

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7423511号  
(P7423511)

(45)発行日 令和6年1月29日(2024.1.29)

(24)登録日 令和6年1月19日(2024.1.19)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/56 (2006.01)	C 0 7 K	14/56
C 0 7 K	14/565 (2006.01)	C 0 7 K	14/565
請求項の数 20 (全149頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-507585(P2020-507585)	(73)特許権者	519287378
(86)(22)出願日	平成30年8月8日(2018.8.8)		オリオンズ バイオサイエンス インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2020-530298(P2020-530298 A)		アメリカ合衆国 0 2 4 6 6 マサチューセッツ州 ニュートン グローブ ストリート 2 7 5
(43)公表日	令和2年10月22日(2020.10.22)	(73)特許権者	519287389
(86)国際出願番号	PCT/US2018/045743		オリオンズ バイオサイエンス ビービーベルギー王国 ビー・9 0 5 2 ズウェイナールデ レイフィセストラート 1 2 0
(87)国際公開番号	WO2019/032663	(74)代理人	100084995
(87)国際公開日	平成31年2月14日(2019.2.14)		弁理士 加藤 和詳
審査請求日	令和3年8月6日(2021.8.6)	(72)発明者	クレイ、ニコライ
(31)優先権主張番号	62/542,921		アメリカ合衆国 0 2 4 6 6 マサチューセッツ州 ニュートン グローブ ストリート 2 7 5
(32)優先日	平成29年8月9日(2017.8.9)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 P D - 1 および P D - L 1 結合物質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 8 6 の、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号 3 0 1、2 8 7、2 9 0、3 0 0、3 0 5、3 0 6、および 3 0 9 のうちの 1 つと少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、P D - L 1 結合物質であって、配列番号 8 6 の、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号 3 0 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記 P D - L 1 結合物質は、3 つの相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含む少なくとも 1 つの標的化部分をさらに含み、ここで、C D R 1 が、配列番号 1 9 9 または 1 8 1 のアミノ酸配列からなり；C D R 2 が、配列番号 2 5 9 または 2 6 0 のアミノ酸配列からなり；C D R 3 が、配列番号 2 6 8 のアミノ酸配列からなる、または

配列番号 8 6 の、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号 2 8 7 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記 P D - L 1 結合物質は、3 つの相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含む少なくとも 1 つの標的化部分をさらに含み、ここで、C D R 1 が、配列番号 1 9 6 または 1 7 8 のアミノ酸配列からなり；C D R 2 が、配列番号 2 4 1 または 2 4 2 のアミノ酸配列からなり；C D R 3 が、配列番号 2 6 8 のアミノ酸配列からなる、または

配列番号 8 6 の、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号 2 9 0 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記 P D - L 1 結合物質は、3 つの相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2、および C D R 3) を含む少な

くとも1つの標的化部分をさらに含み、ここで、CDR1が、配列番号199または181のアミノ酸配列からなり；CDR2が、配列番号245または246のアミノ酸配列からなり；CDR3が、配列番号268のアミノ酸配列からなる、または配列番号86の、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号300と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記PD-L1結合物質は、3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む少なくとも1つの標的化部分をさらに含み、ここで、CDR1が、配列番号199または181のアミノ酸配列からなり；CDR2が、配列番号245または246のアミノ酸配列からなり；CDR3が、配列番号268のアミノ酸配列からなる、または配列番号86の、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号305と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記PD-L1結合物質は、3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む少なくとも1つの標的化部分をさらに含み、ここで、CDR1が、配列番号206または189のアミノ酸配列からなり；CDR2が、配列番号263または264のアミノ酸配列からなり；CDR3が、配列番号277のアミノ酸配列からなる、または配列番号86の、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号306と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記PD-L1結合物質は、3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む少なくとも1つの標的化部分をさらに含み、ここで、CDR1が、配列番号201または183のアミノ酸配列からなり；CDR2が、配列番号249または250のアミノ酸配列からなり；CDR3が、配列番号272のアミノ酸配列からなる、または配列番号86の、AAAリンカー、HAタグ、および末端ヒスチジントグ配列を含まない配列番号309と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む前記PD-L1結合物質は、3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む少なくとも1つの標的化部分をさらに含み、ここで、CDR1が、配列番号199または181のアミノ酸配列からなり；CDR2が、配列番号245または246のアミノ酸配列からなり；CDR3が、配列番号268のアミノ酸配列からなる、前記PD-L1結合物質。

【請求項2】

前記少なくとも1つの標的化部分が、単ドメイン抗体である、請求項1に記載のPD-L1結合物質。

【請求項3】

前記少なくとも1つの標的化部分が、V<sub>H</sub>Hまたはヒト化V<sub>H</sub>Hを含む、請求項2に記載のPD-L1結合物質。

【請求項4】

インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの1つまたは複数から選択され、これらはいずれも改変されていてもよい、1種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質。

【請求項5】

1つまたは複数の追加の標的化部分を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質。

【請求項6】

前記1つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原または免疫細胞上の抗原を認識し、前記1つまたは複数の追加の標的化部分はそれぞれ腫瘍抗原または免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、請求項5に記載のPD-L1結合物質。

【請求項7】

前記免疫細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、およびNK細胞からなる群から選択される、請求項6に記載のPD-L1結合物質。

【請求項8】

細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、請求項1～7のいずれか1

10

20

30

40

50

項に記載の P D - L 1 結合物質。

【請求項 9】

P D - L 1 を認識して P D - L 1 に結合し、その活性を機能的に調節するかあるいはその活性を機能的に調節しない、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質をコードする組換え核酸。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 に記載の P D - L 1 結合物質、ならびに

インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択され、これらはいずれも改変されていてもよいシグナル伝達物質を含むキメラを含む、癌の治療または予防における使用のための医薬。

【請求項 13】

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌（kidney or renal cancer）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌、口内、および咽頭を含む）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびに B 細胞リンパ腫（低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度 / 濾胞性 NHL、中悪性度びまん性 NHL、高悪性度免疫芽細胞 NHL、高悪性度リンパ芽球性 NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性 NHL、巨大腫瘍病変 NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群に関連する異常血管増殖のうちの 1 つまたは複数から選択される、請求項 12 に記載の医薬。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質を含む、癌、感染症、免疫異常、または自己免疫疾患のうちの少なくとも 1 つの治療における使用のための医薬。

【請求項 15】

（a）請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質；および

（b）野生型 I F N 2 に比べて改善された安全性を付与する 1 つまたは複数の変異を有する改変ヒト I F N 2

を含むキメラタンパク質であって、

少なくとも 1 つの標的化部分および改変シグナル伝達物質が、1 つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、

キメラタンパク質。

【請求項 16】

前記改変ヒト I F N 2 が、位置 R 1 2 0、M 1 4 8、R 1 4 9、および L 1 5 3 に 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 15 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 17】

前記改変ヒト I F N 2 が、R 1 2 0 E、R 1 4 9 A、および L 1 5 3 A からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 16 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

( a ) 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質 ; および

( b ) 野生型 I F N に比べて改善された安全性を付与する 1 つまたは複数の変異を有する改変ヒト I F N

を含むキメラタンパク質であって、

少なくとも 1 つの標的化部分および改変シグナル伝達物質が、 1 つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、

キメラタンパク質。

【請求項 19】

前記改変ヒト I F N が、位置 W 2 2、R 2 7、L 3 2、R 3 5、V 1 4 8、L 1 5 1、R 1 5 2、および Y 1 5 5 に 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 1 8 に記載のキメラタンパク質。

10

【請求項 20】

前記改変ヒト I F N が、W 2 2 G、R 2 7 G、L 3 2 A、L 3 2 G、R 3 5 A、R 3 5 G、V 1 4 8 G、L 1 5 1 G、R 1 5 2 A、および R 1 5 2 G からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 1 9 に記載のキメラタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年8月9日出願の米国特許仮出願第62/542,921号の利益および優先権を主張する。この特許の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

発明の分野

本発明は、一部は、P D - 1 または P D - L 1 を結合する結合物質および治療薬および診断薬としてのそれらの使用に関する。

【0003】

電子申請したテキストファイルの説明

本明細書と共に電子申請された次記のテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列リストのコンピュータ可読形式コピー（ファイル名：O R N - 0 3 4 P C \_ \_ S T 2 5、作成日付：2018年8月8日、ファイルサイズ：827KB）。

30

【背景技術】

【0004】

身体の免疫系を癌の方向に向け直すための免疫療法が開発されている。免疫療法は、化学療法および放射線療法などの他の治療方式が欠く、細胞特異性の利点をもたらす。従って、免疫に基づく療法の効力を高めるための方法は、臨床的に有益であり得る。例えば、共刺激または共抑制シグナルをもたらす免疫チェックポイント分子は、腫瘍細胞に対する T 細胞免疫応答の調節において中心的な役割を果たす。

【0005】

40

しかし、例えば、ヤーボイ、キイトルーダ、およびオプジーボの承認に至った臨床試験を含む、チェックポイント分子を標的とする物質に対する患者の著しい応答にもかかわらず、チェックポイント阻害療法などの免疫療法は、圧倒的多数の患者ではまだ成功していない。さらに未だに、多くの免疫療法では、治療のための患者の治療濃度域を大きく狭めかつ患者を他の疾患によりかかりやすくする、副作用が併発する。

【0006】

したがって、最小限の副作用にしながら癌に対する標的療法を提供できる、改善された免疫療法薬の必要性が残されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 0 7 】

種々の態様では、本発明は、PD - 1またはPD - L 1に特異的に結合する少なくとも1つの標的化部分を有する結合物質に関する。種々の実施形態では、これらの結合物質は、PD - 1またはPD - L 1に結合し、これを機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）。種々の実施形態では、これらの結合物質は、PD - 1またはPD - L 1に結合するが、これを機能的に調節しない（例えば、部分的にまたは完全に中和しない）。したがって、種々の実施形態では、本発明の結合物質は、例えば、PD - 1発現細胞またはPD - L 1発現細胞にPD - 1またはPD - L 1を介してシグナル伝達させつつそのPD - 1発現細胞またはPD - L 1発現細胞を目的の部位に直接または間接的に動員するのに使用される（すなわち、PD - 1またはPD - L 1結合物質の結合は、目的の部位でのPD - 1またはPD - L 1シグナル伝達を低減せず排除しない）。ある実施形態では、標的化部分は単ドメイン抗体（VHH）である。

10

## 【 0 0 0 8 】

種々の実施形態では、本発明の結合物質は、シグナル伝達物質、例えば、限定されないが、活性を弱めるように改変され得るインターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子をさらに含む。種々の実施形態では、結合物質は、目的とする他の標的（例えば、抗原、受容体）に結合する追加の標的化部分を含む。ある実施形態では、目的とする他の標的（例えば、抗原、受容体）は、腫瘍細胞上に存在する。別の実施形態では、目的とする他の標的（例えば、抗原、受容体）は、免疫細胞上に存在する。いくつかの実施形態では、本発明の結合物質は、免疫細胞、（例えば、樹状細胞）を、作用の部位（例えば、非限定的例であるが、腫瘍微小環境など）に直接的にまたは間接的に動員し得る。いくつかの実施形態では、本発明の結合物質は、樹状細胞による抗原（例えば、腫瘍抗原）の提示を促進する。

20

## 【 0 0 0 9 】

種々の実施形態では、本発明の結合物質は、癌、感染症、免疫異常、ならびに他の疾患および障害などの種々の疾患または障害の治療で使用され、さらに本発明は、治療の様々な方法を包含する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 0 】

【図1】図1は、実施例1に記載のPD - 1またはPD - L 1 AcTaferonのクローニング方法の概略図を示す。

30

【図2】図2は、PD - L 1（上段パネル）またはPD - 1（下段パネル）AcTaferonの遺伝子導入HeK293T細胞への結合を示す。

【図3】図3は、末梢血単核球（PBMC）中のpSTAT1の状態により評価したPD - 1標的化を示す。データは、非刺激pSTAT1平均蛍光強度（MFI）のパーセンテージとしてプロットされる。

【図4】図4は、遺伝子導入HeK293T細胞中のpSTAT1の状態により評価したPD - 1標的化を示す。pSTAT1細胞パーセンテージがプロットされている。

【図5】図5は、MDA - MB - 231細胞中のpSTAT1の状態により評価したPD - L 1標的化を示す。データは、平均蛍光強度（MFI）のプロットである。

40

【図6】図6は、遺伝子導入HeK293T細胞へのPD - L 1 VHHの結合を示す。データは、平均蛍光強度（MFI）のプロットである。

【図7A】図7Aは、PD - L 1 VHH AcTaferon（AFN）の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞（p6 - 16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株）で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰（20 μg / ml）の対応するPD - L 1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD - L 1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD - L 1 VHHは、2LIG3であった。

【図7B】図7Bは、PD - L 1 VHH AcTaferon（AFN）の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞（p6 - 16ルシフェラーゼレポーターを

50

安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、2 L I G 2 7 (図7 B)であった。

【図7 C】図7 Cは、PD-L1 VHH AcT a f e r o n (AFN)の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、2 L I G 9 7であった。

10

【図7 D】図7 Dは、PD-L1 VHH AcT a f e r o n (AFN)の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、2 L I G 9 9であった。

【図7 E】図7 Eは、PD-L1 VHH AcT a f e r o n (AFN)の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、2 L I G 1 7 6であった。

20

【図7 F】図7 Fは、PD-L1 VHH AcT a f e r o n (AFN)の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、2 L I G 1 8 9であった。

【図7 G】図7 Gは、PD-L1 VHH AcT a f e r o n (AFN)の生物活性を示すグラフである。生物活性は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)で測定した。ルシフェラーゼ活性は、過剰(20 µg/ml)の対応するPD-L1 VHHの存在下または非存在下で、段階希釈のPD-L1 VHH AFNにより誘導された。試験したPD-L1 VHHは、3 L I G 8であった。

30

【図8】図8は、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入したIFN応答性細胞株)でのアテゾリズマブ-AcT a f e r o n (a t e - A F N ; すなわち、A t e - I F N a 2 m u t )の生物活性を示すグラフである。生物活性は、過剰(50 µg/ml)のアテゾリズマブ(a t e )の存在下または非存在下で、段階希釈のa t e - A F Nにより誘導したルシフェラーゼ活性により測定された。

【図9】図9は、ヒト化免疫系を有するマウスでのRL腫瘍モデルにおける2 L I G 9 9 ベースAFNのインビボ抗腫瘍活性を示すグラフである。

40

【図10 A】図10 Aは、ヒトPD-1または空のベクターを遺伝子導入し、段階希釈の1 0 2 C 3 A F N (図10 A)で刺激したHe k 2 9 3 T細胞中のp S T A T 1を示すグラフである。p S T A T 1陽性細胞のパーセンテージがグラフでプロットされている。

【図10 B】図10 Bは、ヒトPD-1または空のベクターを遺伝子導入し、段階希釈の1 0 2 C 1 2 A F N (図10 B)で刺激したHe k 2 9 3 T細胞中のp S T A T 1を示すグラフである。p S T A T 1陽性細胞のパーセンテージがグラフでプロットされている。

【図10 C】図10 Cは、ヒトPD-1または空のベクターを遺伝子導入し、段階希釈の野生型IFN a 2で刺激したHe k 2 9 3 T細胞中のp S T A T 1を示すグラフである。p S T A T 1陽性細胞のパーセンテージがグラフでプロットされている。

50

**【発明を実施するための形態】****【0011】**

本発明は、一部は、PD-1またはPD-L1を認識し、それに結合する結合物質（例えば、非限定的例であるが、VHHなどの抗体）の発見に基づいている。いくつかの実施形態では、本発明の結合物質は、1つまたは複数の標的化部分および/または1種類または複数種類のシグナル伝達物質とのキメラまたは融合タンパク質の一部である。種々の実施形態では、これらの結合物質は、PD-1またはPD-L1に結合し、これを機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）。いくつかの実施形態では、これらの結合物質は、PD-1またはPD-L1に結合するが、これを機能的に調節しない。

**【0012】**

本発明は、結合物質を含む医薬組成物および、癌、自己免疫疾患、および/または神経変性疾患を含む、種々の疾患の治療におけるそれらの使用をさらに提供する。

**【0013】**

PD-1またはPD-L1結合物質

種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、PD-1またはPD-L1を機能的に調節することなくPD-1またはPD-L1に特異的に結合できるタンパク質ベースの物質である。

**【0014】**

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

**【0015】**

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

**【0016】**

種々の実施形態では、本発明のPD-1結合物質は、ヒトPD-1の完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、本発明のPD-1結合物質は、任意の形態のヒトPD-1に結合し得る。ある実施形態では、PD-1結合物質は、リン酸化型のPD-1に結合する。

**【0017】**

ある実施形態では、本発明のPD-1結合物質は、ヒトPD-1上に存在する1つまたは複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形

10

20

30

40

50

態では、ヒトPD-1は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0018】

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

【0019】

種々の実施形態では、本発明のPD-1結合物質は、特異的に結合できる標的化部分を含む。種々の実施形態では、PD-1結合物質は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、PD-1結合物質は、抗体である標的化部分を含む。種々の実施形態では、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む完全長マルチマータンパク質である。それぞれの重鎖は、1つの可変領域（例えば、V<sub>H</sub>）および少なくとも3つの定常領域（例えば、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>）を含み、それぞれの軽鎖は、1つの可変領域（V<sub>L</sub>）および1つの定常領域（C<sub>L</sub>）を含む。可変領域は抗体の特異性を決定する。それぞれの可変領域は、4つの比較的保存されたフレームワーク領域（FR）により挟まれた、相補性決定領域（CDR）としても知られる、3つの高頻度可変領域を含む。3つのCDRは、CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、抗体の結合特異性に寄与する。いくつかの実施形態では、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0020】

いくつかの実施形態では、PD-1結合物質は、特定の抗体誘導体または抗体フォーマットである標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、本発明のPD-1結合物質は、次の標的化部分を含む：単ドメイン抗体、組み換え型の重鎖抗体（重鎖抗体）（V<sub>H</sub>H）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；アフィマー；ミクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エピボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニッツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ペプチド模倣分子、または合成分子。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および/または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz M Abs. 2011 May - Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

【0021】

いくつかの実施形態では、PD-1結合物質は、V<sub>H</sub>Hなどの単ドメイン抗体である標的化部分を含む。V<sub>H</sub>Hは、例えば、ラクダ類、サメなどのV<sub>H</sub>H抗体を産生する生物から誘導されるか、またはV<sub>H</sub>Hは設計されたV<sub>H</sub>Hであってもよい。V<sub>H</sub>Hは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。V<sub>H</sub>H技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（V<sub>H</sub>H）および2つの定常ドメイン（C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>）を含む。

【0022】

ある実施形態では、PD-1結合物質はV<sub>H</sub>Hを含む。いくつかの実施形態では、V<sub>H</sub>



Hは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

【0023】

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

10

【0024】

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

【0025】

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

20

【0026】

いくつかの実施形態では、PD-1 CDR1配列は、下記から選択される：GFSDYYAIA (配列番号2)；GFSVDYYAIA (配列番号3)；GGFN RVSYMG (配列番号4)；GIIKSINFMG (配列番号5)；GFILDYYGIG (配列番号6)；GLSLDYDGVG (配列番号7)；GRTFSSLGMG (配列番号8)；GFAFGSYDMG (配列番号9)；GFSFGNNDMS (配列番号10)；IHAMG (配列番号11)；INAMA (配列番号12)；SGTMG (配列番号13)；GSIASIHAM (配列番号14)；GSIASIHAMG (配列番号15)；FYGMG (配列番号16)；GGTF SFYGMG (配列番号17)；YYAIA (配列番号18)；VSYMG (配列番号19)；INFMG (配列番号20)；SLGMG (配列番号21)；SYDMG (配列番号22)；およびNNDMS (配列番号23)。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、PD-1 CDR2配列は、下記から選択される：CITG SDFMVD T (配列番号24)；SVTSGGEI (配列番号25)；STTS DGR T (配列番号26)；CISSSDGST (配列番号27)；AIAWNGAST (配列番号28)；GINS GGRI T (配列番号29)；AINS GG GST (配列番号30)；AITWSGGITYYEDSVKG (配列番号31)；VITWSGGITYYA DSVKG (配列番号32)；VITVSGGITYYADSVKG (配列番号33)；AITWSGGITYYADSLKG (配列番号34)；LISWSGGSTYYEDSVKG (配列番号35)；SIPWSGGRIYYADSVKG (配列番号36)；VITWSGGITY (配列番号37)；VITVSGGITY (配列番号38)；DIRTSAGRTYYADSVKG (配列番号39)；DIRTSAGRTY (配列番号40)；CITGSDFMVD TY (配列番号41)；CITGSDFMVD TY YVASVK G (配列番号42)；SVTSGGEIT (配列番号43)；SVTSGGEIT IADSVKG (配列番号44)；SVTSGGEITVADSVKG (配列番号45)；STTS DGR TT (配列番号46)；STTS DGR TT VADSVKG (配列番号47)；CISSSDGST Y (配列番号48)；AIAWNGAST Y (配列番号49)；AIAWNGAST Y YTESVKG (配列番号50)；GINS GGRI TD (配列番号

40

50

51) ; G I N S G G R I T D Y A D S V T G (配列番号52) ; A I N S G G G S T Y (配列番号53) ; および A I N S G G G S T Y Y A D S V K G (配列番号54)。

【0028】

いくつかの実施形態では、PD-1 CDR3配列は、下記から選択される：A V R S T A N T L C P S H Y S V M D Y (配列番号55) ; A V R S T A N T L C P S H Y S I M D Y (配列番号56) ; N A D I W V S D A R M Y N Y (配列番号57) ; N A D I W L P S D R M Y N Y (配列番号58) ; A T A T L C D G G I W G Y (配列番号59) ; A A S G L G S V V V T A N E Y D Y (配列番号60) ; A Q G D R S S W H Y Y G M D Y (配列番号61) ; A T K S D P M T N E Y D L (配列番号62) ; D R A E S S W Y D Y (配列番号63) ; D K H Q S S W Y D Y (配列番号64) ; D K H Q S S F Y D Y (配列番号65) ; D R A Q S S W Y D Y (配列番号66) ; D R V D S N W Y D Y (配列番号67) ; K E R S T G W D F A S (配列番号68) ; および E M S G I S G W D Y (配列番号69)。

10

【0029】

種々の代表的実施形態では、PD-1結合物質は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

2PD23

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F S M D Y Y A I A W F R Q A  
P G K E R E E I S C I T G S D F M V D T Y Y V A S V K G R F T I S R D N A E N T  
A Y L Q M N N L K P E D T G V Y F C A V R S T A N T L C P S H Y S V M D Y W G K  
G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H (配列番号70) ;

20

2PD26

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

2PD90

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S V D Y Y A I A W F R Q A  
P G K E R E E I S C I T G S D F M V D T Y Y V A S V K G R F T I S R D N A K N T  
A Y L Q M N S L K P E D T G V Y F C A V R S T A N T L C P S H Y S I M D Y W G K  
G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H (配列番号72) ;

30

2PD-106

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S M D Y Y A I A W F R Q A  
P G K E R E E I S C I T G S D F M V D T Y Y V A S V K G R F T I S R D N A K N T  
A H L Q M N S L K P E D T G V Y F C A V R S T A N T L C P S H Y S V M D Y W G K  
G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H (配列番号73) ;

2PD-16

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G G F N R V S Y M G W Y R Q A  
P G T K R E L V A S V T S G G E I T I A D S V K G R F T V S R D N S K N T L Y L  
Q M N G L K P E D G A T Y W C N A D I W V S D A R M Y N Y W G Q G T Q V T V S S  
A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H (配列番号74) ;

40

2PD71

Q V Q L Q E S G G G L V Q T G E S L R L S C A A S G G F N R V S Y M G W Y R Q A  
P G S K R E L V A S V T S G G E I T V A D S V K G R F T V S R D N N K N T L Y L  
Q M N G L K P E D G A T Y W C N A D I W V S D A R M Y N Y W G Q G T Q V T V S S  
A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H (配列番号75) ;

2PD-152

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

50

AAAYPYDVDPDYGSHHHHHH (配列番号 76) ;

2PD-12

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGFILDYYGIGWFRQA  
PGKEREA VSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNALNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYHCATATL CDGGIWGYWGQGTQVTVSS  
AAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 77) ;

3PD55

QVQLQESGGGLAQAGGSLRLSCEGSGLSLDYDGVGWFRQA  
PGKEREA VSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRGNALNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCATATL CDGGIWGYWGQGTQVTVSS  
AAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 78) ;

3PD82

QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCAVSGFILDYYGIGWFRQA  
PGKEREA VSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNALNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCATATL CDGGIWGYWGQGTQVTVSS  
AAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 : 79) ;

2PD8

QVQLQESGGGSVQAGDSLRLSCTASGRTFSSLGMGWFRQA  
PGKEREFVSAIAWNGASTYYTESVKGRFTISRDDAKNTVY  
LQMNSLKPTD TAVYFCAASGLGSVVVTANEYDYWGQGTQV  
TVSSAAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 80) ;

2PD27

QVQLQESGGGSVQPGKSLRLSCAASGRTFSSLGMGWFRQA  
PGKEREFVSAIAWNGASTYYTESVKGRFTISRDDAKNTVY  
LQMNSLKPTD TAVYFCAASGLGSVVVTANEYDYWGQGTQV  
TVSSAAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 81) ;

2PD82

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFAFGSYDMGWVRQA  
PGKGPEWVSGINS GGRI TDYADSVTGRFTISRDNALNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAQGDRSSWHYYGMDYWGKGTQVTV  
SSAAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 82) ; または

3PD36

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGNNDMSWVRQA  
PGKGPEWVSAINS GGGS TYADSVKGRFTISRDNALNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCATKSDPMTNEYDLWG XGTQVTVSS  
AAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH (配列番号 83) 。

#### 【0030】

種々の代表的実施形態では、PD-1 結合物質は、末端ヒスチジントグ配列（すなわち、HHHHHHH；配列番号 84）を含まない配列番号 70～配列番号 83 から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0031】

いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、HA タグ（すなわち、YPYDVDPDYGS；配列番号 85）を含まない配列番号 70～83（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、AAA リンカーを含まない配列番号 70～83（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、AAA リンカー、HA タグ、および末端ヒスチジントグ配列（すなわち、AAAYPYDVDPDYGSHHHHHHH；配列番号

10

20

30

40

50

86) を含まない配列番号70～83(上記で提供)から選択されるアミノ酸配列を含む。  
【0034】

種々の代表的実施形態では、PD-1結合物質は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

102C3：

QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSI FSIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAAITWSGGITYYEDSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAADRAESSWYDYWGQG GTQVTVSS (配列番号1246)；または

102C12：

QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQG GTQVTVSS (配列番号1247)。

10

【0035】

種々の実施形態では、PD-1結合物質は、米国特許出願公開第2017/0137517号に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一例として、いくつかの実施形態では、PD-1結合物質は、米国特許出願公開第2017/0137517号中の次の配列のうちの1つを含む：

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQG T L V T V S S (配列番号87)；

20

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQG T L V T V S S (配列番号88)；

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQG T L V K V S S (配列番号89)；

30

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQG T Q V Q V S S (配列番号90)；

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQG T L V T V K S (配列番号91)；

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQG T L V T V Q S (配列番号92)；

40

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG T L V K V S S (配列番号93)；

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG T L V Q V S S (

50

配列番号 94) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVKS (

配列番号 95) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVQS (

配列番号 96) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVSS (

10

配列番号 97) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVKVSS (

配列番号 98) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVQVSS (

20

配列番号 99) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVKS (

配列番号 100) ;

EVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVQS (

配列番号 101) ;

EVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVSS (

30

配列番号 102) ;

DVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTVSS (

配列番号 103) ;

DVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVTS SA (

40

配列番号 104) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTATYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVKVSSA

(配列番号 105) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQG GTLVQVSSA

(配列番号 106) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA

50

P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V K S A  
(配列番号107);

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V Q S A  
(配列番号108);

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V K V S S A  
(配列番号109);

10

E V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V Q V S S A  
(配列番号110);

E V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V K S A  
(配列番号111);

E V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V Q S A  
(配列番号112);

20

E V Q L V E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V S S A  
(配列番号113);

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V K V S S A  
(配列番号114);

30

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V Q V S S A  
(配列番号115);

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V K S A  
(配列番号116);

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V Q S A  
(配列番号117);

40

E V Q L V E S G G G V V Q A G G S L R L S C A A S G G T F S F Y G M G W F R Q A  
P G K E Q E F V A D I R T S A G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A A E M S G I S G W D Y W G Q G T L V T V S S A  
(配列番号118);

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

50

( 配列番号 1 1 9 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 0 ) ;

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 1 ) ;

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 2 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTTFSSFGMSWVRQAPGKGLE  
WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSL  
RPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA ( 配列番号 1 2 3 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREF  
VAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL  
RPEDTALYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSSGGGGSGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV  
QPGNSLRLSCAASGFTTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS  
GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTA  
LYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA ( 配列番号 1 2 4 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 5 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 6 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 7 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS ( 配列番号 1 2 8 ) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS (

10

20

30

40

50

配列番号 129) ;

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDS SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSSFYDYWGQGGLVTVSS (

配列番号 130) ;

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQA  
PGKEREEVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKERE  
EVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL  
RPEDTAIYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSSGGGGSGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV  
QPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS  
GSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTA  
VYYCTIGGSLSRSSQGGLVTVSS (配列番号 131) ; および

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPA  
LLVVT EGD NATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLA  
AFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT  
YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP  
RPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSR AARGTI  
GARRTGQPLKEDPSAVPVFVDYGE LDFQWREKTPEPPVPC  
VPEQTEYATIVFPSGMGTSSSPARRGSADGPRSAQPLRPED  
GHCSWPL (配列番号 132) 。

【0036】

いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、位置 1、11、14、52a、73、74、83、89、100a、110、および 112 (Kabat ナンバリングによる) に 1 つまたは複数の置換を有する配列番号 87 ~ 132 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、位置 1 のアミノ酸は E または D である。いくつかの実施形態では、位置 11 のアミノ酸は L または V である。いくつかの実施形態では、位置 14 のアミノ酸は A または P である。いくつかの実施形態では、位置 52a のアミノ酸は W または V である。いくつかの実施形態では、位置 73 のアミノ酸は N、S、P または Q である。いくつかの実施形態では、位置 74 のアミノ酸は A または S である。いくつかの実施形態では、位置 83 のアミノ酸は K または R である。いくつかの実施形態では、位置 89 のアミノ酸は T、V、I または L である。いくつかの実施形態では、位置 100a のアミノ酸は W または F である。いくつかの実施形態では、位置 110 のアミノ酸は T、K、または Q である。いくつかの実施形態では、位置 112 のアミノ酸は S、K、または Q である。

【0037】

種々の実施形態では、PD-1 結合物質は、国際公開第 2017/087587 号に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一例として、いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、国際公開第 2017/087587 号中の次の配列のうちの 1 つを含む：

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQA  
PGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGQTQVTVSS (

配列番号 133) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSSWYDYWGQGGLVTVSS (

配列番号 134) ;

10

20

30

40

50



EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVKVS (配列番号 135) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVQVS (配列番号 136) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVKS (配列番号 137) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVQS (配列番号 138) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVKVS (配列番号 139) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVQVS (配列番号 140) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVKS (配列番号 141) ;

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVQS (配列番号 142) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVSS (配列番号 143) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVKVS (配列番号 144) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVQVS (配列番号 145) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLLVTVKS (配列番号 146) ;

EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY

10

20

30

40

50

L Q M N S L K P E D T A L Y Y C A G D K H Q S S W Y D Y W G Q G T L V T V Q S ( 配列番号 147 ) ;

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

配列番号 148 ) ;

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

配列番号 149 ) ;

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

( 配列番号 150 ) ;

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

( 配列番号 151 ) ;

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

( 配列番号 152 ) ;

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

( 配列番号 153 ) ;

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

( 配列番号 154 ) ;

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

( 配列番号 155 ) ;

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

( 配列番号 156 ) ;

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

( 配列番号 157 ) ;

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

( 配列番号 158 ) ;

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

( 配列番号 159 ) ;

10

20

30

40

50

EVQLVESGGGVVQAAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVKVSSA  
(配列番号160);

EVQLVESGGGVVQAAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVQVSSA  
(配列番号161);

EVQLVESGGGVVQAAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVKSA  
(配列番号162);

10

EVQLVESGGGVVQAAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVQSA  
(配列番号163);

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSSA  
(配列番号164);

20

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSSA  
(配列番号165);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAIITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSS  
(配列番号166);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSS  
(配列番号167);

30

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSS  
(配列番号168);

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE  
WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTLVTVSSA  
(配列番号169);

40

DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSSG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE  
SGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREF  
VAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGGLTLVTVSS  
GGGGSGGG

50

GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV  
QPGNSLR LSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS  
GSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTA  
LYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA (配列番号170) ;  
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS (配列番号171) ;  
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS (配列番号172) ; および  
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDP SKNTVY  
LQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTVSS (配列番号173) 。

**【0038】**

いくつかの実施形態では、PD-1 結合物質は、位置1、11、14、52a、73、74、83、89、100a、110、および112 (Kabatatナンバリングによる) に1つまたは複数の置換を有する配列番号133~173から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、位置1のアミノ酸はEまたはDである。いくつかの実施形態では、位置11のアミノ酸はLまたはVである。いくつかの実施形態では、位置14のアミノ酸はAまたはPである。いくつかの実施形態では、位置52aのアミノ酸はWまたはVである。いくつかの実施形態では、位置73のアミノ酸はN、S、PまたはQである。いくつかの実施形態では、位置74のアミノ酸はAまたはSである。いくつかの実施形態では、位置83のアミノ酸はKまたはRである。いくつかの実施形態では、位置89のアミノ酸はT、V、IまたはLである。いくつかの実施形態では、位置100aのアミノ酸はWまたはFである。いくつかの実施形態では、位置110のアミノ酸はT、K、またはQである。いくつかの実施形態では、位置112のアミノ酸はS、K、またはQである。

**【0039】**

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明のPD-1 結合物質の任意の天然のまたは合成の類似体、変異体、バリエーション、アレル、同族体およびオースログ (本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ) の使用を意図している。種々の実施形態では、PD-1 結合物質のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

