

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7256348号
(P7256348)

(45)発行日 令和5年4月12日(2023.4.12)

(24)登録日 令和5年4月4日(2023.4.4)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 20 外国語出願 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-131158(P2021-131158)	(73)特許権者	518408981
(22)出願日	令和3年8月11日(2021.8.11)		スチヨー アルファマブ カンパニー リ
(62)分割の表示	特願2019-513103(P2019-513103)		ミテッド
原出願日	平成29年5月19日(2017.5.19)		中華人民共和国, 2 1 5 1 2 5 チアン
(65)公開番号	特開2021-184736(P2021-184736)		スー, スチヨー ナンバー 2 1 8, シ
(43)公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)	(73)特許権者	518408992
審査請求日	令和3年9月7日(2021.9.7)		チャン, シティアン
(31)優先権主張番号	201610332590.7		中華人民共和国, 2 0 0 0 2 3, シャ
(32)優先日	平成28年5月19日(2016.5.19)		ンハイ, ファンブー ディストリクト,
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(73)特許権者	518409003
			チャン, シン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C T L A 4 に対する単一ドメイン抗体及びその誘導タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C T L A 4 に特異的に結合することができ、少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む C T L A 4 結合タンパク質であって、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、

(1) 配列番号 2 5 に示される C D R 1、配列番号 2 6 に示される C D R 2、配列番号 2 7 に示される C D R 3 ;

から選択される C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み、

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは V H H である、

C T L A 4 結合タンパク質。

【請求項 2】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインがヒト化 V H H である、請求項 1 に記載の C T L A 4 結合タンパク質。

【請求項 3】

前記 V H H が、

a) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列、

b) 配列番号 8 4 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は

c) 配列番号 1 0 6 ~ 1 0 9 のいずれか1つのアミノ酸配列

を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C T L A 4 結合タンパク質。

【請求項 4】

2つの前記免疫グロブリン単一可変ドメインを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質。

【請求項5】

- a) 免疫グロブリンFc領域、
- b) ヒト免疫グロブリンのFc領域、又は
- c) 配列番号132に示されているアミノ酸配列を有する免疫グロブリンFc領域をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質。

【請求項6】

前記ヒト免疫グロブリンのFc領域がヒトIgGのFc領域である、請求項5に記載のCTLA4結合タンパク質。

【請求項7】

配列番号114、126及び128から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載のCTLA4結合タンパク質。

【請求項8】

以下の特徴：

- (a) 1×10^{-7} M未満のKDでヒトCTLA4に結合すること；
- (b) CTLA4とCD80及び/又はCD86との相互作用をブロックすること；
- (c) PBM C及び/又はT細胞の活性化を増強すること；
- (d) 腫瘍増殖を阻害すること

の少なくとも1つを有する、請求項1～7のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項10】

発現調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項9に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項11】

請求項9に記載の核酸分子を含むか、又は請求項10に記載の発現ベクターで形質転換されており、前記CTLA4結合タンパク質を発現することができる組換え細胞。

【請求項12】

請求項1～8のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質を製造する方法であって、

- a) CTLA4結合タンパク質の発現を可能にする条件下で、請求項11に記載の組換え細胞を培養するステップ；
- b) 工程a)の培養物から宿主細胞によって発現されたCTLA4結合タンパク質を回収する工程；並びに
- c) 任意選択で、工程b)から得られたCTLA4結合タンパク質をさらに精製及び/又は修飾するステップを含む方法。

【請求項13】

請求項1～8のいずれか一項に記載のCTLA4結合タンパク質、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項14】

がんの予防及び/又は治療剤である、請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項15】

追加の抗腫瘍治療手段と併用される、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記追加の抗腫瘍治療手段が、化学療法、放射線療法、腫瘍特異的抗原を標的とする抗体療法、他の腫瘍免疫療法又は腫瘍標的化小分子薬を含む、請求項15に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記追加の抗腫瘍治療手段が、抗 E G F R 抗体、抗 E G F R 変異抗体、抗 V E G F a 抗体、抗 H E R 2 抗体、若しくは抗 C M E T 抗体又はそれらの組み合わせを用いた抗体療法を含む、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記がんが、肺がん、卵巣がん、結腸がん、直腸がん、黒色腫、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮体癌、骨肉腫からなる群から選択される、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

感染症の予防及び / 又は治療剤である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記感染症が、H I V、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、ジアルジア属、マラリア原虫 (p l a s m o d i u m)、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌 (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s)、緑膿菌 (P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a) からなる群から選択される病原体によって引き起こされる、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学生物学の分野に関し、C T L A 4 に対する単一ドメイン抗体及びその誘導タンパク質を開示する。特に、本発明は、C T L A 4 結合タンパク質及びその使用、とりわけ C T L A 4 に関連する疾患、例えば、腫瘍を治療及び / 又は予防するための使用を開示する。

【背景技術】

【0002】

ラクダ又はアルパカのようなラクダ科の動物は、軽鎖が天然に欠損している重鎖抗体を産生することができる。重鎖抗体の分子は、1つの重鎖可変領域 (V H H) 並びに2つの従来の C H 2 及び C H 3 領域のみを含有するが、完全な抗原結合機能を有し、人工的に操作された一本鎖抗体断片 (s c F v) ほどに凝集は容易ではない。さらに重要なことに、組換え的に発現された V H H ドメインは、元の重鎖抗体と同等の構造的安定性及び抗原結合活性を有し、ナノボディ又は重鎖単一ドメイン抗体と呼ばれる、標的抗原に結合することができる現在公知である最小単位である。その特別な構造的性質のために、重鎖単一ドメイン抗体は、伝統的な抗体と小分子薬物の両方の利点を有し、長期開発サイクル、低い安定性、及び厳しい貯蔵条件などの伝統的な抗体の欠点を克服し、新世代の抗体療法を開発する方向性を表す。

【0003】

腫瘍細胞によって発現される腫瘍関連抗原は、有効な免疫応答を生じさせるための基礎である。しかしながら、抗原が、抗原提示細胞 (A P C) の表面上の主要組織適合複合体 (M H C) 分子に結合されて提示される場合、エフェクター T 細胞の活性化を促進するために共刺激シグナルが必要とされる。研究は、多数の腫瘍が、部分的には、T 細胞を完全に活性化するための補助刺激シグナルの欠如のために、及びおそらくは調節性 T 細胞 (T r e g) によって誘導される免疫抑制のために、患者自身の免疫系を逃れることができることを示している。T 細胞上の C D 2 8 への、抗原提示細胞上の C D 8 0 又は C D 8 6 の結合は、主要な共刺激シグナルである。ヒト細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (C T L A 4) は、T 細胞発現の負の調節因子であり、C D 8 0 及び C D 8 6 に対してより高い親和性を有する。これは、C D 2 8 の共刺激シグナルをブロックし、一方、T 細胞の負の調節経路を活性化する。C T L A 4 の免疫抑制効果は、自己免疫応答の制限において重要な役割を果たす。しかしながら、腫瘍免疫応答において、C T L A 4 媒介性阻害機構は、多くの場合、腫瘍細胞が免疫系から逃げることができる理由のうちの1つである。したがって

10

20

30

40

50

、T細胞媒介性抗腫瘍応答は、CTLA4とCD80又はCD86との相互作用をブロックすることによって増強することができる。

【0004】

高い親和性でCTLA4に結合し、CTLA4のCD80への結合をブロックすることができる、抗CTLA4抗体、とりわけCTLA4に対する重鎖単一ドメイン抗体に対する必要性が当該技術分野において依然として存在する。

【発明の概要】

【0005】

本発明者らは、ファージディスプレイ技術によるスクリーニングによって、高い特異性、高親和性及び高い安定性を有する抗CTLA4重鎖単一ドメイン抗体(VHH)を得た。

10

【0006】

第1の態様において、本発明は、CTLA4に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むCTLA4結合タンパク質を提供する。

【0007】

別の態様では、本発明は、CTLA4結合タンパク質をコードする核酸分子、並びに上記核酸分子を含有する発現ベクター及び宿主細胞に関する。

【0008】

本発明はさらに、本発明のCTLA4結合タンパク質を含む医薬組成物に関する。

【0009】

本発明はさらに、本発明のCTLA4結合タンパク質を製造する方法に関する。

20

【0010】

本発明はさらに、本発明のCTLA4結合タンパク質及び医薬組成物の使用、特にCTLA4関連疾患を予防及び/又は治療するための使用及び方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、CTLA4-Fc抗原タンパク質に対するCTLA4重鎖単一ドメイン抗体の結合曲線を示す。

【図2】図2は、CD80/CTLA4相互作用に対するCTLA4重鎖単一ドメイン抗体のプロッキング曲線を示す。

【図3】図3は、CD80/CTLA4相互作用に対するCTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質のプロッキング曲線を示す。

30

【図4】図4は、抗体番号C27の5つのヒト化変異体(A)及び抗体番号C1の4つのヒト化変異体(B)の配列アライメントを示す。

【図5】図5は、CTLA4に対するCTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質の結合曲線を示す(ELISAによる)。

【図6】図6は、CTLA4に対するCTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質の結合曲線を示す(ELISAによる)。

【図7】図7は、CD80/CTLA4相互作用に対するCTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質のプロッキング曲線を示す(競合ELISAによる)。

【図8】図8は、CTLA4に対する四価CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質の結合曲線を示す(競合ELISAによる)。

40

【図9】図9は、CD80/CTLA4相互作用に対する二価又は四価CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質のプロッキング能を示す(細胞中和実験による)。

【図10】フローサイトメトリーによって検出されたCTLA4タンパク質に対するCTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質の結合特異性。

【図11】図11は、フローサイトメトリーによって検出されたサルCTLA4タンパク質に対する四価CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質の結合を示す。

【図12】図12は、CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質によるPBMCの活性化を示す。

【図13】図13は、二価及び四価CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質に

50

よるP B M Cの活性化の比較を示す。

【図14】図14は、C T L A 4単ドメイン抗体 - F c融合タンパク質によるC D 4 + T細胞の活性化を示す。

【図15】図15は、C T L A 4 - ヒト化マウスにおけるM C 3 8腫瘍に対するC T L A 4単ドメイン抗体 - F c融合タンパク質のインビボ阻害効果を示す。

【図16】図16は、経時的なラットにおける二価及び四価C T L A 4単ドメイン抗体 - F c融合タンパク質の血漿濃度の変化曲線を示す。

【図17】図17は、ラットにおけるC T L A 4単ドメイン抗体 - F c融合タンパク質の薬物動態パラメーターを示す。

【図18】図18は、C T L A 4単ドメイン抗体 - F c融合タンパク質の熱安定性を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

他に指示又は定義がない限り、使用される全ての用語は、当業者には明らかである当該技術分野におけるそれらの通常の意味を有する。例えば、標準ハンドブック、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(第2版)、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989年); Lewin、「Genes IV」、Oxford University Press、New York(1990年)、及びRoittら、「Immunology」(第2版)、Gower Medical Publishing、London、New York(1989年)、並びに本明細書において引用されている一般的な背景技術が参照される。さらに、他に指示がない限り、詳細に具体的に記載されていない全ての方法、ステップ、技術及び操作は、当業者には明らかであるように、それ自体が公知である方法で実施され得て及び実施されている。再度、例えば、標準ハンドブック、上記で言及された一般的な背景技術、及びそこに引用されているさらなる参考文献が参照される。

20

【0013】

他に指示がない限り、交換可能な用語である「抗体」及び「免疫グロブリン」は、本明細書において使用されているかどうかに関わらず、重鎖抗体又は従来の4本鎖抗体を指し、一般的な用語として使用され、フルサイズの抗体、その個々の鎖、並びにそれらの全ての部分、ドメイン又は断片(限定されないが、それぞれ、V H Hドメイン又はV H / V Lドメインなどの抗原結合ドメイン又は断片を含む)が含まれる。さらに、(例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「単一可変ドメイン配列」、「V H H配列」又は「タンパク質配列」のような用語で)本明細書で使用される用語「配列」は、文脈がより限定された解釈を必要としない限り、関連するアミノ酸配列、並びにそれをコードする核酸配列又はヌクレオチド配列の両方を含むことが一般的に理解されるべきである。

30

【0014】

本明細書で使用される(ポリペプチド又はタンパク質の)「ドメイン」という用語は、タンパク質の残りとは独立してその3次構造を保持する能力を有する折り畳まれたタンパク質構造を指す。一般的に、ドメインはタンパク質の別々の機能的性質を担い、多くの場合、タンパク質及び/又はドメインの残りの機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、除去又は転移され得る。

40

【0015】

本明細書で使用される「免疫グロブリンドメイン」という用語は、抗体鎖の球状領域(例えば、従来の4本鎖抗体又は重鎖抗体の鎖など)、又はこのような球状領域から本質的になるポリペプチドを指す。免疫グロブリンドメインは、保存されたジスルフィド結合によって任意に安定化された2つのベータシートに配置された約7つの逆平行ベータ鎖の2層サンドイッチからなる抗体分子の免疫グロブリンフォールド特性を保持することを特徴とする。

50

【0016】

本明細書で使用される「免疫グロブリン可変ドメイン」という用語は、4つの「フレームワーク領域」から本質的になる免疫グロブリンドメインを意味し、これらは、当該技術分野において及び本明細書の以下において、それぞれ、「フレームワーク領域1」又は「FR1」；「フレームワーク領域2」又は「FR2」；「フレームワーク領域3」又は「FR3」；及び「フレームワーク領域4」又は「FR4」と称する；これらのフレームワーク領域は、3つの「相補性決定領域」又は「CDR」によって中断され、これらは、当該技術分野において及び本明細書の以下において、それぞれ、「相補性決定領域」又は「CDR1」；「相補性決定領域2」又は「CDR2」；及び「相補性決定領域3」又は「CDR3」と称する。したがって、免疫グロブリン可変ドメインの一般的な構造又は配列は、以下：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4のように示すことができる。抗原結合部位を担持することによって、抗原に対して抗体に特異性を付与するのは、免疫グロブリン可変ドメイン（複数可）である。

10

【0017】

本明細書で使用される「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語は、付加的な可変免疫グロブリンドメインと対になることなく、抗原のエピトープに特異的に結合することができる免疫グロブリン可変ドメインを意味する。本発明の意味における免疫グロブリン単一可変ドメインの一例は、「ドメイン抗体」であり、例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインVH及びVL（VHドメイン及びVLドメイン）などが挙げられる。免疫グロブリン単一可変ドメインの別の例は、本明細書において以下に定義されるラクダ由来の「VHHドメイン」（又は単に「VHH」）である。

20

【0018】

「VHHドメイン」は、重鎖単一ドメイン抗体、VHH、V_HHドメイン、VHH抗体断片、及びVHH抗体としても公知であり、「重鎖抗体」の抗原結合免疫グロブリン可変ドメイン（すなわち、「軽鎖を欠損した抗体」（Hamers - Casterman C、Atarhouch T、Muyldermans S、Robinson G、Hamers C、Songa EB、Bendahman N、Hamers R. : 「Naturally occurring antibodies devoid of light chains」；Nature 363巻、446～448頁（1993年））である。用語「VHHドメイン」は、これらの可変ドメインを、従来の4本鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（本明細書において「VHドメイン」と称される）及び従来の4本鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（本明細書では「VLドメイン」と称される）と区別するために使用されている。VHHドメインは、付加的な抗原結合ドメインがないエピトープに特異的に結合することができる（エピトープがVHドメインとともにVLドメインによって認識される場合における、従来の4本鎖抗体のVH又はVLドメインとは対照的である）。VHHドメインは、単一の免疫グロブリンドメインによって形成された、小さく、強固であり、効率的な抗原認識単位である。

30

【0019】

本発明の文脈において、重鎖単一ドメイン抗体、VHHドメイン、VHH、V_HHドメイン、VHH抗体断片、VHH抗体、並びに「ナノボディ（登録商標）」及び「ナノボディ（登録商標）ドメイン」という用語（「ナノボディ」は、Ablynx N.V.（Ghent；ベルギー）の商標である）は、互換的に使用される。

40

【0020】

ラクダ由来のVHHドメインのアミノ酸残基は、例えば、Riechmann及びMuyldermans、J. Immunol. Methods 231巻、25～38頁（1999年）の図2に示されるように、Kabataら（「Sequence of proteins of immunological interest」、US Public Health Services、NIH Bethesda、MD、Publication No. 91）によって与えられたVHドメインの一般的な番号付けに従って番号付けされる。この番号付けによれば、

50

FR1は、1～30位にアミノ酸残基を含み、
 CDR1は、31～35位にアミノ酸残基を含み、
 FR2は、36～49位にアミノ酸を含み、
 CDR2は、50～65位にアミノ酸残基を含み、
 FR3は、66～94位にアミノ酸残基を含み、
 CDR3は、95～102位にアミノ酸残基を含み、及び
 FR4は、103～113位にアミノ酸残基を含む。

【0021】

しかしながら、VHドメイン及びVHHドメインに関して当該技術分野において周知であるように、CDRの各々におけるアミノ酸残基の総数は変化し得、カバット(Kabat)の番号付けによって示されるアミノ酸残基の総数に対応し得ない(すなわち、カバット番号付けによる1つ以上の位置は、実際の配列で占有されない場合があり、又は実際の配列は、カバット番号付けによって許容される数より多くのアミノ酸残基を含有する場合がある)ことに留意するべきである。これは、一般的に、カバットによる番号付けが、実際の配列中のアミノ酸残基の実際の番号付けに対応する場合もあり、又は対応しない場合もあることを意味する。

10

【0022】

VHドメインのアミノ酸残基を番号付ける代替の方法は、当該技術分野において公知であり、この方法はまた、VHHドメインに類似の方法で適用することができる。しかしながら、本明細書、特許請求の範囲及び図面において、他に指示がない限り、カバットによる、上記されるVHHドメインに適用される番号付けに従う。

