 8 】

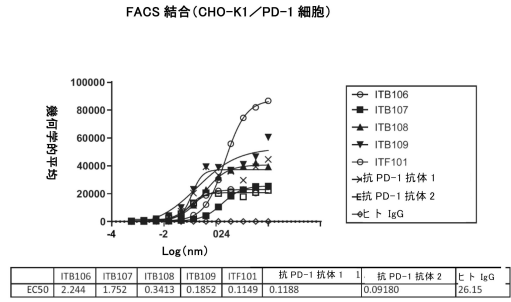


10

【 図 9 A 】

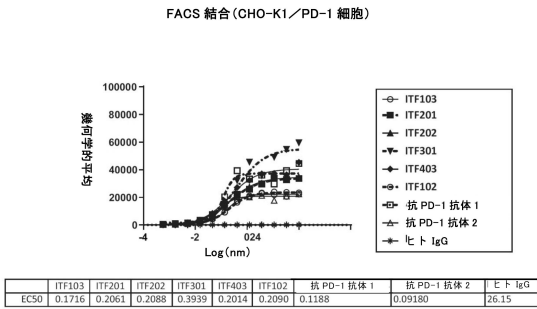


【 図 9 B 】

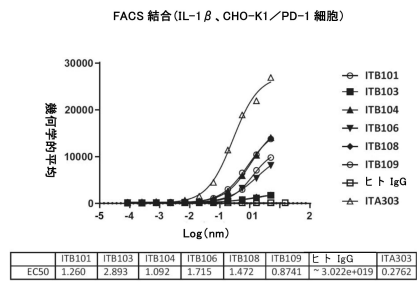


20

【 図 9 C 】



【 図 10 A 】

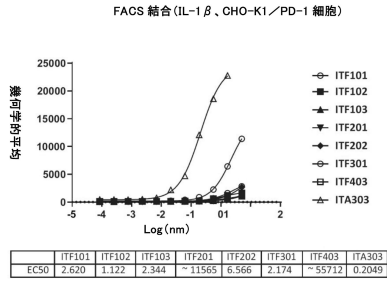


30

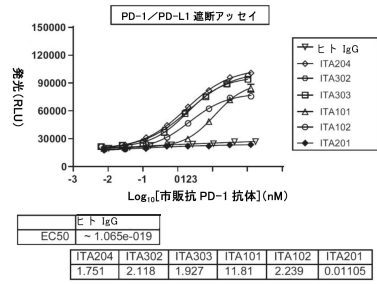
40

50

【 図 1 0 B 】

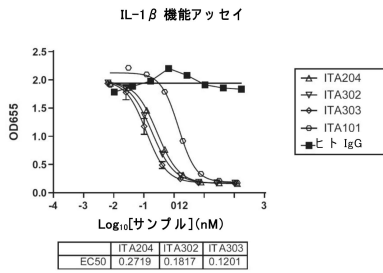


【 図 1 1 】

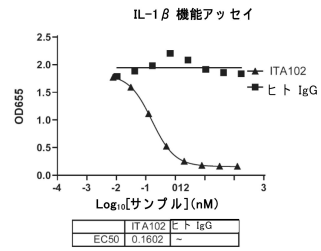


10

【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



20

【 配列表 】

2022525238000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/025979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - C07K 16/24; C07K 16/28 (2020.01)
 CPC - C07K 16/245; C07K 16/2803; C07K 16/2866; C07K 2317/31; C07K 2317/76; C07K 2319/30;
 C07K 2319/32 (2020.05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0298106 A1 (ZYNGENIA, INC.) 19 October 2017 (19.10.2017) entire document	1-5
-		22-28
Y	WO 2018/119001 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 28 June 2018 (28.06.2018) entire document	22-28
Y	US 2018/0022807 A1 (MEDIMMUNE, LLC) 25 January 2018 (25.01.2018) entire document	34-44
Y	US 2016/0009824 A1 (MERCK PATENT GMBH) 14 January 2016 (14.01.2016) entire document	34-44
A	US 2017/0037131 A1 (BERNETT et al) 09 February 2017 (09.02.2017) entire document	1-5, 22-28, 34-44
A	US 2018/0264130 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 20 September 2018 (20.09.2018) entire document	1-5, 22-28, 34-44

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "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
01 July 2020

Date of mailing of the international search report
12 AUG 2020

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
 Blaine R. Copenheaver
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/025979

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs:1-30, 37-48, 57, 58, 68, and 69 were searched.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/025979

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 6-21, 29-33, 45-76
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

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)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 P 35/02	
	A 6 1 K 39/395	C

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

テッド

(72)発明者 レイニー , ゴッドフリー ジョナ
アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 9 3 6 , イースト ハノーバー , イーグル ロック アヴ
ェニュー 1 2 0 , スイート 1 4 1 , シーノオー インメタス セラピューティクス , インコー
ポレイテッド

F ターム (参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 CE10 DA01
4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA25 CA44
4C084 AA19 MA31 MA52 MA55 MA56 MA57 MA60 MA65 MA66 NA05
NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
4C085 AA03 AA13 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB42 CC22 DD62
EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
FA74 GA21