**【0040】**

種々の実施形態では、本発明は、PD-L1 結合物質をさらに提供する。プログラム死リガンド1 (PD-L1) は、表面抗原分類274 (CD274) またはB7ホモログ1 (B7-H1) としても知られ、免疫系の抑制に大きな役割を果たすと推測されている1型膜貫通タンパク質である。PD-L1は、LPSおよびGM-CSF処理にตอบสนองしてマクロファージおよび樹状細胞 (DC) 上で、ならびにTCRおよびB細胞受容体シグナル伝達時にT細胞およびB細胞上で発現上昇される。

**【0041】**

種々の実施形態では、本発明のPD-L1 結合物質は、PD-L1上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-L1上に存在する1つまたは複数の線形エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、線形エピトープは、PD-L1上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、PD-L1上に存在する1つまたは複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピ

トープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および/または形状および/または三次構造を備えた3次元表面を形成する1つまたは複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0042】

種々の実施形態では、本発明のPD-L1結合物質は、ヒトPD-L1の完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意の他の天然のまたは合成の類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、本発明のPD-L1結合物質は、任意の形態のヒトPD-L1に結合し得る。ある実施形態では、PD-L1結合物質は、リン酸化型のPD-L1に結合する。ある実施形態では、PD-L1結合物質は、アセチル化型のPD-L1に結合する。

10

【0043】

ある実施形態では、本発明のPD-L1結合物質は、ヒトPD-L1上に存在する1つまたは複数のエピトープを認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、ヒトPD-L1は、下記のアミノ酸配列（下線はシグナルペプチド）を含む：

【化1】

アイソフォーム1：

MRIFAVFIFMTYWHL~~LLNAFTVTVPKDL~~YVVEYGSNMTIEC  
KFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHG~~EEDLKVQHSS~~  
YRQRRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG  
ADYKRITVKVNAPY~~NKINQRILVVD~~PVTSEHELTCAEGY  
PKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRIN  
TTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPLEPLAHPNERTH  
LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSK  
KQSDTHLEET（配列番号174）；

20

アイソフォーム2：

MRIFAVFIFMTYWHL~~LNAPY~~NKINQRILVVD~~PVTSEHELT~~  
CQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVT  
STLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPLEPLAHP  
PNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI  
QDTNSKKQSDTHLEET（配列番号175）；または

30

アイソフォーム3：

MRIFAVFIFMTYWHL~~LLNAFTVTVPKDL~~YVVEYGSNMTIEC  
KFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHG~~EEDLKVQHSS~~  
YRQRRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG  
ADYKRITVKVNAPY~~NKINQRILVVD~~PVTSEHELTCAEGY  
PKAEVIWTSSDHQVLSGD（配列番号176）。

【0044】

種々の実施形態では、本発明のPD-L1結合物質は、特異的結合ができる標的化部分を含む。種々の実施形態では、PD-L1結合物質は、抗体またはその誘導体などの抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、PD-L1結合物質は、抗体である標的化部分を含む。種々の実施形態では、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む完全長マルチマータンパク質である。それぞれの重鎖は、1つの可変領域（例えば、V<sub>H</sub>）および少なくとも3つの定常領域（例えば、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>）を含み、それぞれの軽鎖は、1つの可変領域（V<sub>L</sub>）および1つの定常領域（C<sub>L</sub>）を含む。可変領域は抗体の特異性を決定する。それぞれの可変領域は、4つの比較的保存されたフレームワーク領域（FR）により挟まれた、相補性決定領域（CDR）としても知られる、3つの高頻度可変領域を含む。3つのCDRは、CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、抗体の結合特異性に寄与する。いくつかの実施形態では、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

40

【0045】

50

いくつかの実施形態では、PD-L1結合物質は、特定の抗体誘導体または抗体フォーマットである標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、本発明のPD-L1結合物質は、次の標的化部分を含む：単ドメイン抗体、組み換え型の重鎖抗体（重鎖抗体）（VHH）、単鎖抗体（scFv）、サメの重鎖抗体（VNAR）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、DARPin；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；アフィマー；マイクロボディ；アプタマー；alterase；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エビボディ；フィノマー；アルマジロリピートタンパク質（armadillo repeat protein）；クニツツドメイン、アビマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペプボディ、ワクシボディ、ユニボディ；デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ペプチド模倣分子、または合成分子。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および/または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz Mabs. 2011 May - Jun; 3(3): 310-317、も参照されたい。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、PD-L1結合物質は、VHHなどの単ドメイン抗体である標的化部分を含む。VHHは、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物から誘導するか、またはVHHは設計によるVHHであってもよい。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン（VHH）および2つの定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。

#### 【0047】

ある実施形態では、PD-L1結合物質はVHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

#### 【0048】

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

#### 【0049】

いくつかの実施形態では、PD-L1結合物質は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHである標的化部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を意味する。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

#### 【0050】

種々の実施形態では、PD-L1 結合物質は、少なくとも1つのCDR1、CDR2、および/またはCDR3配列を含む可変ドメインを有するVHHを含む。種々の実施形態では、PD-L1 結合物質は、少なくとも1つのFR1、FR2、FR3、および/またはFR4配列を含む可変領域を有するVHHを含む。

#### 【0051】

いくつかの実施形態では、PD-L1 CDR1配列は、下記から選択される：GFTLDYYAIG（配列番号177）；GTIFSI NHMD（配列番号178）；GFTFDDY GMS（配列番号179）；GFTLDYYAIN（配列番号180）；GTIFSI NRMD（配列番号181）；GFTFSSSY GMS（配列番号182）；GKIFSGNDMG（配列番号183）；GFTFNDYAMS（配列番号184）；GFNLDPY AIA（配列番号185）；GFTFTAYAMS（配列番号186）；GFTFDYYAIG（配列番号187）；GFNLDPY AIG（配列番号188）；ESIF SIEAMG（配列番号189）；GRTFSISAMG（配列番号190）；YYAIG（配列番号191）；YYAKC（配列番号192）；QYDVG（配列番号193）；NSAMG（配列番号194）；DSIVS（配列番号195）；INHMD（配列番号196）；DYGMS（配列番号197）；YYAIN（配列番号198）；INRMD（配列番号199）；SYGMS（配列番号200）；GNDMG（配列番号201）；DYAMS（配列番号202）；PYAIA（配列番号203）；AYAMS（配列番号204）；PYAIG（配列番号205）；IEAMG（配列番号206）；およびISAMG（配列番号207）。

#### 【0052】

いくつかの実施形態では、PD-L1 CDR2配列は、下記から選択される：ISSSDGSTY（配列番号208）；ITS DGFPT（配列番号209）；IRWNGGSTN（配列番号210）；ITS DGTPT（配列番号211）；IDS GGGSTS（配列番号212）；ITS GGITD（配列番号213）；ITS DGTPT（配列番号214）；IDS GGGSTS（配列番号215）；IRSNGGYTN（配列番号216）；ISSSDVGT Y（配列番号217）；INS SDGSTY（配列番号218）；ISGSDSSTY（配列番号219）；ISSSDVGT Y（配列番号220）；ITS DGTPT（配列番号221）；ITS DGT PA（配列番号222）；IDS GGGSTS（配列番号223）；ISSGDGSKY（配列番号224）；ISSSDVGT Y（配列番号225）；IFGGGFTN（配列番号226）；ITS GGITD（配列番号227）；IDS GGGSTS（配列番号228）；ITS DGTPT（配列番号229）；IDS GGGSTS（配列番号230）；ISSSDVGT Y（配列番号231）；ITWSGGSTS（配列番号232）；IDS GGGSTS（配列番号233）；IRSNGGYTN（配列番号234）；SISSSDGSTYYADSVKG（配列番号235）；CISSSDGSTYYADSVKG（配列番号236）；CISGGDNSTYYADSVKG（配列番号237）；FSSSGGRTIYPDSVKG（配列番号238）；RITGGGLIAYTDSVKG（配列番号239）；GISNGGTIKYAESVLG（配列番号240）；LITS DGFPT（配列番号241）；LITS DGFPTYADSAKG（配列番号242）；AIRWNGGSTN（配列番号243）；AIRWNGGSTNYADSVKG（配列番号244）；LITS DGTPT（配列番号245）；LITS DGTPTYADSAKG（配列番号246）；AIDSGGGSTS（配列番号247）；AIDSGGGSTSYADSVKG（配列番号248）；IITS GGITD（配列番号249）；IITS GGITDYADAVKG（配列番号250）；GIRSNGGYTN（配列番号251）；GIRSNGGYTNYADSVKG（配列番号252）；CISSSDVGT Y（配列番号253）；CISSDVGTYYADSVKG（配列番号254）；CINS SDGSTY（配列番号255）；CINS SDGSTYYADSVKG（配列番号256）；CISGSDSSTY（配列番号257）；CISGSDSSTYYADSVKG（配列番号258）；LITS DGT PA（配列番号259）；LITS DGT PAYADSAKG（配列番号260）

); C I S S G D G S K Y ( 配列番号 2 6 1 ); C I S S G D G S K Y Y A D S V K G ( 配列番号 2 6 2 ); A I F G G G F T N ( 配列番号 2 6 3 ); A I F G G G F T N Y A D S V K G ( 配列番号 2 6 4 ); A I T W S G G S T S ( 配列番号 2 6 5 ); および A I T W S G G S T S Y T D S V K G ( 配列番号 2 6 6 )。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、C D R 3 配列は、下記から選択される：D G W S S C R H G I N E Y L Y W ( 配列番号 2 6 7 ); S S G V Y N Y W ( 配列番号 2 6 8 ); Q G Y Y C S G Y G C P R ( 配列番号 2 6 9 ); S G W R L C R P T D E Y D Y S Y W ( 配列番号 2 7 0 ); Q G Y Y C S G Y G C S D Y W ( 配列番号 2 7 1 ); R D R T I W W ( 配列番号 2 7 2 ); Q G Y Y C S G Y G C Y P ( 配列番号 2 7 3 ); D G Y Y Y C S D Y P H P L Y W ( 配列番号 2 7 4 ); D G W R D C T W S N E Y A Y W ( 配列番号 2 7 5 ); T G W R T C R G L N E Y D Y W ( 配列番号 2 7 6 ); D L V S G S S R L Y D Y W ( 配列番号 2 7 7 ); M G R T N Y G V I Y D P N M Y N Y W ( 配列番号 2 7 8 ); S G W R L C R P T D E Y D Y L Y W ( 配列番号 2 7 9 ); S Q A P I T I A T M M K P F Y D Y ( 配列番号 2 8 0 ); R H G G P L T V E Y F F D Y ( 配列番号 2 8 1 ); G G W K Y C S G Y D P E Y I Y ( 配列番号 2 8 2 ); D W Y L N S Y ( 配列番号 2 8 3 ); I N S R D G ( 配列番号 2 8 4 ); および R Q Y ( 配列番号 2 8 5 )。

【 0 0 5 4 】

種々の代表的実施形態では、P D - L 1 結合物質は、下記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：

2 L I G 2

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F T L D Y Y A I G W F R Q A P G K E R E E V S C I S S S D G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V N L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G W S S C R H G I N - E Y L Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 8 6 );

または

2 L I G 3

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C T A S G T I F S I N H M D W F R Q A P G K Q R E L V A L I T S D G F P T Y A D S A K G R F T I S R D N T K K T V S L Q M N S L K P E D T A V Y Y C H V S S G V Y N Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 8 7 );

または

2 L I G 1 6

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P G K G L E W V S A I R W N G G S T N Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A - Q G Y Y - C S G Y G C P R G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 8 8 );

または

2 L I G 2 2

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T L D Y Y A I N W F R Q A P G K E R E E V S C I S S S D G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T S G W R L C R P T D E Y D Y S Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 8 9 );

または

2 L I G 2 7

Q V Q L Q E S G G G V V Q A G G S L R L S C T A S G T I F S I N R M D W F R Q A P G K Q R E L V A L I T S D G T P T Y A D S A K G R F T I S R D N T K K T V S L Q M N S L K P E D T A V Y Y C H V S S G V Y N Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 0 );

または



## 2 L I G 2 9

Q V Q L Q E S G G G L V Q T G G S L R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V R Q T  
P G K G P E W V S A I D S G G G S T S Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A - Q G Y Y - C S G Y G C S D Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 1 ) ;

または

## 2 L I G 3 0

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G K I F S G N D M G W Y R Q A  
P G K Q R E L V G I I T S G G I T D Y A D A V K G R F T I S R D N A K N M M Y L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C N M R D R T I W W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y  
D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 2 ) ;

10

または

## 2 L I G 3 4

Q V Q L Q E S G G G S V Q A G G S L R L S C T A S G T I F S I N R M D W F R Q A  
P G K Q R E L V A L I T S D G T P T Y A D S A K G R F T I S R D N T K K T V S L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C H V S S G V Y N Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P  
Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 3 ) ;

または

## 2 L I G 3 5

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y G M S W V R Q T  
P G K G P E W V S A I D S G G G S T S Y A D S V K G R F T T S R D N A K N T L Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A - Q G Y Y - C S G Y G C S D Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 4 ) ;

20

または

## 2 L I G 4 8

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F N D Y A M S W V R Q A  
P G K G L E W V S G I R S N G G Y T N Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y  
L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A - Q G Y Y - C S G Y G C Y P G Q G T Q V T V S  
S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 5 ) ;

または

30

## 2 L I G 6 5

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F N L D P Y A I A W F R Q A  
P G K E R E E V S C I S S S D V G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K K T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G Y Y Y C S D Y P H P L Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 6 ) ;

または

## 2 L I G 8 5

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T A Y A M S W F R Q A  
P G K E R E E V S C I N S S D G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y H C A T D G W R D C T W S N E Y A Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 7 ) ;

40

または

## 2 L I G 8 6

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D Y Y A I G W F R Q A  
P G K E R E E V S C I S G S D S S T Y Y A D S V K G R F T I V R D N A Q N T V Y  
L Q M N S L K P E D T A I Y Y C A V T G W R T C R G L N E Y D Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 8 ) ;

または

## 2 L I G 8 9

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

50

P G K E R E E V S C I S S S D V G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N T K K T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G Y Y Y C S D Y P H P L Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 2 9 9 ) ;

または

2 L I G 9 7

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G E S L R L S C T A S G T I F S I N R M D W F R Q A  
P G K Q R E L V A L I T S D G T P T Y A D S A K G R F T I S R D N T K K T V S L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C H V S S G V Y N Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P  
Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 0 ) ;

または

2 L I G 9 9

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C T A S G T I F S I N R M D W F R Q A  
P G K Q R E L V A L I T S D G T P A Y A D S A K G R F T I S R D N T K K T V S L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C H V S S G V Y N Y W G Q G T Q V T V S S A A A Y P  
Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 1 ) ;

または

2 L I G 1 0 9

Q V Q L Q E S G G G L V Q S G G S L R L S C K T S G F T F S S Y G M S W V R Q T  
P G K G P E W V S A I D S G G G S T S Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A Q G Y Y - C S G Y G C S D Y W G Q G T Q V T V  
S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 2 ) ;

または

2 L I G 1 2 7

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N L D P Y A I G W F R Q A  
P G K E R E E V S C I S S G D G S K Y Y A D S V K G R F T M S R D N A K K T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G Y Y Y C S D Y P H P L Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 3 ) ;

または

2 L I G 1 3 9

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G F N L D P Y A I A W F R Q A  
P G K E R E E V S C I S S S D V G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K K T V Y  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G Y Y Y C S D Y P H P L Y W G Q G T Q V T  
V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 4 ) ;

または

2 L I G 1 7 6

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S E S I F S I E A M G W Y R Q A  
P G K Q R E L V A A I F G G G F T N Y A D S V K G R F T I S R D N A N R T V Y L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C N A D L V S G S S R L Y D Y W G Q G T Q V T V S S  
A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 5 ) ;

または

2 L I G 1 8 9

Q V Q L Q E S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G K I F S G N D M G W Y R Q A  
P G K Q R E L V G I I T S G G I T D Y A D A V K G R F T I S R D N A K N M M Y L  
Q M N S L K P E D T A V Y Y C N M R D R T I W W G Q G T Q V T V S S A A A Y P Y  
D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 0 6 ) ;

または

3 L I G 3

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

10

20

30

40

50

TVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 307) ;

または

3 L I G 7

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFS SYGMSWVRQT  
PGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAQGY - CSGYGCS DYWGQGTQVTV  
SSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 308) ;

または

3 L I G 8

QVQLQESGGGLVQP GGSLRLSCTASGTIF SINRMDWFRQA  
PGKQRELV ALITSDGTPTYADSAKGRFTISRDN TKKT VSL  
QMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYP  
YDVPDYGSHHHHHH (配列番号 309) ;

10

または

3 L I G 9

QVQLQESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS SYGMSWVRQT  
PGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAQGY YCSGYGCS DYWGQGTQVTVS  
SAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 310) ;

または

3 L I G 1 8

QVQLQESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNLDPYAI AWFRQA  
PGKEREEVSCISSSDVGTYYADSVKGRFTISRDN AKKT VY  
LQMNSLKPEDTAVYYCATDGY YCSDYPHPLYWGQGTQVT  
VSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 311) ;

20

または

3 L I G 2 0

QVQLQESGGGLVXAGGSLRLSCAASGR TFSISAMGWFRQA  
PGKEREFVAAITWSGGSTSYTDSVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAAMGR TNYGVIYDPNMYNYWGQGT  
QVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 312) ;

30

または

3 L I G 2 8

QVQLQESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTLDYYA INWFRQA  
PGKEREEVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAVYYCATSGWRLCRPTDEYDYL YWGQGTQ  
VTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 313) ;

または

3 L I G 2 9

QVQLQESGGGLVQAGGSMRLSCAASGFTFS SYGMSWVRQT  
PGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLKPEDTAVYYCAQGY YCSGYGCS DYWGQGTQVTVS  
SAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 314) ;

40

または

3 L I G 3 0

QVQLQESGGGT VQAGGSLRLSCAASGFTFNDY AMSWVRQA  
PGKGLEWVSGIRSN GGYTNYADSVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLKSEDTAVYYCAQGY YCSGYGCYPGQGTQVTVSSA  
AAYPYDVPDYGSHHHHHH (配列番号 315) ;

または

50

## 3 L I G 3 3

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G T S L R L S C A A S G F T L D Y Y A I G W F R Q A  
P G K E R E E V S C I S S S D G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T V N  
L Q M N S L K P E D T A V Y Y C A T D G W S S C R H G I N E Y L Y W G Q G T Q V  
T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ( 配列番号 3 1 6 ) 。

## 【 0 0 5 5 】

種々の例示的实施形態では、PD - L 1 結合物質は、末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、HHHHHHH：配列番号 8 4）を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 結合物質は、HA タグ（すなわち、YPYDVPDYGS；配列番号 8 5）を含まない配列番号 2 8 6 ~ 3 1 6（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 結合物質は、AAA リンカーを含まない配列番号 2 8 6 ~ 3 1 6（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 結合物質は、AAA リンカー、HA タグ、および末端ヒスチジンタグ配列（すなわち、AAAYPYDVPDYGS HHHHHH；配列番号 8 6）を含まない配列番号 2 8 6 ~ 3 1 6（上記で提供）から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 5 9 】

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明の PD - L 1 結合物質の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、同族体およびオースログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、PD - L 1 結合物質のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

## 【 0 0 6 0 】

種々の実施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つに少なくとも 6 0 % 同一である配列を含む標的化部分を含む。例えば、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれかに、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 1 %、少なくとも約 6 2 %、少なくとも約 6 3 %、少なくとも約 6 4 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 6 %、少なくとも約 6 7 %、少なくとも約 6 8 %、少なくとも約 6 9 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 1 %、少なくとも約 7 2 %、少なくとも約 7 3 %、少なくとも約 7 4 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 6 %、少なくとも約 7 7 %、少なくとも約 7 8 %、少なくとも約 7 9 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 1 %、少なくとも約 8 2 %、少なくとも約 8 3 %、少なくとも約 8 4 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % 同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれか 1 つに約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、約 9 9 % または約 1 0 0 % の配列同一

10

20

30

40

50

性)である配列を含む標的化部分を含み得る。

【0061】

種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに関して1つまたは複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに関して1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、または20個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および短縮化から独立に選択され得る。

10

【0062】

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

【0063】

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

20

【0064】

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

【0065】

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

30

【0066】

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

40

【0067】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、標的化部分のCDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域)中にあってもよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、標的化部分のフレームワーク領域(FR)(例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域)中にあってもよい。

【0068】

アミノ酸配列の改変は、任意の当該技術分野において、周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRベース変異誘発を用いて実現され得る。このような技術は、例え

50

ば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989に記載されている。

【0069】

種々の実施形態では、変異は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合する本発明のPD-1またはPD-L1結合物質の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合する本発明のPD-1またはPD-L1結合物質の能力を実質的に低下させず、さらにPD-1またはPD-L1を機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）こともない。

10

【0070】

種々の実施形態では、ヒトPD-1またはPD-L1の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスパリアントおよび/またはフラグメントおよび/またはモノマーおよび/またはダイマー型および/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、パリアント、または変異体（モノマー、ダイマー型を含む）に対する本発明のPD-1またはPD-L1結合物質の結合親和性は、平衡解離定数（ $K_D$ ）により特徴付けられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、ヒトPD-1またはPD-L1の完全長および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスパリアントおよび/またはフラグメントおよび/または任意のその他の天然のまたは合成類似体、パリアント、または変異体（モノマーおよび/またはダイマー型を含む）に、約1  $\mu$ M、約900 nM、約800 nM、約700 nM、約600 nM、約500 nM、約400 nM、約300 nM、約200 nM、約100 nM、約90 nM、約80 nM、約70 nM、約60 nM、約50 nM、約40 nM、約30 nM、約20 nM、約10 nM、または約5 nM、または約1 nM未満の $K_D$ で結合する標的化部分を含む。

20

【0071】

種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、目的の抗原、すなわち、PD-1またはPD-L1を結合するが機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に中和）しない標的化部分を含む。例えば、種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質の標的化部分は、単に抗原を標的とするが、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害するかあるいは中和する）しない。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質の標的化部分は、生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

30

【0072】

種々の実施形態では、これらの結合物質は、PD-1またはPD-L1に結合し、かつこれを機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）。

【0073】

PD-1またはPD-L1結合物質を含む治療薬

40

シグナル伝達物質とのキメラおよび融合体

種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、1種類または複数種類のシグナル伝達物質とのキメラまたは融合体の一部である。したがって、本発明は、例えば、PD-1またはPD-L1に対する標的化部分および1種類または複数種類のシグナル伝達物質を含むキメラまたは融合タンパク質を提供する。

【0074】

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

50

ナル伝達物質は野生型の形態で拮抗性であり、そのアンタゴニスト活性を弱める 1 つまたは複数の変異を有する。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数の変異に起因して拮抗性であり、例えば、アゴニストシグナル伝達物質はアンタゴニストシグナル伝達物質に変換され、このような変換されたシグナル伝達物質は、場合により、そのアンタゴニスト活性を弱める 1 つまたは複数の変異も有する（例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号に記載のように、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【 0 0 7 5 】

したがって、種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数の改変（例えば、変異）を有する改変された（変異した）型のシグナル伝達物質である。種々の実施形態では、変異は改変シグナル伝達物質が、非変異型、すなわち、野生型形態のシグナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変（例えば、変異）形態での同じシグナル伝達物質を比較して）、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性のうちの 1 つまたは複数などの 1 つまたは複数の弱められた活性を有することを可能にする。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異を含む。いくつかの実施形態では、結合または親和性を弱めるまたは低減する変異は、結合または活性を実質的に低減または除去する変異とは異なる。結果として、種々の実施形態では、変異は、シグナル伝達物質が、非変異型、すなわち、野生型シグナル伝達物質に比べて（例えば、野生型形態と改変（例えば、変異）形態での同じシグナル伝達物質を比較して）、向上した安全性、例えば、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にする。

#### 【 0 0 7 6 】

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

#### 【 0 0 7 7 】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数のその受容体に対する結合親和性または活性を低減する 1 つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、受容体に対する結合親和性または活性を実質的に低減または除去する 1 つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、野生型シグナル伝達物質により与えられる活性は、受容体に対するアゴニズム（例えば、治療の部位での細胞効果の活性化）である。例えば、野生型シグナル伝達物質は、その受容体を活性化し得る。このような実施形態では、変異は、受容体に対する活性化作用を低減または除去するように改変されたシグナル伝達物質をもたらす。例えば、変異は、標的細胞に低減された活性化シグナルを送るよう改変されたシグナル伝達物質をもたらし得る、または活性化シグナルが除去され得る。いくつかの実施形態では、野生型シグナル伝達物質により与えられる作用は、受容体に対するアンタゴニズム（例えば、治療の部位での細胞効果の遮断または抑制）である。例えば、野生型シグナル伝達物質は、受容体をアンタゴナイズするかあるいは阻害し得る。これらの実施形態では、変異は、受容体に対するアンタゴナイズ活性を低減または除去するように改変されたシグナル伝達物質をもたらす。例えば、変異は、標的細胞に低減された阻害シグナルを送るよう改変されたシグナル伝達物質をもたらし得る、または阻害シグナルが除去され得る。種々の実施形態では、シグナル伝達物質は、1 つまたは複数の変異に起因して拮抗性であり、例えば、アゴニストシグナル伝達物質はアンタゴニストシグナル伝達物質に変換され（例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号に記載のように）、また、このような変換されたシグナル伝達物質は、場合により

10

20

30

40

50

、１つまたは複数のその受容体に対するその結合親和性または活性を低減する、または１つまたは複数のその受容体に対する結合親和性または活性を実質的に低減または除去する１つまたは複数の変異も有する。

【００７８】

いくつかの実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、本明細書に記載の１つまたは複数の標的化部分（例えば、PD-1またはPD-L1に対する標的化部分）の結合により回復可能である。他の実施形態では、受容体に対し低減された親和性または活性は、１つまたは複数の標的化部分の活性により実質的に回復可能でない。

【００７９】

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

【００８０】

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

【００８１】

いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、標的化部分（PD-1またはPD-L1に対する標的化部分または本明細書に記載の任意のその他の標的化部分）を用いて実質的に回復可能ではない。いくつかの実施形態では、結合または活性の実質的な低減または除去は、標的化部分を用いて回復可能である。種々の実施形態では、第２の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、他の受容体により媒介される有害作用も防止し得る。あるいは、または加えて、他の受容体に対する結合または活性の実質的な低減または除去は、治療作用部位から離れて治療キメラタンパク質を隔離するのを低減するかあるいは無くするので、治療効果を改善させる。例えば、いくつかの実施形態では、これは、他の受容体での損失を補償するための高用量の本発明のキメラタンパク質の必要性を無くする。このような投与量を低減する能力は、さらに副作用の可能性を低くする。

【００８２】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、１つまたは複数のその受容体に対し、シグナル伝達物質に、親和性、例えば、結合（例えば、 $K_D$ ）および／または活性化（例えば、改変シグナル伝達物質がその受容体のアゴニストである場合、例えば、 $K_A$ および／または $EC_{50}$ として測定可能である）および／または阻害（例えば、改変シグナル伝

10

20

30

40

50



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

#### 【0083】

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

#### 【0084】

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

#### 【0085】

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

#### 【0086】

受容体結合活性は、当該技術分野において既知の方法を使用して測定され得る。例えば、親和性および/または結合活性は、スキャッチャードプロット分析および結合データのコンピューターフィッティング(例えば、Scatchard, 1949)またはBrechtら(1993)により記載のように、フロースルー条件下で反射型干渉分光法によ

10

20

30

40

50

り評価し得る。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0087】

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

【0088】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達物質は、インターロイキンまたは改変インターロイキンであり、例えば、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL21、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36またはそのフラグメント、バリエーション、類似体、またはファミリーメンバーを含む。インターロイキンは、リンパ球、単球、およびマクロファージにより合成される多機能サイトカイン群である。既知の機能は、免疫細胞（例えば、ヘルパーT細胞、B細胞、好酸球、およびリンパ球）の増殖の刺激、好中球およびTリンパ球の遊走作用、および/またはインターフェロンの阻害を含む。インターロイキン活性は、当該技術分野において既知のアッセイを使用して測定できる（Matthews et al., in *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*, Clemens et al., eds, IRL Press, Washington, D.C. 1987, pp. 221-225; and Orencole & Dinarello (1989) *Cytokine* 1, 14-20）。

10

20

【0089】

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

【0090】

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

30

【0091】

本明細書に記載の野生型シグナル伝達物質のアミノ酸配列は、当該技術分野において、周知である。したがって、種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質の既知の野生型アミノ酸配列との少なくとも約60%、または少なくとも約61%、または少なくとも約62%、または少なくとも約63%、または少なくとも約64%、または少なくとも約65%、または少なくとも約66%、または少なくとも約67%、または少なくとも約68%、または少なくとも約69%、または少なくとも約70%、または少なくとも約71%、または少なくとも約72%、または少なくとも約73%、または少なくとも約74%、または少なくとも約75%、または少なくとも約76%、または少なくとも約77%、または少なくとも約78%、または少なくとも約79%、または少なくとも約80%、または少なくとも約81%、または少なくとも約82%、または少なくとも約83%、または少なくとも約84%、または少なくとも約85%、または少なくとも約86%、または少なくとも約87%、または少なくとも約88%、または少なくとも約89%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性（例えば、約60%、または

40

50

約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、または約 9 9 %の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 2 】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、本明細書に記載のシグナル伝達物質のうちのいずれかのアミノ酸配列との少なくとも約 6 0 %、または少なくとも約 6 1 %、または少なくとも約 6 2 %、または少なくとも約 6 3 %、または少なくとも約 6 4 %、または少なくとも約 6 5 %、または少なくとも約 6 6 %、または少なくとも約 6 7 %、または少なくとも約 6 8 %、または少なくとも約 6 9 %、または少なくとも約 7 0 %、または少なくとも約 7 1 %、または少なくとも約 7 2 %、または少なくとも約 7 3 %、または少なくとも約 7 4 %、または少なくとも約 7 5 %、または少なくとも約 7 6 %、または少なくとも約 7 7 %、または少なくとも約 7 8 %、または少なくとも約 7 9 %、または少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 1 %、または少なくとも約 8 2 %、または少なくとも約 8 3 %、または少なくとも約 8 4 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 8 6 %、または少なくとも約 8 7 %、または少なくとも約 8 8 %、または少なくとも約 8 9 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 1 %、または少なくとも約 9 2 %、または少なくとも約 9 3 %、または少なくとも約 9 4 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 6 %、または少なくとも約 9 7 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 %の配列同一性(例えば、約 6 0 %、または約 6 1 %、または約 6 2 %、または約 6 3 %、または約 6 4 %、または約 6 5 %、または約 6 6 %、または約 6 7 %、または約 6 8 %、または約 6 9 %、または約 7 0 %、または約 7 1 %、または約 7 2 %、または約 7 3 %、または約 7 4 %、または約 7 5 %、または約 7 6 %、または約 7 7 %、または約 7 8 %、または約 7 9 %、または約 8 0 %、または約 8 1 %、または約 8 2 %、または約 8 3 %、または約 8 4 %、または約 8 5 %、または約 8 6 %、または約 8 7 %、または約 8 8 %、または約 8 9 %、または約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、または約 9 9 %の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 3 】

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

【 0 0 9 4 】

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

## 【0095】

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

## 【0096】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達物質のI型サイトカイン受容体、II型サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーの受容体、TGFベータ受容体、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーの受容体、および/またはチロシンキナーゼスーパーファミリーの受容体に対する親和性および/または活性を低減させる1つまたは複数の変異を含む。

## 【0097】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、I型サイトカイン受容体である。I型サイトカイン受容体は当技術分野において既知であり、限定されないが、IL2（ベータサブユニット）、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL9、IL11、IL12、GM-CSF、G-CSF、LIF、CNTFに対する受容体、および同様に、トロンボポエチン（TPO）、プロラクチン、および成長ホルモンに対する受容体が挙げられる。例示I型サイトカイン受容体としては、限定されないが、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、LIF受容体、CNTF受容体、TPO受容体、およびI型IL受容体が挙げられる。

## 【0098】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、II型サイトカイン受容体である。II型サイトカイン受容体は、異種のサブユニットからなる多量体受容体であり、主にインターフェロンに対する受容体である。この受容体ファミリーは、限定されないが、インターフェロン、インターフェロン およびインターフェロン、IL10、IL22、および組織因子に対する受容体を含む。例示II型サイトカイン受容体としては、限定されないが、IFN受容体（例えば、IFNAR1およびIFNAR2）、IFN受容体、IFN受容体（例えば、IFNGR1およびIFNGR2）、およびII型IL受容体が挙げられる。

## 【0099】

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

## 【0100】

種々の実施形態では、シグナル伝達物質に対する受容体は、TNFRファミリーメンバーである。腫瘍壊死因子受容体（TNFR）ファミリーメンバーは、細長い分子を作成するCXXCXXCのコアモチーフを取り囲む3つのジスルフィド結合から形成されるシステインリッチドメイン（CRD）を共有する。代表的腫瘍壊死因子受容体ファミリーとしては、下記が挙げられる：CD120a（TNFRSF1A）、CD120b（TNFRSF1B）、リンボトキシンベータ受容体（LTBR、TNFRSF3）、CD134（

10

20

30

40

50

TNFRSF4)、CD40(CD40、TNFRSF5)、FAS(FAS、TNFRSF6)、TNFRSF6B(TNFRSF6B)、CD27(CD27、TNFRSF7)、CD30(TNFRSF8)、CD137(TNFRSF9)、TNFRSF10A(TNFRSF10A)、TNFRSF10B(TNFRSF10B)、TNFRSF10C(TNFRSF10C)、TNFRSF10D(TNFRSF10D)、RANK(TNFRSF11A)、破骨細胞分化抑制因子(TNFRSF11B)、TNFRSF12A(TNFRSF12A)、TNFRSF13B(TNFRSF13B)、TNFRSF13C(TNFRSF13C)、TNFRSF14(TNFRSF14)、神経成長因子受容体(NGFR、TNFRSF16)、TNFRSF17(TNFRSF17)、TNFRSF18(TNFRSF18)、TNFRSF19(TNFRSF19)、TNFRSF21(TNFRSF21)、およびTNFRSF25(TNFRSF25)。ある実施形態では、TNFRファミリーメンバーは、CD120a(TNFRSF1A)またはTNF-R1である。別の実施形態では、TNFRファミリーメンバーは、CD120b(TNFRSF1B)またはTNF-R2である。

10

#### 【0101】

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

#### 【0102】

20

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

#### 【0103】

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

30

#### 【0104】

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

40

#### 【0105】

変異型のインターフェロン は、当業者に既知である。ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号317のアミノ酸配列を有するアレル型IFN 2aである。