20

【0023】

VHHドメイン中のアミノ酸残基の総数は、通常、110～120個、しばしば112～115個の範囲内である。しかしながら、より小さく、より長い配列がまた、本明細書に記載されている目的に適している場合があることに留意すべきである。

【0024】

VHHドメイン及びこれを含有するポリペプチドのさらなる構造的特性及び機能的性質は、以下のように要約することができる：

VHHドメイン(自然において、軽鎖可変ドメインの存在なしに、及びそれとのいずれもの相互作用なしに抗原に機能的に結合するように「設計され」ている)は、単一の、比較的小さな、機能的な抗原結合構造単位、ドメイン又はポリペプチドとして機能することができる。これは、VHHドメインを、一般的に、単独では単一の抗原結合性タンパク質又は免疫グロブリン単一可変ドメインとしての実際の適用には適していないが、機能的な抗原結合性単位(例えば、Fab断片などの従来の抗体断片；VLドメインに共有結合したVHドメインからなるscFvのように)を提供するために、ある形態又は他のものと組み合わせる必要のある従来の4本鎖抗体のVH及びVLドメインと区別される。

30

【0025】

これらの独特の性質のために、単独で又はより大きなポリペプチドの一部としてのVHHドメインの使用は、従来のVH及びVLドメイン、scFv断片又は従来の抗体断片(例えば、Fab又はF(ab')₂断片)の使用と比較して、多数の顕著な利点を提供する：

40

単一のドメインのみが、高い親和性及び高い選択性で抗原に結合するため必要とされ、そのため、2つの別個のドメインが存在する必要もなく、これらの2つのドメインを(scFvと同様に、とりわけ設計されたリンカーの使用を介して)正しい空間的なコンフォメーション及び配置に存在させる必要もない；

VHHドメインは、単一の遺伝子から発現させることができ、翻訳後の折り畳み又は修飾を必要としない；

VHHドメインは、容易に、多価及び多重特異性フォーマットに操作できる(フォーマットされる)；

VHHドメインは、溶解性が高く、凝集する傾向を有しない；

50

VHHドメインは、熱、pH、プロテアーゼ及び他の変性剤又は条件に対して非常に安定であり、したがって、冷凍設備を使用することなく、調製、貯蔵又は輸送され得、コスト、時間及び環境の救済をもたらす；

VHHドメインは、生産に必要とされるスケールにおいてさえ、調製が容易であり、比較的安価である；

VHHドメインは、従来の4本鎖抗体及びこれらの抗原結合性断片と比較して、より小さく（約15kDaであり、従来のIgGの約10倍小さい）、したがって、従来の4本鎖抗体及びこれらの抗原結合性断片と比較して、組織内に（より）高い浸透性を示し、より高い用量で投与することができる；

VHHドメインは、（とりわけ、従来のVHドメインと比較して、伸長したCDR3ループに起因する）いわゆる空孔結合性質を示すことができ、したがって、さらに、従来の4本鎖抗体及びこれらの抗原結合性断片が接近することができない標的及びエピトープに接近することができる。

10

【0026】

特定の抗原又はエピトープに結合するVHHドメインを得る方法は、以前に、例えば、国際公開第2006/040153号及び国際公開第2006/122786号；R. v an der Lindenら、*Journal of Immunological Methods*、240巻（2000年）185～195頁；Liら、*J Biol Chem.*、287巻（2012年）13713～13721頁；Deffarら、*African Journal of Biotechnology* 8巻（12号）、2645～2652頁、2009年6月17日及び国際公開第94/04678号に記載されている。

20

【0027】

ラクダに由来するVHHドメインは、元のVHH配列のアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸残基を、ヒト由来の従来の4本鎖抗体からのVHドメインにおける対応する位置（複数可）で生じる1つ以上のアミノ酸残基で置換することによって「ヒト化」することができる（これは「配列最適化」とも呼ばれ、ヒト化に加えて、配列最適化はまた、改善されたVHH特徴を提供するための1つ以上の突然変異による配列の他の修飾を包含し、例えば、翻訳後の修飾のための潜在的な部位を除くことが挙げられる）。ヒト化VHHドメインは、1つ以上の完全なヒトフレームワーク領域配列を含有し得、特定の実施形態において、IGHV3ヒトフレームワーク領域配列を含有する。

30

【0028】

本明細書中で使用するとき、「ドメイン抗体」は、とりわけ、非ラクダ哺乳動物のVH又はVLドメイン、特にヒト4本鎖抗体を指す。エピトープを単一の抗原結合ドメインとして、すなわちVLドメイン又はVHドメインとそれぞれ対合せずに結合させるために、このような抗原結合性質の特異的選択が必要であり、例えば、ヒト単一VH又はVLドメイン配列のライブラリーを使用することによる。

【0029】

ドメイン抗体は、VHHのように、約13～約16kDaの分子量を有し、完全なヒト配列に由来する場合には、例えば、ヒトにおける治療的使用のために、ヒト化を必要としない。VHHドメインの場合のように、それらは原核生物の発現系においてもよく発現され、全体の製造コストにおいて有意な低下をもたらす。

40

【0030】

「ドメイン抗体」は、例えば、Ward, E. S. ら：「Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*」；*Nature* 341巻：544～546頁（1989年）；Holt, L. J. ら：「Domain antibodies: proteins for therapy」；*TRENDS in Biotechnology* 21巻（11号）：484～490頁（2003年）に記載されている。

【0031】

50

さらに、限定されないが、ヒト足場又は非免疫グロブリン足場を含む、他の「足場」上
 上記されるCDRの1つ以上を「移植」することが可能であることはまた、当業者には
 明らかである。このようなCDR移植のための適切な足場及び技術は、当該技術分野にお
 いて公知である。

【0032】

本明細書で使用するとき、「エピトープ」という用語は、抗体のパラトープが結合する
 抗原上の任意の抗原決定基を指す。抗原決定基は、典型的には、アミノ酸又は糖側鎖など
 の分子の化学的に活性な表面基を含有し、典型的には、特異的な三次元構造特性並びに特
 異的な電荷特性を有する。例えば、エピトープは、典型的には、少なくとも3、4、5、
 6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15の連続又は非連続アミノ酸を、
 固有の空間的なコンフォメーションで含み、このコンフォメーションは、「線状」であ
 ってもよいし、又は「立体的」であってもよい。例えば、Methods in Molec
 ular Biology、66巻、G. E. Morris編集(1996年)における
 エピトープ・マッピング・プロトコルを参照されたい。線状エピトープにおいては、タン
 パク質と相互作用分子(抗体など)との間の相互作用点のすべてが、タンパク質の一次
 アミノ酸配列に沿って直線的に生じる。立体構造エピトープにおいては、相互作用点は、
 互いに分離されたタンパク質上のアミノ酸残基にわたって生じる。

【0033】

所与の抗原のエピトープは、当該技術分野において周知である多数のエピトープマッピ
 ング技術を用いて同定することができる。例えば、Epitope Mapping Pr
 otocols in Methods in Molecular Biology、6
 6巻(Glenn E. Morris編集、1996年)を参照されたい。例えば、線状
 エピトープは、例えばタンパク質分子の部分に対応する、固体支持体上の多数のペプチド
 を同時に合成し、ペプチドがなおも支持体に付着している間に、ペプチドを抗体と反応さ
 せることによって決定され得る。このような技術は、当該技術分野において公知であり、
 例えば、米国特許第4,708,871号; Geysenら(1984年) Proc. N
 atl. Acad. Sci. USA 81巻: 3998~4002頁; Geysenら(
 1986年) Molec. Immunol. 23巻: 709~715頁に記載されている
 。同様に、立体構造エピトープは、例えば、X線結晶学及び2次元核磁気共鳴などのアミ
 ノ酸の空間的なコンフォメーションを決定することによって同定され得る。例えば、上記
 のEpitope Mapping Protocolsを参照されたい。

【0034】

抗体は、当該技術分野において公知である従来の技術によって、同じエピトープへの競
 合的結合についてスクリーニングすることができる。例えば、抗原に対する結合について
 競合又は交差競合する抗体は、競合又は交差競合アッセイによって得ることができる。そ
 れらの交差競合に基づいて同じエピトープに結合する抗体を得るためのハイスループット
 プロセスは、国際特許公開第03/48731号に記載されている。対応して、CTLA
 4上の同じエピトープへの結合について本発明の抗体分子と競合する抗体及びそれらの抗
 原結合断片は、当該技術分野において公知である従来の技術によって得ることができる。

【0035】

一般的に、「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子又は抗原結合タンパク質(本
 発明の免疫グロブリン単一可変ドメインなど)が結合し得る異なるタイプの抗原又はエピ
 トープの数を指す。抗原結合タンパク質の特異性は、その親和性及び/又は結合性(av
 idity)に基づいて決定することができる。親和性は、抗原と抗原結合タンパク質の
 解離の平衡定数(KD)によって表され、エピトープと抗原結合タンパク質上の抗原結合
 部位との間の結合強度の尺度である: KDの値が小さくなるにつれて、エピトープと抗原
 結合タンパク質との間の結合強度が強くなる(あるいは、親和性はまた、1/KDである
 親和性定数(KA)として表すことができる)。当業者に明らかであるように、親和性は
 、目的の特異的抗原に依存して、それ自体公知である方法で決定することができる。結合
 性は、抗原結合タンパク質(例えば、免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ド

10

20

30

40

50

メイン又はそれを含有するポリペプチド)と関連抗原との間の結合強度の尺度である。結合性は、エピトープと抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との間の親和性と、抗原結合タンパク質上に存在する関連結合部位の数の両方に関する。

【0036】

他に指示がない限り、「CTLA4結合タンパク質」という用語は、CTLA4に特異的に結合することができる任意のタンパク質を指す。CTLA4結合タンパク質は、本明細書で定義されるCTLA4に対する抗体又は免疫複合体を包含することができる。「CTLA4結合タンパク質」という用語は、免疫グロブリンスーパーファミリー抗体(IgSF)、又はCDR移植分子を包含する。

【0037】

本発明のCTLA4結合分子は、VHHなどの少なくとも1つのCTLA4結合免疫グロブリン単一可変ドメインを含有し得る。一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合分子は、VHHなどの2つ、3つ、4つ又はそれ以上のCTLA4結合免疫グロブリン単一可変ドメインを含有し得る。本発明のCTLA4結合タンパク質は、CTLA4結合免疫グロブリン単一可変ドメインに加えて、エフェクター機能を有するリンカー及び/又は部分を含み得、例えば、アルブミン結合免疫グロブリン単一可変ドメインのような半減期延長部分、及び/又は血清アルブミンのような融合パートナー及び/又はPEGのような結合ポリマー及び/又はFc領域が挙げられる。一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質はまた、異なる抗原に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含有する二重特異性抗体を包含する。

【0038】

典型的には、本発明のCTLA4結合タンパク質は、抗原(すなわち、CTLA4)に結合し、解離定数(KD)は、(Biacore又はKinExA又はFortiBioアッセイで測定した場合)好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-10}$ モル/リットル(M)、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-10}$ モル/リットル、さらにより好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-10}$ モル/リットル若しくはそれより小さく、及び/又は結合定数(KA)は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも $10^{10} M^{-1}$ である。 $10^{-4} M$ より大きい任意のKD値は、一般的に、非特異的結合を示すと考えられる。抗原又はエピトープへの抗原結合タンパク質の特異的結合は、例えば、本明細書に記載されているアッセイ、スキャッチャード分析及び/又は競合結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)及びサンドイッチ競合アッセイなどのそれ自体が公知である任意の適切な方法で決定することができる。

【0039】

アミノ酸残基は、一般的に公知であり当業界で認められた標準的な3文字又は1文字のアミノ酸コードに従って示される。2つのアミノ酸配列を比較する場合、「アミノ酸の差異」という用語は、第2の配列と比較して、参照配列の位置に指示された数のアミノ酸残基の挿入、欠失又は置換を指す。置換(複数可)の場合、このような置換(複数可)は、好ましくは保存的アミノ酸置換(複数可)であり、これは、保存的アミノ酸置換が、類似した化学構造の別のアミノ酸残基で置き換えられることを意味し、ポリペプチドの機能、活性若しくは他の生物学的特性に影響がほとんどない又は本質的にない。このような保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において周知であり、ここで、保存的アミノ酸置換は、以下のグループ(i)~(v)内の1つのアミノ酸が同じグループ内の別のアミノ酸残基によって置換される置換であることが好ましい：(i)小さい脂肪族、非極性又はわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro及びGly；(ii)極性の、負荷電を持つ残基及びそれらの(無荷電の)アミド：Asp、Asn、Glu及びGln；(iii)極性の、正荷電を持つ残基：His、Arg及びLys；(iv)大きな脂肪族、非極性残基：Met、Leu、He、Val及びCys；並びに(v)芳香族残基：Phe、Tyr及びTrp。特に好ましい保存的アミノ酸置換は、以下の通りである：AlaからGly又はSerへ；ArgからLysへ；AsnからGln又はHisへ；Aspか

10

20

30

40

50

らGluへ；CysからSerへ；GlnからAsnへ；GluからAspへ；GlyからAla又はProへ；HisからAsn又はGlnへ；IleからLeu又はValへ；LeuからIle又はValへ；LysからArg、Gln又はGluへ；MetからLeu、Tyr又はIleへ；PheからMet、Leu又はTyrへ；SerからThrへ；ThrからSerへ；TrpからTyrへ；TyrからTrp又はPheへ；ValからIle又はLeuへ。

【0040】

2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。「配列類似性」は、同一である、又は保存的アミノ酸置換を表すいずれかのアミノ酸のパーセンテージを示す。アミノ酸配列又はヌクレオチド配列間の配列同一性のレベルを評価する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、配列分析ソフトウェアは、多くの場合、アミノ酸配列の同一性を決定するために使用される。例えば、同一性は、NCBIデータベースでBLASTプログラムを使用することによって決定することができる。配列同一性の決定については、例えば、Computational Molecular Biology、Lesk, A.M. 編、Oxford University Press、New York、1988年；Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith, D.W. 編、Academic Press、New York、1993年；Computer Analysis of Sequence Data、パートI、Griffin, A.M.、及びGriffin, H.G. 編集、Humana Press、New Jersey、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G.、Academic Press、1987年、並びにSequence Analysis Primer、Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編集、M Stockton Press、New York、1991年を参照されたい。

【0041】

ポリペプチド又は核酸分子は、例えば、それが得られた天然の生物学的供給源及び/又は反応培地若しくは培養培地と比較した場合に、上記供給源又は培地中に通常付随する少なくとも1つの他の構成要素、例えば別のタンパク質/ポリペプチド、別の核酸、別の生物学的構成要素若しくは巨大分子又は少なくとも1つの夾雑物、不純物若しくは微量構成要素から分離されている場合、「本質的に単離されている」と考えられる。特に、ポリペプチド又は核酸分子は、それが少なくとも2倍、特に少なくとも10倍、より特に少なくとも100倍、及び1000倍又はそれより高くまで精製されている場合、「本質的に単離されている」と考えられる。「本質的に単離されている形態である」ポリペプチド又は核酸分子は、適切な技術、例えば、適切なクロマトグラフィー技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使用して決定されるように好ましくは本質的に均質である。

【0042】

「親和性成熟された」抗CTLA4抗体、特にVHH又はドメイン抗体は、1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有し、その結果、それぞれの親CTLA4結合分子と比較してCTLA4に対する親和性が改善されている。本発明の親和性成熟されたCTLA4結合分子は、例えば、Marksら、1992年、Biotechnology 10巻: 779~783頁、又はBarbasら、1994年、Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91巻: 3809~3813頁；Shierら、1995年、Gene 169巻: 147~155頁；Yeltonら、1995年、Immunol. 155巻: 1994~2004年；Jacksonら、1995年、J. Immunol. 154巻(7号): 3310~9頁；及びHawkinsら、1992年、J. Mol. Biol. 226巻(3号): 889~896頁；KS Johnson及びRE Hawkins、「Affinity maturation of antibodies using phage display」、Oxford University Press 1996年に記載されているように、当該技術分野において公知である方法によって調製され

10

20

30

40

50

得る。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用するときに、「対象」という用語は、哺乳動物、特に霊長類、特にヒトを指す。

【 0 0 4 4 】

本発明の C T L A 4 結合タンパク質

第 1 の態様では、本発明は、C T L A 4 に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む C T L A 4 結合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、上記 C T L A 4 結合分子は、C T L A 4 に特異的に結合する 1 つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。一部の実施形態では、上記 C T L A 4 結合分子は、C T L A 4 に特異的に結合する 2 つ、3 つ、4 つ又はそれを超える免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。一部の実施形態では、上記 C T L A 4 結合タンパク質は、C T L A 4 に特異的に結合する 2 つ以上の同一の免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。他の実施形態では、上記 C T L A 4 結合タンパク質は、C T L A 4 に特異的に結合する 2 つ以上の異なる免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。一部の実施形態では、C T L A 4 に特異的に結合する上記 2 つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインは、互いに直接連結される。一部の実施形態では、C T L A 4 に特異的に結合する上記 2 つ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインは、リンカーによって互いに連結される。上記リンカーは、1 ~ 2 0 個又はそれを超えるアミノ酸の長さを有し、2 次構造及びそれを超える構造を持たない非機能性アミノ酸配列であり得る。例えば、上記リンカーは、G G G G S、G S、G A P、(G G G G S) × 3 などのフレキシブルなリンカーである。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、上記少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一可変ドメインは、以下から選択される C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む：

(1) 配列番号 1 に示される C D R 1、配列番号 2 に示される C D R 2、配列番号 3 に示される C D R 3 (抗体番号 1 1 6 の C D R に対応する) ；

(2) 配列番号 4 に示される C D R 1、配列番号 5 に示される C D R 2、配列番号 6 に示される C D R 3 (抗体番号 1 1 9 の C D R に対応する) ；

(3) 配列番号 7 に示される C D R 1、配列番号 8 に示される C D R 2、配列番号 9 に示される C D R 3 (抗体番号 1 2 8 の C D R に対応する) ；