#### 【0106】

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号318(アミノ酸位置23でIFN 2aと異なる)のアミノ酸配列を有するアレル型のIFN 2bである。

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、上記IFN 2変異体(IFN 2aまたはIFN 2b)は、位置144~154、例えば、アミノ酸位置148、149および/または153に

50

、1つまたは複数のアミノ酸の変異が導入されている。いくつかの実施形態では、IFN 2変異体は、L153A、R149A、およびM148Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。このような変異体は、例えば、国際公開第2013/107791号およびPiehlerら、(2000)J. Biol. Chem., 275:40425-33に記載されている。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0108】

いくつかの実施形態では、IFN 2変異体は、IFNAR1に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、国際公開第2010/030671号に記載のように、IFN 2変異体は、F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A、およびY89Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、国際公開第2008/124086号に記載のように、IFN 2変異体は、K133A、R144A、R149A、およびL153Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0110】

いくつかの実施形態では、国際公開第2015/007520号および国際公開第2010/030671号に記載のように、IFN 2変異体は、R120EおよびR120E/K121Eから選択される1つまたは複数の変異を含む。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、上記IFN 2変異体は、野生型IFN 2活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、上記変異体IFN 2は、IFNAR1に対する低減された親和性および/または活性を有するが、IFNAR2に対する活性は保持される。

20

【0111】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN 2変異体は、(1)R120EおよびR120E/K121Eから選択される1つまたは複数の変異(理論に束縛されることを望むものではないが、これらはアンタゴニスト効果を作り出す)、および(2)K133A、R144A、R149A、およびL153Aから選択される1つまたは複数の変異(理論に束縛されることを望むものではないが、これらは、例えば、IFNAR2に対する減弱化効果を可能とする)を含む。ある実施形態では、ヒトIFN 2変異体は、R120EおよびL153Aを含む。

30

【0112】

いくつかの実施形態では、ヒトIFN 2変異体は、国際公開第2013/059885号に開示のように、L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、D114R、L117A、R120A、R125A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A、およびN156Aから選択される1つまたは複数の変異を含み、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN 2変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および/またはL30Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN 2変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および/またはR33Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN 2変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および/またはM148Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN 2変異体は、変異H57Y、E58N、Q61S、および/またはL153Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開第2013/059885号で開示のように、ヒトIFN 2変異体は、変異N65A、L80A、Y85A、および/またはY89Aを含む。いくつかの実施形態では、国際公開

40

50

第 2 0 1 3 / 0 5 9 8 8 5 号で開示のように、ヒト I F N 2 変異体は、変異 N 6 5 A、L 8 0 A、Y 8 5 A、Y 8 9 A および / または D 1 1 4 A を含む。

【 0 1 1 3 】

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

【 0 1 1 4 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I F N である。種々の実施形態では、I F N は、官能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスバリエント、または I F N のフラグメントを包含する。種々の実施形態では、I F N は、任意の種由来の I F N を包含する。ある実施形態では、キメラタンパク質は、改変型のマウス I F N を含む。ある実施形態では、キメラタンパク質は、改変型のヒト I F N を含む。ヒト I F N は、1 6 6 個のアミノ酸残基を含む約 2 2 k D a の分子量を有するポリペプチドである。ヒト I F N のアミノ酸配列は、配列番号 3 1 9 である。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態では、ヒト I F N は、ヒト I F N のグリコシル化型である I F N 1 a である。いくつかの実施形態では、I F N は、M e t - 1 欠失および C y s - 1 7 の S e r への変異を有する非グリコシル化型のヒト I F N である I F N 1 b である。

【 0 1 1 6 】

種々の実施形態では、改変 I F N は、I F N A R の I F N A R 1 サブユニットに対するその結合または親和性を低減する 1 つまたは複数の変異を有する。一実施形態では、改変 I F N は、I F N A R 1 に対する低減された親和性および / または活性を有する。種々の実施形態では、改変 I F N は、ヒト I F N であり、位置 F 6 7、R 7 1、L 8 8、Y 9 2、I 9 5、N 9 6、K 1 2 3、および R 1 2 4 に 1 つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の変異は、F 6 7 G、F 6 7 S、R 7 1 A、L 8 8 G、L 8 8 S、Y 9 2 G、Y 9 2 S、I 9 5 A、N 9 6 G、K 1 2 3 G、および R 1 2 4 G から選択される置換である。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、K 1 2 3 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G および R 7 1 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 8 8 G および Y 9 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、Y 9 2 G、I 9 5 A、および N 9 6 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、K 1 2 3 G および R 1 2 4 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 G、L 8 8 G、および Y 9 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、F 6 7 S、L 8 8 S、および Y 9 2 S 変異を含む。

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態では、改変 I F N は、I F N A R の I F N A R 2 サブユニットに対するその結合または親和性を低減する 1 つまたは複数の変異を有する。一実施形態では、改変 I F N は、I F N A R 2 に対する低減された親和性および / または活性を有する。種々の実施形態では、改変 I F N は、ヒト I F N であり、位置 W 2 2、R 2 7、L 3 2、R 3 5、V 1 4 8、L 1 5 1、R 1 5 2、および Y 1 5 5 に 1 つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の変異は、W 2 2 G、R 2 7 G、L 3 2 A、L 3 2 G、R 3 5 A、R 3 5 G、V 1 4 8 G、L 1 5 1 G、R 1 5 2 A、R 1 5 2 G、および Y 1 5 5 G から選択される置換である。ある実施形態では、改変 I F N は、W 2 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 3 2 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、L 3 2 G 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 3 5 A 変異を含む。ある実施形態では、改変 I F N は、R 3 5 G 変異を含む。あ

10

20

30

40

50

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

【 0 1 1 8 】

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

【 0 1 1 9 】

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

【 0 1 2 0 】

ヒト I F N の結晶構造は既知であり、K a r p u s a s e t a l . , ( 1 9 9 8 ) P N A S , 9 4 ( 2 2 ) : 1 1 8 1 3 - 1 1 8 1 8 に記載されている。特に、ヒト I F N の構造は、5 つの ヘリックス ( すなわち、A、B、C、D、および E ) およびこれらのヘリックスを連結する 4 つのループ領域 ( すなわち、A B、B C、C D、および D E ループ ) を含むことが示された。種々の実施形態では、改変 I F N は、A、B、C、D、E ヘリックスおよび / または A B、B C、C D、および D E ループ中に、I F N A R などの治療受容体に対するその結合親和性または活性を低減させる 1 つまたは複数の変異を有する。代表的変異は、国際公開第 2 0 0 0 / 0 2 3 1 1 4 号および米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 0 1 1 7 3 2 号に記載されている。これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 1 5、1 6、1 8、1 9、2 2、および / または 2 3 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 2 8 ~ 3 0、3 2、および 3 3 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 3 6、3 7、3 9、および 4 2 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 6 4 および 6 7 にアラニン置換を含み、位置 6 8 にセリン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 7 1 ~ 7 3 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 9 2、9 6、9 9、および 1 0 0 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 1 2 8、1 3 0、1 3 1、および 1 3 4 にアラニン置換を含むヒト I F N である。代表的実施形態では、改変 I F N は、アミノ酸位置 1 4 9、1 5 3、1 5 6、および 1 5 9 にアラニン置換を含むヒト I F N である。いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および W 2 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および R 2 7 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および W 2 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )

10

20

30

40

50



【 0 1 2 3 】

【 0 1 2 4 】

10

【 0 1 2 5 】

【 0 1 2 6 】

20

【 0 1 2 7 】

【 0 1 2 8 】

30

【 0 1 2 9 】

【 0 1 3 0 】

40

【 0 1 3 1 】

50

## 【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および L 8 8 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに Y 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

## 【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および I 9 5 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに Y 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

## 【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および N 9 6 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらに Y 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

## 【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および Y 9 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基であり、および I 9 5 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基であり、および N 9 6 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

## 【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および K 1 2 3 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

30

## 【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および R 1 2 4 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

## 【 0 1 3 8 】

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

40

## 【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および L 1 5 1 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、イソロイシン ( I )、メチオニン ( M )、およびバリン ( V ) から選択される脂肪族疎水性残基である。

## 【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、変異体 I F N は、配列番号 3 1 9 および R 1 5 2 での変異を含み、変異は、グリシン ( G )、アラニン ( A )、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )

50

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

【0141】

いくつかの実施形態では、変異体IFNは、配列番号319およびL151での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにR152での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0142】

いくつかの実施形態では、変異体IFNは、配列番号319およびV148での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびメチオニン(M)から選択される脂肪族疎水性残基である。

10

【0143】

いくつかの実施形態では、変異体IFNは、配列番号319およびV148での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基であり、さらにR152での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

【0144】

いくつかの実施形態では、変異体IFNは、配列番号319およびY155での変異を含み、変異は、グリシン(G)、アラニン(A)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、およびバリン(V)から選択される脂肪族疎水性残基である。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、本発明は、(1)配列番号319のアミノ酸配列および位置W22に変異を有し、変異は脂肪族疎水性残基である改変IFN；および(b)1つまたは複数の標的化部分を含むキメラタンパク質に関し、上記標的化部分は、目的の抗原または受容体(例えば、PD-1またはPD-L1)に特異的に結合する認識ドメインを含み、改変IFNおよび標的化部分は、任意に1つまたは複数のリンカーにより連結されていてよい。種々の実施形態では、位置W22の変異は、G、A、L、I、M、およびVから選択される脂肪族疎水性残基である。種々の実施形態では、位置W22の変異はG

30

【0146】

追加の代表的IFN変異体は、国際出願第PCT/EP2017/061544号で提供される。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0147】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターフェロンである。このような実施形態では、改変インターフェロン物質は、インターフェロンガンマ受容体(IFNGR)、すなわち、IFNGR1および/またはIFNGR2鎖に対し、低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変インターフェロン物質は、インターフェロンガンマ受容体(IFNGR)、すなわち、IFNGR1および/またはIFNGR2鎖に対し、実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

40

【0148】

IFNは、II型クラスのインターフェロンの唯一のメンバーである。IFNは、主にナチュラルキラー(NK)細胞およびナチュラルキラーT(NKT)細胞により自然免疫応答の一部として産生される。IFNは、CD4<sup>+</sup>Th1およびCD8<sup>+</sup>細胞傷害性Tリンパ球(CTL)エフェクターT細胞、マクロファージ、樹状細胞、およびB細胞によっても産生される。活性化されたIFNは、二量体を形成し、IFN受容体1およびIFN受容体2サブユニットからなるヘテロダイマー受容体(すなわち、IFNまたはIFN<sub>R</sub>)を介して作用する。IFN受容体1は、主要なリガンド結合サブユニ

50

ットであり、一方、ＩＦＮ 受容体２は、シグナル伝達に必要であり、また、ＩＦＮ 受容体１のそのリガンドに対する親和性を高める。ＩＦＮ 二量体の受容体に対する結合は、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路活性化し、種々の生物学的作用を誘発する。

【０１４９】

種々の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、改変型のＩＦＮ をシグナル伝達物質として含む。種々の実施形態では、ＩＦＮ は、官能性誘導体、類似体、前駆物質、アイソフォーム、スプライスパリアント、またはＩＦＮ のフラグメントを包含する。種々の実施形態では、ＩＦＮ は、任意の種由来のＩＦＮ を包含する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、改変型のマウスＩＦＮ を含む。別の実施形態では、改変シグナル伝達物質は、改変型のヒトＩＦＮ を含む。

10

【０１５０】

ヒトＩＦＮ は、１６６個のアミノ酸残基を含むポリペプチドである。ある実施形態では、ヒトＩＦＮ は、配列番号３２０のアミノ酸配列を有する。

【０１５１】

本明細書で使用される場合、ヒトＩＦＮ はまた、Ｎ末端シグナルペプチドのない成熟ヒトＩＦＮ を指す。この実施形態では、成熟ヒトＩＦＮ は、１４３個のアミノ酸を含み、配列番号３２１のアミノ酸配列を有する。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、ヒトＩＦＮ は、グリコシル化型のヒトＩＦＮ である。いくつかの実施形態では、ヒトＩＦＮ は、非グリコシル化型のヒトＩＦＮ である。

20

【０１５３】

ＩＦＮ の配列は、当技術分野において既知である種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ の既知の野生型アミノ酸配列と少なくとも約６０％、または少なくとも約６１％、または少なくとも約６２％、または少なくとも約６３％、または少なくとも約６４％、または少なくとも約６５％、または少なくとも約６６％、または少なくとも約６７％、または少なくとも約６８％、または少なくとも約６９％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約７１％、または少なくとも約７２％、または少なくとも約７３％、または少なくとも約７４％、または少なくとも約７５％、または少なくとも約７６％、または少なくとも約７７％、または少なくとも約７８％、または少なくとも約７９％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約８１％、または少なくとも約８２％、または少なくとも約８３％、または少なくとも約８４％、または少なくとも約８５％、または少なくとも約８６％、または少なくとも約８７％、または少なくとも約８８％、または少なくとも約８９％、または少なくとも約９０％、または少なくとも約９１％、または少なくとも約９２％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９４％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９６％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性（例えば、約６０％、または約６１％、または約６２％、または約６３％、または約６４％、または約６５％、または約６６％、または約６７％、または約６８％、または約６９％、または約７０％、または約７１％、または約７２％、または約７３％、または約７４％、または約７５％、または約７６％、または約７７％、または約７８％、または約７９％、または約８０％、または約８１％、または約８２％、または約８３％、または約８４％、または約８５％、または約８６％、または約８７％、または約８８％、または約８９％、または約９０％、または約９１％、または約９２％、または約９３％、または約９４％、または約９５％、または約９６％、または約９７％、または約９８％、または約９９％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【０１５４】

いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、配列番号３２０のアミノ酸配列を有するヒトＩＦＮ と少なくとも約６０％、または少なくとも約６１％、または少なくとも約６２％、または少なくとも約６３％、または少なくとも約６４％、または少なくとも約６５％、または少なくとも約６６％、または少なくとも約６７％、または少なくとも約６８％、

50

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

【0155】

いくつかの実施形態では、改変 IFN は、配列番号 321 のアミノ酸配列を有するヒト IFN と少なくとも約 60 %、または少なくとも約 61 %、または少なくとも約 62 %、または少なくとも約 63 %、または少なくとも約 64 %、または少なくとも約 65 %、または少なくとも約 66 %、または少なくとも約 67 %、または少なくとも約 68 %、または少なくとも約 69 %、または少なくとも約 70 %、または少なくとも約 71 %、または少なくとも約 72 %、または少なくとも約 73 %、または少なくとも約 74 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 76 %、または少なくとも約 77 %、または少なくとも約 78 %、または少なくとも約 79 %、または少なくとも約 80 %、または少なくとも約 81 %、または少なくとも約 82 %、または少なくとも約 83 %、または少なくとも約 84 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 86 %、または少なくとも約 87 %、または少なくとも約 88 %、または少なくとも約 89 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 %の配列同一性（例えば、約 60 %、または約 61 %、または約 62 %、または約 63 %、または約 64 %、または約 65 %、または約 66 %、または約 67 %、または約 68 %、または約 69 %、または約 70 %、または約 71 %、または約 72 %、または約 73 %、または約 74 %、または約 75 %、または約 76 %、または約 77 %、または約 78 %、または約 79 %、または約 80 %、または約 81 %、または約 82 %、または約 83 %、または約 84 %、または約 85 %、または約 86 %、または約 87 %、または約 88 %、または約 89 %、または約 90 %、または約 91 %、または約 92 %、または約 93 %、または約 94 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 %の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。

【0156】

種々の実施形態では、改変 IFN は、1つまたは複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および短縮化から独立に選択され得る。

【0157】

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

## 【0158】

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

## 【0159】

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

## 【0160】

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

## 【0161】

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

## 【0162】

種々の実施形態では、IFNは、1つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、変異は改変IFNが、非変異型、例えば、野生型形態のIFNに比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性のうちの1つまたは複数などの1つまたは複数の弱められた活性を有することを可能にする。例えば、非変異型、例えば、野生型のIFNに比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減した特定の生物活性などの1つまたは複数の弱められた活性は、IFN受容体などの治療受容体に対するものであり得る。結果として、種々の実施形態では、変異は、改変可溶性物質が、非変異型、例えば、野生型IFNに比べて、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にする。

## 【0163】

種々の実施形態では、IFNは、IFN受容体1およびIFN受容体2サブユニットを含むIFN受容体などの治療受容体に対するその結合親和性および/または活性を低減する変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、野生型IFNにより与えられる活性は、治療受容体に対するアゴニズム(例えば、治療の部位での細胞効果の活性化)である。例えば、野生型IFNは、治療受容体を活性化し得る。このような実施形態では、変異は、治療受容体に対する活性化作用を低減するように改変されたIFNをもたらす。

## 【0164】

いくつかの実施形態では、治療受容体(例えば、IFN受容体)に対する低減された

10

20

30

40

50

親和性および／または活性は、標的化部分の結合により回復可能である。他の実施形態では、治療受容体に対する低減された親和性および／または活性は、標的化部分への結合により実質的に回復され得ない。種々の実施形態では、本発明の治療キメラタンパク質は、ＩＦＮ が治療受容体に対する結合親和性および／または活性を弱める変異を有するという理由で、オフターゲット効果を低減する。種々の実施形態では、これは、例えば、野生型ＩＦＮ で観察される副作用を低減する。種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、治療作用部位へ向かう途上では実質的に不活性であり、特異的に標的とされる細胞型に対してその効果を実質的に有し、これにより望ましくない副作用を大きく低減する。

【０１６５】

種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ に、１つまたは複数の治療受容体（例えば、ＩＦＮ 受容体）に対して、弱められたまたは低減された親和性および／または活性、例えば、結合（例えば、ＫＤ）および／または活性化（例えば、ＫＡおよび／またはＥＣ５０として測定可能な）を持たせる１つまたは複数の変異を有する。種々の実施形態では、治療受容体に対する低減された親和性および／または活性は、治療受容体からの活性および／またはシグナル伝達の減弱化を可能にする。

10

【０１６６】

種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１サブユニットに対するその結合または親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異を有する。一実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１サブユニットに対する低減された親和性および／または活性を有する。種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１サブユニットに対する結合に關与するアミノ酸残基で１つまたは複数の変異を有するヒトＩＦＮ である。いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１サブユニットとの境界に位置するアミノ酸で１つまたは複数の変異を有するヒトＩＦＮ である。種々の実施形態では、１つまたは複数の変異は、限定されないが、Ｑ１、Ｖ５、Ｅ９、Ｋ１２、Ｈ１９、Ｓ２０、Ｖ２２、Ａ２３、Ｄ２４、Ｎ２５、Ｇ２６、Ｔ２７、Ｌ３０、Ｋ１０８、Ｈ１１１、Ｅ１１２、Ｉ１１４、Ｑ１１５、Ａ１１８、Ｅ１１９、およびＫ１２５から選択されるアミノ酸の位置に存在する（それぞれ、Ｎ末端シグナル配列を欠いている野生型ヒトＩＦＮ である配列番号３２１を基準にして）。いくつかの実施形態では、１つまたは複数の変異は、Ｖ５Ｅ、Ｓ２０Ｅ、Ｖ２２Ａ、Ａ２３Ｇ、Ａ２３Ｆ、Ｄ２４Ｇ、Ｇ２６Ｑ、Ｈ１１１Ａ、Ｈ１１１Ｄ、Ｉ１１４Ａ、Ｑ１１５Ａ、およびＡ１１８Ｇから選択される置換である（それぞれ、配列番号３２１を基準にして）。いくつかの実施形態では、１つまたは複数の変異は、Ｖ２２Ａ、Ａ２３Ｇ、Ｄ２４Ｇ、Ｈ１１１Ａ、Ｈ１１１Ｄ、Ｉ１１４Ａ、Ｑ１１５Ａ、およびＡ１１８Ｇから選択される置換である。

20

30

【０１６７】

ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、変異Ａ２３ＧおよびＤ２４Ｇを含む。別の実施形態では、改変ＩＦＮ は、変異Ｉ１１４ＡおよびＡ１１８Ｇを含む。さらなる実施形態では、改変ＩＦＮ は、変異Ｖ５Ｅ、Ｓ２０Ｅ、Ａ２３Ｆ、およびＧ２６Ｑを含む。

【０１６８】

種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、１つまたは複数の次記変異を有する：残基Ａ２３の欠失、残基Ｄ２４の欠失、Ｓ２０Ｉ置換、Ａ２３Ｖ弛緩、Ｄ２１Ｋ置換およびＤ２４Ａ置換。

40

【０１６９】

いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体２サブユニットに対するその結合または親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異を有する。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１およびＩＦＮ 受容体２サブユニットの両方に対するその結合または親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異を有する。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１に対するその結合または

50

親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異、およびＩＦＮ 受容体２に対する結合またはその親和性および／または生物活性を実質的に低減または除去する１つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このような改変ＩＦＮ を有するキメラタンパク質は、標的選択的ＩＦＮ 受容体１活性を提供できる（例えば、ＩＦＮ 受容体１活性は、標的化部分を介する標的化により回復可能である）。

#### 【０１７２】

いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、ＩＦＮ 受容体１に対するその結合または親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異、およびＩＦＮ 受容体１に対する結合またはその親和性および／または生物活性を低減する１つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このような改変ＩＦＮ を有するキメラタンパク質は、標的選択的ＩＦＮ 受容体１および／またはＩＦＮ 受容体１活性を提供できる（例えば、ＩＦＮ 受容体１およびＩＦＮ 受容体２活性は、標的化部分を介する標的化により回復可能である）。

10

#### 【０１７３】

種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、Ｃ末端で短縮化されている。いくつかの実施形態では、改変ＩＦＮ は、Ｃ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。このような実施形態では、成熟ＩＦＮ は、少なくとも約１個、約２個、約３個、約４個、約５個、約６個、約７個、約８個、約９個、約１０個、約１１個、約１２個、約１３個、約１４個、約１５個、約１６個、約１７個、約１８個、約１９個、約２０個、約２１個、約２２個、約２３個、約２４個、または約２５個のアミノ酸残基のＣ末端短縮化を含み得る。ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、５個のアミノ酸のＣ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、７個のアミノ酸のＣ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、１４個のアミノ酸のＣ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、１５個のアミノ酸のＣ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。ある実施形態では、改変ＩＦＮ は、１６個のアミノ酸のＣ末端の欠失を有する配列番号３２１のアミノ酸配列を含む成熟ＩＦＮ である。

20

本発明で利用し得るＣ末端短縮化を有するさらなる改変ＩＦＮ は、Haelewyn et al., Biochem. J. (1997), 324: 591-595 およびLundell et al., Protein Eng. (1991) 4: 335-341に記載されている。これらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【０１７４】

種々の実施形態では、改変ＩＦＮ は、例えば、Randal et al. (2001) Structure 9: 155-163 およびRandal et al. (1998) Protein Sci. 7: 1057-1060に記載されているように、単鎖ＩＦＮ である。これらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、単鎖ＩＦＮ は、Ｃ末端で第２のＩＦＮ 鎖のＮ-末端に連結された第１のＩＦＮ 鎖を含む。種々の実施形態では、第１と第２のＩＦＮ 鎖は、本明細書で他の場所で記載のように、リンカーにより連結される。

40

#### 【０１７５】

いくつかの実施形態では、第１のＩＦＮ 鎖は、少なくとも約１個、約２個、約３個、約４個、約５個、約６個、約７個、約８個、約９個、約１０個、約１１個、約１２個、約１３個、約１４個、約１５個、約１６個、約１７個、約１８個、約１９個、約２０個、約２１個、約２２個、約２３個、約２４個、または約２５個のアミノ酸残基のＣ末端短縮化を含む。ある実施形態では、第１のＩＦＮ 鎖は、約２４個のアミノ酸残基のＣ末端短縮化を含む。いくつかの実施形態では、第２のＩＦＮ は、少なくとも約１個、約２個、約３個、約４個、または約５個のアミノ酸残基のＮ末端短縮化を含む。ある実施形態では、第２のＩＦＮ 鎖は、約３個のアミノ酸残基のＮ末端短縮化を含む。いくつかの実施形態では、第２のＩＦＮ 鎖は、少なくとも約１個、約２個、約３個、約４個、約５個、約６

50



個、約 7 個、約 8 個、約 9 個、約 10 個、約 11 個、約 12 個、約 13 個、約 14 個、約 15 個、約 16 個、約 17 個、約 18 個、約 19 個、約 20 個、約 21 個、約 22 個、約 23 個、約 24 個、または約 25 個のアミノ酸残基の C 末端短縮化を含む。種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、本明細書の別の場所で記載のように、Q 1、V 5、E 9、K 12、H 19、S 20、V 22、A 23、D 24、N 25、G 26、T 27、L 30、K 108、H 111、E 112、I 114、Q 115、A 118、E 119、および K 125 の位置に 1 つまたは複数のアミノ酸変異を有する。種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、V 5 E、S 20 E、V 22 A、A 23 G、A 23 F、D 24 G、G 26 Q、H 111 A、H 111 D、I 114 A、Q 115 A、および A 118 G から選択される 1 つまたは複数の置換を含む。種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、V 22 A、A 23 G、D 24 G、H 111 A、H 111 D、I 114 A、Q 115 A、および A 118 G から選択される 1 つまたは複数の置換を含む。種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、A 23 G および D 24 G 置換を含む。種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、I 114 A および A 118 G 置換を含む。別の実施形態では、変異は、V 5 E、S 20 E、A 23 F、および G 26 Q である。

10

#### 【0176】

種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、本明細書で開示の 1 つまたは複数の置換を含み、さらに第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、本明細書で開示の C 末端短縮化を含む。

20

#### 【0177】

種々の実施形態では、第 1 および / または第 2 の IFN 鎖は、1 つまたは複数の本明細書で開示の置換および本明細書で開示の C 末端短縮化を含む。

#### 【0178】

ヒト IFN の結晶構造は既知であり、例えば、E al i c k e t a l . , ( 1 9 9 1 ) S c i e n c e , 2 5 2 : 6 9 8 - 7 0 2 に記載されている。特に、ヒト IFN の構造は、6 個のヘリックスのコアおよび C 末端領域における延長されたアンフォールド配列を含むことが示された。種々の実施形態では、改変 IFN は、治療受容体（例えば、IFN 受容体）に対するその結合親和性および / または生物活性を低減する 1 つまたは複数のヘリックス中の 1 つまたは複数の変異を有する。

30

#### 【0179】

種々の実施形態では、改変 IFN は、野生型 IFN に比較して、約 1 %、または約 3 %、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、または約 10 % ~ 20 %、約 20 % ~ 40 %、約 50 %、約 40 % ~ 60 %、約 60 % ~ 80 %、約 80 % ~ 100 % の治療受容体（例えば、IFN 受容体またはその IFN 受容体 1 および IFN 受容体 2 サブユニットのうちのいずれか 1 つ）に対する親和性および / または生物活性を有する。いくつかの実施形態では、結合親和性および / または生物活性は、野生型 IFN に比べて、少なくとも約 2 倍低い、約 3 倍低い、約 4 倍低い、約 5 倍低い、約 6 倍低い、約 7 倍低い、約 8 倍低い、約 9 倍低い、少なくとも約 10 倍低い、少なくとも約 15 倍低い、少なくとも約 20 倍低い、少なくとも約 25 倍低い、少なくとも約 30 倍低い、少なくとも約 35 倍低い、少なくとも約 40 倍低い、少なくとも約 45 倍低い、少なくとも約 50 倍低い、少なくとも約 100 倍低い、少なくとも約 150 倍低い、または約 10 ~ 50 倍低い、約 50 ~ 100 倍低い、約 100 ~ 150 倍低い、約 150 ~ 200 倍低い、または 200 倍超低い。

40

#### 【0180】

種々の実施形態では、改変 IFN は、例えば、野生型 IFN に比べて、IFN の内在性活性を、約 75 %、または約 70 %、または約 60 %、または約 50 %、または約 40 %、または約 30 %、または約 25 %、または約 20 %、または約 10 %、または約 5 %、または約 3 %、または約 1 % に低減する 1 つまたは複数の変異を含む。

50

## 【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、改変 I F N は、I F N に受容体に対する親和性および / または生物活性を低減させる 1 つまたは複数の変異を含む。いくつかの実施形態では、改変 I F N の受容体に対する結合親和性および / または生物活性は、標的化部分のその受容体に対する結合親和性および / または生物活性より低い。いくつかの実施形態では、この結合親和性および / または生物活性の差異は、同じ細胞上の改変 I F N / 受容体と標的化部分 / 受容体との間に存在する。いくつかの実施形態では、この結合親和性および / または生物活性の差異は、改変 I F N が、局在化されたオンターゲット効果を有し、さらに野生型 I F N で観察される副作用の根底にあるオフターゲット効果を最小化するのを可能にする。いくつかの実施形態では、この結合親和性および / または生物活性は、少なくとも約 2 倍、または少なくとも約 5 倍、または少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 15 倍低い、または少なくとも約 25 倍、または少なくとも約 50 倍低い、または少なくとも約 100 倍、または少なくとも約 150 倍低い。

10

## 【 0 1 8 2 】

受容体結合活性は、当該技術分野において既知の方法を使用して測定され得る。例えば、親和性および / または結合活性は、スキャッチャードプロット分析および結合データのコンピューターフィッティング (例えば、S c a t c h a r d , 1 9 4 9 ) または B r e c h t ら ( 1 9 9 3 ) により記載のように、フロースルー条件下で反射型干渉分光法により評価し得る。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 1 8 3 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質はコンセンサスインターフェロンである。コンセンサスインターフェロンは、いくつかのヒト非アレル I F N サブタイプの配列を走査し、それぞれ対応する位置で最も高頻度に観察されるアミノ酸を割り当てることにより、生成される。コンセンサスインターフェロンは、166 個のアミノ酸のうちの 20 個で I F N 2 b とは異なり (88 % 相同性)、I F N との比較は、30 % を超えるアミノ酸位置で同一性を示す。種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号 322 のアミノ酸配列を含む。

20

## 【 0 1 8 4 】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号 323 のアミノ酸配列を含み、これは、配列番号 322 のアミノ酸配列とは、1 つのアミノ酸だけ異なり、すなわち、配列番号 323 は、配列番号 322 の最初のメチオニン残基を欠いている。

30

## 【 0 1 8 5 】

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

## 【 0 1 8 6 】

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、米国特許第 4,695,623 号、同第 4,897,471 号、同第 5,541,293 号、および同第 8,496,921 号で開示されるコンセンサスインターフェロンバリエントから選択される。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例えば、コンセンサスインターフェロンバリエントは、米国特許第 4,695,623 号、同第 4,897,471 号、および同第 5,541,293 号で開示のような、I F N - C O N 2 または I F N C O N 3 のアミノ酸配列を含み得る。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、I F N - C O N 2 のアミノ酸配列、配列番号 324 を含む。

40

## 【 0 1 8 7 】

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエントは、I F N - C O N 3 のアミノ酸配列、配列番号 325 を含む。

## 【 0 1 8 8 】

50

ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、米国特許第 8,496,921 号で開示のバリエーションのうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。例えば、コンセンサスバリエーションは、配列番号 326 のアミノ酸配列を含み得る。

【0189】

別の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、配列番号 327 のアミノ酸配列を含み得る。

【0190】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、ペグ化され得、すなわち、PEG 部分を含む。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、配列番号 327 の S156C の位置で結合された PEG 部分を含み得る。

10

【0191】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変インターフェロンは、ヒト IFN 2a のバリエーションであり、配列番号 328 の配列の位置 41 の近傍への Asp の挿入により配列番号 329 が得られ（これは IFN 2a 配列に対する配列の再番号割当をもたらす）、次の変異 Arg23Lys、Leu26Pro、Glu53Gln、Thr54Ala、Pro56Ser、Asp86Glu、Ile104Thr、Gly106Glu、Thr110Glu、Lys117Asn、Arg125Lys、および Lys136Thr を有する。コンセンサスインターフェロンについて記載する本明細書の全ての実施形態は、同様に、この遺伝子改変インターフェロンに該当する。

【0192】

20

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

【0193】

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

【0194】

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

30

【0195】

種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、1 つまたは複数の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、変異はコンセンサスインターフェロンバリエーションが、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロン（例えば、配列番号 325 または 326 のアミノ酸配列を有するコンセンサスインターフェロン）に比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減された特定の生物活性のうちの 1 つまたは複数などの 1 つまたは複数の弱められた活性を有することを可能にする。例えば、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロンに比べて、低減された結合親和性、低減された内在性活性、および低減した特定の生物活性などの 1 つまたは複数の弱められた活性は、IFNAR などの治療受容体に対するものであり得る。結果として、種々の実施形態では、変異は、コンセンサスインターフェロンバリエーションが、非変異型、例えば、野生型のコンセンサスインターフェロンに比べて、低減された全身毒性、低減された副作用、および低減されたオフターゲット効果を有することを可能にす

40

50

る。

【 0 1 9 6 】

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

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、治療受容体に対する低減された親和性または活性は、標的化部分の結合により回復可能である。他の実施形態では、治療受容体に対する低減された親和性または活性は、標的化部分への結合により実質的に回復され得ない。種々の実施形態では、本発明の治療Fcベースキメラタンパク質は、コンセンサスインターフェロンバリエーションが、治療受容体に対する結合親和性または活性を弱める変異を有するという理由で、オフターゲット効果を低減させる。種々の実施形態では、これは、例えば、野生型コンセンサスインターフェロンで観察される副作用を低減する。種々の実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、治療作用部位へ向かう途上では実質的に不活性であり、特異的に標的とされる細胞型に対してその効果を実質的に有し、これにより望ましくない副作用を大きく低減する。

【 0 1 9 8 】

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

【 0 1 9 9 】

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

【 0 2 0 0 】

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

【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンバリエーションは、IFNAR2に対するその結合または親和性を低減する1つまたは複数の変異、およびIFNAR1に対する結合またはその親和性を実質的に低減または除去する1つまたは複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、このようなコンセンサスインターフェロンバリエーションを有するFcベースキメラタンパク質は、標的選択的IFNAR2活性を提供できる（例えば

10

20

30

40

50

、IFNAR2 活性は、標的化部分、例えば、SIRP を介する標的化により回復可能である）。

【0202】

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

10

【0203】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号326を基準にして、位置145～155、例えば、アミノ酸位置149、150および/または154に、1つまたは複数のアミノ酸の変異を有するように改変されている。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号326を基準にして、位置145～155、例えば、アミノ酸位置149、150および/または154に、1つまたは複数のアミノ酸の変異を有するように改変され、場合により、置換は疎水性であり、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンから選択される。いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロン変異体は、配列番号323を基準にして、M149A、R150A、およびL154Aから選択される1つまたは複数の変異を含む。