(4) 配列番号 1 0 に示される C D R 1、配列番号 1 1 に示される C D R 2、配列番号 1 2 に示される C D R 3 (抗体番号 1 3 8 の C D R に対応する) ；

(5) 配列番号 1 3 に示される C D R 1、配列番号 1 4 に示される C D R 2、配列番号 1 5 に示される C D R 3 (抗体番号 1 4 5 の C D R に対応する) ；

(6) 配列番号 1 6 に示される C D R 1、配列番号 1 7 に示される C D R 2、配列番号 1 8 に示される C D R 3 (抗体番号 1 5 5 の C D R に対応する) ；

(7) 配列番号 1 9 に示される C D R 1、配列番号 2 0 に示される C D R 2、配列番号 2 1 に示される C D R 3 (抗体番号 1 6 5 の C D R に対応する) ；

(8) 配列番号 2 2 に示される C D R 1、配列番号 2 3 に示される C D R 2、配列番号 2 4 に示される C D R 3 (抗体番号 1 8 8 の C D R に対応する) ；

(9) 配列番号 2 5 に示される C D R 1、配列番号 2 6 に示される C D R 2、配列番号 2 7 に示される C D R 3 (抗体番号 C 1 の C D R に対応する) ；

(1 0) 配列番号 2 8 に示される C D R 1、配列番号 2 9 に示される C D R 2、配列番号 3 0 に示される C D R 3 (抗体番号 C 2 の C D R に対応する) ；

(1 1) 配列番号 3 1 に示される C D R 1、配列番号 3 2 に示される C D R 2、配列番号 3 3 に示される C D R 3 (抗体番号 C 1 6 の C D R に対応する) ；

(1 2) 配列番号 3 4 に示される C D R 1、配列番号 3 5 に示される C D R 2、配列番号 3 6 に示される C D R 3 (抗体番号 C 2 2 の C D R に対応する) ；

(1 3) 配列番号 3 7 に示される C D R 1、配列番号 3 8 に示される C D R 2、配列番号 3 9 に示される C D R 3 (抗体番号 C 2 7 の C D R に対応する) ；

10

20

30

40

50

(14) 配列番号40に示されるCDR1、配列番号41に示されるCDR2、配列番号42に示されるCDR3(抗体番号C29のCDRに対応する)；

(15) 配列番号43に示されるCDR1、配列番号44に示されるCDR2、配列番号45に示されるCDR3(抗体番号C38のCDRに対応する)；

(16) 配列番号46に示されるCDR1、配列番号47に示されるCDR2、配列番号48に示されるCDR3(抗体番号J5のCDRに対応する)；

(17) 配列番号49に示されるCDR1、配列番号50に示されるCDR2、配列番号51に示されるCDR3(抗体番号J17のCDRに対応する)；

(18) 配列番号52に示されるCDR1、配列番号53に示されるCDR2、配列番号54に示されるCDR3(抗体番号J29のCDRに対応する)；

10

(19) 配列番号55に示されるCDR1、配列番号56に示されるCDR2、配列番号57に示されるCDR3(抗体番号J35のCDRに対応する)；

(20) 配列番号58に示されるCDR1、配列番号59に示されるCDR2、配列番号60に示されるCDR3(抗体番号J37のCDRに対応する)；

(21) 配列番号61に示されるCDR1、配列番号62に示されるCDR2、配列番号63に示されるCDR3(抗体番号J38のCDRに対応する)；

(22) 配列番号64に示されるCDR1、配列番号65に示されるCDR2、配列番号66に示されるCDR3(抗体番号J39のCDRに対応する)；

(23) 配列番号67に示されるCDR1、配列番号68に示されるCDR2、配列番号69に示されるCDR3(抗体番号J42のCDRに対応する)；

20

(24) 配列番号70に示されるCDR1、配列番号71に示されるCDR2、配列番号72に示されるCDR3(抗体番号J69のCDRに対応する)；及び

(25) 配列番号73に示されるCDR1、配列番号74に示されるCDR2、配列番号75に示されるCDR3(抗体番号J78のCDRに対応する)。

【0046】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質の上記少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインは、VHHである。一部の特定の実施形態では、上記VHHは、配列番号76～100のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。一部の他の実施形態では、上記VHHは、ヒト化VHHである。上記ヒト化VHHは、配列番号76～100のうちいずれか1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。あるいは、上記VHHのアミノ酸配列は、配列番号76～100のうちいずれか1つと比較して、1つ以上のアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換を含有する。例えば、上記VHHは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の保存的アミノ酸置換を含有する。一部の特定の実施形態では、上記ヒト化VHは、配列番号101～109のうちいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

30

【0047】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質は、親和性成熟によって得られる。親和性成熟によって得られるCTLA4結合タンパク質は、1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有し得、このような変更は、親CTLA4結合タンパク質と比較した場合、CTLA4に対する親和性の増加をもたらす。

40

【0048】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質は、CTLA4に特異的に結合することができる少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインに加えて、免疫グロブリンFc領域をさらに含む。本発明のCTLA4結合タンパク質における免疫グロブリンFc領域の内包により、結合タンパク質は二量体を形成することが可能になり、さらに上記結合タンパク質のインビボ半減期の延長が可能になる。本発明において使用することができるFc領域は、異なるサブタイプの免疫グロブリン、例えば、IgG(例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgMから得ることができる。免疫グロブリンFc領域は、一般的には、ヒ

50

ンジ領域又はヒンジ領域の一部、免疫グロブリン定常領域のCH2領域及びCH3領域を含む。

【0049】

一部の実施形態では、突然変異を野生型のFc配列に導入して、Fcにより媒介される関連活性を変更することができる。上記突然変異には、限定されないが、a) Fcによって媒介されるCDC活性を変更する突然変異；b) Fcによって媒介されるADCC活性を変更する突然変異；又はc) FcRnによって媒介されるインビボ半減期を変更する突然変異が含まれる。このような突然変異は、Leonard G Presta、*Current Opinion in Immunology* 2008年、20巻：460～470頁；Esohe E. Idusogieら、*J Immunol* 2000年、164巻：4178～4184頁；RAPHAEL A. CLYNESら、*Nature Medicine*、2000年、6巻、Number 4号：443～446頁；Paul R. Hintonら、*J Immunol*、2006年、176巻：346～356頁に記載されている。例えば、Fcを媒介したADCC又はCDC活性は、増加若しくは除去させることができ、又はFcRn親和性は、CH2領域上で1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸を突然変異させることによって増大若しくは減弱させることができる。さらに、タンパク質安定性は、ヒンジ領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸を突然変異させることによって増加させることができる。

10

【0050】

一部の実施形態では、突然変異されたFcが、ホモ二量体又はヘテロ二量体をより容易に形成する傾向が高まるように、突然変異がFc配列に導入され得る。例えば、Ridgway、Prestaら、1996年、及びCarter 2001年は、Fc接触界面にあるアミノ酸側鎖基の空間相互作用のノブ-ホールモデル(knob-hole model)を使用して、異なるFc突然変異体がヘテロ二量体をより容易に形成できることに言及し；加えて、中国特許出願公開第102558355号又は中国特許出願公開第103388013号は、Fc接触界面にあるアミノ酸の電荷を変化させ、順に、Fc接触界面でのイオン相互作用を変化させることによって、異なるFc突然変異体がヘテロ二量体をより容易に形成できる(中国特許出願公開第102558355号)、又は同じ突然変異によりFcがホモ二量体をより容易に形成できる(中国特許出願公開第103388013号)ことを開示する。

20

30

【0051】

好ましくは、上記免疫グロブリンFc領域は、ヒト免疫グロブリンのFc領域、より好ましくはヒトIgG1のFc領域である。一部の特定の実施形態では、免疫グロブリンFc領域のアミノ酸配列は、配列番号132に記載されている。一部の実施形態では、配列番号132のN末端EPKSCを欠失させるか、又はEPKSS若しくはMDPKSSに突然変異させることができる。

【0052】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質において、CTLA4に特異的に結合することができる免疫グロブリン単一可変ドメインは、リンカーを介して免疫グロブリンFc領域に連結される。上記リンカーは、二次構造又はそれを超える構造を持たずに、長さが1～20アミノ酸又はそれを超える非機能性アミノ酸配列であり得る。例えば、リンカーは、GGGS、GS、GAPなどのフレキシブルな接続である。

40

【0053】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質は、直接又はリンカーを介して免疫グロブリンFc領域に連結される、CTLA4に特異的に結合する1つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリンFc領域により、上記CTLA4結合タンパク質は2つのCTLA4結合ドメインを含む二量体分子を形成することができる。このようなCTLA4結合タンパク質は、二価CTLA4結合タンパク質とも呼ばれる。一部の実施形態では、二量体はホモ二量体である。

【0054】

50

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質は、直接又はリンカーを介して連結される、CTLA4及び免疫グロブリンFc領域に特異的に結合する2つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリンFc領域により、CTLA4結合タンパク質は、4つのCTLA4結合ドメインを含む二量体分子を形成することができる。このようなCTLA4結合タンパク質はまた、4価CTLA4結合タンパク質とも呼ばれる。一部の実施形態では、二量体はホモ二量体である。

【0055】

一部の好ましい実施形態では、免疫グロブリンFc領域を含む本発明のCTLA4結合タンパク質は、配列番号114～128から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0056】

別の態様では、本発明のCTLA4結合タンパク質はまた、配列番号76～100のいずれかのうちの1つのアミノ酸配列からなるVHHと同じエピトープに結合する抗CTLA4抗体分子を包含する。

【0057】

本発明のCTLA4結合タンパク質は、以下の特徴のうちの少なくとも1つを有する：

- (a) 1×10^{-7} M未満のKDでヒトCTLA4に結合する；
- (b) CTLA4とCD80及び/又はCD86との相互作用をブロックする；
- (c) PBM C及び/又はT細胞の活性化を増強する；
- (d) 腫瘍増殖を阻害する。

【0058】

本発明のCTLA4結合タンパク質は、 1×10^{-7} M未満、好ましくは 1×10^{-8} M未満、より好ましくは 1×10^{-9} M未満、より好ましくは 1×10^{-10} M未満のKDでCTLA4に結合し得る。

【0059】

一部の実施形態では、本発明のCTLA4結合タンパク質は、ヒトCTLA4に特異的に結合し、CTLA4とCD80との相互作用並びに/又はCTLA4とCD80及び/若しくはCD86との相互作用をブロックすることができる。

【0060】

本発明のCTLA4結合タンパク質は、腫瘍増殖を少なくとも約10%、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30%、より好ましくは少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%まで阻害することができる。

【0061】

さらに、本発明のCTLA4結合タンパク質は、熱処理に耐性である。例えば、40で最大30日間まで処理した後、有意な凝集及び分解を観察することができない。

【0062】

最後に、本発明のCTLA4結合タンパク質は、カニクイザルにおいてより良好な耐性を示す。例えば、投与量の最大30mg/kgまで、薬物関連有害反応を観察することができない。

【0063】

核酸、ベクター及び宿主細胞

別の態様では、本発明は、本発明のCTLA4結合タンパク質をコードする核酸分子に関する。本発明の核酸は、RNA、DNA又はcDNAであり得る。本発明の一実施形態によれば、本発明の核酸は、本質的に単離された形態である。

【0064】

本発明の核酸はまた、例えばプラスミド、コスミド又はYACなどのベクターの形態であり得、それに存在し得、及び/又はその一部であり得る。ベクターは、特に、発現ベクター、すなわち、インビトロ及び/又はインビボで(すなわち、適切な宿主細胞、宿主生物及び/又は発現系において)CTLA4結合タンパク質の発現を提供することができる

10

20

30

40

50

ベクターであり得る。このような発現ベクターは、一般的に、プロモーター（複数可）、エンハンサー（複数可）、ターミネーター（複数可）などのような1つ以上の適切な調節エレメントに作動可能に連結された本発明の少なくとも1つの核酸を含む。このようなエレメント及び特定の宿主における特定の配列の発現を考慮したそれらの選択は、当業者の常識である。本発明のCTLA4結合タンパク質を発現するために有用であるか又は必要な調節エレメント及び他のエレメントの具体例には、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、組込み因子、選択マーカー、リーダー配列、レポーター遺伝子などが含まれる。

【0065】

本発明の核酸は、本明細書に記載されている本発明のポリペプチドについてのアミノ酸配列に関する情報に基づいて、それ自体が公知である方法（例えば、自動化DNA合成及び/又は組換えDNA技術）によって調製又は取得することができ、及び/又は適切な天然源から単離することができる。

10

【0066】

別の態様では、本発明は、本発明の1つ以上のCTLA4結合タンパク質を発現するか又は発現することができる；及び/又は本発明の核酸を含有する組換え宿主細胞に関する。特に好ましい実施形態によれば、上記宿主細胞は細菌細胞であり；他の有用な細胞は、酵母細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞である。

【0067】

適切な細菌細胞には、大腸菌（*Escherichia coli*）、プロテウス（*Proteus*）、及びシュードモナス（*Pseudomonas*）の菌株などのグラム陰性細菌株、並びにバチルス（*Bacillus*）、ストレプトマイセス（*Streptomyces*）、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）及びラクトコッカス（*Lactococcus*）属の菌株などのグラム陽性細菌株由来の細胞が含まれる。適切な真菌細胞には、トリコデルマ（*Trichoderma*）、ニューロスボラ（*Neurospora*）、及びアスペルギルス（*Aspergillus*）属の種由来の細胞が含まれる。

20

【0068】

適切な真菌細胞には、トリコデルマ（*Trichoderma*）、*Neurospora*（ニューロスボラ）、及びアスペルギルス（*Aspergillus*）属の種由来の細胞が含まれる。適切な酵母細胞には、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属の種（例えば、サッカロミセス・セレビジア（*Saccharomyces cerevisiae*））、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）属の種（例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*））、ピチア属の種（例えば、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）及びピチア・メタノリカ（*Pichia methanolica*））、及びハンゼヌラ（*Hansenula*）属の種由来の細胞が含まれる。

30

【0069】

適切な哺乳動物細胞には、例えば、HEK293細胞、CHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞などが含まれる。

40

【0070】

しかしながら、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞、及び異種タンパク質の発現のために当該技術分野において使用される任意の他の細胞も同様に使用することができる。

【0071】

本発明はさらに、本発明のCTLA4結合タンパク質を製造する方法を提供し、このような方法は、一般的に、下記のステップを含む：

本発明のCTLA4結合タンパク質の発現を可能にする条件下で本発明の宿主細胞を培養するステップ；及び

宿主細胞によって発現されたCTLA4結合タンパク質を培養物から回収するステップ；及び

50

場合により、本発明の C T L A 4 結合タンパク質をさらに精製及び / 又は修飾するステップ。

【 0 0 7 2 】

本発明の C T L A 4 結合タンパク質は、細胞内（例えば、細胞質ゾル、ペリプラズマ又は封入体中）のいずれかで上記のように細胞内に産生され、次に、宿主細胞から単離され、場合によりさらに精製され得る；又はそれらは細胞外に（例えば、宿主細胞が培養される培地中に）産生され、次に培養培地から単離され、場合によりさらに精製され得る。

【 0 0 7 3 】

特定の適切な発現ベクター、形質転換又はトランスフェクション法、選択マーカー、タンパク質発現の誘導法、培養条件などのポリペプチドの組換え生成のために使用される方法及び試薬は、当該技術分野において公知である。同様に、本発明の C T L A 4 結合タンパク質の製造方法に有用なタンパク質の単離及び精製技術は、当業者に周知である。

【 0 0 7 4 】

しかしながら、本発明の C T L A 4 結合タンパク質は、固相合成又は液相合成を含む化学合成などの当該技術分野において公知であるタンパク質の他の製造方法によっても得ることができる。

【 0 0 7 5 】

医薬組成物

別の態様では、本発明は、医薬として許容される担体とともに製剤化された、本発明の C T L A 4 結合タンパク質の 1 つ又は組合せを含有する組成物、例えば、医薬組成物を提供する。このような組成物には、1 つ又は組合せの（例えば 2 つ若しくはそれ以上の異なる）本発明の C T L A 4 結合タンパク質が含まれ得る。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合する抗体分子の組合せを含むことができる。

【 0 0 7 6 】

本発明の医薬組成物はまた、併用療法において、すなわち他の薬剤と組み合わせる投与することができる。例えば、併用療法は、少なくとも 1 種の他の抗腫瘍剤と組み合わせられた、本発明の C T L A 4 結合タンパク質を含むことができる。例えば、本発明の C T L A 4 結合タンパク質は、他の腫瘍特異的抗原を標的とする抗体と併用して投与され得る。他の腫瘍特異的抗原を標的とする上記抗体には、限定されないが、抗 E G F R 抗体、抗 E G F R 変異抗体、抗 V E G F a 抗体、抗 H E R 2 抗体、又は抗 C M E T 抗体が含まれる。上記抗体はモノクローナルであることが好ましい。本発明の C T L A 4 結合タンパク質はまた、他の腫瘍免疫療法手段又は腫瘍標的化小分子薬と組み合わせる使用することができる。他の腫瘍免疫療法手段には、限定されないが、O X 4 0、P D L 1 / P D 1、C D 1 3 7 などの腫瘍免疫調節分子に対する治療抗体、又は C A R - T 治療手段などが含まれる。

【 0 0 7 7 】

本発明の医薬組成物はまた、放射線療法、化学療法、外科手術などの他の腫瘍治療手段と組み合わせる使用することができ、又は放射線療法、化学療法、若しくは外科手術の前又は後で使用することができる。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用するとき、「医薬として許容される担体」には、生理学的に適合性である任意及びすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、並びに等張化剤及び吸収遅延剤などが含まれる。担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、又は表皮投与（例えば、注射若しくは輸注による）に適していることが好ましい。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体、又は免疫複合体は、化合物を不活性化し得る酸の作用及び他の天然の条件から化合物を保護するための材料でコーティングされ得る。

【 0 0 7 9 】

本発明の薬学的化合物には、1 つ以上の医薬として許容される塩が含まれ得る。「医薬として許容される塩」とは、親化合物の望ましい生物活性を保持し、いずれの望まれない毒物学的作用も与えない塩を指す（例えば、B e r g e , S . M . ら（ 1 9 7 7 年）J .

10

20

30

40

50

Pharm. Sci. 66巻：1～19頁を参照されたい)。このような塩の例には、酸付加塩及び塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、及び亜リン酸などの非毒性無機酸に由来するもの、並びに、脂肪族のモノカルボン酸及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、並びに脂肪族スルホン酸及び芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸に由来するものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、及びカルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの、並びに、N、N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、及びプロカインなどの非毒性有機アミンに由来するものが含まれる。

【0080】

本発明の医薬組成物はまた、医薬として許容される抗酸化剤を含み得る。医薬として許容される抗酸化剤の例には、以下のものが含まれる：(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、及び亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、及び-トコフェロールなどの油性抗酸化剤；並びに(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、及びリン酸などの金属キレート剤。

【0081】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントを含有し得る。

【0082】

微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順、並びに様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、及びフェノールソルビン酸などを含めることの両方によって確実にすることができる。また、糖及び塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含めることが望ましい場合がある。さらに、注射可能な医薬形態の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど吸収を遅延させる作用物質を含めることによって実現され得る。

【0083】

医薬として許容される担体には、無菌の注射可能な溶液又は注射用分散液を用時調製するための、無菌の水溶液又は水性分散液及び無菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。任意の従来の媒体又は薬剤が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるこれらの使用が企図される。補助的な活性化化合物もまた、組成物中に取り込むことができる。

【0084】

治療用組成物は、典型的には、製造及び貯蔵の条件下で無菌であり、安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高い薬物濃度に適した他の規則構造として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコールなど)、並びにそれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合に必要な粒子径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【0085】

無菌の注射可能な溶液は、必要に応じて、上記で列挙された成分の1つ又は組合せとともに、適切な溶媒中で必要な量の活性化化合物を組み込み、続いて滅菌精密ろ過することによって調製することができる。一般的に、分散液は、基本となる分散媒及び上記で列挙したもののうち必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌ろ過したその溶液から、活性成分及び任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥及びフリーズドライ法(凍結乾燥)である。

【0086】

10

20

30

40

50

単一の剤形を産生するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療される対象及び個々の投与様式に応じて変わる。単一の剤形を産生するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般的に、治療的効果をもたらす組成物の量である。一般的に、100パーセントのうち、この量は、医薬として許容される担体と組み合わせた、約0.01パーセント～約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント～約30パーセントの活性成分の範囲である。

【0087】

投与計画は、最適な所望の応答（例えば治療反応）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してよく、いくつかに分割した用量を経時的に投与してよく、又は、治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少又は増加させてよい。投与を容易にし、投薬量を均一にするために、単位剤形の非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される単位剤形とは、治療されるべき対象に対する単位投薬量として適した物理的に個別の単位を指す；各単位は、必要とされる薬学的担体と共同して所望の治療的効果をもたらすように計算された、所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形の仕様は、(a)活性化化合物の独特の特性及び実現すべき特定の治療的効果、並びに(b)個体の感受性を治療するためにこのような活性化化合物を調剤する技術に特有の制約によって決定され、これらに直接依存する。

10

【0088】

抗体分子の投与の場合、投薬量は、対象の体重の約0.0001～100mg/kg、より通常には0.01～20mg/kgの範囲である。例えば、投薬量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、10mg/kg体重、20mg/kg体重、30mg/kg体重又は1～30mg/kgの範囲内であり得る。例示的な治療計画は、1週間に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、1カ月に1回、3カ月毎に1回又は3～6カ月毎に1回の投与を伴い、初期では短い投与間隔（1週間に1回から3週間毎に1回など）、その後延長された間隔（1カ月に1回から3～6カ月毎に1回など）を有する。

20

【0089】

あるいは、抗体は、徐放製剤として投与することができ、この場合、必要とされる投与頻度は少なくなる。投薬量及び頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変化する。一般的に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、続いて、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び非ヒト抗体である。投薬量及び投与頻度は、治療が予防的であるか又は治療的であるかに応じて変化し得る。予防的適用では、比較的少ない投薬量が、長期間に渡って比較的頻度の低い間隔で投与される。一部の患者は、その後一生、治療を受け続ける。治療的適用では、比較的短い間隔で比較的高い投薬量は、時として、疾患の進行が緩和又は終結されるまで、及び好ましくは患者が疾患の症状の部分的又は全面的な改善を示すまで、必要とされる。その後、患者は、予防的計画を施されてもよい。

30

【0090】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、特定の患者、組成物、及び投与様式に対して、患者に有毒とならずに、所望の治療応答を達成するのに効果的である活性成分の量を得るように変化され得る。選択される投薬量レベルは、使用される本発明の特定の組成物、又はそれらのエステル、塩若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排泄速度、治療期間、使用される特定の組成物と組み合わせ使用される他の薬物、化合物、及び/又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全体的健康状態、及び以前の病歴、並びに医薬分野において周知である同様の因子を含む、様々な薬物動態学的因子に依存する。

40

【0091】

本発明のCTLA4結合タンパク質の「治療有効量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患症状の無い期間の頻度及び持続期間の増大、又は疾患の苦痛に起因する機能障害若しくは能力障害の予防をもたらす。例えば、CTLA4関連腫瘍の治療に関して

50

、「治療有効量」は、好ましくは、未治療の対象に比べて、少なくとも約10%、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%まで細胞増殖又は腫瘍増殖を阻害する。腫瘍増殖を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性の予測に役立つ動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの性質は、細胞増殖を阻害する化合物の能力を調べることにより評価することができる；このような阻害は、インビトロで当業者に公知であるアッセイによって決定することができる。治療的有效量の治療的化合物は、腫瘍サイズを縮小し得るか、又は他には対象の症状を改善し得、例えば、がん患者の無増悪生存を達成又は延長し、がん患者の全生存期間を延長することができる。当業者は、対象の大きさ、対象の症状の重症度、及び選択される特定の組成物又は投与経路などの因子に基づいてこのような量を決定することができる。さらに、当業者はまた、インビトロでT細胞を活性化する能力を調べることにより、本発明のCTLA4結合タンパク質の有効量を決定することができる。

10

【0092】

本発明の組成物は、当該技術分野において公知である1つ以上の様々な方法を用いて、1つ以上の投与経路を介して投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路及び/又は様式は、所望の結果に応じて変化する。本発明のCTLA4結合タンパク質の好ましい投与経路には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、又は例えば注射若しくは輸注による他の非経口投与経路が含まれる。本明細書で使用される「非経口投与」という語句は、通常は注射による、経腸投与及び局所投与以外の投与様式を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内の注射及び輸注が含まれる。

20

【0093】

あるいは、本発明のCTLA4結合タンパク質は、局所、表皮又は粘膜の投与経路など非経口ではない経路を介して、例えば、鼻腔内に、経口的に、腔経由、直腸経由、舌下又は局所的に投与することができる。

【0094】

活性化化合物は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤などの、急速な放出から化合物を保護する担体とともに調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。このような製剤を調製するための多数の方法は、特許付与されているか、又は、一般的に当業者に公知である。例えば、Sustained及びControlled Release Drug Delivery Systems、J.R. Robinson編集、Marcel Dekker, Inc.、New York、1978年を参照されたい。

30

【0095】

治療的組成物は、当該技術分野において公知である医療用デバイスを用いて投与することができる。例えば、好ましい実施形態において、本発明の治療的組成物は、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；又は同第4,596,556号に開示されているデバイスなどの、針無しの皮下注入デバイスを用いて投与することができる。本発明において有用な周知のインプラント及びモジュールの例には、以下が含まれる：制御された速度で医薬を分配するための埋め込み可能なマイクロ注入ポンプを開示している米国特許第4,487,603号；皮膚を介して医薬を投与するための治療用デバイスを開示している米国特許第4,486,194号；正確な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示している米国特許第4,447,233号；持続的な薬物送達用の流量可変な埋め込み可能な注入装置を開示している米国特許第4,447,224号；複数のチャンパーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を開示している米国特許第4,439,196号；及び浸透圧薬物送達系を開示している米

40

50

国特許第 4, 475, 196 号。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多数の他のこのようなインプラント、送達系、及びモジュールは、当業者に公知である。

【0096】

特定の実施形態では、本発明の CTLA4 結合タンパク質は、インビボでの適切な分布を確実にするように製剤化することができる。例えば、血液脳関門 (BBB) は、多くの親水性の高い化合物を排除する。(所望の場合は)本発明の治療的化合物が BBB を通過することを確実にするために、例えばリポソーム中にそれらを製剤化することができる。リポソームを製造する方法に関しては、例えば、米国特許第 4, 522, 811 号; 同第 5, 374, 548 号; 及び同第 5, 399, 331 号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞又は臓器中に選択的に輸送され、それによって標的化された薬物送達を向上させる 1 つ以上の部分を含み得る (例えば、V. V. Ranade (1989 年) J. Clin. Pharmacol. 29 巻: 685 頁を参照されたい)。例示的な標的部分には、葉酸又はビオチン (例えば、Lowらによる米国特許第 5, 416, 016 号を参照されたい); マンノシド (Umezawaら (1988 年) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 巻: 1038 頁)、抗体 (P. G. Bloemanら (1995 年) FEBS Lett. 357 巻: 140 頁; M. Owaisら (1995 年) Antimicrob. Agents Chemother. 39 巻: 180 頁)、サーファクタントプロテイン A 受容体 (Briscoeら (1995 年) Am. J. Physiol. 1233 巻: 134 頁); pl20 (Schreierら (1994 年) J Biol. Chem. 269 巻: 9090 頁) が含まれる; また、K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994 年) FEBS Lett. 346 巻: 123 頁; J. J. Killion; L. J. Fidler (1994 年) Immunomethods 4 巻: 273 頁を参照されたい。

【0097】

疾患の予防及び治療

別の態様では、本発明は、CTLA4 関連疾患の予防及び/又は治療のための、本発明の CTLA4 結合タンパク質、核酸、宿主細胞、及び医薬組成物の使用、並びに対応する方法を提供する。本発明の CTLA4 結合タンパク質を用いて予防及び/又は治療できる CTLA4 関連疾患は、以下のように詳細に記載される。

【0098】

がん

本発明の CTLA4 結合タンパク質により CTLA4 をブロックすることにより、がん細胞に対する患者の免疫応答を増強することができる。本発明の CTLA4 結合タンパク質は、単独で使用されて、がん性腫瘍の増殖を阻害し得る。又は、以下に記載されるように本発明の CTLA4 結合タンパク質は、他の抗腫瘍療法と組み合わせて、例えば、他の免疫原性物質、標準的ながん治療薬、又は他の抗体分子と組み合わせて使用され得る。

【0099】

したがって、一実施形態において、本発明は、対象においてがんを予防及び/又は治療する方法であって、本発明の治療有効量の CTLA4 結合タンパク質を対象に投与するステップを含む、方法を提供し、それにより対象における腫瘍細胞の増殖を阻害する。

【0100】

本発明の CTLA4 結合タンパク質を用いて予防及び/又は治療され得る好ましいがんは、典型的には、免疫療法に反応性を有するがんを含む。治療のための好ましいがんの非限定的な例には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、直腸がん、黒色腫 (例えば、転移性の悪性黒色腫)、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮体癌、骨肉腫が挙げられる。本発明の方法を用いて治療され得る他のがんの例には、骨がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、頭部又は頸部のがん、皮膚又は眼内の悪性黒色腫、子宮がん、肛門領域のがん、精巣がん、ファロピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状

10

20

30

40

50

腺がん、副腎がん、軟部組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病を含む慢性又は急性の白血病、幼児期の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱がん、腎臓又は尿管のがん、腎う癌、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、脳下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されるものを含む環境的に誘導されるがん、及び上記がんの組合せが含まれる。

【0101】

任意選択で、本発明のCTLA4結合タンパク質は、がん細胞、精製された腫瘍抗原（組換えタンパク質、ペプチド、及び炭水化物分子を含む）、細胞、及び免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクトされた細胞などの免疫原性物質と組み合わせることができる（Heら（2004年）J. Immunol. 173巻：4919～28頁）。使用され得る腫瘍ワクチンの非限定的な例には、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1、及びノ若しくはチロシナーゼのペプチドなどの黒色腫瘍抗原のペプチド、又はサイトカインGM-CSFを発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞が含まれる。

10

【0102】

ヒトにおいて、黒色腫瘍などの一部の腫瘍は免疫原性であることが示されている。本発明のCTLA4結合タンパク質を用いてCTLA4ブロックによってT細胞活性化の閾値を上げることにより、宿主における腫瘍応答を活性化し得ることが予想される。CTLA4の遮断は（CTLA4抗体など、例えば本発明のCTLA4結合タンパク質）は、ワクチン接種プロトコールと組み合わせられた場合に最も効果的である可能性が高い。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的戦略が考案されている（Rosenberg, S., 2000年、Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60～62頁；Logothetis, C., 2000年、ASCO Educational Book Spring: 300～302頁；Khayat, D., 2000年、ASCO Educational Book Spring: 414～428頁；Foon, K., 2000年、ASCO Educational Book Spring: 730～738頁；さらにRestifo, N.及びSznol, M., Cancer Vaccines, 61章、3023～3043頁、DeVita, V.ら（編集）、1997年、Cancer: Principles and Practice of Oncology, 第5版を参照されたい）。これらの戦略のうち1つにおいて、ワクチンは、自己由来又は同種異系の腫瘍細胞を用いて調製される。これらの細胞ワクチンは、GM-CSFを発現するように腫瘍細胞に形質導入する場合、最も効果的であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種に対する抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている（Dranooffら（1993年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90巻：3539～43頁）。

20

30

【0103】

種々の腫瘍における遺伝子発現及び大規模遺伝子発現パターンの研究は、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義をもたらしている（Rosenberg, SA（1999年）Immunity 10巻：281～7ページ）。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍及び腫瘍が生じた細胞において発現される分化抗原、例えばメラノサイト抗原gp100、MAGE抗原、及びTrp-2である。より重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主中に見出される腫瘍特異的T細胞の標的であることが示され得る。本発明のCTLA4結合タンパク質は、これらのタンパク質に対する免疫応答を生じさせるために、腫瘍に発現された組換えタンパク質及びノ又はペプチドの回収物と組み合わせて使用され得る。これらのタンパク質は、通常、免疫系によって自己抗原と考えられ、したがってそれらに耐性である。腫瘍抗原はまた、染色体のテロメアの合成に必要であり、85%を超えるヒトがん及びごく限られた数の体細胞組織において発現されるタンパク質テロメラーゼを含み

40

50

得る (Kim, Nら (1994年) Science 266巻: 2011~2013頁)。腫瘍抗原はまた、タンパク質配列を変化させる体細胞突然変異又は2つの無関係な配列間の融合タンパク質 (すなわち、フィラデルフィア染色体の bcr - abl) を作製するため、がん細胞において発現される「ネオ抗原」であり得る。

【0104】

他の腫瘍ワクチンは、ヒトパピローマウイルス (HPV)、肝炎ウイルス (HBV及びHCV) 並びにカポジヘルペス肉腫ウイルス (KHSV) などのヒトがんに関するウイルス由来のタンパク質を含み得る。CTLA4の遮断 (CTLA4抗体など、例えば本発明のCTLA4結合タンパク質) と併用してもよい別の形態の腫瘍特異的抗原は、腫瘍組織自体から単離され、精製された熱ショックタンパク質 (HSP) である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞由来のタンパク質の断片を含有し、これらのHSPは、腫瘍免疫を誘発するために抗原提示細胞への送達において非常に効率的である (Suot, R及びSrivastava, P (1995年) Science 269巻: 1585~1588頁; Tamura, Y.ら (1997年) Science 278巻: 117~120頁)。

10

【0105】

樹状細胞 (DC) は、抗原特異的応答をプライミングするために使用することができる強力な抗原提示細胞である。DCは、エクスピドで産生され、様々なタンパク質及びペプチド抗原、並びに腫瘍細胞抽出物で負荷され得る (Nestle, F.ら (1998年) Nature Medicine 4巻: 328~332頁)。DCはまた、遺伝的手段によって形質導入されて、これらの腫瘍抗原を同様に発現し得る。DCはまた、免疫化の目的で腫瘍細胞に直接融合されている (Kugler, Aら (2000年) Nature Medicine 6巻: 332~336頁)。ワクチン接種の方法として、DC免疫化は、より強力な抗腫瘍応答を活性化するために、CTLA4の遮断 (CTLA4抗体など、例えば本発明のCTLA4結合タンパク質) と効果的に組み合わせられ得る。

20

【0106】

CAR-T (キメラ抗原受容体T細胞免疫療法) は、腫瘍を治療するための別の細胞療法である。キメラ抗原受容体T細胞 (CAR-T細胞) は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現させるために、CD3 - 鎖又はFcRIの細胞内部分と結合した特定の腫瘍抗原に対する抗体の抗原結合部分のキメラタンパク質を遺伝的に感染させた患者由来のT細胞である。また、同時刺激シグナリング配列は、T細胞の細胞傷害活性、増殖及び生存を増加させるために、及びサイトカインの放出を促進させるために導入されてもよい。再プログラムした後、患者由来のT細胞をインビトロで拡大させて、多数の腫瘍特異的CAR-T細胞を産生させ、次に、腫瘍を治療するために患者に輸注される。CTLA4ブロック剤 (CTLA4抗体など、例えば、本発明のCTLA4結合タンパク質) は、より強力な抗腫瘍応答を活性化させるために、CAR-T細胞療法と組み合わせ使用され得る。