20

【0204】

いくつかの実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号323を基準にして、アミノ酸位置121（すなわち、K121）に変異を有するように改変されている。ある実施形態では、コンセンサスインターフェロンは、配列番号323を基準にして、K121E 変異を含む。

【0205】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）である。VEGF は、生理学的であるが病的でもある血管新生において重要な役割を果たし、血管透過性を調節し、VEGF 受容体を発現する細胞に対して成長因子として作用できる、強力な成長因子である。さらなる機能は、特に、マクロファージ系および内皮細胞の細胞遊走の刺激を含む。少なくとも3個の受容体（VEGFR1、VEGFR2 およびVEGFR3）に加えて、VEGF 成長因子ファミリーのいくつかのメンバーが存在する。VEGF ファミリーのメンバーは、2種以上のVEGFR タイプを結合し活性化できる。例えば、VEGF-A は、VEGFR1 およびVEGFR2 を結合し、一方、VEGF-C は、VEGFR2 およびVEGFR3 を結合できる。VEGFR1 およびVEGFR2 活性化は、血管新生を調節し、VEGFR3 活性化は、リンパ管新生に関与する。大部分の血管新生促進シグナルは、VEGFR2 の活性化から生成される。VEGFR1 活性化は、血管新生の負の役割と関連する可能性があることが報告された。VEGFR1 シグナル伝達は、腫瘍の骨髄由来VEGFR1 陽性細胞を介したインビガ進行にも重要である（骨中の転移前微小環境の形成の一因となる）ことも報告された。治療抗体を指向する/治療抗体を中和するVEGF-A をベースにしたいくつかの治療法が、主に、血管新生に依存する種々のヒト腫瘍の治療での使用のために開発されてきた。しかし、これらは、副作用がないわけではない。これは、これらが一般的な非細胞/組織特異的VEGF/VEGFR 相互作用阻害剤として作用することを考慮すると驚くべきことではない。従って、特定の標的細胞（例えば、腫瘍血管系内皮細胞）に対するVEGF（例えば、VEGF-A）/VEGFR2 阻害を制限することが望ましいであろう。

30

40

【0206】

いくつかの実施形態では、VEGF は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはVEGF-E およびVEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>121b</sub>、VEGF<sub>145</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>165b</sub>、VEGF<sub>189</sub>、およびVEGF<sub>206</sub>などの種

50

々の V E G F - A のアイソフォームを含むこれらのアイソフォームである。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) および / または V E G F R - 2 ( K D R / F l k - 1 ) に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) および / または V E G F R - 2 ( K D R / F l k - 1 ) に対する低減または除去された親和性および / または活性を有する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 2 ( K D R / F l k - 1 ) に対する低減された親和性および / または活性を有し、および / または V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) に対する低減または除去された親和性および / または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷治療方法または虚血関連疾患の治療で使用される ( 理論に束縛されることを意図するものではないが、内皮細胞機能および血管新生に対する V E G F R 2 の効果により媒介されて ) 。種々の実施形態では、癌および炎症促進性活性と関連する V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) への結合が回避される。種々の実施形態では、V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) は、デコイ受容体として機能し、そのため、この受容体に対する親和性を実質的に低減または除去し、治療薬の隔離を回避する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 1 ( F l t - 1 ) に対する低減または除去された親和性および / または活性を有し、および / または V E G F R - 2 ( K D R / F l k - 1 ) に対する低減または除去された親和性および / または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R 3 に対する低減された親和性および / または活性を有する。あるいは、改変シグナル伝達物質は、V E G F R 3 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

10

20

#### 【 0 2 0 7 】

血管新生促進治療法はまた、種々の疾患 ( 例えば、虚血性心疾患、出血など ) において重要であり、V E G F ベース治療薬を含む。V E G F R 2 の活性化は血管新生促進性である ( 内皮細胞上で作用する ) 。V E G F R 1 は、炎症細胞 ( 例えば、マクロファージを含む ) の遊走の刺激を生じ、血管過多透過性に関連する炎症をもたらす得る。V E G F R 1 の活性化はまた、腫瘍微小環境形成に関連する骨髄を活性化できる。従って、V E G F R 2 活性化に対し選択性がある V E G F ベース治療薬は、この場合には望ましいであろう。さらに、例えば、内皮細胞を特異的に標的とする細胞が望ましいであろう。

#### 【 0 2 0 8 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、V E G F R - 2 に対する低減された親和性および / または活性 ( 例えば、拮抗的な ) を有し、および / または V E G F R - 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。腫瘍内皮細胞マーカー ( 例えば、P S M A など ) に結合する標的化部分を介して腫瘍血管系内皮細胞を標的にする場合、このような構築物は、このようなマーカー陽性細胞上で特異的に V E G F R 2 活性化を阻害するが、標的細胞へ向かう途上および標的細胞上では ( 活性が除去された場合 ) V E G F R 1 を活性化せず、従って、例えば、炎症反応の誘導を無くする。これは、V E G F - A 中和療法に比べて、多くの腫瘍型に対するより選択的で安全な抗血管新生薬療法を提供することになる。

30

#### 【 0 2 0 9 】

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

40

#### 【 0 2 1 0 】

ある例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号 3 3 0 のアミノ酸を有する V E G F <sub>165</sub> である。

#### 【 0 2 1 1 】

50

別の例示的实施形態では、改変シグナル伝達物質は、配列番号 3 3 1 のアミノ酸配列を有する V E G F<sub>165b</sub> である。

【0 2 1 2】

これらの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸 I 8 3 に変異を有する（例えば、I 8 3 での置換変異、例えば、I 8 3 K、I 8 3 R、または I 8 3 H）。理論に束縛されることを意図するものではないが、このような変異は、低減された受容体結合親和性を生じ得ると考えられている。例えば、米国特許第 9, 0 7 8, 8 6 0 号を参照されたい。この全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0 2 1 3】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は T N F である。T N F は、細胞増殖、分化、アポトーシス、腫瘍形成、ウイルス複製、自己免疫、免疫細胞機能および輸送、炎症、ならびに敗血性ショックの調節を含む、多くの多様な機能を有する多面的サイトカインである。それは、標的細胞：T N F R 1 ( p 5 5 ) および T N F R 2 ( p 7 5 ) 上の 2 つの別々の膜受容体に結合する。T N F R 1 は非常に広範な発現パターンを示すが、T N F R 2 はリンパ球、T r e g、内皮細胞、特定のニューロン、ミクログリア、心筋細胞および間葉系幹細胞の特定の集団上で選択的に発現される。受容体活性化にตอบสนองして、全く別々の生物学的経路が活性化されるが、若干の重なり合いも存在する。一般原則として、理論に束縛されることを望むものではないが、T N F R 1 シグナル伝達はアポトーシス（細胞死）の誘導に関連し、T N F R 2 シグナル伝達は細胞生存シグナルの活性化に関連する（例えば、N F B 経路の活性化）。T N F の投与は、全身的毒性であり、これは主に T N F R 1 の関与のためである。しかし、T N F R 2 の活性化もまた、T N F R 1 と同様に、多様な作用に関連し、T N F 系治療薬の開発においては、T N F 標的化および活性に対する制御が重要であることに留意されたい。

【0 2 1 4】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T N F R 1 および / または T N F R 2 に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T N F R 1 および / または T N F R 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。T N F R 1 はほとんどの組織で発現され、かつ細胞死シグナル伝達に関与するが、対照的に、T N F R 2 は細胞生存シグナルに関与する。したがって、癌の治療法に関する実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T N F R 1 に対する低減された親和性および / または活性を有し、および / または T N F R 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。これらの実施形態では、キメラタンパク質は、アポトーシスが望ましい細胞、例えば、腫瘍細胞または腫瘍血管内皮細胞を標的にし得る。例えば、神経変性障害の治療のためのニューロン新生における、細胞生存を促進する方法に関する実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T N F R 2 に対する低減された親和性および / または活性および / または T N F R 1 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。言い方を変えれば、本キメラタンパク質は、いくつかの実施形態では、死シグナルまたは生存シグナルのどちらかを優先できる改変 T N F 物質を含む。

【0 2 1 5】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、T N F R 1 に対する低減された親和性および / または活性および / または T N F R 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する改変 T N F を有する。このようなキメラは、いくつかの実施形態では、野生型 T N F および / または T N F R 1 に対する低減された親和性および / または活性をもたらず変異のみを有するキメラに比べて、より強力なアポトーシスの誘導因子である。このようなキメラは、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞死または腫瘍血管内皮細胞死の誘導に使用される（例えば、癌の治療において）。また、いくつかの実施形態では、これらのキメラは、例えば、T N F R 2 を介して T r e g 細胞の活性化を回避または低減し、したがってインビボでの T N F R 1 介在性抗腫瘍活性をさらに支持する。

【0 2 1 6】

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

10

#### 【0217】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、例えば、TNFR2の活性化および/またはTNFR1の回避により（例えば、TNFR2に対する低減された親和性および/または活性を有し、および/またはTNFR1に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する改変TNFにより）自己反応性T細胞の死をもたらす。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの自己反応性T細胞は、NF- $\kappa$ B経路活性/シグナル伝達の変化により、変更されたアポトーシス/生存シグナルを有する。いくつかの実施形態では、キメラは、細胞死（アポトーシス）/生存シグナル特性の不均衡の根底にある、NF- $\kappa$ B経路での損傷または変更および、場合により特定の死誘導シグナルに対する変更された感受性（例えば、TNFR2活性化）を有する自己反応性T細胞の死をもたらす。

20

#### 【0218】

いくつかの実施形態では、TNFR2ベースキメラは、種々の自己免疫疾患、特に、心臓疾患、脱髄性および神経変性障害、および感染症を含む疾患に対する追加の治療用途を有する。

#### 【0219】

ある実施形態では、野生型TNF- $\alpha$ は、配列番号332のアミノ酸配列を有する。

#### 【0220】

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

30

#### 【0221】

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

40

50



115 Gから選択される変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、E146 K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、Y87 HおよびE146 K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、Y87 HおよびA145 R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、R32 WおよびS86 T変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、R32 WおよびE146 K変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、L29 SおよびR32 W変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、D143 NおよびA145 R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、D143 NおよびA145 R変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、A145 T、E146 D、およびS147 D変異を有する。ある実施形態では、ヒトTNF 部分は、A145 T、およびS147 D変異を有する。

10

#### 【0222】

いくつかの実施形態では、国際公開第2008/124086号に記載のように、改変TNF 物質は、N39 Y、S147 Y、およびY87 Hから選択される1つまたは複数の変異を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0223】

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

20

30

#### 【0224】

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

#### 【0225】

ある実施形態では、野生型TNF は、配列番号333のアミノ酸配列を有する。

#### 【0226】

このような実施形態では、改変可溶性物質は、1つまたは複数のアミノ酸位置106~113に変異を含み得、これが、TNFR2 に対する低減された受容体結合親和性を有する改変TNF をもたらす。ある実施形態では、改変可溶性物質は、アミノ酸位置106~113に1つまたは複数の置換変異を有する。例示的实施形態では、置換変異は、Q107 E、Q107 D、S106 E、S106 D、Q107 R、Q107 N、Q107 E/S106 E、Q107 E/S106 D、Q107 D/S106 E、およびQ107 D/S106 Dから選択される。別の実施形態では、改変可溶性物質は、位置106~113に、約1~約3個のアミノ酸の挿入を有する。

40

#### 【0227】

いくつかの実施形態では、国際公開第2015/007903号に記載のように、改変

50

物質は、TNFファミリーメンバー（例えば、TNF、TNF）であり、これは、単鎖トリマー型であり得る。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0228】

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

10

20

【0229】

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

30

【0230】

ある実施形態では、野生型TRAILは、配列番号334のアミノ酸配列を有する。

【0231】

このような実施形態では、改変TRAIL物質は、アミノ酸位置T127~R132、E144~R149、E155~H161、Y189~Y209、T214~I220、K224~A226、W231、E236~L239、E249~K251、T261~H264およびH270~E271に変異を含み得る（ジェンバンク受入番号NP\_003801、バージョン10NP\_003801.1、GI:4507593、ヒト配列に基づいてナンバリング；上記参照）。

【0232】

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

40

【0233】

いくつかの実施形態では、改変TRAIL物質は、TRAIL-R2に対するその親和

50

性および／または活性を実質的に低減する１つまたは複数の変異を含み得る。このような実施形態では、改変 T R A I L 物質は、T R I L - R 1 に特異的に結合し得る。代表的変異には、アミノ酸位置 G 1 3 1、R 1 4 9、S 1 5 9、N 1 9 9、K 2 0 1、および S 2 1 5 のうちの１つまたは複数の変異が挙げられる。例えば、変異は、G 1 3 1 R、R 1 4 9 I、S 1 5 9 R、N 1 9 9 R、K 2 0 1 H、および S 2 1 5 D のうちの１つまたは複数であり得る。ある実施形態では、改変 T R A I L 物質は、変異 G 1 3 1 R、R 1 4 9 I、S 1 5 9 R、N 1 9 9 R、K 2 0 1 H、および S 2 1 5 D を含む。さらなる T R A I L 変異は、例えば、T r e b i n g e t a l . , ( 2 0 1 4 ) C e l l D e a t h a n d D i s e a s e , 5 : e 1 0 3 5 に記載されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【 0 2 3 4 】

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

#### 【 0 2 3 5 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は T G F である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T G F B R 1 および／または T G F B R 2 に対する低減された親和性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T G F B R 1 および／または T G F B R 2 に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、場合により、T G F B R 3 に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有し、これは、理論に束縛されることを意図するものではないが、T G F ベータ受容体に対するリガンドのリザーバーとして作用し得る。いくつかの実施形態では、T G F は、T G F B R 2 よりも T G F B R 1 または T G F B R 1 よりも T G F B R 2 を選択する。同様に、理論に束縛されることを意図するものではないが、L A P は、T G F ベータ受容体に対するリガンドのリザーバーとして作用し得る。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、T G F B R 1 および／または T G F B R 2 に対する低減された親和性および／または活性および／または潜在関連ペプチド ( L A P ) に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、このようなキメラは、カムラチ・エンゲルマン病、または不適切な T G F シグナル伝達に関連する他の疾患において使用される。

20

30

#### 【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、改変物質は、T G F ファミリーメンバー ( 例えば、T G F 、 T G F ) であり、これは、T G F B R 1、T G F B R 2、T G F B R 3 のうちの１つまたは複数に対し、低減された親和性および／または活性、すなわち、アンタゴニスト活性 ( 例えば、天然のアンタゴニスト活性または１つまたは複数の変異の結果であるアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる ) を有する。これらの実施形態では、改変物質は、T G F ファミリーメンバー ( 例えば、T G F 、 T G F ) であり、これも同様に、場合により、T G F B R 1、T G F B R 2、T G F B R 3 のうちの１つまたは複数に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有する。

40

#### 【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、改変物質は、T G F ファミリーメンバー ( 例えば、T G F 、 T G F ) であり、これは、T G F B R 1 および／または T G F B R 2 に対して、低減された親和性および／または活性、すなわち、アンタゴニスト活性 ( 例えば、天然のアンタゴニスト活性または１つまたは複数の変異の結果であるアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる ) を有する。これらの実施形態では、改変物質は、T G F ファミリーメン

50

パー（例えば、 $TGF$ 、 $TGF$ ）であり、これも同様に、場合により、 $TGFBR3$ に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0238】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はインターロイキンである。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は $IL1$ である。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は $IL1$ または $IL1$ である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、 $IL1R1$ および/または $IL1RAP$ に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、 $IL1R1$ および/または $IL1RAP$ に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、 $IL1R2$ に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、 $IL1R2$ に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。例えば、いくつかの実施形態では、本改変 $IL1$ 物質は、 $IL1R2$ に対する相互作用を回避し、したがって、治療薬に対するデコイおよび/またはシンクとしてのその機能を実質的に低減する。

10

【0239】

ある実施形態では、野生型 $IL1$ は、配列番号335のアミノ酸配列を有する。

【0240】

$IL1$ は、炎症促進性のサイトカインであり、重要な免疫系制御因子である。それは、 $CD4$  T細胞応答の強力な活性化因子であり、 $Th17$ 細胞の比率を高め、 $IFN$ および $IL4$ 産生細胞の増殖を増大させる。 $IL1$ はまた、 $CD8^+$  T細胞の強力な制御因子であり、抗原特異的 $CD8^+$  T細胞増殖、分化、周辺部への移動および記憶を強化する。 $IL1$ 受容体は、 $IL1R1$ および $IL1R2$ を含む。 $IL1R1$ への結合および $IL1R1$ を介したシグナル伝達は、それにより $IL1$ が多くのその生物学的（および病理学的）作用を媒介する機序を構成する。 $IL1R2$ は、デコイ受容体として機能でき、それにより、 $IL1R1$ を介した相互作用およびシグナル伝達のための $IL1$ の利用可能性を減らす。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、改変 $IL1$ は、 $IL1R1$ に対する低減された親和性および/または活性（例えば、アゴニスト活性）を有する。いくつかの実施形態では、改変 $IL1$ は、 $IL1R2$ に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、回復可能な $IL1$ / $IL1R1$ シグナル伝達ならびに $IL1R2$ に対する治療用キメラの損失の防止およびその結果としての必要な $IL1$ 投与量の削減（例えば、野生型または $IL1R1$ に対する減弱化変異のみを有するキメラに比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を刺激して抗癌応答を開始することを含む、例えば、癌を治療する方法で使用される。

30

【0242】

いくつかの実施形態では、改変 $IL1$ は、 $IL1R1$ に対し、低減された親和性および/または活性（例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を有する。いくつかの実施形態では、改変 $IL1$ は、 $IL1R2$ に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、 $IL1$ / $IL1R1$ シグナル伝達は回復可能でなく、また、 $IL1R2$ に対する治療用キメラの損失の防止およびその結果として必要とされる $IL1$ 投与量の削減（例えば、野生型または $IL1R1$ に対する減弱化変異のみを有するキメラに比べて）がもたらされる。このような構築物は、例えば、免疫系を抑制することを含む、例えば、自己免疫疾患を治療する方法で使用される。

40

【0243】

このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸52～54の欠失を有し

50

、これは、I型IL1Rに対して、低減された結合親和性および低減された生物活性を有する改変ヒトIL1を産生する。例えば、国際公開第1994/000491号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL1は、A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Qから選択される1つまたは複数の置換変異（Xはアミノ酸の任意の変化、例えば、非保守的变化であり得る）を有し、これらは、例えば、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/007542号および国際公開第2015/007536号に記載のように、IL1Rに対し低減された結合を示す（ジェンバンク受入番号NP\_000567、バージョンNP\_000567.1、GI:10835145、ヒトIL1配列に基づいてナンバリング）。いくつかの実施形態では、改変ヒトIL1は、R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221SおよびE221Kから選択される1つまたは複数の変異を有し得る。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異Q131GおよびQ148Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異Q148GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびQ131Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびH146Aを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびH146Nを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびH146Rを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびH146Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびH146Gを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120GおよびK208Eを含む。ある実施形態では、改変ヒトIL1は、変異R120G、F162A、およびQ164Eを含む。

#### 【0244】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL2である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2Rおよび/またはIL2Rおよび/またはIL2Rに対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2Rおよび/またはIL2Rに対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL2Rに対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。このような実施形態は、例えば、改変IL2がIL2Rおよび/またはIL2Rに対し拮抗的である場合、癌の治療に適切であり得る。例えば、本発明の構築物は、IL2受容体および/またはを有するCD8<sup>+</sup>T細胞（抗腫瘍効果を与えることができる）の減弱化された活性化を優先し、IL2受容体、および/またはを有するTreg（免疫抑制効果、腫瘍促進効果を与えることができる）を優先しない。さらに、いくつかの実施形態では、IL2RよりもIL2Rおよび/またはIL2Rに対する選択性は、肺水腫などのIL2副作用を回避させる。また、IL2ベースキメラは、例えば、改変IL2が、IL2Rおよび/またはIL2Rに対してアンタゴニスト（例えば、天然のアンタゴニスト活性または1つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第2015/007520号を参照。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）である場合、自己免疫疾患の治療に有用である。例えば、本発明の構築物は、IL2受容体および/またはを有するCD8<sup>+</sup>T細胞の抑制の減弱化（したがって、免疫応答を抑制する）を優先し、IL2受容体、および/またはを有するTregを優先しない。あるいは、いくつかの実施形態では、IL2を有するキメラは、Tregの活性化、したがって

10

20

30

40

50

免疫抑制を優先し、 $CD8^+$  T細胞の活性化を優先しない。例えば、これらの構築物は、疾患または免疫抑制により恩恵を受けるとされる疾患、例えば、自己免疫障害の治療に使用される。

【0245】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、 $CD8^+$  T細胞を指向する本明細書に記載の標的化部分を有し、改変IL2物質は、IL2R および/またはIL2R に対する低減された親和性および/または活性および/またはIL2R に対し実質的に低減されたまたは除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、これらの構築物は、 $CD8^+$  T細胞活性を標的とし、通常、 $Treg$ 細胞に対して不活性である（または実質的に低減された活性を有する）。いくつかの実施形態では、このような構築物は、野生型IL2に比べて、高められた免疫刺激効果を有し（理論に束縛されることを望むものではないが、 $Treg$ を刺激しないことにより）、一方で、IL2に関連する全身毒性を除去または低減する。

10

【0246】

ある実施形態では、野生型IL2は、配列番号336のアミノ酸配列を有する。

【0247】

このような実施形態では、改変ヒトIL2物質は1つまたは複数の変異を、アミノ酸L72の位置（L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R、またはL72K）、F42の位置（F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、またはF42K）およびY45の位置（Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45RまたはY45K）に有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL2物質は、野生型IL2と比べて、高親和性IL2受容体に対して低減された親和性を有し、中間的親和性IL2受容体に対しては親和性をそのまま維持すると考えられる。例えば、米国特許出願公開第2012/0244112号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0248】

いくつかの実施形態では、改変IL2物質は、アミノ酸位置R38、F42、Y45、およびE62に1つまたは複数の変異を有する。例えば、改変IL2物質は、R38A、F42A、Y45A、およびE62Aのうちの1つまたは複数を含み得る。いくつかの実施形態では、改変IL2物質は、C125で変異を含み得る。例えば、C125Sであってよい。このような実施形態では、改変IL2物質は、例えば、Carmenate et al. (2013) The Journal of Immunology, 190: 6230-6238に記載されているように、IL2R に対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL2物質は、 $CD8^+$  T細胞およびNK細胞を含むが、 $Treg$ 細胞を含まない、エフェクター細胞の増殖を誘導できる。いくつかの実施形態では、R38、F42、Y45、および/またはE62に変異を有する改変IL2物質は、野生型IL2物質よりも少ない毒性である。IL2R に対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL2物質を含むキメラタンパク質は、例えば、腫瘍学において用途が見出され得る。

30

40

【0249】

他の実施形態では、改変IL2物質は、例えば、国際公開第2016/025385号に記載されているように、IL2R に対して実質的に低減された親和性および/または活性を有し得る。この全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、改変IL2物質は、 $Treg$ 細胞の増殖を誘導し得るが、 $CD8^+$  T細胞およびNK細胞などのエフェクター細胞の増殖を誘導し得ない。IL2R に対する実質的に低減された親和性および/または活性を有する改変IL2物質を含むキメラタンパク質は、例えば、自己免疫疾患の治療で用途が見出され得る。いくつかの実施形態では、改変I

50

L 2 物質は、アミノ酸位置 N 8 8、D 2 0、および / または A 1 2 6 に 1 つまたは複数の変異を有し得る。例えば、改変 I L 2 物質は、N 8 8 R、N 8 8 I、N 8 8 G、D 2 0 H、Q 1 2 6 L、および Q 1 2 6 F のうちの 1 つまたは複数を含み得る。

#### 【 0 2 5 0 】

種々の実施形態では、改変 I L 2 物質は、D 1 0 9 または C 1 2 5 に変異を含み得る。例えば、変異は、D 1 0 9 C または C 1 2 5 S であってよい。いくつかの実施形態では、D 1 0 9 または C 1 2 5 に変異を有する改変 I L 2 は、P E G 部分への結合のために利用され得る。

#### 【 0 2 5 1 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 3 である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 3 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有し、I L 3 受容体は共通のベータ (ベータ c または C D 1 3 1) サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 3 受容体に対して実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有し、I L 3 受容体は共通のベータ (ベータ c または C D 1 3 1) サブユニットと対になった特有のアルファ鎖を有するヘテロダイマーである。

#### 【 0 2 5 2 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 4 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1 型および / または 2 型 I L 4 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、1 型および / または 2 型 I L 4 受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。1 型 I L 4 受容体は、共通の鎖を有する I L 4 R サブユニットから構成され、I L 4 を特異的に結合する。2 型 I L 4 受容体は、I L 1 3 R 1 とし知られる異なるサブユニットに結合した I L 4 R サブユニットを含む。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、2 型 I L 4 受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

#### 【 0 2 5 3 】

ある実施形態では、野生型 I L 4 は、配列番号 3 3 7 のアミノ酸配列を有する。

#### 【 0 2 5 4 】

このような実施形態では、改変 I L 4 物質は、アミノ酸 R 1 2 1 (R 1 2 1 A、R 1 2 1 D、R 1 2 1 E、R 1 2 1 F、R 1 2 1 H、R 1 2 1 I、R 1 2 1 K、R 1 2 1 N、R 1 2 1 P、R 1 2 1 T、R 1 2 1 W)、E 1 2 2 (E 1 2 2 F)、Y 1 2 4 (Y 1 2 4 A、Y 1 2 4 Q、Y 1 2 4 R、Y 1 2 4 S、Y 1 2 4 T) および S 1 2 5 (S 1 2 5 A) に 1 つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変 I L 4 物質は、I 型受容体により媒介される活性を維持するが、その他の受容体により媒介される生物活性を顕著に低減すると考えられる。例えば、米国特許第 6, 4 3 3, 1 5 7 号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 2 5 5 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 6 である。I L 6 は、リガンド結合 I L 6 R 鎖 (C D 1 2 6) およびシグナル伝達成分 g p 1 3 0 を含む細胞表面 I 型サイトカイン受容体複合体を介して信号を伝達する。I L 6 はまた、可溶性型の I L 6 R (s I L 6 R) にも結合し得、これは、I L 6 R の細胞外の部分である。s I L 6 R / I L 6 複合体は、神経突起の成長およびニューロンの生存に関与し、したがって、再ミエリン化による神経再生に重要であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 6 R / g p 1 3 0 および / または s I L 6 R に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I L 6 R / g p 1 3 0 および / または s I L 6 R に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

#### 【 0 2 5 6 】

ある実施形態では、野生型 I L 6 は、I L 6 (成熟型、野生型) (配列番号 3 3 8) の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を有する。

【0257】

このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、アミノ酸58、160、163、171または177に1つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL6物質は、IL6R に対し低減された結合親和性および低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第97/10338号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0258】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL10である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL10受容体1およびIL10受容体2に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL10受容体1およびIL10受容体2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

10

【0259】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL11である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL11R および/またはIL11R および/またはgp130に対する低減された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL11R および/またはIL11R および/またはgp130に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0260】

20

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL12である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL12R 1および/またはIL12R 2に対する低減された親和性および/または活性を有する。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL12R 1および/またはIL12R 2に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0261】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL13である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL4受容体(IL4R )およびIL13R 1に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL4受容体(IL4R )またはIL13R 1に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

30

【0262】

ある実施形態では、野生型IL13は、IL13(成熟型、野生型)(配列番号339)のアミノ酸配列を有する。

【0263】

このような実施形態では、改変IL13物質は、アミノ酸13、16、17、66、69、99、102、104、105、106、107、108、109、112、113および114に1つまたは複数の変異を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、これらの改変IL13物質は、低減された生物活性を示すと考えられている。例えば、国際公開第2002/018422号を参照されたい。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0264】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質はIL18である。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL18R および/またはIL18R に対する低減された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IL18R および/またはIL18R に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、シグナル伝達に必要なTIRドメインを欠くIL18R のアイソフォームであるIL18R 2型に対する実質的に低減または除去された親和性および/または活性を有する。

【0265】

50



ある実施形態では、野生型 I L 1 8 は、I L 1 8 (野生型) (配列番号 3 4 0) のアミノ酸配列を有する。

【0266】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 4 2 号に記載のように、改変 I L 1 8 物質は、Y 3 7 ~ K 4 4、R 4 9 ~ Q 5 4、D 5 9 ~ R 6 3、E 6 7 ~ C 7 4、R 8 0、M 8 7 ~ A 9 7、N 1 2 7 ~ K 1 2 9、Q 1 3 9 ~ M 1 4 9、K 1 6 5 ~ K 1 7 1、R 1 8 3 および Q 1 9 0 ~ N 1 9 1 から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に 1 つまたは複数の変異を含み得る (ジェンバンク受入番号 A A V 3 8 6 9 7、バージョン A A V 3 8 6 9 7 . 1、G I : 5 4 6 9 6 6 5 0、ヒト I L 1 8 配列に基づいてナンバリング)。

10

【0267】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I L 3 3 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、S T 2 受容体 1 および I L 1 R A c P に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、S T 2 受容体および I L 1 R A c P に対する実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。

【0268】

ある実施形態では、野生型 I L 3 3 は、配列番号 3 4 1 のアミノ酸配列を有する。

【0269】

このような実施形態では、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 4 2 号に記載のように、改変 I L 3 3 物質は、I 1 1 3 ~ Y 1 2 2、S 1 2 7 ~ E 1 3 9、E 1 4 4 ~ D 1 5 7、Y 1 6 3 ~ M 1 8 3、E 2 0 0、Q 2 1 5、L 2 2 0 ~ C 2 2 7 および T 2 6 0 ~ E 2 6 9 から選択されるアミノ酸またはアミノ酸領域に 1 つまたは複数の変異を含み得る (ジェンバンク受入番号 N P \_ 2 5 4 2 7 4、バージョン 2 5 4 2 7 4 . 1、G I : 1 5 5 5 9 2 0 9、ヒト配列に基づいてナンバリング)。

20

【0270】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は上皮増殖因子 (E G F) である。E G F は、強力な成長因子のファミリーである。メンバーは、E G F、H B - E G F、および T G F、アンフィレギュリン、ニューレグリン、エピレギュリン、ベータセルリンなどの他のものを含む。E G F ファミリー受容体は、E G F R (E r b B 1)、E r b B 2、E r b B 3 および E r b B 4 を含む。これらは、ホモダイマーおよび / またはヘテロダイマー受容体サブタイプとして機能し得る。異なる E G F ファミリーメンバーは、種々の受容体サブタイプに対して、他と異なる選択性を示す。例えば、E G F は、E r b B 1 / E r b B 1、E r b B 1 / E r b B 2、E r b B 4 / E r b B 2 およびいくつかの他のヘテロダイマーサブタイプと結合する。H B - E G F は、類似のパターンを有するが、E r b B 4 / 4 と結合する。E G F (E G F 様) 増殖因子シグナル伝達の正または負方向への調節は、大きな治療上の観点から関心がもたれている。例えば、E G F R シグナル伝達の阻害は、E G F R シグナル伝達が主要な成長促進シグナルを構成する種々の癌の治療で関心がもたれている。あるいは、E G F R シグナル伝達の刺激は、例えば、創傷治癒 (急性および慢性)、口腔粘膜炎症 (限定されないが、放射線療法を含む種々の癌療法の主要な副作用) における治療上の観点から関心が持たれている。

30

40

【0271】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および / または E r b B 4 に対する低減された親和性および / または活性を有する。このような実施形態は、例えば、創傷の治療方法で使用される。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および E r b B 4 のうちの 1 つまたは複数に結合し、その受容体の活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1、E r b B 2、E r b B 3、および / または E r b B 4 に対する低減された親和性および / または活性を有し、これにより、その受容体の活性が、弱められる様式でアンタゴナイズされる。このような実施形態は、

50

例えば、癌の治療で使用される。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1 に対する低減された親和性および / または活性を有する。E r b B 1 は、キナーゼ阻害剤の治療標的であるが - 大抵の場合、副作用があり、その理由は、それらがあまり選択的でないためである (例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、プリガチニブおよびイコチニブ)。いくつかの実施形態では、弱められた拮抗的 E r b B 1 シグナル伝達は、E G F の受容体を標的とする他の物質より、オンターゲットであり、少ない副作用を有する。

#### 【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、E r b B 1 に対し、低減された親和性および / または活性 (例えば、アンタゴニスト活性、例えば、天然のアンタゴニスト活性または 1 つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照、この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる) および / または E r b B 4 またはそれが相互作用し得る他のサブタイプに対し実質的に低減または除去された親和性および / または活性を有する。標的化部分を介した特異的標的化により、E r b B 1 / E r b B 1 受容体活性化の細胞選択的抑制 (アンタゴニズム、例えば、天然のアンタゴニスト活性または 1 つまたは複数の変異の結果としてのアンタゴニスト活性、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 0 0 7 5 2 0 号を参照、この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる) が達成されるであろう - 阻害関連副作用に関連する可能性のある他の受容体サブタイプを関与させず。従って、身体中の全ての細胞型の E G F R 活性を阻害する E G F R キナーゼ阻害剤と対照的に、このような構築物は、副作用の低減された細胞選択的 (例えば、受容体の増幅、過剰発現などによる活性化 E G F R シグナル伝達を有する腫瘍細胞) 抗 E G F R (E r b B 1) 薬物作用を提供するであろう。

#### 【 0 2 7 3 】

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

#### 【 0 2 7 4 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリンまたはインスリン類似体である。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインスリン類似体は、インスリン受容体および / または I G F 1 または I G F 2 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変インスリンまたはインスリン類似体は、インスリン受容体および / または I G F 1 または I G F 2 受容体に対する低減または除去された親和性および / または活性を有する。インスリン受容体に対する弱められた応答は、糖尿病、肥満症、代謝障害などの制御を可能にし、同時に、I G F 1 または I G F 2 受容体から離すことにより、癌促進性作用を回避する。

#### 【 0 2 7 5 】

ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン様増殖因子 - I またはインスリン様増殖因子 - I I (I G F 1 または I G F 2) である。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は I G F 1 である。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン受容体および / または I G F 1 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有する。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に結合し、受容体の活性をアンタゴナイズする。このような実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に対する低減された親和性および / または活性を有し、これにより、受容体の活性が、弱められる形式でアンタゴナイズされることを可能にする。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、I G F 1 受容体に対する実質的に低減または除去