30

【0107】

本発明のCTLA4結合タンパク質はまた、標準的ながん治療と組み合わせることができる。本発明のCTLA4結合タンパク質は、化学療法計画と効果的に組み合わせることができる。本発明のCTLA4結合タンパク質及び化学療法の併用後の科学的根拠は、ほとんどの化学療法化合物の細胞傷害作用の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原レベルの増加をもたらすべきであるということである。細胞死によりCTLA4の遮断との相乗効果をもたらす得る他の併用療法は、放射線、外科手術、及びホルモン欠乏である。これらのプロトコールの各々は、宿主内に腫瘍抗原の供給源を作り出す。血管新生阻害剤はまた、本発明のCTLA4結合タンパク質と組み合わせることができる。血管新生の阻害は、腫瘍抗原を宿主抗原提示経路に供給することができる腫瘍細胞死をもたらす。

40

【0108】

本発明のCTLA4結合タンパク質はまた、他の腫瘍特異的抗原に対する抗体と組み合

50

わせて使用することができる。他の腫瘍特異的抗原に対する上記抗体には、限定されないが、抗EGFR抗体、抗EGFR変異抗体、抗VEGF α 抗体、抗HER2抗体、又は抗CMET抗体が含まれる。上記抗体はモノクローナルであることが好ましい。

【0109】

本発明のCTLA4結合タンパク質はまた、腫瘍細胞に対してFcアルファ又はFcガンマ受容体発現エフェクター細胞を標的とする二重特異性抗体と組み合わせて使用することができる（例えば、米国特許第5,922,845号及び同第5,837,243号を参照されたい）。二重特異性抗体を用いて、2つの別々の抗原を標的にすることができる。例えば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原（例えば、Her-2/neu）二重特異性抗体は、マクロファージを腫瘍部位に標的化するために使用されている。この標的化は、腫瘍特異的反応をより効果的に活性化し得る。これらの応答のT細胞アームは、CTLA4の遮断の使用によって増強される。あるいは、抗原は、腫瘍抗原及び樹状細胞特異的細胞表面マーカーに結合する二重特異性抗体の使用によって、DCに直接送達され得る。

10

【0110】

腫瘍は、非常に様々な機構によって宿主の免疫監視を回避する。これらの機構の多くは、腫瘍によって発現され、免疫抑制性であるタンパク質の不活性化によって克服することができる。これらには、とりわけ、TGF- β （Kehrl, J.ら（1986年）*J. Exp. Med.* 163巻：1037~1050頁）、IL-10（Howard, M.及びO'Garra, A.（1992年）*Immunology Today* 13巻：198~200頁）、及び Fasリガンド（Hahne, M.ら（1996年）*Science* 274巻：1363~1365頁）が含まれる。これらの実体の各々に対する抗体は、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進するために、本発明のCTLA4結合タンパク質と組み合わせて使用され得る。

20

【0111】

宿主免疫応答性を活性化するために使用され得る他の抗体は、抗CTLA4と組み合わせて使用することができる。抗CD40抗体は、ヘルパーT細胞活性を効果的に置換することができる（Ridge, J.ら（1998年）*Nature* 393巻：474~478頁）、本発明のCTLA4結合タンパク質と併用することができる。OX-40（Weinberg, A.ら（2000年）*Immunol* 164巻：2160~2169頁）、4-1BB（Melero, I.ら（1997年）*Nature Medicine* 3巻：682~685頁（1997年））、及びICOS（Hutloff, A.ら（1999年）*Nature* 397巻：262~266頁）などのT細胞共刺激分子に対する抗体、並びにCTLA-4（例えば、米国特許第5,811,097号）又はBTLA（Watanabe, N.ら（2003年）*Nat Immunol* 4巻：670~9頁）、B7-H4（Sica, G.ら（2003年）*Immunity* 18巻：849~61頁）などの負の補助刺激分子の活性をブロックする抗体の活性化はまた、増加したレベルのT細胞活性化をもたらす得る。

30

【0112】

骨髄移植は、現在、造血起源の様々な腫瘍を治療するために使用されている。移植片対宿主疾患はこの処置の結果であるが、移植片対腫瘍応答から治療上の利益を得ることができる。CTLA4の遮断は、ドナー移植腫瘍特異的T細胞の有効性を増加させるために使用することができる。また、腫瘍に対する抗原特異的T細胞のために、抗原特異的なT細胞のエキスピボでの活性化及び拡大、並びにレシピエントへのこれらの細胞の養子移入を伴ういくつかの実験的処理プロトコールがある（Greenberg, R.及びRiddell, S.（1999年）*Science* 285巻：546~51頁）。これらの方法はまた、CMVなどの感染性因子に対するT細胞反応を活性化するために使用され得る。本発明のCTLA4結合タンパク質の存在下におけるエキスピボでの活性化は、養子移入されたT細胞の頻度及び活性を増加させることが期待され得る。

40

【0113】

感染症

50

本発明の他の方法は、特定の毒素又は病原体に曝露された患者を治療するために使用される。したがって、本発明の別の態様は、対象における感染症を予防又は治療する方法であって、対象に本発明のCTLA4結合性タンパク質を投与することを含む、方法を提供し、それにより、対象は感染症のために治療される。

【0114】

上記で検討した腫瘍へのその適用と同様に、CTLA4の遮断は、単独で又はアジュバントとして、ワクチンと組み合わせて使用して、病原体、毒素、及び自己抗原に対する免疫応答を刺激することができる。この治療アプローチが特に有用であり得る病原体の例としては、現在有効なワクチンが存在しない病原体、又は従来のワクチンが完全には有効でない病原体が挙げられる。これらには、限定されないが、HIV、肝炎（A、B、及びC）、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、緑膿菌（*Pseudomonas Aeruginosa*）が含まれる。CTLA4の遮断は、感染の過程で変化した抗原を提示するHIVなどの、薬剤によって確立された感染に対して特に有用である。これらの新規なエピトープは、抗ヒトCTLA4投与の時点で異物として認識され、したがって、CTLA4を介した負のシグナルによって弱くならない強いT細胞反応を引き起こす。

10

【0115】

発明の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性ウイルスの例の中には、HIV、肝炎（A、B、又はC）、ヘルペスウイルス（例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、及びCMV、エプスタイン・バーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス（*coronavirus*）、呼吸器合胞体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟体動物ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス及びアルボウイルス性脳炎ウイルスが含まれる。

20

【0116】

本発明の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性細菌の例の中には、クラミジア、リケッチア細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌及び淋菌、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュードモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、バチルス、コレラ、破傷風、ボツリヌス、炭疽、ペスト、レプトスピラ症、及びライム病の細菌が含まれる。

30

【0117】

本発明の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性真菌の例の中には、カンジダ（*Candida*）（アルビカンス（*albicans*）、クルセイ（*krusei*）、グラブラタ（*glabrata*）、トロピカリス（*tropicalis*）など）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ（*Cryptococcus neoformans*）、アスペルギルス（*Aspergillus*）（フミガタス（*fumigatus*）、ニガー（*niger*）など）、ムコラエ属（ムコル（*mucor*）、アビシジア（*absidia*）、リゾフス（*rhizophus*）、スポロトリックス・スケンキー（*Sporothrix schenckii*）、プラストミセス・デルマチチジス（*Blastomyces dermatitidis*）、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス（*Paracoccidioides brasiliensis*）、コクシジオイデス・イミチス（*Coccidioides immitis*）及びヒストプラスマ・カプスラーツム（*Histoplasma capsulatum*）が含まれる。

40

【0118】

本発明の方法によって治療可能な感染を引き起こす病原性寄生虫の例の中には、赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）、大腸バランチジウム（*Balantidium coli*）、ネグレリア（*Naegleria fowleri*）、アcantamoeba属種（*Acanthamoeba sp.*）、ランブル鞭毛虫（*Giardia*

50

dia lambia)、クリプトスポリジウム属種(Cryptosporidium sp.)、ニューモシステリス・カリニ(Pneumocystis carinii)、三日熱マラリア原虫(Plasmodium vivax)、バベシア・ミクロチ(Babesia microti)、トリパノソーマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)、トリパノソーマ・クルージ(Trypanosoma cruzi)、リーシュマニア・ドノバン(Leishmania donovani)、トキソプラズマ原虫(Toxoplasma gondii)、ニッポストロンギルス・ブラジリエンシス(Nippostrongylus brasiliensis)が含まれる。

【0119】

上記の方法の全てにおいて、CTLA4の遮断は、サイトカイン治療(例えば、インターフェロン、GM-CSF、G-CSF、IL-2)、又は腫瘍抗原の提示の増強を提供する二重特異性抗体療法(例えば、Holliger(1993年)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90巻:6444~6448頁;Poljak(1994年)Structure 2巻:1121~1123頁を参照されたい)などの他の形態の免疫療法と組み合わせることができる。

10

【実施例】

【0120】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、本発明の範囲は、いずれにせよ特定の実施例に限定されるべきではない。

【0121】

実施例1:CTLA4に対する重鎖単一ドメイン抗体のスクリーニング

20

1.1 ライブラリー構築及びスクリーニング

免疫化のためのCTLA4-Fc融合タンパク質(配列番号129)をHEK293細胞(pCDNA4、Invitrogen、カタログV86220)により発現させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。1頭のフタコブラクダ(Camelus bactrianus)を免疫化のために選んだ。4回の免疫化後、リンパ球を100mlのラクダ末梢血から単離し、総RNAをRNA抽出キット(QIAGEN)により抽出した。抽出されたRNAは、指示書に従ってSuper-Script II FIRST STRAND SUPERMIXキットを用いてcDNAに逆転写された。重鎖抗体をコードする核酸断片を入れ子PCRによって増幅した:

30

第1ラウンドのPCR:

上流プライマー:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC(配列番号110);

下流プライマー:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC(配列番号111)。

【0122】

第2ラウンドのPCR:

鋳型としての第1ラウンドのPCRからのPCR産物、

上流プライマー:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG(配列番号112);

40

下流プライマー:GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT(配列番号113)。

【0123】

標的重鎖単一ドメイン抗体核酸断片を回収し、エンドヌクラーゼPstI及びNotI(NEB由来)を用いてファージディスプレイベクターpCDisplay-3(Creative Biolabs、カタログ:VPT4023)にクローニングした。次に、生成物を大腸菌(E.coli)コンピテント細胞TG1に電気穿孔し、CTLA4に対する重鎖単一ドメイン抗体のファージディスプレイライブラリーを構築し、確認した。連続希釈をプレーティングすることにより、ライブラリー容量は約 10^8 と決定された。ライブラリーの挿入率を決定するために、50クローンをコロニーPCR用にランダムに

50

選択した。結果は、挿入率が99%以上であることを示した。

【0124】

1.2 CTLA4に対する重鎖単一ドメイン抗体のパニング

マルチウェルプレートは、5 µg / ウェルでCTLA4 - Fc融合タンパク質及びFcタンパク質を用いて、48で一晚、コーティングされた。翌日、室温で2時間、1%スキムミルクでブロックした後、100 µlのファージ (8×10^{11} t f u、1.1で構築されたラクダ重鎖単一ドメイン抗体のファージディスプレイライブラリー由来) を室温で1時間添加した。その後、Fc非結合ファージは、PBST (PBS中0.05% tween 20) を用いて室温で1時間洗浄することにより、CTLA4 - Fc融合タンパク質でコーティングされたウェルに再度移された。CTLA4に特異的に結合したファージをトリエチルアンモニウム (100 mM) で解離させ、大腸菌TG1を対数期で感染させてファージを生成し、次にこれを次のラウンドスクリーニング用に精製した。同じスクリーニングを3~4回繰り返した。これにより、陽性クローンが濃縮され、ファージディスプレイ技術によって抗体ライブラリーからCTLA4特異的抗体を選択する目的を達成した。

10

【0125】

1.3 ファージ酵素結合免疫アッセイ (ELISA) による個々の陽性クローンの特異的選択

3ラウンドのパニング後に得られたCTLA4結合陽性ファージを用いて、空の大腸菌を感染させ、播種した。96個の単一コロニーを培養のためにランダムに選択し、ファージをそれぞれ産生させ、精製した。プレートを48で一晚、CTLA4 - Fc融合タンパク質でコーティングした；得られた試料ファージを添加し (対照としてブランクファージ)、室温で1時間、インキュベートした。一次抗体であるマウス抗HAタグ抗体 (Beijing Kangwei Shiji Biotech. Ltd.) を洗浄後に加え、反応のために室温で1時間、インキュベートした。二次抗体であるヤギ抗マウスアルカリホスファターゼ標識抗体 (Amyject Scientific Ltd.) を洗浄後に添加し、反応のために室温で1時間、インキュベートした。アルカリホスファターゼ発色溶液を洗浄後に添加し、吸収値を405 nmの波長で読み取った。試料ウェルのODが対照ウェルのODと比較して3倍である場合、試料は陽性として決定される。陽性ウェルの細菌は、プラスミド抽出及びその後の配列決定のために、100 µg / mlアンピシリンを補足したLB液体培地に移して培養された。

20

30

【0126】

各クローンのタンパク質配列は、配列アラインメントソフトウェアであるVector NTIに従って分析された。同じCDR1、CDR2、及びCDR3配列を有するクローンは同じ抗体であると考えられ、一方、異なるCDR配列を有するクローンは異なる抗体であると考えられ、これらの早期終了配列は除外された。最終的には、計34種の異なる抗体が得られた。

【0127】

実施例2 CTLA4に対する重鎖単一ドメイン抗体の予備評価

2.1 大腸菌における重鎖単一ドメイン抗体の発現及びそれらの精製

配列決定分析により得られた34個の重鎖単一ドメイン抗体のコード配列を発現ベクターPET32b (Novagen、製品番号: 69016-3) にサブクローニングし、正しい組換えプラスミドを発現宿主株BL1 (DE3) (Tiagen Biotech、CB105-02) に形質転換し、100 µg / mlアンピシリンを含有するLB固体培地上に37で一晚、播種した。単一コロニーを接種し、一晚培養し、翌日、移し、振とうして37で増殖させた。培養物が0.6-1のOD値に達したとき、0.5 mMのIPTGを添加し、28で一晚、振とうしながら誘導した。翌日、遠心分離により細菌を回収し、溶解して抗体の粗抽出物を得た。次に、ニッケルイオンアフィニティークロマトグラフィーを用いて、抗体タンパク質を精製し、純度が90%を超える抗体タンパク質を得た。

40

50

【0128】

2.2 ヒトCTLA4タンパク質への候補CTLA4重鎖単ドメイン抗体の特異的結合プレートにCTLA4-Fc融合タンパク質で一晩、4℃でコーティングし、実施例2.1で得られた10ngの重鎖単ドメイン抗体を各ウェルに添加し(対照はCTLA4-Fcタンパク質に結合しない単ドメイン抗体である)、室温で1時間反応させた。洗浄後、一次抗体である抗Hisタグ抗体(Beijing Kangwei Century Biotechnology Co., Ltd.から購入した)を添加し、1時間、室温で反応させた。洗浄後、二次ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体(Yiqiao Shenzhen、カタログ:SSA007200)を添加し、1時間、室温で反応させた。洗浄後、発色剤を添加し、吸光度を405nmで読み取った。

10

【0129】

プレートにFcタンパク質で一晩、4℃でコーティングし、実施例2.1で得られた10ng重鎖単ドメイン抗体を各ウェルに添加し(対照は他の無関係の標的に対する単ドメイン抗体である)、室温で1時間反応させた。洗浄後、ウサギ抗ヒトFc抗体(Shanghai Pu Xin Biotechnology Co., Ltd.から購入した)を添加し、1時間、室温で反応させた。洗浄後、ヤギ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体(Shanghai Pu Xin Biotechnology Co., Ltd.から購入した)を添加し、室温で1時間反応させた。洗浄後、発色剤を添加し、吸光度を405nmで読み取った。

20

【0130】

CTLA4-Fcタンパク質についてのOD値をブランク対照についてのOD値で割った比が4を超えるか又は4に等しい場合、候補抗体はCTLA4-Fcタンパク質に結合するものと考えられる;同時に、CTLA4-Fc抗原タンパク質に結合することができる上記抗体は、CTLA4-Fcへの結合についてのOD値をFcタンパク質への結合についてOD値で割った比が ≥ 5 である場合、Fc部分よりむしろCTLA4部分に特異的に結合するものと考えられる。

【0131】

結果は、34個の抗体のうち25個(太字中の太字)がFcに結合することなくCTLA4に特異的に結合できることを示した。結果を以下の表1に示す。

【0132】

30

40

50

【表 1】

表 1

抗体番号	OD(CTLA4 に対する)	OD(Fc に対する)	ODa / ODb	ODa/OD ブランク	配列番号
<i>C1</i>	<i>1.201</i>	<i>0.053</i>	<i>42.9</i>	<i>22.7</i>	<i>84</i>
<i>C2</i>	<i>1.231</i>	<i>0.035</i>	<i>44.0</i>	<i>35.2</i>	<i>85</i>
<i>C16</i>	<i>1.786</i>	<i>0.053</i>	<i>63.8</i>	<i>33.7</i>	<i>86</i>
<i>C22</i>	<i>0.848</i>	<i>0.06</i>	<i>30.3</i>	<i>14.1</i>	<i>87</i>
C23	0.951	1.057	34.0	0.9	
C24	0.231	0.114	8.3	2.0	
C25	0.091	0.03	3.3	3.0	
<i>C27</i>	<i>1.31</i>	<i>0.049</i>	<i>46.8</i>	<i>26.7</i>	<i>88</i>
<i>C29</i>	<i>1.513</i>	<i>0.085</i>	<i>54.0</i>	<i>17.8</i>	<i>89</i>
C34	1.022	0.945	36.5	1.1	
<i>C38</i>	<i>1.022</i>	<i>0.045</i>	<i>36.5</i>	<i>22.7</i>	<i>90</i>
C46	0.621	0.241	22.2	2.6	
<i>J5</i>	<i>1.21</i>	<i>0.036</i>	<i>43.2</i>	<i>33.6</i>	<i>91</i>
<i>J17</i>	<i>1.4</i>	<i>0.046</i>	<i>50.0</i>	<i>30.4</i>	<i>92</i>
J24	0.032	0.041	1.1	0.8	
<i>J29</i>	<i>1.439</i>	<i>0.036</i>	<i>51.4</i>	<i>40.0</i>	<i>93</i>
J34	0.932	1.023	33.3	0.9	
<i>J35</i>	<i>0.823</i>	<i>0.036</i>	<i>29.4</i>	<i>22.9</i>	<i>94</i>
<i>J37</i>	<i>1.201</i>	<i>0.034</i>	<i>42.9</i>	<i>35.3</i>	<i>95</i>
<i>J38</i>	<i>1.031</i>	<i>0.752</i>	<i>36.8</i>	<i>1.4</i>	<i>96</i>
<i>J39</i>	<i>1.747</i>	<i>0.042</i>	<i>62.4</i>	<i>41.6</i>	<i>97</i>
J41	0.055	0.064	2.0	0.9	
<i>J42</i>	<i>1.086</i>	<i>0.045</i>	<i>38.8</i>	<i>24.1</i>	<i>98</i>
J47	0.062	0.041	2.2	1.5	
<i>J69</i>	<i>0.635</i>	<i>0.037</i>	<i>22.7</i>	<i>17.2</i>	<i>99</i>
<i>J78</i>	<i>0.632</i>	<i>0.121</i>	<i>22.6</i>	<i>5.2</i>	<i>100</i>
<i>116</i>	<i>0.234</i>	<i>0.046</i>	<i>8.4</i>	<i>5.1</i>	<i>76</i>
<i>119</i>	<i>0.537</i>	<i>0.037</i>	<i>19.2</i>	<i>14.5</i>	<i>77</i>
<i>128</i>	<i>1.268</i>	<i>0.036</i>	<i>45.3</i>	<i>35.2</i>	<i>78</i>
<i>138</i>	<i>1.843</i>	<i>0.041</i>	<i>65.8</i>	<i>45.0</i>	<i>79</i>
<i>145</i>	<i>1.487</i>	<i>0.065</i>	<i>53.1</i>	<i>22.9</i>	<i>80</i>
<i>155</i>	<i>1.724</i>	<i>0.051</i>	<i>61.6</i>	<i>33.8</i>	<i>81</i>
<i>165</i>	<i>1.214</i>	<i>0.051</i>	<i>43.4</i>	<i>23.8</i>	<i>82</i>
<i>188</i>	<i>0.945</i>	<i>1.021</i>	<i>33.8</i>	<i>0.9</i>	<i>83</i>
Blank	0.028	0.035	0.8	0.8	

【 0 1 3 3 】

2.3 競合 ELISA による CD80 と CTLA4 の相互作用に対する CTLA4 重鎖単一ドメイン抗体のブロッキング効果の検討

CTLA4 - Fc タンパク質及び CD80 - Fc タンパク質 (配列番号 130) は、HEK293 細胞 (pCDNA4、Invitrogen、カタログ V86220) における発現によって得られた。ビオチン化タンパク質である CD80 - Fc - ビオチンは、Thermo Biotinlytation キットを用いて得られた。

【 0 1 3 4 】

プレートを 0.5 µg / ウェルで CTLA4 - Fc 融合タンパク質を用いて一晩、4

10

20

30

40

50

でコーティングし、続いて、実施例 2 . 2 で確認された C T L A 4 に特異的に結合する 5 0 0 n g の重鎖単一ドメイン抗体（対照は他の無関係の標的に対する単一ドメイン抗体又は単なる緩衝液である）、及び 2 5 n g の C D 8 0 - F c - ビオチン（抗体又はタンパク質をブランク群に添加せず、等容量の緩衝液だけを添加した）を各ウェルに添加し、1 時間、室温で反応させた。S A - H R P（S i g m a から購入した）を添加し、1 時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を 4 0 5 n m の波長で読み取った。対照 O D 値に対する試料 O D 値が 0 . 8 未満である場合、抗体はブロッキング効果を有すると考えられる。

【 0 1 3 5 】

表 2 に示されるように、抗体番号 C 1、C 1 6、C 2 7、J 3 7、J 4 2、1 2 8、1 4 5、1 5 5、1 6 5 は、C D 8 0 / C T L A 4 相互作用に対するブロッキング効果を示した。

【 0 1 3 6 】

【表 2】

表 2

試料	OD	試料	OD
対照 1	2.453	J38	2.357
対照 2	2.391	J39	2.133
ブランク	0.016	J42	0.94
C1	0.054	J5	2.504
C16	1.893	J69	2.343
C2	2.517	J78	2.413
C22	2.474	116	2.579
C27	0.04	119	2.534
C29	2.431	128	0.893
C38	2.284	138	1.918
J17	2.528	145	0.597
J29	2.502	155	0.746
J35	2.57	165	1.838
J37	1.061	188	2.633

【 0 1 3 7 】

2 . 4 マウス C T L A 4 タンパク質に対する C T L A 4 重鎖単一ドメイン抗体の結合

マウス C T L A 4 - F c タンパク質（配列番号 1 3 1）は、H E K 2 9 3 細胞（p C D N A 4、I n v i t r o g e n、カタログ V 8 6 2 2 0）における発現によって得られた。ビオチン化タンパク質である m C T L A 4 - F c - ビオチンは、T h e r m o B i o t i n l y t i o n キットを使用して得られた。

【 0 1 3 8 】

プレートは、0 . 5 μ g / ウェルで、実施例 2 . 1 で得られた重鎖単一ドメイン抗体（対照群は、他の無関係の標的に対する単一ドメイン抗体である）、すなわち、実施例 2 . 3 の結果に従って選択されたより良好なブロッキング効果を有する 4 つの抗体 1 4 5、1 5 5、C 1 及び C 2 7 を用いて一晩、4 でコーティングされ、1 0 0 μ g のマウス C T L A 4 - F c 融合タンパク質を各ウェルに添加し、1 . 5 時間、室温で反応させた。その後、S A - H R P（S i g m a より購入した）を添加し、混合物を室温で 1 . 5 時間反応させた。洗浄後、発色剤を添加し、吸光度を 4 0 5 n m で読み取った。結果を表 3 に示す。

【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

抗体番号	OD(マウス CTLA4 に対する)
145	0.026
155	0.032
C1	0.042
C27	0.021
対照	0.026
ブランク	0.027

10

【0140】

本発明のヒト CTLA4 の重鎖単一ドメイン抗体は、マウス CTLA4 - Fc タンパク質に結合しないことが見てとることができる。

【0141】

2.5 CTLA4 - Fc 抗原タンパク質に対する CTLA4 重鎖単一ドメイン抗体の結合曲線

プレートは、0.5 µg / ウェルで、得られた CTLA4 重鎖単一ドメイン抗体を用いて一晩、4 でコーティングされ、続いて、勾配希釈系列の CTLA4 - Fc 融合タンパク質を添加し、1時間、室温で反応させた。洗浄後、ヤギ抗ヒト IgG - Fc 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体 (Lakepharma) を添加し、1時間、室温で反応させた。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ c 発色溶液を添加し、吸光度を波長 405 nm で読み取った。SoftMax Pro v5.4 をデータ処理及びマッピング分析に用いて、CTLA4 に対する抗体の結合曲線を得て、及び 4 パラメーター適合により EC50 値 (抗体番号 14 については約 50 ng / ml ; 抗体番号 155 については約 13 ng / ml ; 抗体番号 C1 については約 123 ng / ml、抗体番号 C27 については約 93 ng / ml) を得た。145 及び 155 の結果を図 1A に示し、C1 及び C27 の結果を図 1B に示す。

20

【0142】

2.6 CD80 と CTLA4 の相互作用に対する CTLA4 重鎖単一ドメイン抗体のプロッキング曲線

プレートは、0.5 µg / ウェルの CTLA4 - Fc 融合タンパク質を用いて、一晩、4 でコーティングされ、続いて、実施例 2.1 で得られた、ウェルあたり 100 µL の勾配希釈系列 (250 ng / mL の CD80 - Fc - ビオチンを含む) の 100 µL の CTLA4 プロッキング単一ドメイン抗体 / ウェルを添加し、1時間、室温で反応させた。SA-HRP (Sigma から購入した) を添加し、1時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を 405 nm の波長で読み取った。

30

【0143】

SoftMax Pro v5.4 をデータ処理及びグラフ分析に用いて、4 パラメーター適合による CD80 / CTLA4 に対する抗体番号 C1、C27、145、155 のプロッキング曲線及び IC50 値を得た (抗体番号 C1 の IC50 は 852 ng / mL であり、抗体番号 C27 については約 731 ng / ml であり、抗体番号 145 については約 1.947 µg / ml であり、抗体番号 155 については約 4.690 µg / ml である)。145 及び 155 の結果を図 2A に示し、C1 及び C27 の結果を図 2B に示す。

40

【0144】

2.7 CTLA4 単一ドメイン抗体の Fc 融合タンパク質の調製

ヒト IgG1 - Fc 領域 (配列番号 132) のアミノ酸配列は、タンパク質データベース Uniprot (P01857) からのヒト免疫グロブリンガンマ 1 (IgG1) の定常領域アミノ酸配列に基づいて得られた。ヒト IgG1 - Fc をコードする核酸断片は、ヒト PBMC 総 RNA から逆転写 PCR により得られ、上記実施例で得られた CTLA4 単一ドメイン抗体と Fc の融合タンパク質をコードする核酸断片は、オーバーラップ PC

50

Rにより得られ、次に、ベクターpCDNA4 (Invitrogen、カタログV86220)にサブクローニングされた。

【0145】

組換え単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質プラスミドは、抗体発現のためにHEK293細胞にトランスフェクトされた。組換え発現プラスミドをFreestyle 293培地で希釈し、形質転換のためにPEI (ポリエチレンジアミン) 溶液に添加した。各プラスミド/PEI混合物をHEK293細胞懸濁液に添加し、37℃及び10%CO₂で90rpmにてインキュベートした。同時に、50µg/LのIGF-1を添加した。4時間後、EX293培地、2mMグルタミン及び50µg/LのIGF-1を補足し、135rpmで培養した。24時間後、3.8mMのVPAを添加した。5~6日間培養した後、一過性の発現上清を回収し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、標的CTLA4単一ドメイン抗体-Fc融合タンパク質を得た。

10

【0146】

抗体番号C1、C27、145、155のFc融合タンパク質の配列をそれぞれ配列番号114~117に示す。

【0147】

2.8 CD80とCTLA4の相互作用に対するCTLA4重鎖単一ドメイン抗体Fc融合タンパク質のブロッキング曲線

プレートは、0.5µg/ウェルのCTLA4-Fc融合タンパク質を用いて、一晚、4℃でコーティングされ、続いて、実施例2.7で得られた、ウェルあたり100µLの勾配希釈系列(250ng/mLのCD80-Fc-ビオチンを含む)のCTLA4ブロッキング単一ドメイン抗体を添加し、1.5時間、室温で反応させた。SA-HRP (Sigmaから購入した)を添加し、1.5時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を405nmの波長で読み取った。

20

【0148】

SoftMax Pro v5.4をデータ処理及びグラフ分析に用いて、4パラメーター適合によるCD80/CTLA4に対する抗体番号145、155のブロッキング曲線及びIC50値を得た(抗体番号145のIC50は約339ng/mLであり、抗体番号155については約261ng/mLである)。結果を図3に示す。

【0149】

実施例3 CTLA4単一ドメイン抗体のヒト化

ヒト化は、タンパク質表面アミノ酸ヒト化方法(再表面化)及びVHHヒト化のための普遍的なフレームワークグラフト法(普遍的なフレームワークへのCDRグラフト化)によって実施される。

【0150】

ヒト化のステップは以下の通りである: 抗体番号C27及びC1の相同モデリングは、モデリングソフトウェアModeler 9を用いて行われた。参照相同配列は、cAb-Lys3抗体(PDBコード: 1XFV)であり、アミノ酸の相対的溶媒接近可能性は、タンパク質の三次元構造に従って計算される。抗体番号C27及びC1のアミノ酸の1つが溶媒に曝露された場合、全ての置換が完了するまで、参照ヒト抗体DP-47配列の同じ位置でのアミノ酸と置換された。

40

【0151】

抗体番号C27をヒト化し、抗体番号C27の5種のヒト化変異体を得た; 抗体番号C1をヒト化し、抗体番号C1の4種のヒト化変異体を得た。表4は、これらのヒト化変異体の配列番号及びその中のアミノ酸変化を、カバット番号付け後のアミノ酸残基番号とともに列挙する。図4aはC27ヒト化配列のアラインメントを示し、図4bはC1ヒト化配列のアラインメントを示す。

【0152】

50

【表 4】

表 4

	配列 番号	Q5V	S11L	A14P	G19R	E44G	R45L	V46E	Q71R	I73N	A74S	K83R	P84A	M89V	S91Y
C27V1	101	✓	✓	✓							✓	✓	✓	✓	✓
C27V2	102	✓	✓	✓					✓		✓	✓	✓	✓	✓
C27V3	103	✓	✓	✓		✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓
C27V4	104	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
C27V5	105	✓	✓	✓				✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
C1V1	106	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
C1V2	107	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C1V3	108	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C1V4	109	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

10

【 0 1 5 3 】

実施例 4 哺乳動物細胞を用いた C T L A 4 ブロッキング抗体タンパク質の調製

4 . 1 C T L A 4 単ドメイン抗体の F c 融合タンパク質の調製

ヒト I g G 1 - F c 領域のアミノ酸配列（配列番号 1 3 2）は、タンパク質データベース Uniprot（P 0 1 8 5 7）からのヒト免疫グロブリンガンマ 1（I g G 1）の定常領域アミノ酸配列に基づいて得られた。ヒト I g G 1 - F c をコードする核酸断片は、ヒト P B M C 総 R N A から逆転写 P C R により得られ、上記実施例で得られた C T L A 4 単ドメイン抗体と F c の融合タンパク質をコードする核酸断片は、オーバーラップ P C R により得られ、次に、ベクター p C D N A 4（Invitrogen、カタログ V 8 6 2 2 0）にサブクローニングされた。

20

【 0 1 5 4 】

組換え単ドメイン抗体 - F c 融合タンパク質プラスミドは、抗体発現のために H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトされた。組換え発現プラスミドを Freestyle 2 9 3 培地で希釈し、形質転換のために P E I（ポリエチレンジアミン）溶液に添加した。各プラスミド / P E I 混合物を H E K 2 9 3 細胞懸濁液に添加し、37 °C 及び 10% C O 2 で 9 0 r p m にてインキュベートした。同時に、5 0 μ g / L の I G F - 1 を添加した。4 時間後、E X 2 9 3 培地、2 m M グルタミン及び 5 0 μ g / L の I G F - 1 を補足し、1 3 5 r p m で培養した。2 4 時間後、3 . 8 m M の V P A を添加した。5 ~ 6 日間培養した後、一過性の発現上清を回収し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより精製して、標的 C T L A 4 単ドメイン抗体 - F c 融合タンパク質を得た。

30

【 0 1 5 5 】

得られた C T L A 4 単ドメイン抗体 - F c 融合タンパク質の配列をそれぞれ配列番号 1 1 4 ~ 1 2 6 に示し、ここで、配列番号 1 1 8 ~ 1 2 6 はヒト化 C T L A 4 単ドメイン抗体の F c 融合タンパク質である。これらの融合タンパク質は、1 つの C T L A 4 結合ドメインを含み、それぞれが 2 つの C T L A 4 結合ドメインを含むホモダイマーを形成し、そのため、これらの融合タンパク質はまた、2 価の C T L A 4 単ドメイン抗体 - F c 融合タンパク質とも呼ばれる。

【 0 1 5 6 】

4 . 2 B M S からの C T L A 4 抗体の調製

B M S I n c . からの抗 C T L A 4 抗体であるイピリムマブの遺伝子は、米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 8 6 0 4 1 号の抗体 1 0 D 1 の方法によりクローニングされ、ベクター p C D N A 4 にクローニングされた。

40

【 0 1 5 7 】

組換えプラスミドは、実施例 4 . 1 と同じ方法により H E K 2 9 3 細胞に一過的にトランスフェクトされ、得られた B M S の抗 C T L A 4 抗体を 1 0 D 1 と改名した。

【 0 1 5 8 】

4 . 3 C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質及び公知の C T L A 4 抗体の発現の比較

50

同じ発現システム及び一過性トランスフェクション条件を用いると、本発明のCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の発現レベルは400mg/Lより高かったが、一方、抗体10D1の発現レベルは約150mg/Lであった。この結果は、本発明のCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質が構造においてより安定であり、公知のCTLA4抗体よりも高い発現レベルをもたらすことができることを示す。

【0159】

4.4 四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の調製

2つのタンデムCTLA4単ドメイン抗体と1つのFc領域の融合タンパク質をコードする核酸断片は、オーバーラップPCRにより得られ、次に、ベクターpCDNA4(Invitrogen、カタログV86220)にサブクローニングされた。構築された組換えプラスミドを用いて、4.1に記載されているのと同じ方法により、一過性発現のためにHEK293細胞をトランスフェクトした。2つのタンデムなCTLA4単ドメイン抗体と1つのFcの融合タンパク質が得られ、これは、4価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質とも呼ばれる、4つのCTLA4結合ドメインを含む二量体分子を形成することができた。

【0160】

四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の平均的な一過性発現レベルは、約400mg/Lであり、二価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質のそれに匹敵する。

【0161】

実施例5 CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の特徴付け

5.1 CTLA4に対するCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合能力(ELISAによる)

プレートは、実施例2.7及び4.1により得られた0.5µg/ウェルのCTLA4単ドメインFc融合タンパク質、及び例4.2により得られた10D1タンパク質で一晩、4でコーティングされ、続いて、勾配希釈系列のCTLA4-Fc-ビオチンを添加し、1時間、室温で反応させた。SA-HRP(Sigmaから購入した)を添加し、1.5時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を405nmの波長で読み取った。