された親和性および／または活性を有する。いくつかの実施形態では、改変シグナル伝達物質は、IGF2受容体に対する低減された親和性および／または活性を有し、これにより、受容体の活性が、弱められる形式でアンタゴナイズされることを可能にする。ある実施形態では、改変シグナル伝達物質は、インスリン受容体に対する実質的に低減または除去された親和性および／または活性を有し、したがって、インスリンシグナル伝達を妨げない。種々の実施形態では、これは、癌治療に適用される。種々の実施形態では、本物質は、IRアイソフォームAが癌治療に対し耐性を生じるのを防止し得る。

#### 【0276】

一実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載のうちのいずれかの改変または変異シグナル伝達物質と共に、(i)PD-1またはPD-L1に対する標的化部分および(ii)腫瘍細胞を指向する標的化部分を有する。

10

#### 【0277】

一実施形態では、本キメラタンパク質は、本明細書に記載のうちのいずれかの改変または変異インターフェロンと共に、(i)PD-1またはPD-L1に対する標的化部分および(ii)チェックポイント阻害剤マーカーを指向する標的化部分を有する。

#### 【0278】

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

20

#### 【0279】

シグナル伝達物質との多重特異的キメラおよび融合体

種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、本明細書に記載の1種類または複数種類のシグナル伝達物質および／または1つまたは複数の追加の標的化部分のキメラまたは融合体の一部である。したがって、本発明は、例えば、1種類または複数種類のシグナル伝達物質およびPD-1またはPD-L1に対する標的化部分および／または1つまたは複数の追加の標的化部分を含むキメラまたは融合タンパク質を提供する。

30

#### 【0280】

種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、多重特異的であり、すなわち、PD-1またはPD-L1結合物質は、2つ以上の標的、例えば、抗原、または受容体、またはエピトープを認識して結合する認識ドメインを有する2つ以上の標的化部分を有する。このような実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、同じ抗原上または異なる抗原上の2個以上のエピトープを認識して結合する認識ドメインを有する2つ以上の標的化部分を含み得る。種々の実施形態では、このような多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、向上した結合力および／または改善された選択性などの有利な性質を示す。ある実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、2つの標的化部分を含み、二重特異性であり、すなわち、同じ抗原上または異なる抗原上の2個のエピトープに結合し、それを認識する。

40

#### 【0281】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、それぞれの標的化部分が本明細書に記載の抗体または抗体誘導体である2つ以上の標的化部分を含む。ある実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、

50

P D - 1 または P D - L 1 に対する抗原認識ドメインを含む少なくとも 1 種類の V H H および腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを含む 1 種類の抗体または抗体誘導体を含む。

【 0 2 8 2 】

種々の実施形態では、本多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、異なる抗原または受容体を標的とする 2 つ以上の標的化部分を有し、1 つの標的化部分は、その抗原または受容体に対し減弱化され得、例えば、標的化部分はその抗原または受容体を低親和性または結合力で結合する（例えば、その他の標的化部分がその抗原または受容体に対して有する親和性または結合力より低い親和性または結合力で結合することを含み、例えば、結合親和性の間の差異は、約 1 0 倍、または 2 5 倍、または 5 0 倍、または 1 0 0 倍、または 3 0 0 倍、または 5 0 0 倍、または 1 0 0 0 倍、または 5 0 0 0 倍であってよく；例えば、より低い親和性または結合力の標的化部分はその抗原または受容体に中～高 n M または低～中 μ M の範囲の  $K_D$  で結合し得るが、より高い親和性または結合力の標的化部分は、中～高 p M または低～中 n M の範囲の  $K_D$  で結合し得る）。例えば、いくつかの実施形態では、本多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、無差別の抗原または受容体を指向する減弱化標的化部分を含み、これは、目的の細胞に対する標的化を改善し（例えば、その他の標的化部分を介して）かつ治療用の標的にされないものを含む、複数細胞型間にまたがる効果を防止し得る（例えば、これらの実施形態で与えられるものより高い親和性で無差別の抗原または受容体に結合することによる）。

【 0 2 8 3 】

本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、当該技術分野において既知の方法を使用して構築し得る。例えば、米国特許第 9 , 0 6 7 , 9 9 1 号、米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 2 6 2 3 4 8 号および国際公開第 2 0 0 4 / 0 4 1 8 6 2 号を参照されたい。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、2 つ以上の標的化部分を含む本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、例えば、アミノ酸残基と、全内容が参照により本明細書に組み込まれる、B l a t t l e r e t a l . , B i o c h e m i s t r y 2 4 , 1 5 1 7 - 1 5 2 4 および欧州特許第 2 9 4 7 0 3 号に記載のような有機誘導体化試薬とを反応させることにより、化学架橋により構築され得る。別の例示的实施形態では、2 つ以上の標的化部分を含む多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、遺伝子融合、すなわち、個別の標的化部分のポリペプチドを含む単一ポリペプチドを構築することにより、構築される。例えば、P D - 1 または P D - L 1 に対する抗原認識ドメインを有する第 1 の V H H および腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを有する第 2 の抗体または抗体誘導体をコードする、単一ポリペプチド構築物を形成し得る。二価または多価性の V H H ポリペプチド構築物を産生する方法は、国際公開第 9 6 / 3 4 1 0 3 号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。さらなる例示的实施形態では、本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、リンカーを用いて構築され得る。例えば、P D - 1 または P D - L 1 に対する抗原認識ドメインを有する第 1 の V H H のカルボキシ末端を、腫瘍抗原に対する抗原認識ドメインを有する第 2 の抗体または抗体誘導体のアミノ末端に連結され得る（または逆もまた同様）。使用し得る代表的リンカーは、本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質の成分は、リンカーを使用せずに、相互に直接連結される。

【 0 2 8 4 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、P D - 1 または P D - L 1 および 1 つまたは複数の免疫細胞上に見つけた 1 つまたは複数の抗原を認識して、それらに結合する。免疫細胞には、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、T リンパ球（例えば、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパー T 細胞）、B リンパ球、プラズマ細胞、樹状細胞、またはこれらのサブセットを含め得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、目的の抗原に特異的に結合し、直接または間接的に 1 つまたは複数の免疫細胞を効果的に動員する。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 8 5 】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、P D - 1 または P D - L 1 および腫瘍細胞上に見つけた 1 つまたは複数の抗原を認識して、それらに結合する。これらの実施形態では、本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、免疫細胞を直接的にまたは間接的に腫瘍細胞にまたは腫瘍微小環境に動員し得る。いくつかの実施形態では、本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、免疫細胞、例えば、腫瘍を死滅させるおおよび / または抑制することができる免疫細胞（例えば、C T L）を、作用部位（非限定的例であるが、腫瘍微小環境など）に直接的にまたは間接的に動員し得る。

## 【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態では、本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、腫瘍の免疫攻撃に有利なように免疫細胞のバランスを変化させることができ、または免疫細胞のバランスを変化させることを含む方法において使用される。例えば、本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、臨床的に重要な部位の免疫細胞の比率を、腫瘍を死滅させるおおよび / または抑制することができる細胞（例えば、T 細胞、細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパー T 細胞、ナチュラルキラー（N K）細胞、ナチュラルキラー ナチュラルキラー T（N K T）細胞、抗腫瘍マクロファージ（例えば、M 1 マクロファージ）、好中球、B 細胞、樹状細胞またはこれらのサブセット）に有利なように、おおよび腫瘍を保護する細胞（例えば、骨髄由来サプレッサー細胞（M D S C）、制御性 T 細胞（T r e g）；腫瘍関連好中球（T A N）、M 2 マクロファージ、腫瘍関連マクロファージ（T A M）、またはこれらのサブセット）に不利なように変化させることができる。いくつかの実施形態では、本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、エフェクター T 細胞の制御性 T 細胞に対する比率を高めることができる。

## 【 0 2 8 7 】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、腫瘍細胞関連抗原に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、腫瘍細胞を直接または間接的に動員する。例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の動員は、腫瘍細胞を死滅させることができるおおよび / または抑制できる 1 つまたは複数のエフェクター細胞（例えば、本明細書に記載の免疫細胞）に対するものである。いくつかの実施形態では、標的化部分は、腫瘍おおよび C D 8 陽性免疫細胞（例えば、T 細胞）上で、それらのそれぞれの抗原と相互作用する 2 つの標的化部分によって、T 細胞を腫瘍細胞に直接または間接的に動員する。

## 【 0 2 8 8 】

腫瘍細胞、または癌細胞は、身体の器官およびシステムの正常な機能動作を妨害する、細胞または組織の無制御な増殖および / または細胞生存の異常な増大および / またはアポトーシスの抑制の異常な増大を指す。例えば、腫瘍細胞は、良性および悪性の癌、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移を含む。腫瘍細胞の例としては、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌（胃腸癌を含む）、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎臓癌（k i d n e y o r r e n a l c a n c e r）、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌（唇、舌状、舌、口内、および咽頭）、卵巣癌、睪臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびに B 細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫（N H L）を含む）、小リンパ球性（S L）N H L、中悪性度 / 濾胞性 N H L、中悪性度びまん性 N H L、高悪性度免疫芽細胞 N H L、高悪性度リンパ芽球性 N H L、高悪性度小型非切れ込み核細胞性 N H L、巨大腫瘍病変 N H L、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブ

10

20

30

40

50

リン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびにその他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群と関連する異常血管増殖の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0289】

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

10

【0290】

腫瘍抗原の例としては、MART-1/Melan-A、gp100、ジベプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、シクロフィリンb、結腸直腸関連性抗原（CRC）-0017-1A/GA733、癌胎児抗原（CEA）およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異抗原（PSA）およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、MAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、GAGEファミリーの腫瘍抗原（例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 $\alpha$ -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニンおよび $\gamma$ -カテニン、p120ctn、gp100、Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質（APC）、フォドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産物、Smadファミリーの腫瘍抗原、lmp-1、NA、EBV-コード化核内抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、c-erbB-2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、PD-L2、PMSA、およびBCMA（TNFRSF17）が挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの腫瘍抗原を結合する標的化部分を含む。

20

30

40

【0291】

いくつかの実施形態では、存在する多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、腫瘍細胞上のPD-1またはPD-L1ならびに抗原を認識し、それに結合する。

【0292】

種々の実施形態では、本多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、2個の異なる細胞（例えば、シナプスを作るために）または同じ細胞（例えば、より高濃度のシグナル伝達物質効果を得るために）を標的とする標的化部分を有する。

【0293】

50

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、T細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、直接または間接的にT細胞を動員する。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、エフェクターT細胞に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、エフェクターT細胞を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に直接または間接的に動員する。エフェクターT細胞の例としては、細胞傷害性T細胞（例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>）；CD4<sup>+</sup>エフェクターT細胞（例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD62Lhi、IL7R/CD127<sup>+</sup>）；CD8<sup>+</sup>エフェクターT細胞（例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD62Lhi、IL7R/CD127<sup>+</sup>）；エフェクターメモリーT細胞（例えば、CD62Llow、CD44<sup>+</sup>、TCR、CD3<sup>+</sup>、IL7R/CD127<sup>+</sup>、IL15R<sup>+</sup>、CCR7low）；セントラルメモリーT細胞（例えば、CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>；またはCCR7hi、CD44<sup>+</sup>、CD62Lhi、TCR、CD3<sup>+</sup>、IL7R/CD127<sup>+</sup>、IL15R<sup>+</sup>）；CD62L<sup>+</sup>エフェクターT細胞；早期エフェクターメモリーT細胞（CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>）および後期エフェクターメモリーT細胞（CD27<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>）（それぞれ、TemEおよびTemL）を含むCD8<sup>+</sup>エフェクターメモリーT細胞（TEM）；CD127<sup>+</sup>CD25<sup>（low/-）</sup>エフェクターT細胞；CD127<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクターT細胞；CD8<sup>+</sup>幹細胞メモリーエフェクター細胞（TSCM）（例えば、CD44<sup>（low）</sup>CD62L<sup>（high）</sup>CD122<sup>（high）</sup>sca<sup>（+）</sup>）；TH1エフェクターT細胞（例えば、CXCR3<sup>+</sup>、CXCR6<sup>+</sup>およびCCR5<sup>+</sup>；またはTCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL12R<sup>+</sup>、IFN<sup>+</sup>、CXCR3<sup>+</sup>）；TH2エフェクターT細胞（例えば、CCR3<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>およびCCR8<sup>+</sup>；またはTCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL4R<sup>+</sup>、IL33R<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>、IL17RB<sup>+</sup>、CRTH2<sup>+</sup>）；TH9エフェクターT細胞（例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>）；TH17エフェクターT細胞（例えば、TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL23R<sup>+</sup>、CCR6<sup>+</sup>、IL1R<sup>+</sup>）；CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>エフェクターT細胞、ICOS<sup>+</sup>エフェクターT細胞；CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>エフェクターT細胞；およびIL2、IL4および/またはIFN- $\gamma$ を分泌するエフェクターT細胞が挙げられる。

#### 【0294】

目的とするT細胞抗原の例としては、例えば、下記が挙げられる（該当する場合には、細胞外ドメインも含む）：CD8、CD3、SLAMF4、IL2R $\alpha$ 、4-1BB/TNFRSF9、IL2R $\beta$ 、ALCAM、B7-1、IL4R、B7-H3、BLAME/SLAMFS、CEACAM1、IL6R、CCR3、IL7R、CCR4、CXCR1/ILSRA、CCR5、CCR6、IL10R、CCR7、IL10R、CCRS、IL12R $\alpha$ 1、CCR9、IL12R $\alpha$ 2、CD2、IL13R $\alpha$ 1、IL13、CD3、CD4、ILT2/CDS5j、ILT3/CDS5k、ILT4/CDS5d、ILT5/CDS5a、Integrin $\alpha$ 4/CD49d、CDS、インテグリン $\alpha$ E/CD103、CD6、インテグリン $\alpha$ M/CD11b、CDS、インテグリン $\alpha$ X/CD11c、インテグリン $\alpha$ 2/CD15、KIR/CD15S、CD27/TNFRSF7、KIR2DL1、CD25、KIR2DL3、CD30/TNFRSF5、KIR2DL4/CD15Sd、CD31/PECAM-1、KIR2DS4、CD40リガンド/TNFSF5、LAG-3、CD43、LAIR1、CD45、LAIR2、CDS3、ロイコトリエンB4-R1、CDS4/SLAMF5、NCAM-L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229/SLAMF3、NKG2D、CD2F-10/SLAMF9、NT-4、CD69、NTB-A/SLAMF6、共通鎖/IL2R $\beta$ 、オステオポンチン、CRACC/SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK/TNFRSF11A、CX3CR1、CX3C

10

20

30

40

50

L1、L-セレクチン、CXCR3、SIRP1、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCCR/WSX-1、DNAM-1、サイモポエチン、EMMPRIN/CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas/TNFRSF6、TIM-3、Fasリガンド/TNFRSF6、TIM-4、FcRIII/CD16、TIM-6、TNFR1/TNFRSF1A、グラニューライシン、TNFRIII/TNFRSF1B、TRAILR1/TNFRSF10A、ICAM-1/CD54、TRAILR2/TNFRSF10B、ICAM-2/CD102、TRAILR3/TNFRSF10C、IFN- $\gamma$ R1、TRAILR4/TNFRSF10D、IFN- $\gamma$ R2、TSLP、IL1R1およびTSLPR。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示的T細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

10

**【0295】**

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDRを有する単一アミノ酸鎖を含むVHHであるCD8に対する標的化部分を含む。本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置する可変ドメイン中の領域を意味する。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可変領域を指す。

**【0296】**

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、CDR1、CDR2、および/またはCDR3配列のうちの少なくとも1つを含む可変ドメインを有するCD8に対するVHHを含む。

20

**【0297】**

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号342または配列番号343から選択される。

**【0298】**

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号344または配列番号345から選択される。

**【0299】**

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号346または配列番号347または配列番号348から選択される。

30

**【0300】**

種々の実施形態では、CD8標的化部分は、次の配列：R3HCD27（配列番号349）またはR3HCD129（配列番号350）またはR2HCD26（配列番号351）から選択されるアミノ酸配列を含む。

**【0301】**

種々の実施形態では、CD8標的化部分は、後述のようにCDR1、CDR2、および/またはCDR3配列のうちの少なくとも1つを含む可変ドメインを有するVHHを含む。

**【0302】**

いくつかの実施形態では、CDR1配列は、配列番号352～配列番号420から選択される。

40

**【0303】**

いくつかの実施形態では、CDR2配列は、配列番号421～配列番号489から選択される。

**【0304】**

いくつかの実施形態では、CDR3配列は、配列番号490～配列番号558から選択される。

**【0305】**

種々の実施形態では、CD8標的化部分は、1CDA7（配列番号559）または1CDA12（配列番号560）または1CDA14（配列番号561）または1CDA15

50



(配列番号 562) または 1CDA17 (配列番号 563) または 1CDA18 (配列番号 564) または 1CDA19 (配列番号 565) または 1CDA24 (配列番号 566) または 1CDA26 (配列番号 567) または 1CDA28 (配列番号 568) または 1CDA37 (配列番号 569) または 1CDA43 (配列番号 570) または 1CDA45 (配列番号 571) または 1CDA47 (配列番号 572) または 1CDA48 (配列番号 573) または 1CDA58 (配列番号 574) または 1CDA65 (配列番号 575) または 1CDA68 (配列番号 576) または 1CDA73 (配列番号 577) または 1CDA75 (配列番号 578) または 1CDA86 (配列番号 579) または 1CDA87 (配列番号 580) または 1CDA88 (配列番号 581) または 1CDA89 (配列番号 582) または 1CDA92 (配列番号 583) または 1CDA93 (配列番号 584) または 2CDA1 (配列番号 585) または 2CDA5 (配列番号 586) または 2CDA22 (配列番号 587) または 2CDA28 (配列番号 588) または 2CDA62 (配列番号 589) または 2CDA68 (配列番号 590) または 2CDA73 (配列番号 591) または 2CDA74 (配列番号 592) または 2CDA75 (配列番号 593) または 2CDA77 (配列番号 594) または 2CDA81 (配列番号 595) または 2CDA87 (配列番号 596) または 2CDA88 (配列番号 597) または 2CDA89 (配列番号 598) または 2CDA91 (配列番号 599) または 2CDA92 (配列番号 600) または 2CDA93 (配列番号 601) または 2CDA94 (配列番号 602) または 2CDA95 (配列番号 603) または 3CDA3 (配列番号 604) または 3CDA8 (配列番号 605) または 3CDA11 (配列番号 606) または 3CDA18 (配列番号 607) または 3CDA19 (配列番号 608) または 3CDA21 (配列番号 609) または 3CDA24 (配列番号 610) または 3CDA28 (配列番号 611) または 3CDA29 (配列番号 612) または 3CDA31 (配列番号 613) または 3CDA32 (配列番号 614) または 3CDA33 (配列番号 615) または 3CDA37 (配列番号 616) または 3CDA40 (配列番号 617) または 3CDA41 (配列番号 618) または 3CDA48 (配列番号 619) または 3CDA57 (配列番号 620) または 3CDA65 (配列番号 621) または 3CDA70 (配列番号 622) または 3CDA73 (配列番号 623) または 3CDA83 (配列番号 624) または 3CDA86 (配列番号 625) または 3CDA88 (配列番号 626) または 3CDA90 (配列番号 627) から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

#### 【0306】

種々の代表的実施形態では、CD8 標的化部分は、末端ヒスチジンタグ配列 (すなわち、HHHHHH; 配列番号 84) を含まない上記配列のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0307】

いくつかの実施形態では、CD8 標的化部分は、HA タグ (すなわち、YPYDVPDYGS; 配列番号 85) を含まない配列番号 559 ~ 627 (上記で提供) から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0308】

いくつかの実施形態では、CD8 標的化部分は、AAA リンカーを含まない配列番号 559 ~ 627 (上記で提供) から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

#### 【0309】

いくつかの実施形態では、CD8 標的化部分は、AAA リンカー、HA タグ、および末端ヒスチジンタグ配列 (すなわち、AAAYPYDVPDYGSHHHHHHH; 配列番号 86) を含まない配列番号 559 ~ 627 (上記で提供) から選択されるアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、CD8 標的化部分は、米国特許出願公開第 2014/0271462 号に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。種々の実施形態では、CD8 標的化部分は、米国特許出願公開第 2014/0271462 号の表 0.1、表 0.2、表 0.3、および/または図 1A ~ 12I に記載のアミノ酸配列を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。種

50

々の実施形態では、CD8 標的化部分は、配列番号 628、配列番号 629、または配列番号 630 で提供される、配列番号 22 または 23 の HCDR1 の HCDR1 および / または配列番号 22 または 23 の HCDR1 の HCDR2 および / または配列番号 22 または 23 の HCDR1 の HCDR3 および / または配列番号 24 の LCDR1 の LCDR1 および / または配列番号 24 の LCDR1 の LCDR2 および / または配列番号 24 の LCDR1 の LCDR3 を含む。

#### 【0310】

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明の CD8 を指向する標的化部分の任意の天然または合成類似体、変異体、パリアント、アレル、同族体およびオースログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、CD8 を指向する標的化部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

#### 【0311】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 PD-1 または PD-L1 結合物質は、B 細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1 つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的に B 細胞を動員する。目的の B 細胞抗原の例としては、例えば、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD70、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138、CDw150、および B 細胞成熟抗原（BCMA）が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1 または PD-L1 結合物質は、1 つまたは複数のこれらの例示的 B 細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

#### 【0312】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的 PD-1 または PD-L1 結合物質は、ナチュラルキラー細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー細胞を、治療部位（例えば、1 つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）へ直接または間接的に動員する。目的のナチュラルキラー細胞抗原の例としては、例えば、TIGIT、2B4/SLAMF4、KIR2DS4、CD155/PVR、KIR3DL1、CD94、LMIR1/CD300A、CD69、LMIR2/CD300c、CRACC/SLAMF7、LMIR3/CD300LF、Kir1alpha、DNAM-1、LMIR5/CD300LB、Fc-イプシロンRII、LMIR6/CD300LE、Fc-R1/CD64、MICA、Fc-RIIB/CD32b、MICB、Fc-RIIC/CD32c、MULT-1、Fc-RIIA/CD32a、Nectin-2/CD112、Fc-RIII/CD16、NKG2A、FcRH1/IRTA5、NKG2C、FcRH2/IRTA4、NKG2D、FcRH4/IRTA1、NKp30、FcRH5/IRTA2、NKp44、Fc-受容体様3/CD16-2、NKp46/NCR1、NKp80/KLRF1、NTB-A/SLAMF6、Rae-1、Rae-1、Rae-1、H60、Rae-1、ILT2/CD85j、Rae-1、ILT3/CD85k、TREM-1、ILT4/CD85d、TREM-2、ILT5/CD85a、TREM-3、KIR/CD158、TREML1/TLT-1、KIR2DL1、ULBP-1、KIR2DL3、ULBP-2、KIR2DL4/CD158d および ULBP-3 が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1 または PD-L1 結合物質は、1 つまたは複数のこれらの例示的 NK 細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

#### 【0313】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、マクロファージ/単球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、マクロファージ/単球を直接または間接的に、治療部位（例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に動員する。目的のマクロファージ/単球抗原の例としては、例えば、SIRP1a、B7-1/CD80、ILT4/CD85d、B7-H1、ILT5/CD85a、共通鎖、インテグリン 4/CD49d、BLAME/SLAMF8、インテグリン X/CD11c、CCL6/C10、インテグリン 2/CD18、CD155/PVR、インテグリン 3/CD61、CD31/PECAM-1、Latexin、CD36/SR-B3、ロイコトリエンB4R1、CD40/TNFRSF5、LIMPIIISR-B2、CD43、LMIR1/CD300A、CD45、LMIR2/CD300c、CD68、LMIR3/CD300LF、CD84/SLAMF5、LMIR5/CD300LB、CD97、LMIR6/CD300LE、CD163、LRP-1、CD2F-10/SLAMF9、MARCO、CRACC/SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN/CD147、MGL2、エンドグリン/CD105、オステオアクチビン/GPNMB、Fc-RI/CD64、オステオポンチン、Fc-RIIB/CD32b、PD-L2、Fc-RIIC/CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-RIIA/CD32a、SIGNR1/CD209、Fc-RII/CD16、SLAM、GM-CSFR、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-γR1、TLR4、IFN-γR2、TREM-1、IL-1RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL10R、ALCAM、IL10R、アミノペプチダーゼN/ANPEP、ILT2/CD85j、共通鎖、ILT3/CD85k、C1qR1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、CD206、インテグリン 4/CD49d、CCR5、インテグリン M/CD11b、CCR8、インテグリン X/CD11c、CD155/PVR、インテグリン 2/CD18、CD14、インテグリン 3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロイコトリエンB4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、LMIR3/CD300LF、凝固因子III/組織因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSFR、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、エンドグリン/CD105、NCAM-L1、Fc-RI/CD64、PSGL-1、Fc-RIIICD16、RP105、G-CSFR、L-セレクチン、GM-CSFR、シグレック-3/CD33、HVE-M/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL6R、TREM-2、CXCR1/IL8RA、TREM-3およびTREML1/TLT-1が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示的マクロファージ/単球抗原を結合する標的化部分を含む。

#### 【0314】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、樹状細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的に樹状細胞を動員する。目的の樹状細胞抗原の例としては、例えば、CLEC9A、XCR1、RANK、CD36/SR-B3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MS

10

20

30

40

50

R、CD5L、SREC-1、CL-P1/COLEC12、SREC-II、LIMP  
IIISRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、T  
LR3、TLR9、4-IBBリガンド/TNFSF9、IL12/IL23p40、  
4-アミノ-1,8-ナフタルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckin  
e、ILT3/CD85k、8-oxo-dG、ILT4/CD85d、8D6A、IL  
T5/CD85a、A2B5、luteogrin 4/CD49d、Aag、インテグ  
リン 2/CD18、AMICA、Langerin、B7-2/CD86、ロイコトリ  
エンB4 R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、  
LMIR2/CD300c、ClqR1/CD93、LMIR3/CD300LF、CC  
R6、LMIR5/CD300LBCCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/  
TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD  
-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAM  
F5、MMR、CD97、NCAM1、CD2F-10/SLAMF9、Osteoa  
ctivin GPNMB、Chern23、PD-L2、CLEC-1、RP105、  
CLEC-2、CLEC-8、シグレック-2/CD22、CRACC/SLAMF7、  
シグレック-3/CD33、DC-SIGN、DEC205、シグレック-5、DC-S  
IGNR/CD299、シグレック-6、DCAR、シグレック-7、DCIR/CLE  
C4A、シグレック-9、DEC-205、シグレック-10、Dectin-1/CL  
EC7A、シグレック-F、Dectin-2/CLEC6A、SIGNR1/CD20  
9、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/C  
D147、TCCR/WSX-1、Fc- R1/CD64、TLR3、Fc- RII  
B/CD32b、TREM-1、Fc- RIIIC/CD32c、TREM-2、Fc-  
RIIA/CD32a、TREM-3、Fc- RIII/CD16、TREML1/  
TLT-1、ICAM-2/CD102、DEC205、およびパニロイドR1が挙げら  
れる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこ  
れらの例示的DC抗原を結合する標的化部分を含む。

10

20

#### 【0315】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、  
4つの「フレームワーク領域」またはFRおよび3つの「相補性決定領域」またはCDR  
を有する単一アミノ酸鎖を含むVHHであるClec9Aに対する標的化部分を含む。本  
明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、CDRの間に位置  
する可変ドメイン中の領域を意味する。本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」  
または「CDR」は、抗原性標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含むVHH中の可  
変領域を指す。

30

#### 【0316】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、CD  
R1、CDR2、および/またはCDR3配列のうちの少なくとも1つを含む可変ドメイ  
ンを有するClec9Aに対するVHHを含む。

#### 【0317】

例示的实施形態では、CDR1配列は、配列番号631～配列番号650から選択され  
る。

40

#### 【0318】

例示的实施形態では、CDR2配列は、配列番号651～配列番号672から選択され  
る。

#### 【0319】

例示的实施形態では、CDR3配列は、配列番号673～配列番号687；またはLGR  
；またはVIKから選択される。

#### 【0320】

種々の実施形態では、Clec9A標的化部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸  
配列を含む：R2CHCL8（配列番号688）；R1CHCL50（配列番号689）

50

; R 1 C H C L 2 1 ( 配 列 番 号 6 9 0 ) ; R 2 C H C L 8 7 ( 配 列 番 号 6 9 1 ) ; R 2 C H C L 2 4 ( 配 列 番 号 6 9 2 ) ; R 2 C H C L 3 8 ( 配 列 番 号 6 9 3 ) ; R 1 C H C L 1 6 ( 配 列 番 号 6 9 4 ) ; R 2 C H C L 1 0 ( 配 列 番 号 6 9 5 ) ; R 1 C H C L 3 4 ( 配 列 番 号 6 9 6 ) ; R 1 C H C L 8 2 ( 配 列 番 号 6 9 7 ) ; R 2 C H C L 3 ( 配 列 番 号 6 9 8 ) ; R 2 C H C L 6 9 ( 配 列 番 号 6 9 9 ) ; R 1 C H C L 5 6 ( 配 列 番 号 7 0 0 ) ; R 2 C H C L 3 2 ( 配 列 番 号 7 0 1 ) ; R 2 C H C L 4 9 ( 配 列 番 号 7 0 2 ) ; R 2 C H C L 5 3 ( 配 列 番 号 7 0 3 ) ; R 2 C H C L 2 2 ( 配 列 番 号 7 0 4 ) ; R 2 C H C L 2 5 ( 配 列 番 号 7 0 5 ) ; R 2 C H C L 1 8 ( 配 列 番 号 7 0 6 ) ; R 1 C H C L 2 3 ( 配 列 番 号 7 0 7 ) ; R 1 C H C L 2 7 ( 配 列 番 号 7 0 8 ) ; R 2 C H C L 1 3 ( 配 列 番 号 7 0 9 ) ; R 2 C H C L 1 4 ( 配 列 番 号 7 1 0 ) ; R 2 C H C L 4 2 ( 配 列 番 号 7 1 1 ) ; R 2 C H C L 4 1 ( 配 列 番 号 7 1 2 ) ; R 2 C H C L 9 4 ( 配 列 番 号 7 1 3 ) ; または R 2 C H C L 2 7 ( 配 列 番 号 7 1 4 ) 。

10

【 0 3 2 1 】

種々の実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、後述のように少なくとも1つのC D R 1、C D R 2、および/またはC D R 3 配列を含む可変ドメインを有するV H Hを含む。

【 0 3 2 2 】

いくつかの実施形態では、C D R 1 配列は、配列番号 7 1 5 ~ 配列番号 7 8 0 から選択される。

【 0 3 2 3 】

いくつかの実施形態では、C D R 2 配列は、配列番号 7 8 1 ~ 配列番号 8 4 6 から選択される。

20

【 0 3 2 4 】

いくつかの実施形態では、C D R 3 配列は、配列番号 8 4 7 ~ 配列番号 9 1 2 から選択される。

【 0 3 2 5 】

種々の例示的实施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、次記の配列から選択されるアミノ酸配列を含む：1 L E C 7 ( 配列番号 9 1 3 ) 。

【 0 3 2 6 】

種々の例示的实施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、末端ヒスチジンタグ配列(すなわち、H H H H H H : 配列番号 8 4 ) を含まない上記配列のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【 0 3 2 7 】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、H A タグ(すなわち、Y P Y D V P D Y G S ; 配列番号 8 5 ) を含まない配列番号 9 1 3 ~ 9 7 8 から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 3 2 8 】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、A A A リンカーを含まない配列番号 9 1 3 ~ 9 7 8 ( 上記で提供 ) から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 3 2 9 】

いくつかの実施形態では、C l e c 9 A 標的化部分は、A A A リンカー、H A タグ、および末端ヒスチジンタグ配列(すなわち、A A A Y P Y D V P D Y G S H H H H H H ; 配列番号 8 6 ) を含まない配列番号 9 1 3 ~ 9 7 8 ( 上記で提供 ) から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【 0 3 3 0 】

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

【 0 3 3 1 】

種々の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の本発明のC l e c 9 A を指向する標的化部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、同族体およびオ

50

ーソログ（本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ）の使用を意図している。種々の実施形態では、C l e c 9 Aを指向する標的化部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、またはその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

#### 【0332】

種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む標的化部分を含む。例えば、キメラタンパク質は、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれか1つに約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、約99%または約100%の配列同一性）であるアミノ酸配列を含む標的化部分を含み得る。

#### 【0333】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、限定されないが、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、および好酸球から選択される免疫細胞上の標的（例えば、抗原、受容体）を特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、巨核球、血小板、赤血球、マスト細胞、好塩基球、好中球、および好酸球を、例えば、いくつかの実施形態では、治療部位（例えば、1つまたは複数の疾患細胞または治療効果を得るために調節されるべき細胞を有する部位）に、直接または間接的に動員する。

#### 【0334】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、巨核球および/または血小板関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。巨核球および/または血小板抗原の例としては、例えば、GPIIb/IIIa、GPIb、vWF、PF4、およびTSPが挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの例示的巨核球および/または血小板抗原を結合する標的化部分を含む。

#### 【0335】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、赤血球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の赤血球抗原の例としては、例えば、CD34、CD36、CD38、CD41a（血小板糖タンパク質IIb/IIIa）、CD41b（GPIIb）、CD71（トランスフェリン受容体）、CD105、グリコホリンA、グリコホリンC、c-kit、HLA-DR、H2（MHC-II）、およびRh抗原が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの例

示的赤血球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0336】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、マスト細胞関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的のマスト細胞抗原の例としては、例えば、SCFR/CD117、FcRI、CD2、CD25、CD35、CD88、CD203c、C5R1、CMA1、FCER1A、FCER2、TPSAB1が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらのマスト細胞抗原を結合する標的化部分を含む。

【0337】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、好塩基球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好塩基球抗原の例としては、例えば、FcRI、CD203c、CD123、CD13、CD107a、CD107b、およびCD164が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの好塩基球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0338】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、好中球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好中球抗原の例としては、例えば、7D5、CD10/CALLA、CD13、CD16(FcRIII)、CD18タンパク質(LFA-1、CR3、およびp150、95)、CD45、CD67、およびCD177が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの好中球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0339】

いくつかの実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、好酸球関連標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。目的の好酸球抗原の例としては、例えば、CD35、CD44およびCD69が挙げられる。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの好酸球抗原を結合する標的化部分を含む。