【0162】

SoftMax Pro v5.4は、データ処理及びグラフ分析に用いられた。4パラメーター適合により、CTLA4に対する抗体の結合曲線及びEC50値(全ての試験抗体のEC50値は約60~70ng/mLである)が得られ、CTLA4に対する親和性を反映した。

【0163】

結果を図5に示す。この場合、縦軸はOD405であり、横軸はCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質(又は10D1タンパク質)の濃度(ng/mL)である;抗体番号C27のFc融合タンパク質の4種の異なるヒト化形態は、huC27v1-LdFc(配列番号118)、huC27v2-LdFc(配列番号119)、huC27v3-LdFc(配列番号120)、huC27v4-LdFc(配列番号121)として標識された。4つのタンパク質は、CTLA4に匹敵する親和性を有し、BMSの非ヒト化C27-LdFc及び公知のCTLA4抗体10D1に匹敵する。

【0164】

5.2 CTLA4に対するCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合能力(ELISAによる)

プレートは、実施例2.7及び4.1により得られた0.5µg/ウェルのCTLA4単ドメインFc融合タンパク質を用いて一晩、4でコーティングされ、続いて、勾配希釈系列のCTLA4-Fc-ビオチンを添加し、1時間、室温で反応させた。SA-HRP(Sigmaから購入した)を添加し、1.5時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を405nmの波長で読み取った。

10

20

30

40

50

【0165】

SoftMax Pro v5.4は、データ処理及びグラフ分析に使用された。4パラメーター適合により、CTLA4に対する抗体の結合曲線及びEC50値(全ての試験抗体のEC50値は約25~35ng/mLである)が得られ、CTLA4に対する親和性を反映した。

【0166】

結果を図6に示す。この場合、縦軸はOD405であり、横軸はCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の濃度(ng/mL)である;三角は、抗体番号C27のヒト化形態Fc融合タンパク質であるhuC27v3-LdFc(配列番号120)を表し、四角は、抗体番号C1のヒト化形態Fc融合タンパク質であるhuC1v4-Ld-Fc(配列番号126)を表し、円は、抗体番号C1のFc融合タンパク質であるC1-ld-Fcを表す。C1-ld-Fcは、長い反応時間のために他の2つよりもはるかに高い着色度を有し、したがって、良好なEC50を示す。しかしながら、CTLA4に対する3種のタンパク質の親和性において実際には差がない。

10

【0167】

5.2 CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質のCTLA4-CD80相互作用に対するブロッキング効果(競合ELISAによる)

プレートは、0.5µg/ウェルのCTLA4-Fc融合タンパク質で一晩、4でコーティングされ、続いて、ウェルあたり、実施例4.1によって得られたCTLA4単ドメインFc融合タンパク質又は実施例4.2によって得られた10D1タンパク質の勾配希釈系列(250ng/mLのCD80-Fc-ビオチンを含有する)を100uL添加し、1時間、室温で反応させた。SA-HRP(Sigmaから購入した)を添加し、1時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を405nmの波長で読み取った。

20

【0168】

SoftMax Pro v5.4は、データ処理及びグラフ分析に使用された。4パラメーター適合により、CTLA4-CD80に対する抗体のブロッキング曲線及びIC50値が得られた。結果を図7A及び図7Bに示す。2種の異なる単ドメイン抗体C27及びC1は、ヒト化配列又は元の配列であるかどうかにかかわらず、CTLA4-CD80相互作用をブロックする同等の能力を有し、BMSの既に市販されている抗体(10D1と標識されている)よりも優れていることが見てとれる。

30

【0169】

5.3 CTLA4に対する四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合能力(ELISAによる)

プレートは、実施例4.1により得られたCTLA4単ドメインFc融合タンパク質及び実施例4.4により得られた四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質を0.5µg/ウェルで一晩、4でコーティングされ、続いて、勾配希釈系列のCTLA4-Fc-ビオチンを添加し、1時間、室温で反応させた。SA-HRP(Sigmaから購入した)を添加し、1.5時間、室温で反応させた。発色溶液を添加した後、吸光度を405nmの波長で読み取った。

40

【0170】

SoftMax Pro v5.4は、データ処理及びグラフ分析に使用された。4パラメーター適合により、CTLA4に対する抗体の結合曲線及びEC50値(全ての試験抗体のEC50値は約25~35ng/mLである)が得られ、CTLA4に対する親和性を反映した。

【0171】

結果を図8に示す。この場合、縦軸はOD405であり、横軸はCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の濃度(ng/mL)である;三角は、四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質であるhuC1v4-tet-Fc(配列番号128)を表し;四角は、抗体番号C1のヒト化形態Fc融合タンパク質であるhuC1v4-Fc

40

を表し；円は、CTLA4単ドメイン抗体番号C1のFc融合タンパク質であるC1-Ld-Fcを表す。3つのタンパク質のEC50はわずかに異なるが、四価タンパク質の分子量が2価分子の約5/4であることを考慮すると、モル濃度に変換した場合の3つのタンパク質のCTLA4に対する親和性に差はない。

【0172】

5.4 CTLA4に対する二価及び四価のCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合能力の同定及び比較（SPR法）

組換えヒトCTLA4に対する、上記の実施例において得られたCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合反応速度論は、BIAcore X100装置を用いた表面プラズモン共鳴（SRP）法により測定された。組換えラクダ抗ヒトFc抗体をCM5バイオセンサーチップに結合させて、約1000反応単位（RU）を得た。反応速度論測定について、抗体をHBS-EP+1×緩衝液（GE、カタログ番号BR-1006-69）を用いて一定濃度（1.37~1000nm）に希釈し、25で120秒間注入して、CTLA4及びマウスFcの融合タンパク質について連続して3倍希釈し、25で120秒間注入して、解離時間を30分とし、10mMグリシン-HCl（pH2.0）で120秒間再生した。結合速度（kon）及び解離速度（koff）は、単純な1対1のLangmuir結合モデル（BIAcore評価ソフトウェアバージョン3.2）を用いて計算された。平衡解離定数（KD）は、koff/kon比として計算される。

10

【0173】

抗CTLA4抗体の測定された結合親和性を表5に示す。結果は、四価分子の親和性がおそらく特定の立体障害のために二価分子の親和性よりわずかに低いことを示す。

20

【0174】

【表5】

表5

抗体	Ka	Kd	KD
HuC1V4-tet-Fc	1.318E+5	2.510E-5	1.905E-10
HuC1V4-Ld-Fc	2.335E+5	2.035E-4	8.715E-11

【0175】

5.4 CTLA4/CD80相互作用に対する二価及び四価CTLA4単ドメインFc融合タンパク質のブロッキング能（細胞中和実験による）

96ウェルプレートは、抗ヒトCD3（50ng/mL）を補足した1.5×10⁵個のJurkat T細胞（中国科学アカデミーの上海細胞バンク）を接種され、37で15分間インキュベートした。次に、二価又は四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質（30ng/mL~0.94ng/mL、100ng/mLのCTLA4-Fc融合タンパク質を希釈液に添加した）及び等密度のRaji細胞（中国科学アカデミーの上海細胞バンク）を添加した。培養24時間後、IL-2発現の検出のために上清を回収した。データをSoftMaxで処理して、CTLA4-Fc融合タンパク質の中和を介した、二価又は四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質によるIL-2の阻害効果を計算した。EC50を用いて効果を比較した。

30

40

【0176】

結果を図9に示す。二価及び四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質（それぞれ正方形及び三角で表す）は、CTLA4-CD80の阻害において同等であり、既に市販されているBMSのCTLA4抗体よりも優れていた（10D1として標識され、円で示される）。

【0177】

5.5 CTLA4タンパク質に対するCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の結合特異性

ヒトHEK293細胞は、全長ヒトB7ファミリータンパク質遺伝子を有するプラスミ

50

ド (p C D N A 4、I n v i t r o g e n、カ タ ロ グ V 8 6 2 2 0) の一過性トランスフェクションにより、膜上にヒト C T L A 4、C D 2 8、P D 1 タンパク質を一過性に発現する。このプラスミドはまた、標的タンパク質の C 末端が E G F P タンパク質に融合されるのを可能にし、それにより、膜上に発現される B 7 ファミリータンパク質のレベルは緑色蛍光強度によって検査され得るようにする。構築された一過性にトランスフェクトされた細胞株には、2 9 3 - C T L A 4 - E G F P、2 9 3 - P D 1 - E G F P、2 9 3 - C D 2 8 - E G F P が含まれる。

【 0 1 7 8 】

構築された細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、h u C 1 v 4 - t e t - F c 抗体を添加した。同時に、他の無関係の標的に対する、2 μ g の単ドメイン抗体の陰性対照を設定し、氷上で 2 0 分間インキュベートした。洗浄後、e B i o s c i e n c e 二次抗体である抗 h I g - P E を氷上で 2 0 分間添加した。洗浄後、細胞を 5 0 0 μ l の 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーにより検出した。

10

【 0 1 7 9 】

結果を図 1 0 に示す。上段は対照群を示し、下段は試料群を示す。h u C 1 v 4 - t e t - F c はヒト C T L A 4 タンパク質のみに特異的に結合し、他の B 7 ファミリータンパク質には結合しないことは明らかである。

【 0 1 8 0 】

5 . 6 サル C T L A 4 タンパク質への四価 C T L A 4 単ドメイン F c 融合タンパク質の結合

20

サル C T L A 4 - F c タンパク質を Y i q i a o S h e n z h o u から購入した。ビオチン化タンパク質である h u C 1 v 4 - t e t - F c - ビオチンは、実施例 4 . 4 において得られた四価 C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質を用いて、T h e r m o B i o t i n l y t i o n キットの使用により得られた。

【 0 1 8 1 】

プレートは、0 . 5 μ g / ウェルのサル C T L A 4 - F c タンパク質又はヒト C T L A 4 - F c タンパク質で一晩、4 でコーティングされ、続いて、勾配希釈系列の h u C 1 v 4 - t e t - F c - ビオチンを添加し、1 時間、室温で反応させた。次に、S A - H R P (S i g m a から購入した) を添加し、室温で 1 . 5 時間反応させた。次に、発色剤を添加し、吸光度を 4 0 5 n m で読み取った。

30

【 0 1 8 2 】

S o t f M a x P r o v 5 . 4 は、データ処理とグラフ分析に使用された。4 パラメーター適合により、サル C T L A 4 又はヒト C T L A 4 に対する抗体のプロッキング曲線及び E C 5 0 値が得られた。

【 0 1 8 3 】

結果を図 1 1 に示す。縦軸は O D 4 0 5 であり、横軸は四価 C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質の濃度 (n g / m L) である ; 三角は、サル C T L A 4 との結合を表し、四角及び円は、ヒト C T L A 4 との結合を表す。四価の C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質は、サル C T L A 4 タンパク質に効率的に結合することができることが見てとれる。

40

【 0 1 8 4 】

5 . 7 C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質による P B M C の活性化

末梢血単核細胞 (P B M C) は、健常ドナーの末梢血から、ヒトリンパ球 (T i a n j i n H a o Y a n g) 用の単離溶液を用いた密度勾配遠心分離によって単離された。

【 0 1 8 5 】

プレートは、0 . 3 μ g / ウェルの抗 C D 3 抗体で一晩、4 でコーティングされた。翌日、 1×10^5 個の P B M C を各ウェルに添加し、同時に 1 0 μ g / m L の C T L A 4 単ドメイン抗体 F c 融合タンパク質である h u C 1 v 4 - F c、h u C 2 7 - F c 又は B M S C T L A 4 抗体 (1 0 D 1 と命名される) をそれぞれ、各ウェルに添加した。5 日間培養した後、上清を採取し、上清中の I F N - γ レベルを I F N - γ E L I S A キッ

50

ト (e b i o s c i e n c e) により検出した。

【 0 1 8 6 】

結果を図 1 2 に示す。1 0 μ g / m L の濃度で、抗 C D 3 抗体と組み合わせた C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質は、P B M C 細胞による - インターフェロンの分泌を増強することができ、すなわち、C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質は、P B M C 細胞の活性化を増強することが見てとれる。さらに、h u C 1 v 4 - L d - F c と h u C 2 7 v 3 - L d - F c の両方は、B M S 抗 C T L A 4 抗体よりも良好な活性を示した。

【 0 1 8 7 】

5 . 8 二価及び四価 C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質による P B M C の活性化

10

末梢血単核細胞 (P B M C) は、健常ドナーの末梢血から、ヒトリンパ球 (T i a n j i n H a o Y a n g) 用の単離溶液を用いた密度勾配遠心分離によって単離された。

【 0 1 8 8 】

プレートは、0 . 3 μ g / ウェルの抗 C D 3 抗体で一晩、4 でコーティングされた。翌日、1 × 1 0 ⁵ 個の P B M C を各ウェルに添加し、同時に 0 . 0 3 μ g / m L の二価又は四価 C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質である h u C 1 v 4 - L D - F c (図中、L d として標識される)、h u C 1 v 4 - t e t - F c (図中、t e t として標識される) 又は B M S C T L A 4 抗体 (1 0 D 1 と命名される) をそれぞれ、各ウェルに添加した。5 日間培養した後、上清を採取し、上清中の I F N - レベルを I F N - E L I S A キット (e b i o s c i e n c e) により検出した。

20

【 0 1 8 9 】

結果を図 1 3 に示す。0 . 0 3 μ g / m L の低用量濃度で、抗 C D 3 抗体と組み合わせた C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質 (二価又は四価の両方) は、P B M C 細胞による - インターフェロンの分泌を増強することができ、すなわち、二価又は四価 C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質は、0 . 0 3 μ g / m L の低用量濃度で、P B M C 細胞の活性化を有意に増強することが見てとれる。さらに、4 価 C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質である h u C 1 v 4 - t e t - F c は、B M S 抗 C T L A 4 抗体よりも良好な活性を示した。

【 0 1 9 0 】

30

5 . 9 樹状細胞 - T 細胞混合リンパ球反応における C T L A 4 単一ドメイン抗体 F c 融合タンパク質による C D 4 + T 細胞の活性化

末梢血単核細胞 (P B M C) は、健常ドナー由来の末梢血の白血球から、ヒトリンパ球 (T i a n j i n H a o Y a n g) 用の単離溶液を用いた密度勾配遠心分離によって単離された。次に、それらは無血清 R P M I 1 6 4 0 培地とともに 1 ~ 2 時間インキュベートして、非付着性細胞を除去し、細胞を 1 0 % F B S、1 0 n g / m l の G M - C S F 及び 2 0 n g / m L の I L - 4 を含有する R P M I 中で培養した。5 ~ 6 日間培養した後、1 0 n g / m l の T N F - を添加し、2 4 時間インキュベートして、成熟樹状細胞を得た。

【 0 1 9 1 】

40

この方法で得られた樹状細胞を 2 × 1 0 ⁵ / m l の R P M I 完全培地に再懸濁した。次に、ウェルあたり 5 0 μ l を 9 6 ウェルの U 底プレート (C o s t a r : 3 7 9 9) に添加し、インキュベーター中で培養した。

【 0 1 9 2 】

C D 4 + T 細胞は、磁気ビーズ単離キット (M i l t e n y i B i o t e c : 1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 3) を用いて、製造業者の指示書に従って、別のドナーの P B M C から単離された。

【 0 1 9 3 】

上記の方法で得られた 1 × 1 0 ⁴ 個の樹状細胞及び 1 × 1 0 ⁵ 個の C D 4 + T 細胞を混合し、R P M I 完全培地に再懸濁し、9 6 ウェル培養プレートに添加し、5 0 μ l の細胞

50

混合物を各ウェルに添加した。RPMI完全培地に希釈された、ウェルあたり100 μ lのhuC1v4-Ld-Fcを0.1 μ g/ml又は0.01 μ g/mlの最終抗体濃度に添加した。上清を培養5~7日後に回収し、上清中のIFN- γ レベルをIFN- γ ELISAキット(ebioscience)により検出した。

【0194】

結果を図14に示す。CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、混合リンパ球反応においてCD4+T細胞のIFN- γ 分泌を増強することができるが見てとれる。すなわち、CTLA4ブロッキング単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、T細胞活性化を増強する。さらに、この生物学的活性は濃度依存性であり、T細胞の有意な活性化が低用量濃度(0.01 μ g/ml)で観察された。

10

【0195】

5.10 ヒト化マウスにおける四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の抗腫瘍効果

CTLA4ヒト化マウス(すなわち、ヒトCTLA4タンパク質を発現するマウス)に 5×10^5 個のMC38腫瘍細胞を接種した。

【0196】

接種後の7、10、13、及び16日目に、100 μ gの試験試料又は同量のヒト免疫グロブリン(対照群として)を腹腔内投与した。腫瘍サイズは、接種後5日目から20日目まで、2日ごとに測定された。検査した試料は、4価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質(図中のTet)、及びBMSによって市販されているCTLA4モノクローナル抗体であるイピリムマブを含んだ。

20

【0197】

以下の図に示される結果から、CTLA4ヒト化マウスにおける4価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の抗腫瘍効果は、約5mg/kgの用量でBMSイピリムマブの効果に匹敵した。

【0198】

実施例6:ラットにおけるCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の薬物動態

CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質をSDラットに単回静脈内(IV)投与し、血液試料を様々な時点で回収し、Eliasaアッセイを用いて、試験物質の投与後、ラットの血漿中の試験物質の濃度を決定した。薬物動態パラメーターを計算した。

30

【0199】

動物の選択:6~8週齢及び体重200~300gのSDラットを選択した。それらをランダムに2群に分け、各群は8匹であり、半分が雄であり、半分が雌であった。

【0200】

投与:10mg/kgの用量で単回静脈内(IV)投与。

【0201】

採血:投与前、投与直後、投与後の様々な時点で、約0.5mlの血液は、各ラットの頸静脈から毎回を回収された。回収された血液を迅速に遠心分離して血清を分離し、分析するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0202】