【0340】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、当業者に既知の任意の適切な抗原または受容体または細胞表面マーカーに特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。いくつかの実施形態では、抗原または細胞表面マーカーは、組織特異的のマーカーである。組織特異的のマーカーの例としては、ACE、CD14、CD34、CDH5、ENG、ICAM2、MCAM、NOS3、PECAM1、PROCR、SELE、SELP、TEK、THBD、VCAM1、VWFなどの内皮細胞表面マーカー；ACTA2、MYH10、MYH11、MYH9、MYOCDなどの平滑筋細胞表面マーカー；ALCAM、CD34、COL1A1、COL1A2、COL3A1、FAP、PH-4などの線維芽細胞（間質）細胞表面マーカー；CD1D、K6IRS2、KRT10、KRT13、KRT17、KRT18、KRT19、KRT4、KRT5、KRT8、MUC1、TACSTD1などの上皮細胞表面マーカー；CD13、TFNA、アルファ-vベータ-3( $\alpha_v\beta_3$ )、E-セ렉チンなどの新生血管マーカー；およびADIPOQ、FABP4、およびRETNなどの脂肪細胞表面マーカーが挙げられるが、これらに限定されない。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数のこれらの抗原を結合する標的化部分を含む。

【0341】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、T細胞上に発現されるチェックポイントマーカー、例えば、PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、CD27、CD40

10

20

30

40

50

L、TIM3、およびA2aRのうちの1つまたは複数に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。

【0342】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、チェックポイントマーカー、例えば、PD-1/PD-L1またはPD-L2、CD28/CD80またはCD86、CTLA4/CD80またはCD86、ICOS/ICOSLまたはB7RP1、BTLA/HVEM、KIR、LAG3、CD137/CD137L、OX40/OX40L、CD27、CD40L、TIM3/Ga19、およびA2aRのうちの1つまたは複数に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。

【0343】

非限定的例であるが、種々の実施形態では、本多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、(i)CD8；(ii)T細胞上に発現されるチェックポイントマーカー、例えば、PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、Cd27、CD40L、TIM3、およびA2aRのうちの1つまたは複数を指向する標的化部分を含み、および/または(iii)標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの改変(例えば、変異体)シグナル伝達物質と協調して、腫瘍細胞を指向する。

【0344】

種々の実施形態では、本多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、本明細書の他の場所で開示のPD-1結合VHHとは別に、PD-1を指向する1つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、PD-1ポリペプチドを選択的に結合する1つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、PD-1ポリペプチドを選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、PD-1結合物質は、本明細書で開示の1種類または複数種類のシグナル伝達物質と共に、1種類または複数種類の下記で開示のPD-1結合物質を含む。

【0345】

ある実施形態では、標的化部分は、抗PD-1抗体ペムプロリズマブ(別名MK-3475、キイトルーダ)、またはそのフラグメントを含む。ペムプロリズマブおよびその他のヒト化抗PD-1抗体は、Hamid, et al. (2013) New England Journal of Medicine 369(2):134-44, US 8,354,509、および国際公開第2009/114335号に開示されている。これらの全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのペムプロリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号979のアミノ酸配列を含む重鎖および/または配列番号980のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0346】

ある実施形態では、標的化部分は、抗PD-1抗体、ニボルマブ(別名BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、オプジーボ)、またはそのフラグメントを含む。PD-1に特異的に結合するニボルマブ(クローン5C4)およびその他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号および国際公開第2006/121168号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、ニボルマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号981のアミノ酸配列を含む重鎖および/または配列番号982のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0347】

ある実施形態では、標的化部分は、抗PD-1抗体ピディリズマブ(別名CT-011、hBATまたはhBAT-1)、またはそのフラグメントを含む。ピディリズマブおよびその他のヒト化抗PD-Iモノクローナル抗体は、米国特許出願公開第2008/00

10

20

30

40

50



25980号および国際公開第2009/101611号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗PD-1抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号15~18：米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号15（配列番号983）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号16（配列番号984）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号17（配列番号985）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号18（配列番号986）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および/または米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号20~24：米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号20（配列番号987）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号21（配列番号988）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号22（配列番号989）；米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号23（配列番号990）；または米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号24（配列番号991）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

#### 【0348】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号18を含む軽鎖および米国特許出願公開第2008/0025980の配列番号22を含む重鎖を含む。

#### 【0349】

ある実施形態では、標的化部分は、AMP-514（別名MEDI-0680）を含む。

#### 【0350】

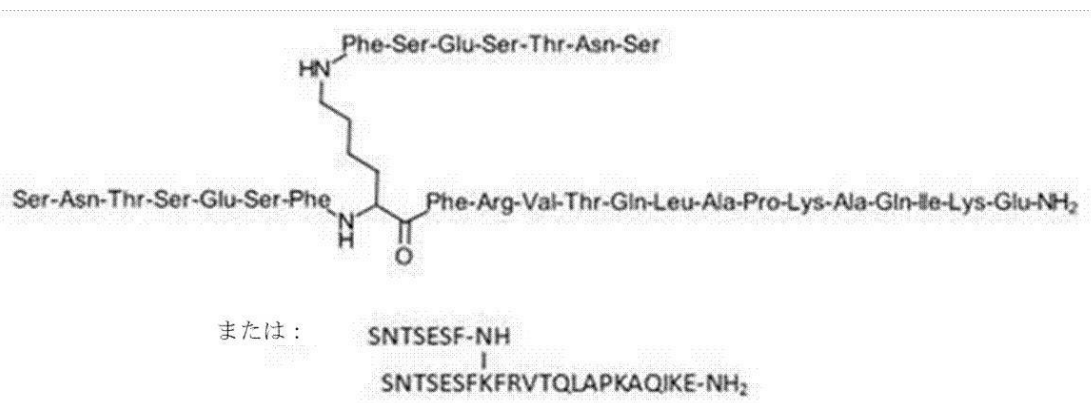
ある実施形態では、標的化部分は、pd-12-Fc融合タンパク質AMP-224を含み、これは、国際公開第2010/027827号および同第2011/066342号に開示されている。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このような実施形態では、標的化部分は、国際公開第2010/027827号の配列番号4（配列番号992）を含む標的化ドメインおよび/または国際公開第2010/027827号の配列番号83（配列番号993）を含むB7-DC融合タンパク質を含み得る。

#### 【0351】

ある実施形態では、標的化部分は、ペプチドAUNP12または米国特許出願公開第2011/0318373号または米国特許第8,907,053号に開示のうちのいずれかの他のペプチドを含む。例えば、標的化部分は、配列番号994の次記配列を有するAUNP12（すなわち、米国特許出願公開第2011/0318373号の化合物8または配列番号49）を含み得る：

SNTSESEFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH<sub>2</sub>

#### 【化2】



#### 【0352】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-1抗体1E3またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示

は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1 E 3またはその抗原結合フラグメントは、配列番号995のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号996のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0353】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-1抗体1 E 8またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1 E 8またはその抗原結合フラグメントは、配列番号997のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号998のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0354】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-1抗体1 H 3またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1 H 3またはその抗原結合フラグメントは、配列番号999のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1000のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0355】

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第8,907,065号および国際公開第2008/071447号に開示のように、PD-1を指向するVHHを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-1に対するVHHは、米国特許第8,907,065号の配列番号347~351；米国特許第8,907,065号の配列番号347（配列番号1001）；米国特許第8,907,065号の配列番号348（配列番号1002）；米国特許第8,907,065号の配列番号349（配列番号1003）；米国特許第8,907,065号の配列番号350（配列番号1004）；または米国特許第8,907,065号の配列番号351（配列番号1005）を含む。

20

【0356】

いくつかの実施形態では、PD-1標的化部分は、位置11、37、44、45、47、83、84、103、104、および108（Kababナンバリングによる）に1つまたは複数の置換を有する配列番号1001~1005から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、位置11のアミノ酸はL、M、S、V、またはWである。いくつかの実施形態では、位置37のアミノ酸はF、Y、H、I、L、またはVである。いくつかの実施形態では、位置44のアミノ酸はG、E、A、D、Q、R、S、またはLである。いくつかの実施形態では、位置45のアミノ酸はL、R、C、I、L、P、Q、またはVである。いくつかの実施形態では、位置47のアミノ酸はW、L、F、A、G、I、M、R、S、V、またはYである。いくつかの実施形態では、位置83のアミノ酸はR、K、N、E、G、I、M、Q、またはTである。いくつかの実施形態では、位置84のアミノ酸はP、A、L、R、S、T、D、またはVである。いくつかの実施形態では、位置103のアミノ酸はW、P、R、またはS；位置104のGまたはDである。いくつかの実施形態では、位置108のアミノ酸はQ、L、またはRである。

30

40

【0357】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2011/0271358号および国際公開第2010/036959号に開示のように、抗PD-1抗体またはそのフラグメントのうちのいずれか1種類を含み、これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号25~29；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号25（配列番号1006）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号26（

50

配列番号 1007) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 27 (配列番号 1008) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 28 (配列番号 1009) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 29 (配列番号 1010) から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 ; および / または米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 30 ~ 33 : 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 30 (配列番号 1011) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 31 (配列番号 1012) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 32 (配列番号 1013) ; 米国特許出願公開第 2011/0271358 号の配列番号 33 (配列番号 1014) から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

**【0358】**

種々の実施形態では、本多重特異的 PD - 1 または PD - L1 結合物質は、TSR - 042 (Tesar o, Inc.)、REGN2810 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)、PDR001 (Novartis Pharmaceuticals)、および BGB - A317 (BeiGene Ltd.) から選択される PD - 1 を指向する 1 つまたは複数の抗体、またはその抗体フラグメントを含む。

**【0359】**

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L1 を指向する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L1 ポリペプチドに選択的に結合する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L1 ポリペプチドに選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの 1 つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、PD - L1 結合物質は、本明細書で開示の 1 種類または複数種類のシグナル伝達物質と共に、1 種類または複数種類の下記で開示の PD - 1 結合物質を含む。

20

**【0360】**

ある実施形態では、標的化部分は、抗 PD - L1 抗体 MEDI4736 (別名デュルバルマブ)、またはそのフラグメントを含む。MEDI4736 は、PD - L1 に対し選択的であり、PD - L1 の PD - 1 および CD80 受容体に対する結合を阻止する。本明細書で提供される方法で使用するための MEDI4736 およびその抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖または重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。MEDI4736 の配列は、国際公開第 2016/06272 号に開示され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための MEDI4736 またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1015 のアミノ酸配列を含む重鎖および / または配列番号 1016 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

**【0361】**

例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための MEDI4736 またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第 2016/06272 号の配列番号 4 (配列番号 1017) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および / または国際公開第 2016/06272 号の配列番号 3 (配列番号 1018) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

**【0362】**

ある実施形態では、標的化部分は、抗 PD - L1 抗体アテゾリズマブ (別名 MPDL3280A、RG7446)、またはそのフラグメントを含む。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1019 のアミノ酸配列を含む重鎖 ; および / または配列番号 1020 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

**【0363】**

ある実施形態では、標的化部分は、抗 PD - L1 抗体アベルマブ (別名 MSB0010

50

718C)、またはそのフラグメントを含む。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのためのアテゾリズマブまたはその抗原結合フラグメントは、配列番号1021のアミノ酸配列を含む重鎖; および/または配列番号1022のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0364】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体BMS-936559(別名12A4、MDX-1105)、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのためのBMS-936559またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1023のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1024のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0365】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体3G10、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための3G10またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1025のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1026のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0366】

20

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体10A5、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための10A5またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1027のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1028のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0367】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体5F8、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための5F8またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1029のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1030のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0368】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体10H10、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための10H10またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1031のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1032のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0369】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体1B12、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するのための1B12またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1033のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; および/または配列番号1034のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0370】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体7H1、ま

50

たはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法での使用のための7H1またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1035のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1036のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0371】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体11E6、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための11E6またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1037のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1038のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0372】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体12B7、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための12B7またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1039のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1040のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0373】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2013/0309250号および国際公開第2007/005874号に開示のように、抗PD-L1抗体13G4、またはそのフラグメントを含む。これら特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための13G4またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1041のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1042のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0374】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体1E12またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1E12またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1043アミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1044のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0375】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体1F4またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための1F4またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1045のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1046のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0376】

ある実施形態では、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2G11またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2G11またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1047のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1048のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0377】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2014/0044738号に開示のように、抗PD-L1抗体3B6、またはそのフラグメントを含む。この特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される

50

方法で使用するための３Ｂ６またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１０４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号１０５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０３７８】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第２０１４／００４４７３８号および国際公開第２０１２／１４５４９３号に開示のように、抗ＰＤ－Ｌ１抗体３Ｄ１０、またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための３Ｄ１０またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１０５１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号１０５２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【０３７９】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号および国際公開第２０１０／０３６９５９号に開示のうちのいずれか１種類の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３４～３８；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３４（配列番号１０５３）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３５（配列番号１０５４）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３６（配列番号１０５５）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３７（配列番号１０５６）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３８（配列番号１０５７）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および／または米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３９～４２；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号３９（配列番号１０５８）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号４０（配列番号１０５９）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号４１（配列番号１０６０）；米国特許出願公開第２０１１／０２７１３５８号の配列番号４２（配列番号１０６１）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

【０３８０】

ある実施形態では、国際公開第２０１１／０６６３８９号、米国特許第８，７７９，１０８号、および米国特許出願公開第２０１４／０３５６３５３号に開示のように、標的化部分は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体２．７Ａ４またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための２．７Ａ４またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第２０１１／０６６３８９号の配列番号２（配列番号１０６２）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号１０６３のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【０３８１】

ある実施形態では、国際公開第２０１１／０６６３８９号、米国特許第８，７７９，１０８号、および米国特許出願公開第２０１４／０３５６３５３号に開示のように、標的化部分は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体２．９Ｄ１０またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための２．９Ｄ１０またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第２０１１／０６６３８９号の配列番号１２（配列番号１０６４）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または配列番号１０６５のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【０３８２】

ある実施形態では、国際公開第２０１１／０６６３８９号、米国特許第８，７７９，１０８号、および米国特許出願公開第２０１４／０３５６３５３号に開示のように、標的化部分は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体２．１４Ｈ９またはそのフラグメントを含む。これらの特許の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための２．１４Ｈ９またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第２０１１／０６６３８９号の配列番号２２（配列番号１０６６）のアミノ酸配列を含む重

50

鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号27（配列番号1067）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0383】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2.20A8またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.20A8またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号32（配列番号1068）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号37（配列番号1069）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0384】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体3.15G8またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3.15G8またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号42（配列番号1070）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号47（配列番号1071）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0385】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体3.18G1またはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための3.18G1またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号52（配列番号1072）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号57（配列番号1073）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0386】

30

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2.7A4OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.7A4OPTまたはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号62（配列番号1074）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号67（配列番号1075）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0387】

ある実施形態では、国際公開第2011/066389号、米国特許第8,779,108号、および米国特許出願公開第2014/0356353号に開示のように、標的化部分は、抗PD-L1抗体2.14H9OPTまたはそのフラグメントを含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための2.14H9OPTまたはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2011/066389号の配列番号72（配列番号1076）のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および／または国際公開第2011/066389号の配列番号77（配列番号1077）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0388】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2016/061142号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組

50

み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2016/061142号の配列番号18、30、38、46、50、54、62、70、および78：国際公開第2016/061142号の配列番号18（配列番号1078）；国際公開第2016/061142号の配列番号30（配列番号1079）；国際公開第2016/061142号の配列番号38（配列番号1080）；国際公開第2016/061142号の配列番号46（配列番号1081）；国際公開第2016/061142号の配列番号50（配列番号1082）；国際公開第2016/061142号の配列番号54（配列番号1083）；国際公開第2016/061142号の配列番号62（配列番号1084）；国際公開第2016/061142号の配列番号70（配列番号1085）；国際公開第2016/061142号の配列番号78（配列番号1086）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および/または、国際公開第2016/061142号の配列番号22、26、34、42、58、66、74、82、および86：国際公開第2016/061142号の配列番号22（配列番号1087）；国際公開第2016/061142号の配列番号26（配列番号1088）；国際公開第2016/061142号の配列番号34（配列番号1089）；国際公開第2016/061142号の配列番号42（配列番号1090）；国際公開第2016/061142号の配列番号58（配列番号1091）；国際公開第2016/061142号の配列番号66（配列番号1092）；国際公開第2016/061142号の配列番号74（配列番号1093）；国際公開第2016/061142号の配列番号82（配列番号1094）；国際公開第2016/061142号の配列番号86（配列番号1095）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

20

#### 【0389】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2016/022630号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2016/022630号の配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、および46：国際公開第2016/022630号の配列番号2（配列番号1096）；国際公開第2016/022630号の配列番号6（配列番号1097）；国際公開第2016/022630号の配列番号10（配列番号1098）；国際公開第2016/022630号の配列番号14（配列番号1099）；国際公開第2016/022630号の配列番号18（配列番号1100）；国際公開第2016/022630号の配列番号22（配列番号1101）；国際公開第2016/022630号の配列番号26（配列番号1102）；国際公開第2016/022630号の配列番号30（配列番号1103）；国際公開第2016/022630号の配列番号34（配列番号1104）；国際公開第2016/022630号の配列番号38（配列番号1105）；国際公開第2016/022630号の配列番号42（配列番号1106）；国際公開第2016/022630号の配列番号46（配列番号1107）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および/または、国際公開第2016/022630号の配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、および48：国際公開第2016/022630号の配列番号4（配列番号1108）；国際公開第2016/022630号の配列番号8（配列番号1109）；国際公開第2016/022630号の配列番号12（配列番号1110）；国際公開第2016/022630号の配列番号16（配列番号1111）；国際公開第2016/022630号の配列番号20（配列番号1112）；国際公開第2016/022630号の配列番号24（配列番号1113）；国際公開第2016/022630号の配列番号28（配列番号1114）；国際公開第2016/022630号の配列番号32（配列番号1115）；国際公開第2016/022630号の配列番号36（配列番号1116）；国際公開第2016/022630号の配列番号40（配列番号1117）；国際公開第2016/022630号の配列番号44（配列番号1118）；国際公開第2016/022630号の配列番号48（配列番号1119）から選択され

30

40

50



るアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0390】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2015/112900号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2015/112900号の配列番号38、50、82、および86：国際公開第2015/112900号の配列番号38（配列番号1120）；国際公開第2015/112900号の配列番号50（配列番号1121）；国際公開第2015/112900号の配列番号82（配列番号1122）；国際公開第2015/112900号の配列番号86（配列番号1123）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および/または国際公開第2015/112900号の配列番号42、46、54、58、62、66、70、74、および78：国際公開第2015/112900号の配列番号42（配列番号1124）；国際公開第2015/112900号の配列番号46（配列番号1125）；国際公開第2015/112900号の配列番号54（配列番号1126）；国際公開第2015/112900号の配列番号58（配列番号1127）；国際公開第2015/112900号の配列番号62（配列番号1128）；国際公開第2015/112900号の配列番号66（配列番号1129）；国際公開第2015/112900号の配列番号70（配列番号1130）；国際公開第2015/112900号の配列番号74（配列番号1131）；国際公開第2015/112900号の配列番号78（配列番号1132）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

10

20

【0391】

ある実施形態では、標的化部分は、国際公開第2010/077634号および米国特許第8,217,149号に開示されるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗PD-L1またはその抗原結合フラグメントは、国際公開第2010/077634号の配列番号20（配列番号1133）のアミノ酸配列を含む重鎖領域；および/または国際公開第2010/077634号の配列番号21（配列番号1134）のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0392】

30

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第20120039906号に開示されているように、CNCM受託番号CNCM I-4122、CNCM I-4080およびCNCM I-4081により入手可能なハイブリドーマから得ることができるいずれか1種類の抗PD-L1抗体を含む。これらの特許の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0393】

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第8,907,065号および国際公開第2008/071447号に開示のように、PD-L1抗体を指向するVHHを含む。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD-L1に対するVHHは、米国特許第8,907,065号の配列番号394~399：米国特許第8,907,065号の配列番号394（配列番号1135）；米国特許第8,907,065号の配列番号395（配列番号1136）；米国特許第8,907,065号の配列番号396（配列番号1137）；米国特許第8,907,065号の配列番号397（配列番号1138）；米国特許第8,907,065号の配列番号398（配列番号1139）；米国特許第8,907,065号の配列番号399（配列番号1140）を含む。

40

【0394】

いくつかの実施形態では、PD-L1標的化部分は、位置11、37、44、45、47、83、84、103、104、および108（Kababナンバリングによる）に1つまたは複数の置換を有する配列番号1135~1140から選択されるアミノ酸配列を

50

含む。いくつかの実施形態では、位置 11 のアミノ酸は L、M、S、V、または W である。いくつかの実施形態では、位置 37 のアミノ酸は F、Y、H、I、L、または V である。いくつかの実施形態では、位置 44 のアミノ酸は G、E、A、D、Q、R、S、または L である。いくつかの実施形態では、位置 45 のアミノ酸は L、R、C、I、L、P、Q、または V である。いくつかの実施形態では、位置 47 のアミノ酸は W、L、F、A、G、I、M、R、S、V、または Y である。いくつかの実施形態では、位置 83 のアミノ酸は R、K、N、E、G、I、M、Q、または T である。いくつかの実施形態では、位置 84 のアミノ酸は P、A、L、R、S、T、D、または V である。いくつかの実施形態では、位置 103 のアミノ酸は W、P、R、または S；位置 104 の G または D である。いくつかの実施形態では、位置 108 のアミノ酸は Q、L、または R である。

10

**【0395】**

種々の実施形態では、本発明の多重特異的 PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L2 を指向する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L2 ポリペプチドに選択的に結合する 1 つまたは複数の標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L1 結合物質は、PD - L2 ポリペプチドを選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、または融合タンパク質のうちの 1 つまたは複数を含む。

**【0396】**

ある実施形態では、標的化部分は、例えば、米国特許第 8,907,065 号および国際公開第 2008/071447 号に開示のように、PD - L2 を指向する VHH を含む。これらの特許の開示は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、PD - 1 に対する VHH は、米国特許第 8,907,065 号の配列番号 449 ~ 455；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 449（配列番号 1141）；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 450（配列番号 1142）；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 451（配列番号 1143）；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 452（配列番号 1144）；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 453（配列番号 1145）；米国特許第 8,907,065 号の配列番号 454（配列番号 1146）；または米国特許第 8,907,065 号の配列番号 455（配列番号 1147）を含む。

20

30

**【0397】**

いくつかの実施形態では、PD - L2 標的化部分は、位置 11、37、44、45、47、83、84、103、104、および 108（Kabata ナンバリングによる）に 1 つまたは複数の置換を有する配列番号 1141 ~ 1147 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、位置 11 のアミノ酸は L、M、S、V、または W である。いくつかの実施形態では、位置 37 のアミノ酸は F、Y、H、I、L、または V である。いくつかの実施形態では、位置 44 のアミノ酸は G、E、A、D、Q、R、S、または L である。いくつかの実施形態では、位置 45 のアミノ酸は L、R、C、I、L、P、Q、または V である。いくつかの実施形態では、位置 47 のアミノ酸は W、L、F、A、G、I、M、R、S、V、または Y である。いくつかの実施形態では、位置 83 のアミノ酸は R、K、N、E、G、I、M、Q、または T である。いくつかの実施形態では、位置 84 のアミノ酸は P、A、L、R、S、T、D、または V である。いくつかの実施形態では、位置 103 のアミノ酸は W、P、R、または S；位置 104 の G または D である。いくつかの実施形態では、位置 108 のアミノ酸は Q、L、または R である。

40

**【0398】**

種々の実施形態では、PD - L2 標的化部分は、少なくとも 1 つの CDR1、CDR2、および/または CDR3 配列を含む可変ドメインを有する VHH を含む。種々の実施形態では、PD - L2 結合物質は、少なくとも 1 つの FR1、FR2、FR3、および/または FR4 配列を含む可変領域を有する VHH を含む。

**【0399】**

50

いくつかの実施形態では、PD-L2 CDR1配列は、配列番号1148～配列番号1154から選択される。

【0400】

いくつかの実施形態では、PD-L2 CDR2配列は、配列番号1155～配列番号1161から選択される。

【0401】

いくつかの実施形態では、PD-L2 CDR3配列は、配列番号1162～配列番号1168から選択される。

【0402】

ある実施形態では、標的化部分は、米国特許出願公開第2011/0271358号および国際公開第2010/036959号に開示のうちのいずれか1種類の抗PD-L2抗体を含む。これらの特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。例示的实施形態では、本明細書で提供される方法で使用するための抗体またはその抗原結合フラグメントは、米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号43～47；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号43（配列番号1169）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号44（配列番号1170）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号45（配列番号1171）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号46（配列番号1172）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号47（配列番号1173）から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖；および/または米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号48～51；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号48（配列番号1174）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号49（配列番号1175）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号50（配列番号1176）；米国特許出願公開第2011/0271358号の配列番号51（配列番号1177）から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0403】

種々の実施形態では、本発明の標的化部分は、本明細書で開示の配列のうちのいずれかに少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一（例えば、本明細書で開示の配列のうちのいずれかと約60%、または約61%、または約62%、または約63%、または約64%、または約65%、または約66%、または約67%、または約68%、または約69%、または約70%、または約71%、または約72%、または約73%、または約74%、または約75%、または約76%、または約77%、または約78%、または約79%、または約80%、または約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、約99%または約100%の配列同一性）である、PD-1、PD-L1、および/またはPD-L2を標的とする配列を含み得る。

【0404】

種々の実施形態では、本発明の標的化部分は、本明細書で開示のPD-1、PD-L1

10

20

30

40

50

、および／またはPD-L2を標的とする重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域(CDR)、およびフレームワーク領域配列のいずれの組み合わせを含み得る。

#### 【0405】

PD-1、PD-L1および／またはPD-L2を選択的に結合するかあるいは標的にする追加の抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチドまたは融合タンパク質は、国際公開第2011/066389号、米国特許出願公開第2008/0025980号、米国特許出願公開第2013/0034559号、米国特許第8,779,108号、米国特許出願公開第2014/0356353号、米国特許第8,609,089号、米国特許出願公開第2010/028330号、米国特許出願公開第2012/0114649号、国際公開第2010/027827号、国際公開第2011/066342号、米国特許第8,907,065号、国際公開第2016/062722号、国際公開第2009/101611号、国際公開第2010/027827号、国際公開第2011/066342号、国際公開第2007/005874号、国際公開第2001/014556号、米国特許出願公開第2011/0271358号、国際公開第2010/036959号、国際公開第2010/077634号、米国特許第8,217,149号、米国特許出願公開第2012/0039906号、国際公開第2012/145493号、米国特許出願公開第2011/0318373号、米国特許第8,779,108号、米国特許出願公開第2014/0044738号、国際公開第2009/089149号、国際公開第2007/00587号、国際公開第2016/061142号、国際公開第2016/02263号、国際公開第2010/077634号、および国際公開第2015/112900号で開示されている。これらの特許の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

#### 【0406】

種々の実施形態では、本技術の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、シグナル調節タンパク質-1(SIRP1)に対する標的化部分を含む。SIRP1(SIRPとしても知られる)は、阻害性(SIRP)、活性化(SIRP)、非シグナル伝達性(SIRP)および可溶性(SIRP)のメンバーを包含する細胞免疫受容体ファミリーに属する。SIRP1は、主に、マクロファージ、顆粒球、骨髄細胞(DC)、マスト細胞、および造血幹細胞を含むそれらの前駆物質で発現される。SIRP1は、広範に発現される膜貫通型糖タンパク質CD47と相互作用して食作用を調節する抑制性受容体として作用する。特に、標的細胞上に発現されるCD47によるマクロファージ上のSIRP1の結合は、標的細胞の食作用を負に調節する抑制シグナルを生成する。

30

#### 【0407】

種々の実施形態では、SIRP1標的化部分は、マクロファージ上のSIRP1を特異的に認識して結合する標的化部分である。

#### 【0408】

種々の実施形態では、SIRP1標的化部分は、単球上のSIRP1を特異的に認識して結合する標的化部分である。

40

#### 【0409】

種々の実施形態では、SIRP1標的化部分は、TAM上のSIRP1を特異的に認識して結合する標的化部分である。

#### 【0410】

種々の実施形態では、SIRP1標的化部分は、限定されないが、cDC2およびpDCを含む樹状細胞上のSIRP1を特異的に認識して結合する標的化部分である。

#### 【0411】

種々の実施形態では、SIRP1標的化部分は、SIRP1を認識する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、SIRP1上に存在する1つまたは複数の線形エピトープを認識する。本明細書で使用される場合

50

、線形エピトープは、S I R P 1 上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、S I R P 1 上に存在する1つまたは複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識できる特徴および/または形状および/または三次構造を備えた3次元表面を形成する1つまたは複数のアミノ酸の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0412】

いくつかの実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、S I R P 1 の完全長型および/または成熟型および/またはアイソフォームおよび/またはスプライスバリエントおよび/またはフラグメントおよび/または任意の他の天然または合成の類似体、バリエント、または変異体に結合し得る。ある実施形態では、S I R P 1 はヒトS I R P 1 である。種々の実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、モノマー、ダイマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む、任意の形態のヒトS I R P 1 に結合し得る。ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、モノマー型のS I R P 1 に結合する。別の実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、ダイマー型のS I R P 1 に結合する。

【0413】

ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、ヒトS I R P 1 上に存在する1つまたは複数のエピトープを認識する認識ドメインを含む。ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、シグナルペプチド配列を有するヒトS I R P 1 を認識する認識ドメインを含む。シグナルペプチド配列を有する代表的ヒトS I R P 1 ポリペプチドは、配列番号1178である。

【0414】

ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、シグナルペプチド配列のないヒトS I R P 1 を認識する認識ドメインを含む。シグナルペプチド配列のない代表的ヒトS I R P 1 ポリペプチドは、配列番号1179である。

【0415】

ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、ヒトS I R P 1 アイソフォーム2（配列番号1180）をコードするポリペプチドを認識する認識ドメインを含む。

【0416】

ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、ヒトS I R P 1 アイソフォーム4（配列番号1181）をコードするポリペプチドを認識する認識ドメインを含む。

【0417】

種々の実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、抗体またはその誘導体などの、特異的結合の可能な任意のタンパク質ベース物質であり得る。ある実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、抗体を含む。種々の実施形態では、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む完全長マルチマータンパク質である。それぞれの重鎖は、1つの可変領域（例えば、V<sub>H</sub>）および少なくとも3つの定常領域（例えば、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>およびC<sub>H3</sub>）を含み、それぞれの軽鎖は、1つの可変領域（V<sub>L</sub>）および1つの定常領域（C<sub>L</sub>）を含む。可変領域は抗体の特異性を決定する。それぞれの可変領域は、4つの比較的保存されたフレームワーク領域（F<sub>R</sub>）により挟まれた、相補性決定領域（C<sub>D</sub>R）としても知られる、3つの高頻度可変領域を含む。3つのC<sub>D</sub>Rは、C<sub>D</sub>R1、C<sub>D</sub>R2、およびC<sub>D</sub>R3と呼ばれ、抗体の結合特異性に寄与する。いくつかの実施形態では、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0418】

いくつかの実施形態では、S I R P 1 標的化部分は、抗体誘導体またはフォーマットを含む。いくつかの実施形態では、本発明のS I R P 1 標的化部分は、単ドメイン抗体、組み換え型の重鎖抗体（重鎖抗体）（V<sub>H</sub>H）、単鎖抗体（s c F<sub>v</sub>）、サメの重鎖抗体（V<sub>N</sub>A<sub>R</sub>）、マイクロタンパク質（システインノットタンパク質、ノッチン）、D A R P i n；テトラネクチン；アフィボディ；トランスボディ；アンチカリン；アドネクチン；アフィリン；ミクロボディ；ペプチドアプタマー；a l t e r a s e；プラスチック抗体；フィロマー；ストラドボディ；マキシボディ；エピボディ；フィノマー；アルマ

10

20

30

40

50

ジオリピートタンパク質 (armadillo repeat protein) ; クニツドメイン、アピマー、アトリマー、プロボディ、イムノボディ、トリオマブ、トロイボディ、ペブボディ、ワクシボディ、ユニボディ ; アフィマー、デュオボディ、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ペプチド模倣分子、または合成分子である。これらは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,417,130号、米国特許出願公開第2004/132094号、米国特許第5,831,012号、米国特許出願公開第2004/023334号、米国特許第7,250,297号、米国特許第6,818,418号、米国特許出願公開第2004/209243号、米国特許第7,838,629号、米国特許第7,186,524号、米国特許第6,004,746号、米国特許第5,475,096号、米国特許出願公開第2004/146938号、米国特許出願公開第2004/157209号、米国特許第6,994,982号、米国特許第6,794,144号、米国特許出願公開第2010/239633号、米国特許第7,803,907号、米国特許出願公開第2010/119446号、および/または米国特許第7,166,697号に記載されている。Storz Mabs. 2011 May - Jun ; 3 (3) : 310 - 317、も参照されたい。

#### 【0419】

一実施形態では、SIRP1 標的化部分は、例えば、ラクダ類、サメなどのVHH抗体を産生する生物由来のVHH、または設計されたVHHなどの単ドメイン抗体を含む。VHHは、天然起源の重鎖抗体の特有の構造および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。VHH技術は、軽鎖を欠くラクダ類由来の完全に機能的な抗体に基づいている。これらの重鎖抗体は、単一可変ドメイン (VHH) および2つの定常ドメイン (CH2およびCH3) を含む。

#### 【0420】

ある実施形態では、SIRP1 標的化部分は、VHHを含む。いくつかの実施形態では、VHHは、ヒト化VHHまたはラクダ化VHHである。

#### 【0421】

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

#### 【0422】

例えば、いくつかの実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 を選択的に結合する、抗体、抗体誘導体もしくはフォーマット、ペプチドもしくはポリペプチド、VHH、または融合タンパク質のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 に特異的に結合する抗体またはこれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 に特異的に結合するラクダ類重鎖抗体 (VHH) である。

#### 【0423】

種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 を認識およびそれに結合することが既知である、重鎖、軽鎖、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、相補性決定領域 (CDR)、およびフレームワーク領域配列のうちのいずれかの組み合わせを含み得る。

#### 【0424】

種々の実施形態では、本技術は、本明細書で記載のSIRP1 標的化部分の任意の天然または合成類似体、変異体、バリエーション、アレル、ホモログおよびオルソログ (本明細書では、ひとまとめにして「類似体」と呼ぶ) の使用を意図している。種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分のアミノ酸配列は、アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体、また

はその他の非古典的アミノ酸をさらに含む。

【0425】

種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 を認識し、それに結合することが既知のうちのいずれかの標的化部分配列に対して1つまたは複数のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、SIRP1 を認識し、それに結合することが既知のうちのいずれかの標的化部分配列に対して、1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個、または15個、20個、30個、40個、または50個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸変異は、置換、挿入、欠失、および短縮化から独立に選択され得る。

10

【0426】

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

【0427】

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

20

【0428】

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

【0429】

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

30

【0430】

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

40

【0431】

種々の実施形態では、アミノ酸変異は、標的化部分のCDR(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3領域)中にあってもよい。別の実施形態では、アミノ酸変化は、標的化部分のフレームワーク領域(FR)(例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4領域)中にあってもよい。

【0432】

アミノ酸配列の改変は、任意の当該技術分野において、周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRベース変異誘発を用いて実現され得る。このような技術は、例え

50

ば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989に記載されている。

【0433】

種々の実施形態では、変異は、SIRP1 を特異的に認識し、それに結合するSIRP1 標的化部分の能力を実質的に低下させない。種々の実施形態では、変異は、SIRP1 に特異的に結合するSIRP1 標的化部分の能力を実質的に低下させず、また、SIRP1 を機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に中和する）こともない。

10

【0434】

種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、目的の抗原、すなわち、SIRP1 を結合するが機能的に調節しない。例えば、種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、抗原を標的とするのみであり、抗原が有する生物学的作用を実質的に機能的に調節（例えば、部分的にまたは完全に阻害するかあるいは中和することを）しない。種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、その生物活性にとって重要な抗原部位（例えば、抗原の活性部位）から物理的に離れたエピトープを結合する。

【0435】

他の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、目的の抗原、すなわち、SIRP1 を結合し機能的に調節する。例えば、種々の実施形態では、SIRP1 標的化部分は、抗原、すなわち、SIRP1 を標的とし、さらに、抗原が有する生物学的作用を機能的に調節する（例えば、部分的にまたは完全に阻害または中和する）。このような結合は、機能的調節と共に、本発明のキメラタンパク質がエフェクター抗原を介して必要な部位に活性免疫細胞を直接的にまたは間接的に動員するのに用いられる方法を含む、本発明の種々の実施形態で使用される。

20

【0436】

種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、例えばDC上で、XCR1に特異的に結合する抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。種々の実施形態では、本発明の多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、XCL1の全体または一部を含む抗原認識ドメインを有する標的化部分を含む。

30

【0437】

種々の実施形態では、多重特異的PD-1またはPD-L1結合物質は、非細胞構造の一部である標的（例えば、抗原、受容体）に特異的に結合する認識ドメインを有する標的化部分を有する。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、無傷の細胞または細胞構造の不可欠な構成要素ではない。いくつかの実施形態では、抗原または受容体は、細胞外の抗原または受容体である。いくつかの実施形態では、標的は、非タンパク質性の非細胞マーカーであり、これらは、限定されないが、例えば、壊死腫瘍細胞から放出されたDNA、などのDNAまたはRNAを含む、核酸またはコレステロールなどの細胞外沈着物を含む。

【0438】

40

いくつかの実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、ストローマもしくは細胞外マトリックス（ECM）の非細胞成分またはそれと関連するマーカーの一部である。本明細書で使用される場合、ストローマは、組織または器官の連結および支持フレームワークを指す。ストローマは、細胞外マトリックス（ECM）および細胞外分子と共に線維芽細胞/筋線維芽細胞/膠細胞、上皮、脂肪、免疫、血管、平滑筋、および免疫細胞などの細胞の寄せ集めを含み得る。種々の実施形態では、目的の標的（例えば、抗原、受容体）は、細胞外マトリックスおよび細胞外分子などのストローマの非細胞成分の一部である。本明細書で使用される場合、ECMは、全ての組織および器官内に存在する非細胞成分を指す。ECMは、限定されないが、タンパク質、糖タンパク質、プロテオグリカン、および多糖類を含む生化学的に別々の成分の多数の集まりからなる。これらのECM成

50



分は通常、隣接する細胞により産生され、エキソサイトーシスによりECM中に分泌される。分泌されると、ECM成分は多くの場合、集合して、巨大分子の複合体ネットワークを形成する。種々の実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、ECMの任意の成分上に位置する標的（例えば、抗原または受容体または非タンパク質分子）を認識する標的化部分を含む。ECMの成分の例としては、限定されないが、プロテオグリカン、非プロテオグリカン多糖類、繊維および他のECMタンパク質またはECM非タンパク質、例えば、多糖類および/または脂質、またはECM関連分子（例えば、タンパク質または非タンパク質、例えば、多糖類、核酸および/または脂質）が挙げられる。

#### 【0439】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、ECMプロテオグリカン上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。プロテオグリカンはグリコシル化タンパク質である。塩基性プロテオグリカン単位は、1つまたは複数の共有結合グリコサミノグリカン（GAG）鎖を有するコアタンパク質を含む。プロテオグリカンは、正電荷のナトリウムイオン（Na<sup>+</sup>）を引き付ける正味負電荷を有し、これは、浸透を介して水を引き付け、ECMおよび常在性細胞を水和した状態に保持する。プロテオグリカンはまた、成長因子を捕捉し、ECM内に貯蔵し得る。本発明のキメラタンパク質により標的とされ得るプロテオグリカンの例としては、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、およびケラタン硫酸が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、標的化部分は、ヒアルロン酸などの非プロテオグリカン多糖類上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。

#### 【0440】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、ECM繊維上の標的（例えば、抗原、受容体）を認識する。ECM繊維は、コラーゲン繊維およびエラスチン繊維を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、コラーゲンまたはコラーゲン繊維上の1つまたは複数のエピトープを認識する。コラーゲンは、ECM中で最も豊富なタンパク質である。コラーゲンはECM中に線維性タンパク質として存在し、常在性細胞に対し構造支持を与える。1つまたは複数の実施形態では、標的化部分は、限定されないが、線維性コラーゲン（I、II、III、V、XI型）、FACITコラーゲン（IX、XII、XIV型）、短鎖コラーゲン（VIIII、X型）、基底膜コラーゲン（IV型）、および/またはVI、VII、またはXIII型コラーゲンを有するECM内に存在する様々な種類のコラーゲンを認識し、これに結合する。エラスチン繊維は、組織に弾性を与え、組織が必要に応じ伸縮し、その後、元の状態に戻ることを可能にする。いくつかの実施形態では、標的化部分は、エラスチンまたはエラスチン繊維上の1つまたは複数のエピトープを認識する。

#### 【0441】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、限定されないが、テネイシン、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、またはナイドジェン/エンタクチンを含む、1種類または複数種類のECMタンパク質を認識する。

#### 【0442】

ある実施形態では、標的化部分は、テネイシンを認識し、これに結合する。テネイシン（TN）ファミリーの糖タンパク質は、少なくとも4種類のメンバー：テネイシン-C、テネイシン-R、テネイシン-X、およびテネイシン-Wを含む。テネイシンタンパク質の一次構造は、同じ連続配列中に順序づけられたいくつかの共通のモチーフ：アミノ末端7個の反復、上皮増殖因子（EGF）様反復、フィブロネクチンIII型ドメイン反復、およびカルボキシル末端フィブリノーゲン様球状ドメインを含む。それぞれのタンパク質メンバーは、EGF様およびフィブロネクチンIII型反復の数および性質における典型的な変動に関連付けられる。アイソフォームバリエーションはまた、特にテネイシン-Cに対して存在する。27種を超えるテネイシン-Cのスプライスバリエーションおよび/またはアイソフォームが知られている。特定の実施形態では、標的化部分は、テネイシン-CA1を認識し、これに結合する。同様に、テネイシン-Rはまた、種々のスプライスバリエーションおよびアイソフォームを有する。テネイシン-Rは通常、ダイマーまたはトリマーとして存在する。テネイシン-Xは、テネイシンファミリーの最大メンバーであり、トリマー

10

20

30

40

50

として存在することが知られている。テネイシン - W は、トリマーとして存在する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、テネイシンタンパク質上の 1 つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーおよび / またはダイマーおよび / またはトリマーおよび / またはヘキサマー型のテネイシンタンパク質を認識する。

#### 【 0 4 4 3 】

ある実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチンを認識し、これに結合する。フィブロネクチンは、細胞を ECM 中のコラーゲン繊維と連結し、細胞が ECM 中を移動することを可能にする糖タンパク質である。インテグリンに結合時には、フィブロネクチンは折り畳みをほどいて機能的ダイマーを形成する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーおよび / またはダイマー型のフィブロネクチンを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチン上の 1 つまたは複数のエピトープを認識する。例示的実施形態では、標的化部分は、フィブロネクチン細胞外ドメイン A (EDA) またはフィブロネクチン細胞外ドメイン B (EDB) を認識する。EDA レベルの上昇は、乾癬、関節リウマチ、糖尿病、および癌を含む種々の疾患および障害に関連する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、EDA アイソフォームを含むフィブロネクチンを認識し、癌細胞を含む疾患細胞にキメラタンパク質を標的化するのに使用し得る。いくつかの実施形態では、標的化部分は、EDB アイソフォームを含むフィブロネクチンを認識する。種々の実施形態では、このような標的化部分は、腫瘍新生血管を含む腫瘍細胞にキメラタンパク質を標的化するのに使用し得る。

#### 【 0 4 4 4 】

ある実施形態では、標的化部分は、フィブリンを認識し、これに結合する。フィブリンは、ECM のマトリックスネットワーク中に見つかることが多い、もう 1 つのタンパク質物質である。フィブリンは、フィブリノーゲンに対するプロテアーゼトロンビンの作用により形成され、これにより、フィブリンを重合させる。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブリン上の 1 つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマーならびに重合型のフィブリンを認識する。

#### 【 0 4 4 5 】

ある実施形態では、標的化部分は、ラミニンを認識し、これに結合する。ラミニンは、基底膜の主要成分であり、細胞および器官のためのタンパク質ネットワーク基盤である。ラミニンは、鎖、鎖、および鎖を含むヘテロトリマータンパク質である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ラミニン上の 1 つまたは複数のエピトープを認識する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、モノマー、ダイマーならびにトリマー型のラミニンを認識する。

#### 【 0 4 4 6 】

ある実施形態では、標的化部分は、ナイドジェンまたはエンタクチンを認識し、これらに結合する。ナイドジェン / エンタクチンは、高度に保存された硫酸化糖タンパク質ファミリーである。それらは基底膜の主要構造的成分をなし、ラミニンと、基底膜中のコラーゲン IV ネットワークを連結するように機能する。このファミリーのメンバーは、ナイドジェン - 1 およびナイドジェン - 2 を含む。種々の実施形態では、標的化部分は、ナイドジェン - 1 および / またはナイドジェン - 2 上のエピトープを認識する。

#### 【 0 4 4 7 】

種々の実施形態では、標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの標的 (例えば、ECM タンパク質) 上に存在するエピトープを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、抗原認識ドメインは、タンパク質上に存在する 1 つまたは複数の線形エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、線形エピトープは、タンパク質上に存在するアミノ酸の任意の連続配列を指す。別の実施形態では、抗原認識ドメインは、タンパク質上に存在する 1 つまたは複数の立体構造エピトープを認識する。本明細書で使用される場合、立体構造エピトープは、抗原認識ドメインにより認識され得る特徴および / または形状および / または三次構造を備えた 3 次元表面を形成する 1 つまたは複数のアミノ酸

の部分（これは不連続であってよい）を指す。

【0448】

種々の実施形態では、標的化部分は、本明細書に記載のうちのいずれかの標的（例えば、ECMTタンパク質）の完全長型および／または成熟型および／またはアイソフォームおよび／またはスプライスパリアントおよび／またはフラグメントおよび／または任意の他の天然または合成の類似体、パリアント、または変異体に結合し得る。種々の実施形態では、標的化部分は、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー、ヘテロダイマー、マルチマーおよび会合型を含む、本明細書に記載の任意の型のタンパク質に結合し得る。種々の実施形態では、標的化部分は、グリコシル化および／またはリン酸化型などの、本明細書に記載の任意の翻訳後修飾型のタンパク質に結合し得る。

10

【0449】

種々の実施形態では、標的化部分は、DNAなどの細胞外分子を認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、DNAを認識する抗原認識ドメインを含む。ある実施形態では、DNAは、壊死細胞またはアポトーシス腫瘍細胞または他の疾患細胞から細胞外間隙中に脱落する。

【0450】

種々の実施形態では、標的化部分は、アテローム斑と関連する1種類または複数種類の非細胞構造を認識する抗原認識ドメインを含む。2つのタイプのアテローム斑が知られている。線維-脂質（線維-脂肪）斑（fibro-lipid（fibro-fatty）plaque）は、動脈の内膜の下に脂質を取り込んだ（lipid-laden）細胞の蓄積を特徴とする。内皮の下には、アテローム性のプラークコアを覆う繊維状キャップが存在する。コアは、増大した組織コレステロールおよびコレステロールエステル含量を有する脂質を取り込んだ細胞（マクロファージおよび平滑筋細胞）、フィブリン、プロテオグリカン、コラーゲン、エラスチン、ならびに壊死細胞片を含む。進行型プラークでは、プラークの中心コアは通常、細胞外のコレステロール沈着物（死細胞から放出）を含み、これは、空の針状間隙を有するコレステロール結晶の領域を形成する。プラークの周辺部には、より若い泡沫状細胞および毛細血管がある。繊維状プラークはまた、動脈壁内の内膜下にも局在し、壁の肥厚化および増殖、および時には、筋層の若干の萎縮を伴う内腔の飛び飛びに局在化した狭小化をもたらす。繊維状プラークは、コラーゲン繊維（エオシン好性）、カルシウムの沈殿物（ヘマトキシリン好性）および脂質を取り込んだ細胞を含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、フィブリン、プロテオグリカン、コラーゲン、エラスチン、壊死細胞片、およびカルシウムまたは他の鉱物沈着物または沈殿物などのこれらのプラークの1種類または複数種類の非細胞成分を認識し、これに結合する。いくつかの実施形態では、壊死細胞片は、核酸、例えば、死細胞から放出されるDNAまたはRNAである。

20

30

【0451】

種々の実施形態では、標的化部分は、神経変性疾患と関連する脳プラーク中で見つかる1種類または複数種類の非細胞構造を認識する抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的化部分は、アルツハイマー病の患者の脳中で見つかるアミロイド斑中に局在する1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。例えば、標的化部分は、ペプチドアミロイドベータを認識し、これに結合する。ペプチドアミロイドベータは、アミロイド斑の主要な成分である。いくつかの実施形態では、標的化部分は、ハンチントン病の患者で見つかる脳プラーク中にある1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。種々の実施形態では、標的化部分は、レヴィー小体認知症および封入体筋炎などの他の神経変性疾患または筋骨格疾病と関連するプラークで見つかる1種類または複数種類の非細胞構造を認識し、これに結合する。

40

【0452】

リンカーおよび官能基

種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1つまたは複数の官能基、残基、または部分を含み得る。種々の実施形態では、1つまたは複数の官能基、残基、

50

または部分は、本明細書に記載のうちのいずれかのシグナル伝達物質または標的化部分に結合されるか、または遺伝的に融合される。いくつかの実施形態では、このような官能基、残基または部分は、1つまたは複数の望ましい特性または官能基を本発明のPD-1またはPD-L1結合物質に付与する。このような官能基およびそれらをPD-1またはPD-L1結合物質に導入する技術の例は、当技術分野において既知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980)を参照されたい。

#### 【0453】

種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、別の物質と複合化および/または融合して、半減期を延長するか、または別の方法で薬学的および薬物動態学的特性を改善し得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、PEG、XTEN（例えば、rPEGとして）、ポリシアル酸（POLYXEN）、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミンまたはHAS）、エラスチン様タンパク質（ELP）、PAS、HAP、GLK、CTP、トランスフェリンなどのうちの1つまたは複数と融合または複合化され得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、抗体またはFcフラグメントなどの抗体フラグメントと融合または複合化され得る。例えば、キメラタンパク質は、ヒト免疫グロブリン（Ig）GのFcドメインのN-末端またはC末端に融合され得る。種々の実施形態では、それぞれ個々のキメラタンパク質は、BioDrugs (2015) 29: 215-239に記載の1種類または複数種類の物質に融合され、この文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0454】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、好適な薬学的に許容可能なポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）（PEG）またはその誘導体（例えば、メトキシポリ（エチレングリコール）またはmPEG）を含む。いくつかの実施形態では、PEG部分の結合は、半減期を伸ばし、および/またはPD-1またはPD-L1結合タンパク質の免疫原性を低減する。例えば、抗体および抗体フラグメント（限定されないが、VHHなどの単ドメイン抗体を含む）に対し当該技術分野で用いられるペグ化などの任意の好適な形態のペグ化が通常用いられる；例えば、Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); VeroneseおよびHarrisによる、Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); HarrisおよびChessによる、Nat. Rev. Drug Discov., 2, (2003)ならびに国際公開第04/060965号を参照されたい。これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質のペグ化のための種々の試薬も、例えば、Nektar Therapeutics, USAから市販されている。いくつかの実施形態では、特に、システイン残基を介した部位特異的なペグ化が使用される（例えば、Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)を参照されたい、この文献の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、このために、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質中の天然のシステイン残基に結合され得る。いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、PEGの結合のための1つまたは複数のシステイン残基を適切に導入するように修飾されるか、またはPEGの結合のための1つまたは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列が、当該技術分野において既知の技術を使用してPD-1またはPD-L1結合物質のアミノ末端および/またはカルボキシ末端に融合され得る。

#### 【0455】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分には、N結合型またはO結合型グリコシル化を含む。いくつかの実施形態では、N結合型またはO結合型グリコシル化は、翻訳時修飾および/または翻訳後修飾の一部として導入される。

#### 【0456】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、1つまたは複数の検出可能なラベルまたはその他のシグナル生成基または部分を含む。好適なラベルおよびそれらの結合、使用および検出のための技術は、当技術分野において、既知であり、限定されないが、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、ならびにフルオレサミンおよび蛍光金属、例えば、Euまたはランタニド系列の他の金属）、リン光標識、化学発光ラベルまたは生物発光ラベル（例えば、ルミノール、イソルミノール、セロマトニックアクリジニウム・エステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、オキサレートエステル、ジオキセタンまたはGFPおよびその類似体）、放射性同位体、金属、金属キレートもしくは金属カチオンまたはインビボ、インビトロまたはインサイツ診断および画像処理での使用に特に適している他の金属もしくは金属カチオン、ならびに発色団および酵素（例えば、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、ピオチンアビジンペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ）を含む。他の好適なラベルとしては、NMRまたはESR分光法を用いて検出できる部分が挙げられる。このように標識した本発明のVHHおよびポリペプチドは、特定の標識の選択により、例えば、インビトロ、インビボまたはインサイツアッセイ（これ自体ELISA、RIAおよびEIAおよびその他の「サンドイッチ法」などとして知られるイムノアッセイ）ならびにインビボ診断および画像処理の目的に使用し得る。

#### 【0457】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分には、PD-1またはPD-L1結合物質に結合または遺伝的に融合されたタグが含まれる。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、単一タグまたは複数タグを含み得る。例えば、タグは、PD-1またはPD-L1結合物質のPD-1もしくはPD-L1またはいずれか他の腫瘍抗原などの目的抗原に対する結合を阻害または妨害しない、ペプチド、糖、またはDNA分子である。種々の実施形態では、タグは、少なくとも約：3～5アミノ酸長さ、5～8アミノ酸長さ、8～12アミノ酸長さ、12～15アミノ酸長さ、または15～20アミノ酸長さである。タグの例は、例えば、米国特許出願公開第2013/0058962号に記載されている。いくつかの実施形態では、タグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびヒスチジン（His）タグなどの親和性タグである。ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質はHisタグを含む。

#### 【0458】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、例えば、金属または金属カチオンのうちの1つをキレートするためのキレート化基を含む。好適なキレート化基は、例えば、限定されないが、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含む。

#### 【0459】

いくつかの実施形態では、官能基、残基、または部分は、ピオチン-（ストレプト）アビジン結合対などの、特異的結合対の片方の一部である官能基を含む。このような官能基を使って、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質を、結合対のもう一方の半分に結合した別のタンパク質、ポリペプチドまたは化学化合物に、すなわち、結合対の結合を介して、連結し得る。例えば、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をピオチンに複合化させ、アビジンまたはストレプトアビジンに複合化させた別のタンパク質、ポリペプチド、化合物または担体に連結し得る。例えば、検出可能なシグナル生成物質がアビジンまたはストレプトアビジンに複合化される診断システムにおいて、このような結合PD-1またはPD-L1結合物質を、例えば、レポーターとして用い得る。例えば、このような結合対を使用して、PD-1またはPD-L1結合物質を医薬品目的に好適な担体など

の担体に結合し得る。1つの非限定的例は、Cao and Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000)に記載されたリボソーム製剤である。また、このような結合対を使用して、治療活性薬剤を、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質に連結し得る。

#### 【0460】

いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、必要に応じ、1つまたは複数のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、結合領域および/または標的化部分をそれぞれ連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、シグナル伝達物質および標的化部分をそれぞれ連結する（または2つ以上の標的化部分の場合、シグナル伝達物質を標的化部分のうちの1つに連結する）リンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書に記載の種々の官能基、残基、または部分をPD-1またはPD-L1結合物質に連結するのに利用し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、結合領域および結合タンパク質の安定性、配向、結合、中和、および/または排出特性に影響を与えない、またはそれらを低下させない単一アミノ酸または複数のアミノ酸である。種々の実施形態では、リンカーは、ペプチド、タンパク質、糖、または核酸から選択される。

#### 【0461】

いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、標的化部分とシグナル伝達物質とを連結するリンカーを含む。いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、シグナル伝達物質内にリンカーを含む（例えば、単鎖TNFの場合には、トリマーを生じる2つのリンカーを含み得る）。

#### 【0462】

本発明は、種々のリンカー配列の使用を意図する。種々の実施形態では、リンカーは、天然のマルチドメインタンパク質から誘導され得るか、または、例えば、Chichili et al., (2013), Protein Sci. 22(2):153-167; Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369に記載されている経験的リンカーである。これらの文献の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、リンカー設計データベースおよびChen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369 and Crasto et al., (2000), Protein Eng. 13(5):309-312に記載のものなどのコンピュータプログラムを用いて設計し得る。種々の実施形態では、リンカーは機能性であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、折り畳みおよび/または安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態学を改善するように、および/または本発明のPD-1またはPD-L1結合物質の生物活性を改善するように機能し得る。

#### 【0463】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカーは約100アミノ酸長未満である。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、または約2アミノ酸長未満であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカーは約100アミノ酸長を超える。例えば、リンカーは、約100、約95、約90、約85、約80、約75、約70、約65、約60、約55、約50、約45、約40、約35、約30、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、または約2アミノ酸長超であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーはフレキシブルである。別の実施形態では、リンカーは剛性である。

#### 【0464】

【 0 4 6 5 】

10

【 0 4 6 6 】

20

【 0 4 6 7 】

30

40

50

## 【0469】

いくつかの実施形態では、リンカーは抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）のヒンジ部である。種々の実施形態では、リンカーは抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）のヒンジ部である。IgG、IgA、IgD、およびIgEクラス抗体で見つかるヒンジ部は、フレキシブルスパーサーとして機能し、Fab部が空間中で自由に動くことを可能にする。定常領域と対照的に、ヒンジドメインは、構造上多様であり、免疫グロブリンクラスおよびサブクラス中の配列および長さの両方で変動する。例えば、ヒンジ部の長さおよび可撓性は、IgGサブクラス内で変動する。IgG1のヒンジ部は、アミノ酸216～231を包含し、それが自由にフレキシブルであるために、Fabフラグメントは、それらの対称軸の周りで回転でき、2つの重鎖間ジスルフィド架橋の最初の位置を中心とする球内で移動できる。IgG2は、IgG1より短いヒンジを有し、12個のアミノ酸残基と4個のジスルフィド架橋を有する。IgG2のヒンジ部は、グリシン残基を欠き、比較的短く、また、追加の重鎖間ジスルフィド架橋により安定化された剛性ポリプロリン二重らせん体を含む。これらの特性は、IgG2分子の可撓性を制限する。IgG3は、62個のアミノ酸を含む（21個のプロリンと11個のシステインを含む）その特有の延長されたヒンジ部（IgG1ヒンジの約4倍の長さ）により、他のサブクラスとは異なり、柔軟性を欠くポリプロリン二重らせん体を形成する。IgG3では、Fabフラグメントは、Fcフラグメントから比較的遠くに離れており、より大きな可撓性を分子に与える。IgG3の伸びたヒンジは、他のサブクラスに比べて、そのより高分子量の原因でもある。IgG4のヒンジ部は、IgG1より短く、その可撓性は、IgG1とIgG2との中間である。ヒンジ部の可撓性は、次の順に低下すると報告されている：IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2。

## 【0470】

結晶学的調査によれば、免疫グロブリンヒンジ部は、機能的に次の3つの領域にさらに細分できる：上部ヒンジ部、コア部、および下部ヒンジ部。Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130: 87を参照されたい。上部ヒンジ部は、CH1のカルボキシル末端～運動を制限するヒンジ中の最初の残基、通常は2つの重鎖間の鎖間ジスルフィド結合を形成する最初のシステイン残基のアミノ酸を含む。上部ヒンジ部の長さは、抗体のセグメントの可撓性と相関する。コアヒンジ部は重鎖間ジスルフィド架橋を含み、下部ヒンジ部はCH2ドメインのアミノ末端に繋がり、CH2中の残基を含む（前出文献）。野性型ヒトIgG1のコアヒンジ部は、配列番号1241を含み、これは、ジスルフィド結合形成により二量体化されると、環状オクタペプチドを生成し、これが旋回軸として機能することにより、可撓性を付与すると考えられている。種々の実施形態では、本発明のリンカーは、任意の抗体（例えば、IgG、IgA、IgD、およびIgE、サブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、およびIgA1およびIgA2）を含む）の1、または2、または3個の上部ヒンジ部、コア部および下部ヒンジ部を含む。ヒンジ部はまた、1つまたは複数のグリコシル化部位も含み得、これは、多くの構造上異なるタイプの炭水化物付着部位を含む。例えば、IgA1は、ヒンジ部の17アミノ酸セグメント内に5つのグリコシル化部位を含み、腸内プロテアーゼに対するヒンジ部ポリペプチドの耐性を付与し、これは、分泌性免疫グロブリンにとって、有利な性質であると考えられる。種々の実施形態では、本発明のリンカーは、1つまたは複数のグリコシル化部位を含む。種々の実施形態では、リンカーは、ヒトIgG4抗体のヒンジ-CH2-CH3ドメインである。

## 【0471】

必要に応じ、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は抗体Fc領域に連結されてよく、CH2およびCH3ドメインの片方または両方、および場合によりヒンジ部を含む。例えば、単一ヌクレオチド配列としてFc領域に連結された本発明のPD-1またはP

10

20

30

40

50



D - L 1 結合物質をコードするベクターを用いて、このようなポリペプチドを調製できる。

【 0 4 7 2 】

いくつかの実施形態では、リンカーは P E G などの合成リンカーである。

【 0 4 7 3 】

種々の実施形態では、リンカーは機能性であり得る。例えば、限定されないが、リンカーは、折り畳みおよび / または安定性を改善するように、発現を改善するように、薬物動態学を改善するように、および / または本発明の P D - 1 または P D - L 1 結合物質の生物活性を改善するように機能し得る。別の例では、リンカーは、P D - 1 または P D - L 1 結合物質を特定の細胞型または部位に標的化するように機能し得る。

【 0 4 7 4 】

P D - 1 または P D - L 1 結合物質の改変および産生

種々の実施形態では、P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、V H H である標的化部分を含む。種々の実施形態では、V H H は、特定の生物源または特定の調製法に限定されない。例えば、V H H は通常、次記により得ることができる：( 1 ) 天然の重鎖抗体の V H H ドメインを単離することにより；( 2 ) 天然の V H H ドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により；( 3 ) 天然の V H H ドメインの「ヒト化」により、またはこのようなヒト化 V H H ドメインをコードする核酸の発現により；( 4 ) ヒト由来などの哺乳動物種由来などの任意の動物種由来の天然の V H ドメインの「ラクダ化」、またはこのようなラクダ化 V H ドメインをコードする核酸の発現により；( 5 ) 当該技術分野で記載の「ドメイン抗体」または「D a b」の「ラクダ化」により、またはこのようなラクダ化 V H ドメインをコードする核酸の発現により；( 6 ) 当該技術分野において既知のタンパク質、ポリペプチドまたはその他のアミノ酸配列のための合成または半合成技術を用いることにより；( 7 ) 当該技術分野において既知の核酸合成技術を用いて V H H をコードする核酸を調製し、続けて、こうして得られた拡散を発現させることにより；および / または ( 8 ) 前述の 1 つまたは複数の任意の組み合わせにより。

【 0 4 7 5 】

ある実施形態では、P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、ヒト P D - 1 または P D - L 1 を指向する天然の重鎖抗体の V H H ドメインに対応する V H H を含む。いくつかの実施形態では、このような V H H 配列は通常、ラクダ科の動物種を P D - 1 または P D - L 1 分子で適切に免疫化する（すなわち、P D - 1 または P D - L 1 に対する免疫応答を生じさせる、および / または P D - 1 または P D - L 1 に対する重鎖抗体を産生させるように免疫化する）ことにより、ラクダ科の動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、または B 細胞の任意の試料）を得ることにより、および任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、P D - 1 または P D - L 1 に対する V H H 配列を生成することにより、生成または得ることができる。いくつかの実施形態では、P D - 1 または P D - L 1 に対する天然の V H H ドメインは、ラクダ科の動物 V H H 配列の未処理ライブラリーから、例えば、当技術分野で既知の 1 種類または複数種類のスクリーニング技術を使って、P D - 1 または P D - L 1、またはその少なくとも 1 つの部分、フラグメント、抗原決定基またはエピトープを用いてこのようなライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることができる。このようなライブラリーおよび技術は、例えば、国際公開第 9 9 / 3 7 6 8 1 号、国際公開第 0 1 / 9 0 1 9 0 号、国際公開第 0 3 / 0 2 5 0 2 0 号、および国際公開第 0 3 / 0 3 5 6 9 4 号に記載されている。これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、例えば、国際公開第 0 0 / 4 3 5 0 7 号に記載のランダム変異誘発および / または C D R シャッフリングなどの技術により未処理 V H H ライブラリーから得られた V H H ライブラリーなどの未処理 V H H ライブラリー由来の改善された合成または半合成ライブラリーを使用し得る。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、P D - 1 または P D - L 1 に対する V H H 配列を得る別の技術は、重鎖抗体を発現できる遺伝子導入哺乳動物を適切に免疫化し（すなわち、P D - 1 または P D - L 1 に対する免疫応答を生じさせる、および / または P D - 1 または P D - L 1 に対する重鎖抗体を産生させるように免疫化し）、遺

10

20

30

40

50

伝子導入哺乳動物から好適な生物試料（例えば、血液試料、またはB細胞の任意の試料）を得て、その後、任意の好適な既知の技術を用いて、試料から出発して、PD-1またはPD-L1に対するV<sub>H</sub>H配列を生成することを含む。例えば、このために、国際公開第02/085945号および国際公開第04/049794号（これらの特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載の重鎖抗体発現マウスおよびさらなる方法および技術を使用できる。

【0476】

ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、「ヒト化された」、すなわち、天然のV<sub>H</sub>H配列（および特に、フレームワーク配列中の）のアミノ酸配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基を、ヒトの従来の4鎖抗体由来のV<sub>H</sub>Hドメイン中の対応する位置（単一または複数）にある1つまたは複数のアミノ酸残基で置換することによるV<sub>H</sub>Hを含む。これは、当該技術分野において既知のヒト化技術を使用して実施できる。いくつかの実施形態では、可能なヒト化置換またはヒト化置換の組み合わせは、当該技術分野において既知の方法、例えば、V<sub>H</sub>Hの配列と天然のヒトV<sub>H</sub>Hドメインの配列との間の比較により決定し得る。いくつかの実施形態では、ヒト化置換は、得られたヒト化V<sub>H</sub>Hが有利な機能特性をなお保持するように選択される。通常、ヒト化の結果として、本発明のV<sub>H</sub>Hは、より「ヒト様」になり得るが、対応する天然のV<sub>H</sub>Hドメインと比較して、低減された免疫原性などの好ましい特性を依然として保持している。種々の実施形態では、本発明のヒト化V<sub>H</sub>Hは、当該技術分野において既知の任意の好適な方法で得ることができ、したがって、出発材料として天然のV<sub>H</sub>Hドメインを含むポリペプチドを用いて得たポリペプチドに厳密に限定されない。

【0477】

ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、「ラクダ化」、すなわち、従来の4鎖抗体由来の天然のV<sub>H</sub>Hドメインのアミノ酸配列中の1つまたは複数のアミノ酸残基を、ラクダ科の動物の重鎖抗体のV<sub>H</sub>Hドメイン中の対応する位置（単一または複数）にある1つまたは複数のアミノ酸残基で置換しているV<sub>H</sub>Hを含む。いくつかの実施形態では、このような「ラクダ化」置換は、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>インターフェースを形成するおよび/または、そこに存在するアミノ酸位置に、および/またはいわゆるラクダ科の顕著な特徴残基（例えば、国際公開第94/04678号を参照されたい、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）の位置に挿入されるいくつかの実施形態では、ラクダ化V<sub>H</sub>Hを生成するかあるいは設計するための出発材料または出発点として用いられるV<sub>H</sub>配列は、哺乳動物由来のV<sub>H</sub>配列、例えば、V<sub>H</sub>3配列などの、ヒトのV<sub>H</sub>配列である。種々の実施形態では、ラクダ化V<sub>H</sub>Hは、当該技術分野において既知の任意の好適な方法で得ることができ（すなわち、上記（1）～（8）で示したような）、したがって、出発材料として天然のV<sub>H</sub>Hドメインを含むポリペプチドを用いて得たポリペプチドに厳密に限定されない。