血液薬物濃度の検出:血清中のCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の含量をサンドイッチELISAによって検出した。プレートは、CTLA4特異的抗体を捕捉するために、組換えヒトCTLA4タンパク質でコーティングされ、Fc領域は、完全なCTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の検出を確認するために、ヤギ抗ヒトIgG(Fc特異的)-HRP抗体(Sigma)で検出された。

40

【0203】

データ処理:関連する薬物動態パラメーターは、AUC(0-t)、AUC(0- ∞)、Cmax、Tmax、T1/2、Vss、MRTなどを含む血中薬物濃度対時間の曲線を用いて計算された。

【0204】

50

ラットにおける二価及び四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の血中薬物濃度対時間の曲線を図16に示す(aは二価抗体HuC1v4-Ld-Fcであり、bは四価抗体HuC1v4-tet-Fcである)。薬物動態パラメーターを図17に示す。この結果は、二価又は四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の両方が、ラットにおいてより長いインビボ半減期(5日を超える)を有し、良好なインビボ安定性を指示することを示した。同時に、最も高い血中濃度を維持する場合、四価抗体は2倍となるインビボ半減期(11日を超える)を有していた。このように、インビボでの四価抗体の有効血中濃度の維持はより長いと結論付けら、臨床投与はより長い間隔を有し得ることが期待される。

【0205】

実施例7：CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質のドラッグビリティ(druggability)の評価

7.1 CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の物理化学的性質

ヒト293HEK細胞により発現され、アフィニティー精製された四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、実施例4.4に記載される方法によって得られた。次に、そのドラッグビリティは、SE-HPLC、還元条件下でのCE、CE、WCX、非還元条件下でのDSCによる予備的な物理的及び化学的性質分析によって評価された。具体的な値を以下の表に記載する。これらのデータから、四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、良好な物理的及び化学的性質を有し、工業的規模の生産に適していることが予め決定され得る。

【0206】

【表6】

表6

タンパク質名	発現レベル	SE-HPLC純度(%)	SE-HPLCポリマー含量(%)	DSC(単ドメイン抗体、Tm、°C)	CE還元%	CE非還元%	脱アミノ化%
HuC1v4-tet-Fc	~400mg/L	97.6	2.0	71.5	99.3	97.9	7

【0207】

7.2 CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の熱破壊試験

CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質をUF/DFによって濃縮し、PBS緩衝液に交換して20mg/mLの溶液を調製した。熱破壊試験は、40℃に上昇させて、30日間行われた。0日目、10日目、20日目、及び30日目の試料は、SE-HPLCによって純度について試験され、変化の傾向を以下の図に示す。40℃では、調製物を最適化することはなく、主ピークの純度はわずかに低下したが、凝集及び分解の明確な傾向は観察されなかったことが見てとれる。同時に、そのより高いTm値を考慮すると、タンパク質が良好な熱安定性を有することが決定され得る。

【0208】

実施例8：CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質の予備毒性の評価

4匹のカニクイザルをランダムに2群に分け、さらに各群を2つに分け、半分が雄であり、半分が雌であり、それぞれ低用量群及び高用量群(それぞれ7.5及び30mg/kg)とした。四価CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、後肢静脈ポータスを介して1回投与された。投与前(D-1)、投与後のD15及びD29に、体重、血球数、血液凝固能、血液生化学及び免疫原性の指標を検出した。

【0209】

試験中、4匹の動物は死亡及び瀕死を示さなかった。単回投薬7.5~30mpkのカニクイザルに関して、血液学的指標のリンパ、Eos、Baso、Monoの有意な増加

10

20

30

40

50

が観察された。他の動物群の臨床観察、体重、凝固能、血液生化学的指標は、毒性学的有意性を伴う変化を示さなかった。

【 0 2 1 0 】

したがって、7.5及び30mpkでのカニクイザルへの単回静脈内注射は、有意な毒性を示さず、NOAELは30mg/kg以上であった。BMSのイピリムマブについて報告された非臨床NOAELは約10mg/kgである。CTLA4単ドメイン抗体Fc融合タンパク質は、イピリムマブよりも毒性の副作用が低いものと判断することができる。

10

20

30

40

50

【図面】

【図1】

Figures

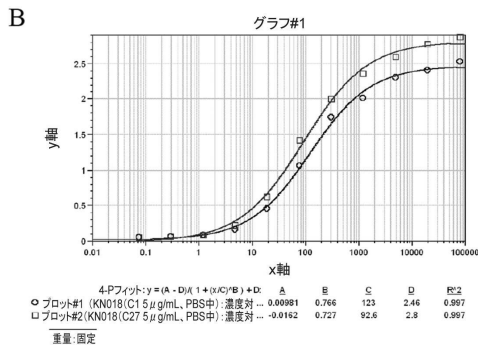
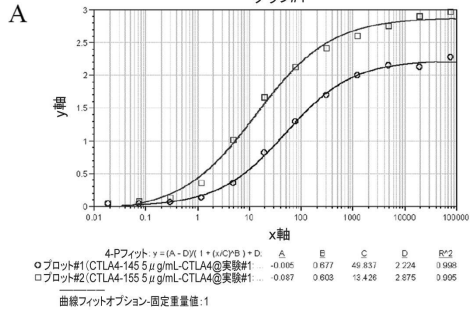


Figure 1

【図2】

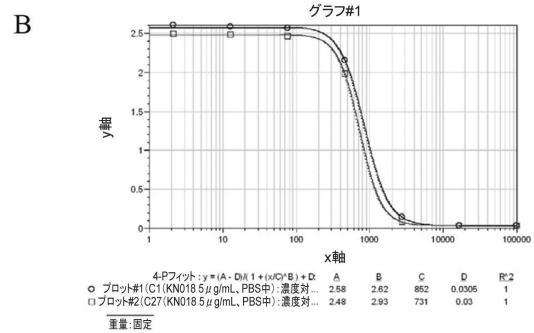
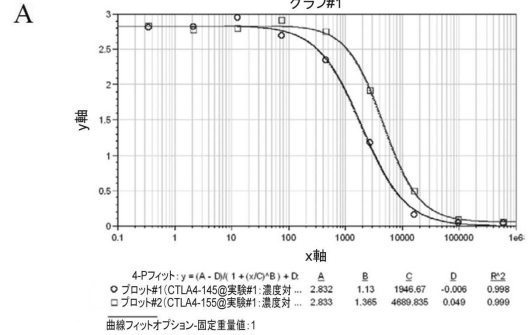


Figure 2

【図3】

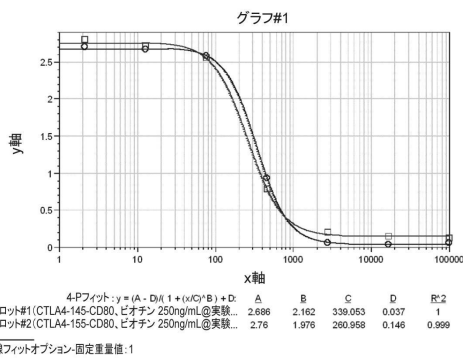


Figure 3

【図4】



Figure 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

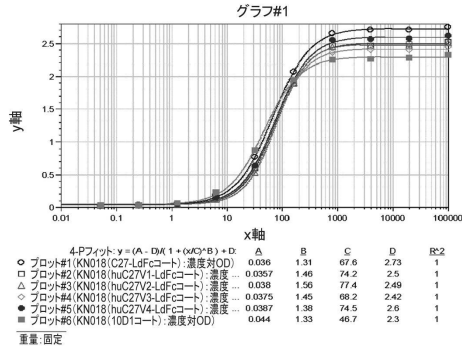


Figure 5

【 図 6 】

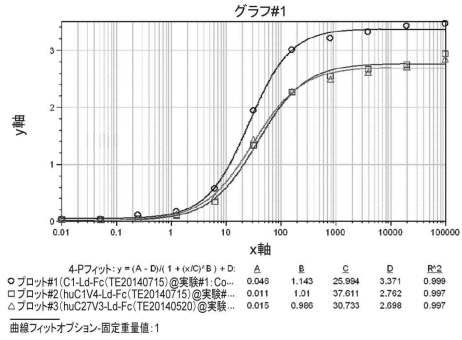


Figure 6

【 図 7 】

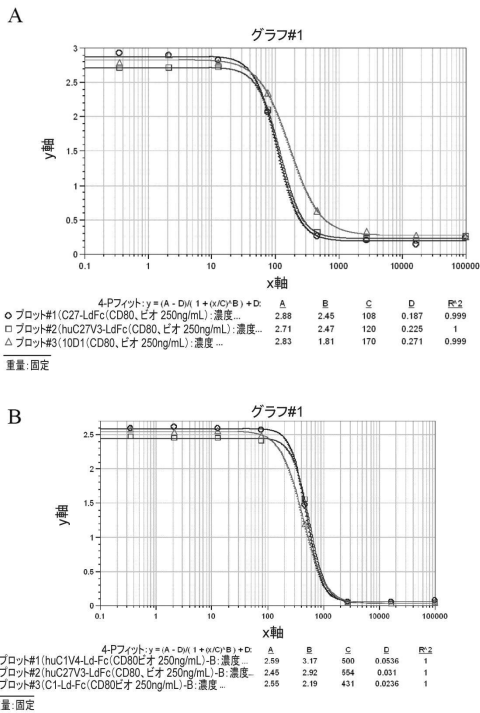


Figure 7

【 図 8 】

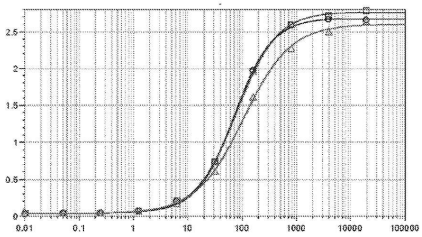


Figure 8

10

20

30

40

50

【 図 9 】

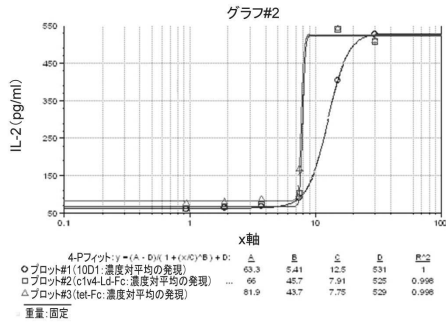


Figure 9

【 図 10 】

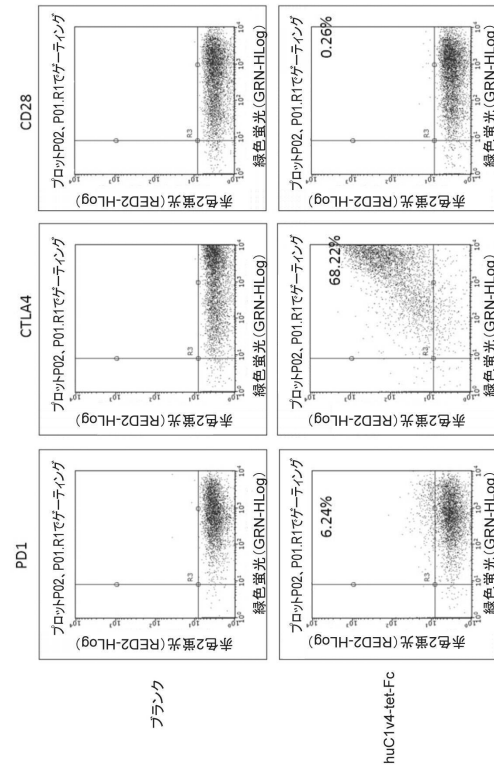


Figure 10

【 図 11 】

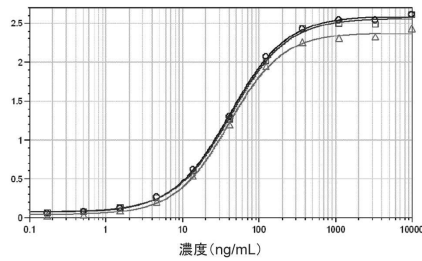


Figure 11

【 図 12 】

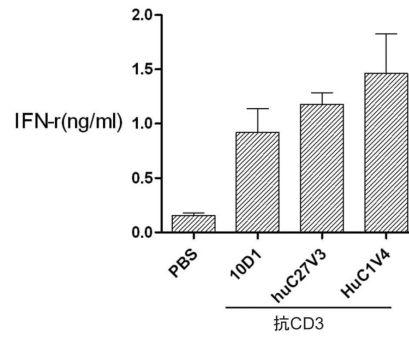


Figure 12

10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

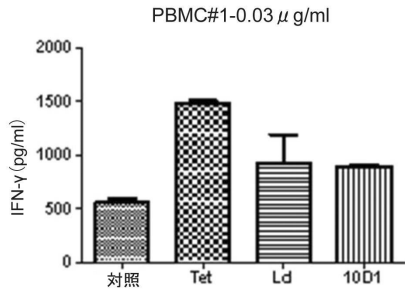


Figure 13

【 図 1 4 】

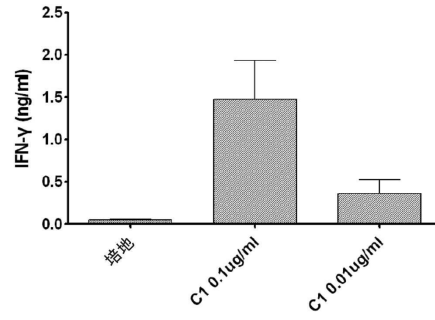


Figure 14

10

20

【 図 1 5 】

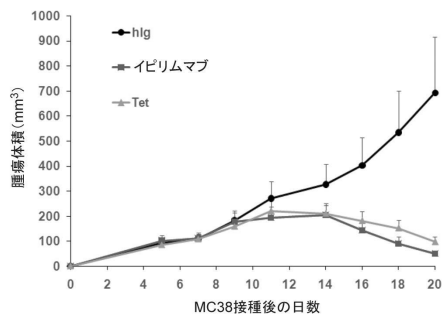


Figure 15

【 図 1 6 】

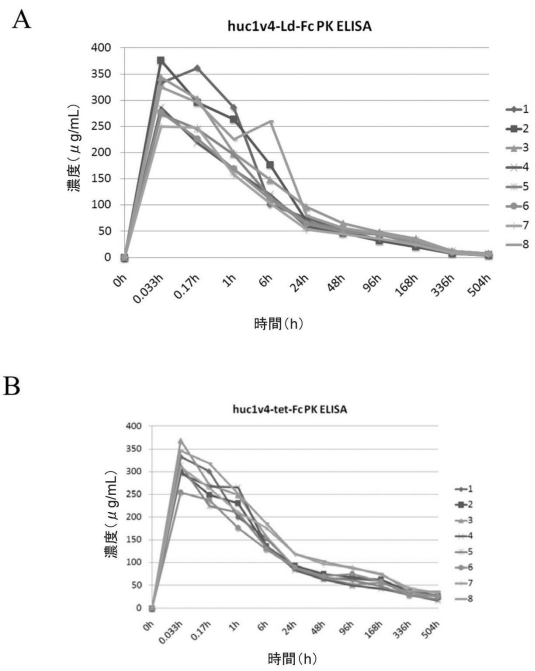


Figure 16

30

40

50

【 17 】

LD-Fc 動物	性別	tl/2 h	Cmax ug/mL	AUClast h·ug/mL	AUCINF_obs h·ug/mL	Vz_obs mL/kg	Cl_obs mL/h/kg	MRlast h
平均		140.79	312.02	13117.18	14946.82	136.22	0.66	128.27
SD		9.79	46.36	2204.47	2487.76	17.96	0.11	8.07
Tet-Fc 動物	性別	tl/2 h	Cmax ug/mL	AUClast h·ug/mL	AUCINF_obs h·ug/mL	Vz_obs mL/kg	Cl_obs mL/h/kg	MRlast h
平均		280.87	315.95	26617.98	37451.86	110.83	0.28	182.46
SD		37.63	34.88	4459.10	7183.06	19.37	0.06	6.40

Figure 17

【 18 】

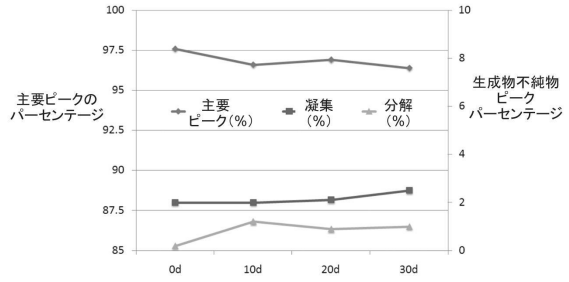


Figure 18

10

20

【 配列表 】

0007256348000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 38/02 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 31/18 (2006.01)
 A 6 1 P 31/16 (2006.01)
 A 6 1 P 31/22 (2006.01)
 A 6 1 P 33/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 38/02
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 31/16
 A 6 1 P 31/22
 A 6 1 P 33/02
 A 6 1 P 31/04

中華人民共和国， 2 0 0 0 3 2 ， シャンハイ， シュフイ ディストリクト， ドンアン ロード
 ナンバー 8 0 0 ， ビルディング 6 ルーム 1 7 0 1

(74)代理人

100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人

100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74)代理人

100123995

弁理士 野田 雅一

(72)発明者

シュー， ティン

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

ワング， シャオシャオ

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

リー， ジエ

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

ウー， ハイヤン

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

ガオ， リー

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

チュー， キアン

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

(72)発明者

バイ， ユー

中華人民共和国， 2 1 5 1 2 5 チアンスー， スチヨー ナンバー 2 1 8 ， シンファー ストリー
 ト， ピオベイ ビルディング シー 2 3

審査官 山本 晋也

(56)参考文献

特表 2 0 1 2 - 5 0 7 2 6 0 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 1 2 0 0 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 7 3 3 2 5 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 1 4 4 7 (W O , A 2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

CAPLUS / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / REGISTRY (ST
N)
PubMed
UniProt / GeneSeq