【0478】

種々の実施形態では、「ヒト化」および「ラクダ化」の両方は、天然のV<sub>H</sub>HドメインまたはV<sub>H</sub>Hドメインをコードするヌクレオチド配列をそれぞれ用意し、次に、当該技術分野において既知の方法で、ヌクレオチド配列中の1つまたは複数のコドン新規ヌクレオチド配列がそれぞれ「ヒト化」または「ラクダ化」V<sub>H</sub>Hをコードするような方法で変更することにより実施することができる。この核酸は、その後、本発明の目的のV<sub>H</sub>Hを得るように、当該技術分野において既知の方法で発現させることができる。あるいは、天然のV<sub>H</sub>HドメインまたはV<sub>H</sub>Hドメインそれぞれのアミノ酸配列に基づいて、目的の本発明のヒト化またはラクダ化V<sub>H</sub>Hのそれぞれのアミノ酸配列を設計し、その後、当該技術分野において既知のペプチド合成技術を用いて新規に合成できる。また、天然のV<sub>H</sub>HドメインまたはV<sub>H</sub>Hドメインそれぞれのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に基づいて、目的のヒト化またはラクダ化V<sub>H</sub>Hのそれぞれをコードするヌクレオチド配列を設計し、次に当該技術分野において既知の核酸合成技術を用いて新規に合成でき、その後、こうして得られた核酸を、本発明の目的のV<sub>H</sub>Hが得られるように、当該技術分野において既知の

方法で発現させることができる。天然のV<sub>H</sub>H配列またはV<sub>H</sub>H配列から出発して、本発明のV<sub>H</sub>Hおよび/またはそれをコードする核酸を得るその他の好適な方法および技術は、当技術分野において既知であり、例えば、1つまたは複数の天然のV<sub>H</sub>H配列(1つまたは複数のF<sub>R</sub>配列および/またはC<sub>D</sub>R配列など)中の1つまたは複数の部分、1つまたは複数の天然のV<sub>H</sub>H配列(1つまたは複数のF<sub>R</sub>配列またはC<sub>D</sub>R配列など)中の1つまたは複数の部分、および/または1つまたは複数の合成または半合成配列を、本発明のV<sub>H</sub>Hまたはそれをコードするヌクレオチド配列もしくは核酸を得るように、好適な方法で組み合わせることを含み得る。

【0479】

本発明のPD-1またはPD-L1結合物質を産生する方法は、本明細書に記載されている。例えば、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードするDNA配列は、当該技術分野において既知の方法を使用して化学的に合成できる。合成DNA配列は、例えば、発現制御配列を含む他の適切なヌクレオチド配列に連結し、目的のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする遺伝子発現構築物を産生できる。したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。

【0480】

本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする核酸は、発現ベクター中に組み込まれ(連結され)てよく、このベクターは、遺伝子導入、形質転換、または形質導入技術により宿主細胞中に導入できる。例えば、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする核酸を、レトロウイルス形質導入により宿主細胞中に導入できる。宿主細胞の例は、大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胎児腎臓293(HEK293)細胞、ヒーラ細胞、仔ハムスター腎(BHK)細胞、サル腎培養細胞(COS)、またはヒト肝細胞癌細胞(例えば、HepG2)、および骨髓腫細胞である。形質転換宿主細胞は、宿主細胞に、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする遺伝子を発現させるのを可能とする条件下で増殖させることができる。したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。種々の実施形態では、本発明は、このような発現ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

【0481】

特定の発現および精製条件は、用いられる発現系に応じて変化する。例えば、遺伝子が<sup>10</sup>大腸菌中で発現される場合、遺伝子は最初に、操作された遺伝子を細菌プロモーター、例えば、TrpまたはTac、および原核生物シグナル配列の下流に配置することにより発現ベクター中に挿入される。別の例では、操作された遺伝子が真核生物宿主細胞、例えば、CHO細胞中で発現される場合、遺伝子は最初に、例えば、好適な真核生物プロモーター、分泌シグナル、転写促進因子、および種々のイントロンを含む発現ベクター中に挿入される。遺伝子構築物は、遺伝子導入、形質転換、または形質導入技術を用いて宿主細胞中に導入できる。

【0482】

本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、タンパク質の発現を許容する条件下で、PD-1またはPD-L1結合物質をコードする発現ベクターを形質導入した宿主細胞を増殖させることにより産生できる。発現後、タンパク質を収集し、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)およびヒスチジン(His)などの親和性タグまたはクロマトグラフィーにより、当該技術分野において周知の技術を用いて精製できる。<sup>40</sup>ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質はHisタグを含む。ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質はHisタグおよびHisタグの切断を可能にするタンパク分解部位を含む。

【0483】

したがって、種々の実施形態では、本発明は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質をコードする核酸を提供する。種々の実施形態では、本発明は、本発明のPD-1ま<sup>50</sup>

たはPD-L1結合物質をコードする核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0484】

種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質またはPD-1またはPD-L1結合物質を含むキメラタンパク質は、例えば、患者中でインビボ発現され得る。例えば、種々の実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質またはPD-1またはPD-L1結合物質を含むキメラタンパク質は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質またはPD-1またはPD-L1結合物質を含むキメラタンパク質をコードする核酸の形態で投与され得る。種々の実施形態では、核酸はDNAまたはRNAである。いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質またはPD-1またはPD-L1結合物質を含むキメラタンパク質は、修飾mRNA、すなわち、1種類または複数種類の修飾ヌクレオチドを含むmRNAによりコードされる。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、米国特許第8,278,036号で見出される1つまたは複数の修飾を含む。この特許の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、修飾mRNAは、m5C、m5U、m6A、s2U、および2'-O-メチル-Uのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の1種類または複数種類のキメラタンパク質をコードする修飾mRNAの投与に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾mRNAを含む遺伝子治療ベクターに関する。いくつかの実施形態では、本発明は、修飾mRNAを含む遺伝子治療ベクターに関する。種々の実施形態では、核酸は、腫瘍溶解性ウイルス、例えば、アデノウイルス、レオウイルス、はしか、単純ヘルペス、ニューカッスル病ウイルスまたはワクシニアの形態である。

10

20

【0485】

薬学的に許容可能な塩および賦形剤

本明細書で記載のPD-1またはPD-L1結合物質（および/またはいずれか他の治療薬）は、無機酸もしくは有機酸と反応できる、十分に塩基性の官能基を有し、または無機酸もしくは有機酸と反応できる、カルボキシル基を有して、薬学的に許容可能な塩を形成できる。薬学的に許容可能な酸付加塩は、当該技術分野でよく知られているように、薬学的に許容可能な酸から形成される。このような塩は、例えば、Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977)およびThe Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002、に挙げられた薬学的に許容可能な塩を含む。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0486】

薬学的に許容可能な塩としては、非限定的例であるが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、ホスフェート、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、樟脳スルホン酸塩、パモ酸塩、フェニル酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アクリル酸塩、クロロ安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、o-アセトキシ安息香酸塩、ナフタレン-2-安息香酸塩、イソ酪酸塩、フェニル酪酸塩、p-ヒドロキシ酪酸塩、ブチン-1,4-ジカルボキシレート、ヘキシン-1,4-ジカルボキシレート、カプリン酸塩、カプリル酸塩、ケイ皮酸塩、グリコール酸塩、ヘプタン酸塩、ヒプル酸塩、リンゴ酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、ニコチン酸塩、フタル酸塩、テラフタル酸塩、プロピオール酸塩、プロピオン酸塩、フェニルプロピオン酸塩、セバシン酸塩、スベリン酸塩、p-プロモベンゼンスルホン酸塩、

40

50

クロロベンゼンスルホン酸塩、エチルスルホン酸塩、2-ヒドロキシエチルスルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、ナフタレン-1,5-スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、および酒石酸塩が挙げられる。

#### 【0487】

「薬学的に許容可能な塩」という用語はまた、カルボン酸官能基などの酸性官能基、および塩基を有する本発明の組成物の塩を指す。適切な塩基としては、限定されないが、ナトリウム、カリウム、およびリチウムなどのアルカリ金属の水酸化物；カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属の水酸化物；アルミニウムおよび亜鉛などのその他の金属の水酸化物；アンモニア、および非置換またはヒドロキシ置換のモノ-、ジ-、またはトリ-アルキルアミン、ジシクロヘキシルアミンなどの有機アミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-、ビス-、またはトリス-(2-ヒドロキシエチル)アミン、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス-(ヒドロキシメチル)メチルアミンなどのモノ-、ビス-、またはトリス-(2-OH-低級アルキルアミン)、N,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アミンまたはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミンなどのN,N-ジ-低級アルキル-N-(ヒドロキシル-低級アルキル)-アミン；N-メチル-D-グルカミン；およびアルギニン、リシンなどのアミノ酸などが挙げられる。

#### 【0488】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載の組成物は、薬学的に許容可能な塩の形態である。

#### 【0489】

##### 医薬組成物および製剤

種々の実施形態では、本発明は、本明細書で記載のPD-1またはPD-L1結合物質（および/またはいずれか他の治療薬）および薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質を含む医薬組成物に関する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のうちのいずれか他の治療薬を含む医薬組成物に関する。さらなる実施形態では、本発明は、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質と本明細書に記載のうちのいずれか他の治療薬との組み合わせを含む医薬組成物に関する。本明細書で記載のいずれの医薬組成物も、薬学的に許容可能な担体またはピークルを含む組成物の成分として、対象に投与することができる。このような組成物は必要に応じ、適切な投与用の形態を与えるように、適切な量の薬学的に許容可能な賦形剤を含み得る。

#### 【0490】

種々の実施形態では、医薬賦形剤は、ピーナッツオイル、大豆油、ミネラルオイル、ゴマ油などの石油、動物、植物、または人工起源のものを含む、水および油などの液体であり得る。医薬賦形剤は、例えば、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、滑石、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであってよい。さらに、助剤、安定化剤、増粘化剤、潤滑剤、および着色料を使用することができる。一実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、対象に投与される場合、無菌である。本明細書で記載のうちのいずれかの薬剤が静脈内に投与される場合、水は有用な賦形剤である。生理食塩水および水性デキストロースならびにグリセリン溶液はまた、液体賦形剤として、特に注射可能溶液に用いることができる。適切な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセリンモノステアレート、滑石、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセリン、プロピレン、グリコール、水、エタノールなども挙げられる。本明細書で記載のいずれの薬剤も、必要に応じ、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでよい。適切な医薬賦形剤のそのほかの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed., 1995)に記載されている。この文献は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 4 9 1 】

本発明は、種々の製剤中に記載医薬組成物（および／または追加の治療薬）を含む。本明細書で記載のいずれの本発明の医薬組成物（および／または追加の治療薬）も、液剤、懸濁剤、乳濁液、点滴剤、錠剤、丸薬、ペレット、カプセル剤、液体含有カプセル剤、ゼラチンカプセル剤、散剤、徐放製剤、坐剤、乳剤、エアロゾル、噴霧剤、懸濁剤、凍結乾燥散剤、凍結懸濁剤、乾燥散剤、または使用に適する他の任意の形態をとってよい。一実施形態では、組成物はカプセルの形態である。別の実施形態では、組成物は錠剤の形態である。さらに別の実施形態では、医薬組成物は、軟質ゲルカプセルの形態に処方される。さらなる実施形態では、医薬組成物は、ゼラチンカプセルの形態に処方される。さらに別の実施形態では、医薬組成物は、液剤として処方される。

10

## 【 0 4 9 2 】

必要に応じて、本発明の医薬組成物（および／または追加の薬剤）は、可溶化剤も含み得る。また、薬剤は当技術分野において既知の適切なビークルまたは送達装置を使って送達することができる。本明細書で概要を述べた併用療法剤は、単一の送達ビークルまたは送達担体で同時送達できる。

## 【 0 4 9 3 】

本発明の医薬組成物（および／または追加の薬剤）を含む製剤は単位剤形として好都合に提供でき、薬学の分野でよく知られたいずれかの方法により調製され得る。このような方法は通常、治療薬を担体と混合するステップを含み、担体は１種類または複数種類の補助成分を構成する。通常、製剤は、治療薬と、液体担体、微粉化固相担体、または両方とを均一に、完全に混合すること、その後、必要に応じ、生成物を所望の製剤の剤形に成形すること（例えば、湿式または乾式造粒、散剤ブレンド、など、それに続く当該技術分野で既知の従来する方法を使って錠剤化すること）により調製される。

20

## 【 0 4 9 4 】

種々の実施形態では、本明細書で記載のいずれの医薬組成物（および／または追加の薬剤）も、本明細書で記載の投与方法に適合された組成物として、ルーチン手順に従って処方される。

## 【 0 4 9 5 】

投与経路は、例えば、経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、脳内、膈内、経皮、直腸内、吸入、または局所を含む。投与は局所的または全身性であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、経口により行われる。別の実施形態では、投与は非経口の注射による。投与方法は、開業医の自由裁量に任ずことができ、１部には、病状の部位に依存する。大抵の場合、投与は本明細書で記載のうちのいずれかの薬剤の血流中への放出をもたらす。

30

## 【 0 4 9 6 】

一実施形態では、本明細書で記載のPD-1またはPD-L1結合物質は、経口投与に適合された組成物として、常法に従って処方される。経口送達用の組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、水性または油性懸濁剤、粒剤、散剤、乳剤、カプセル剤、シロップ剤、またはエリキシル剤の形態であってよい。経口投与される組成物は、薬学的に口当たりの良い製剤を提供するために、１種類または複数種類の薬剤、例えば、ラクトース、アスパルテムまたはサッカリンなどの甘味料、ペパーミント、冬緑油またはチェリー油などの調味料、着色料および保存剤を含み得る。さらに、タブレットまたは丸薬形態では、組成物をコートして、消化管での崩壊および吸収を遅らせることにより長期間にわたり持続作用を可能とすることができる。本明細書に記載のうちのいずれかのPD-1またはPD-L1結合物質を運ぶ浸透圧的に活性な物質を取り囲む選択的透過性膜も、経口投与組成物として好適である。これらの後者のプラットフォームでは、カプセルの周りの環境からの液体が運搬化合物により吸収され、この化合物は膨潤し、開口部を介して薬剤または薬剤組成物を追い出す。これらの送達プラットフォームは、即時放出製剤の急上昇プロファイルとは対照的に、基本的に０次の送達プロファイルを提供することができる。グリセロールモノステアレートまたはグリセロールステアレートなどの時間遅延物質も使用すること

40

50

ができる。経口組成物には、標準的な賦形剤、例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、および炭酸マグネシウムを含んでよい。一実施形態では、賦形剤は医薬品グレードである。活性化化合物に加えて、懸濁剤は、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロオキシド、ベントナイト、寒天、トラガント、など、およびこれらの混合物などの沈殿防止剤を含んでよい。

#### 【0497】

非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下および関節内注射および注入）に好適な剤形は、例えば、液剤、懸濁剤、分散剤、乳剤、などを含む。それらは、無菌の固相組成物（例えば、凍結乾燥組成物）の形態で製造されてよく、これは、使用直前に、無菌の注入可能媒体中に溶解または懸濁され得る。それらは、例えば、当該技術分野において、既知の懸濁剤または分散剤を含み得る。非経口の投与に好適な製剤成分としては、注射用の水、食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、またはその他の合成溶媒などの無菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸もしくは亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤、EDTAなどのキレート化剤、アセテート、シトレート、またはホスフェートなどの緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調節剤が挙げられる。

#### 【0498】

静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌性水、クレモフォア E L T M (BASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。担体は、製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、微生物に対し保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール）、およびこれらの好適な混合物を含む、溶媒または分散媒であってよい。

#### 【0499】

本明細書にて提供される組成物は、単独でまたは他の好適な成分と組み合わせて、吸入により投与されるエアロゾル製剤（すなわち、「噴霧化」製剤）を作製することができる。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの許容され得る加压化噴射剤中に入れることができる。

#### 【0500】

本明細書で記載のいずれの本発明の医薬組成物（および/または追加の薬剤）も、当業者に既知の制御放出によりまたは徐放手段または送達装置により投与可能である。例としては、米国特許第 3,845,770 号；同第 3,916,899 号；同第 3,536,809 号；同第 3,598,123 号；同第 4,008,719 号、同第 5,674,533 号、同第 5,059,595 号、同第 5,591,767 号、同第 5,120,548 号、同第 5,073,543 号、同第 5,639,476 号、同第 5,354,556 号、および同第 5,733,556 号に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。これらの特許のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。このような剤形は、例えば、ヒドロプロピルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、その他のポリマーマトリクス、ゲル、浸透膜、浸透系、多層被膜、微粒子、リポソーム、マイクロスフェア、またはこれらの組み合わせを用いて、1 つまたは複数の有効成分の制御放出または徐放を可能にするために有用であり、様々な割合での所望の放出プロファイルを提供することができる。本明細書に記載されたものを含む当業者に既知の適切な制御放出または徐放製剤は、本明細書で記載の薬剤の有効成分と共に使用する上で容易に選択することができる。本発明はこのように、限定されないが、制御放出または徐放に適合された錠剤、カプセル、ジェルカプセルおよびカプレットなどの経口投与に好適な単位剤形を提供する。

#### 【0501】

有効成分の制御放出または徐放は、限定されないが、pH 変化、温度変化、適切な波長

10

20

30

40

50

の光による刺激、酵素の濃度もしくは利用可能性、水の濃度または利用可能性、または他の生理学的条件または化合物を含む、種々の条件により刺激できる。

【0502】

別の実施形態では、徐放系を、治療される標的領域の近傍に配置でき、したがって全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)を参照）。Langer, 1990, Science 249: 1527 - 1533、中の概説で考察されている他の放出制御系を使用し得る。

【0503】

医薬製剤は好ましくは無菌である。無菌化は、例えば、無菌濾過膜で濾過することにより達成される。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥および再構成の前またはその後でフィルター滅菌を行うことができる。

【0504】

投与および投与量

本発明により投与されるPD-1またはPD-L1結合物質および/または本明細書に記載のうちのいずれかの治療薬の実際の用量は、特定の剤形および投与方法に応じて変わることは理解されよう。当業者なら、PD-1またはPD-L1結合物質の作用を変え得る多くの要因（例えば、体重、性別、食事、投与時期、投与経路、排出速度、対象の状態、薬剤の組み合わせ、遺伝的素因および反応感度）を考慮に入れることができる。投与は、最大耐量の範囲内で連続的にまたは1種類または複数種類の別々の投与量で実施できる。与えられた一連の条件に対する最適投与速度は、従来の用量投与試験を使って、当業者により確認できる。

【0505】

いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質および/または本明細書に記載のうちのいずれかの治療薬の好適な投与量は、対象の体重の約0.01mg/kg～約10g/kg、対象の体重の約0.01mg/kg～約1g/kg、対象の体重の約0.01mg/kg～約100mg/kg、対象の体重の約0.01mg/kg～約10mg/kgの範囲であり、例えば、約0.01mg/kg、約0.02mg/kg、約0.03mg/kg、約0.04mg/kg、約0.05mg/kg、約0.06mg/kg、約0.07mg/kg、約0.08mg/kg、約0.09mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、約1.5mg/kg、約1.6mg/kg、約1.7mg/kg、約1.8mg/kg、約1.9mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg体重、約100mg/kg体重、約1g/kg体重、約10g/kg体重（これらの間の全ての値および範囲を含む）である。

【0506】

PD-1またはPD-L1結合物質および/または本明細書に記載のうちのいずれかの治療薬の個々の投与量は、例えば、単位剤形当たり約0.01mg～約100g、約0.01mg～約75g、約0.01mg～約50g、約0.01mg～約25g、約0.01mg～約10g、約0.01mg～約7.5g、約0.01mg～約5g、約0.01mg～約2.5g、約0.01mg～約1g、約0.01mg～約100mg、約0.1mg～約100mg、約0.1mg～約90mg、約0.1mg～約80mg、約0.1mg～約70mg、約0.1mg～約60mg、約0.1mg～約50mg、約0.1mg～約40mgの有効成分、約0.1mg～約30mg、約0.1mg～約20mg、約0.1mg～約10mg、約0.1mg～約5mg、約0.1mg～約3mg、約0.1mg～約1mg、または単位剤形当たり約5mg～約80mgを含む単位剤形で投与でき

10

20

30

40

50



る。例えば、単位剤形は、約 0.01 mg、約 0.02 mg、約 0.03 mg、約 0.04 mg、約 0.05 mg、約 0.06 mg、約 0.07 mg、約 0.08 mg、約 0.09 mg、約 0.1 mg、約 0.2 mg、約 0.3 mg、約 0.4 mg、約 0.5 mg、約 0.6 mg、約 0.7 mg、約 0.8 mg、約 0.9 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 3 mg、約 4 mg、約 5 mg、約 6 mg、約 7 mg、約 8 mg、約 9 mg、約 10 mg、約 15 mg、約 20 mg、約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、約 100 mg、約 200 mg、約 500 mg、約 1 g、約 2.5 g、約 5 g、約 10 g、約 25 g、約 50 g、約 75 g、約 100 g（これらの間の全ての値および範囲を含む）であってよい。

10

#### 【0507】

一実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質および/または本明細書に記載のうちのいずれかの治療薬は、毎日約 0.01 mg ~ 約 100 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 75 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 50 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 25 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 10 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 7.5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 2.5 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 1 g、毎日約 0.01 mg ~ 約 100 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 100 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 95 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 90 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 85 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 80 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 75 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 70 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 65 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 60 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 55 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 50 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 45 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 40 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 35 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 30 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 25 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 20 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 15 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 10 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 5 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 3 mg、毎日約 0.1 mg ~ 約 1 mg、または毎日約 5 mg ~ 約 80 mg の量で投与される。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、約 0.01 mg、約 0.02 mg、約 0.03 mg、約 0.04 mg、約 0.05 mg、約 0.06 mg、約 0.07 mg、約 0.08 mg、約 0.09 mg、約 0.1 mg、約 0.2 mg、約 0.3 mg、約 0.4 mg、約 0.5 mg、約 0.6 mg、約 0.7 mg、約 0.8 mg、約 0.9 mg、約 1 mg、約 2 mg、約 3 mg、約 4 mg、約 5 mg、約 6 mg、約 7 mg、約 8 mg、約 9 mg、約 10 mg、約 15 mg、約 20 mg、約 25 mg、約 30 mg、約 35 mg、約 40 mg、約 45 mg、約 50 mg、約 55 mg、約 60 mg、約 65 mg、約 70 mg、約 75 mg、約 80 mg、約 85 mg、約 90 mg、約 95 mg、約 100 mg、約 200 mg、約 500 mg、約 1 g、約 2.5 g、約 5 g、約 7.5 g、約 10 g、約 25 g、約 50 g、約 75 g、約 100 g（これらの間の全ての値および範囲を含む）の1日量で投与される。

20

30

#### 【0508】

本発明の特定の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質および/または本明細書に記載のうちのいずれかの治療薬を含む医薬組成物は、例えば、1日2回以上（例えば、毎日約2回、約3回、約4回、約5回、約6回、約7回、約8回、約9回、または約10回）、1日約1回、約1日おき、約3日おき、週約1回、2週毎に約1回、毎月約1回、2ヶ月毎に約1回、3ヶ月毎に約1回、6ヶ月毎に約1回、または毎年約1回投与されてよい。

40

#### 【0509】

併用療法および追加の治療薬

種々の実施形態では、本発明の医薬組成物は、追加の治療薬と共に同時投与される。同時投与は、同時または順次であってよい。

#### 【0510】

一実施形態では、追加の治療薬および本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、対象に同時に投与される。本明細書で使用される場合、用語の「同時に」は、追加の治療

50

薬およびPD-1またはPD-L1結合物質が約60分程度、例えば、約30分程度、約20分程度、約10分程度、約5分程度、または約1分程度の時間間隔で投与されることを意味する。追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質の投与は、単一製剤（例えば、追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質を含む製剤）または別々の製剤（例えば、追加の治療薬を含む第1の製剤およびPD-1またはPD-L1結合物質を含む第2の製剤）の同時投与により行うことが可能である。

#### 【0511】

同時投与は、それらの投与のタイミングが、追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質の薬理学的活性が時間経過と共に重なりあい、それにより組み合わせられた治療効果が発揮されるような場合には、治療薬が同時に投与される必要はない。例えば、追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質は、順次に投与できる。本明細書で使用される場合、用語の「順次に」は、追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質が約60分を超える時間間隔で投与されることを意味する。例えば、追加の治療薬とPD-1またはPD-L1結合物質との逐次投与の間の時間間隔を、約60分を超えて、約2時間を超えて、約5時間を超えて、約10時間を超えて、約1日を超えて、約2日を超えて、約3日を超えて、約1週間を超えて間隔を開ける、約2週間を超えて間隔を開ける、または約1ヶ月を越えて間隔を開けることができる。最適投与時間は、投与される追加の治療薬およびPD-1またはPD-L1結合物質の代謝、排泄速度、および/または薬力学的活性に依存するであろう。追加の治療薬またはPD-1もしくはPD-L1結合物質のうちのいずれかを、最初に投与してよい。

#### 【0512】

同時投与はまた、治療薬が同じ投与経路により対象に投与される必要はない。むしろ、それぞれの治療薬は、任意の適切な経路、例えば、非経口または経口（non-parenterally）で投与できる。

#### 【0513】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のPD-1またはPD-L1結合物質は、別の治療薬と同時投与されると、相乗的に作用する。このような実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質および追加の治療薬は、その治療薬が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。

#### 【0514】

いくつかの実施形態では、本発明は、追加の治療薬としての化学療法剤に関する。例えば、限定されないが、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質と化学療法剤とのこのような組み合わせは、本明細書の別の場所で記載のように、癌の治療に使用される。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパ、CYTOSXAN（シクロホスファミド）、スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インブrosulfanおよびピボスルファン、アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ、エチレンイミン、メチラメラミン例えば、アルトレタミン、トリエチルエネラミン、トリエチレンネフォスフォラミド、トリエチレンチオフォスフォラミドおよび、トリメチロールメラミン、アセトゲニン（例えば、プラタシン、プラタチノン）、カントテシン（合成類似剤トポテカンを含む）、プリオスタチン、カリスタチン（callystatin）、CC-1065（アドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）、クリプトフィシン（例えば、クリプトフィシン1、クリプトフィシン8など）、ドラスタチン、デュオカルマイシン（合成類似薬KW-2189およびCB1-TM1を含む）、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコディクチン、スポンギスタチン、ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化メクロルエタミン塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン（ranimustine）、抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（カリチアマイシン、特にカリチア

マイシニングマIIとカリチアマイシンオメガII (Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))を参照)、ダイネマイシン、ダイネマイシンAを含む、ビスフォスフォネート、例えば、クロドロネート、エスペラマイシン、ならびに、ネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシン (ドキシソルピシン) (モルフォリノドキシソルピシン、シアノモルフォリノドキシソルピシン、2 - ピロリノドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン (例えば、マイトマイシンC)、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン、代謝拮抗薬、例えば、メトトレキセートおよび5 - フルオロウラシル (5 - FU)、葉酸の類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキサート、プリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド (minoglutethimide)、ミトタン、トリロスタン、葉酸補充液、例えば、フロリン酸 (frolinic acid)、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトラキセート (edatraxate)、デメコルチン、ジアジクオン、エルフォルミチン (elformithine)、エリプチニウムアセテート、エボチロン、エトグルシド、ガリウムニトレート、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン (lonidainine)、メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサマイトシン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2 - エチルヒドラジド、プロカルバジン、PSK多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン (例えば、T2毒、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイディン)、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド (アラ - C)、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えば、タキソールパクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、アブラキサンクレモフォアフリー、アルブミン処理ナノ粒子形成パクリタキセル (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.)、タキソテールドキシセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)、クロランブシル、ジェムザール (ゲムシタビン)、6 - チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキセート、白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン、ピンブラスチン、白金、エトボシド (VP-16)、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ナベルピン (ピノレルピン)、ノバントロン、テニボシド、エダトレキセート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、イリノテカン (キャンプトサー, CPT-11) (イリノテカンと5 - FUおよびロイコボリンの治療法を含む)、トボイソメラゼ阻害剤 RFS2000、ヂルルオロメチルオルニチン (DMFO)、レチノイド、例えば、レチノイン酸、カベシタビン、コンブレタスタチン、ロイコボリン (LV)、オキサリプラチン

10

20

30

40

50

、オキサリプラチン治療法（FOLFOLX）を含む、ラパチニブ（Tykerb）、PKC-、Raf、H-Ras、EGFRの阻害剤（例えば、エルロチニブ（Tarceva）および細胞増殖を抑制するVEGF-Aならびに上述のうちのいずれかの薬剤の薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体、が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療の方法は、放射線の使用をさらに含み得る。さらに、治療の方法は、光線力学的治療の使用をさらに含み得る。

【0515】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、PD-1またはPD-L1結合物質および化学療法剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、化学療法剤を用いる治療を受けている患者に対するPD-1またはPD-L1結合物質の投与に関する。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、DNA挿入剤、例えば、限定されないが、ドキソルビシン、シスプラチン、ダウノルビシン、およびエピルビシンである。ある実施形態では、DNA挿入剤は、ドキソルビシンである。

10

【0516】

例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、ドキソルビシンと同時投与されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、腫瘍または癌の治療での使用において、ドキソルビシンと同時投与されると相乗的に作用する。例えば、PD-1またはPD-L1結合物質とドキソルビシンとの同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および/または進行および/または転移を遅らせ得る。例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質とドキソルビシンの組み合わせは、単剤療法の場合に単独で使用する物質に比べて、改善された安全性プロファイルを示し得る。例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質およびドキソルビシンは、その物質が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、変異IFN などの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異IFN は、配列番号317または配列番号318に対して、M148A、R149A、およびL153Aなどのように、148、149および153の位置に1つまたは複数の変異を含む。

20

【0517】

いくつかの実施形態では、本発明は、1種類または複数種類の免疫調節薬、例えば、限定されないが、免疫チェックポイントを調節する物質を用いる併用療法に関する。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、PD-L1、およびPD-L2のうちの1つまたは複数を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1阻害剤である。種々の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、PD-L1、およびPD-L2のうちの1つまたは複수에特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、ニボルマブ（ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、オプジーボ、BRISTOL MYERS SQUIBB）、ペムブロリズマブ（キイトルーダ、MERCCK）、ピディリズマブ（CT-011, CURE TECH）、MK-3475（MERCCK）、BMS936559（BRISTOL MYERS SQUIBB）、MPDL3280A（ROCHE）などの抗体である。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lのうちの1つまたは複数を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD137またはCD137Lのうちの1つまたは複수에特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、ウレルマブ（BMS-663513および抗4-1BB抗体としても知られる）などの抗体である。いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、固形腫瘍および/またはB細胞非ホジキンリンパ腫および/または頭頸部癌および/または多発性骨髄腫の治療のために、ウレルマブと組み合わせられる（必要に応じ、ニボルマブ、リリルマブ、およびウレルマブのうちの1つまたは複数と組み合わせられる）。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2、およびPPP2R5Aのうちの1つまたは複数を標的とする物質である。

30

40

50

種々の実施形態では、免疫調節薬は、CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2、およびPPP2R5Aのうちの1つまたは複数に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、例えば、イピリムマブ(MDX-010、MDX-101、ヤーボイ、BMS)および/またはトレメリムマブ(Pfizer)などの抗体である。いくつかの実施形態では、本発明のキメラタンパク質は、黒色腫、前立腺癌、および肺癌のうちの1つまたは複数の治療のために、イピリムマブと組み合わせられる(必要に応じ、パビツキシマブと組み合わせられる)。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20を標的とする。種々の実施形態では、免疫調節薬は、CD20に特異的な抗体である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、限定されないが、オフアツムマブ(GENMAB)、オビヌツズマブ(GAZYVA)、AME-133v(APPLIED MOLECULAR EVOLUTION)、オクレリズマブ(GENENTECH)、TRU-015(TRUBION/EMERGENT)、ベルツズマブ(IMMU-106)などの抗体である。

10

#### 【0518】

いくつかの実施形態では、本発明は、PD-1またはPD-L1結合物質およびチェックポイント阻害剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、チェックポイント阻害剤を用いる治療を受けている患者に対するPD-1またはPD-L1結合物質の投与に関する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、およびCTLA-4(本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、および抗CTLA-4物質のうちのいずれかを含む)のうちの1つまたは複数を標的とする物質である。いくつかの実施形態ではチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、オブジーボ、BRISTOL MYERS SQUIBB)、ペムブロリズマブ(キイトルーダ、MERCK)、ピディリズマブ(CT-011, CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、MPDL3280A(ROCHE)、イピリムマブ(MDX-010、MDX-101、ヤーボイ、BMS)およびトレメリムマブ(Pfizer)のうちの1つまたは複数である。ある実施形態では、チェックポイント阻害剤はPD-L1に対する抗体である。

20

#### 【0519】

例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、抗PD-L1抗体と同時に投与されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、腫瘍または癌の治療での使用において、抗PD-L1抗体と同時に投与されると相乗的に作用する。例えば、PD-1またはPD-L1結合物質と抗PD-L1抗体との同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および/または進行および/または転移を遅らせ得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質と抗PD-L1抗体の組み合わせは、単剤療法の場合に単独で使用される物質に比べて、改善された安全性プロファイルを示し得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質および抗PD-L1抗体は、その物質が単剤療法で使用される場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、変異IFNなどの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異IFNは、配列番号317または配列番号318に準拠して、M148A、R149A、およびL153Aなどのように、148、149および153の位置に1つまたは複数の変異を含む。

30

40

#### 【0520】

いくつかの実施形態では、本発明は、PD-1またはPD-L1結合物質および免疫抑制剤を用いる併用療法に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫抑制剤を用いる治療を受けている患者に対するPD-1またはPD-L1結合物質の投与に関する。ある実施形態では、免疫抑制剤は、TNFである。

#### 【0521】

例示的实施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、TNFと同時に投与される

50

と、相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、腫瘍または癌の治療での使用において、TNF と同時投与されると相乗的に作用する。例えば、PD - 1 または PD - L 1 結合物質と TNF との同時投与は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および / または進行および / または転移を遅らせ得る。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質と TNF の組み合わせは、単剤療法の場合に単独で使用する物質に比べて、改善された安全性プロファイルを示し得る。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質および TNF は、その物質が単剤療法で 사용되는場合に採用される用量よりも低い用量で投与され得る。いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、変異 IFN などの変異インターフェロンを含む。例示的实施形態では、変異 IFN は、配列番号 317 または配列番号 318 に準拠して、M148A、R149A、および L153A などのように、148、149 および 153 の位置に 1 つまたは複数の変異を含む。

10

#### 【0522】

いくつかの実施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、キメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞療法と組み合わせて使用されると、相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、腫瘍または癌の治療において、CAR T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、血液系腫瘍の治療において、CAR T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例示的实施形態では、PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、固形腫瘍の治療において、CAR T 細胞療法と組み合わせて使用されると相乗的に作用する。例えば、PD - 1 または PD - L 1 結合物質と CAR T 細胞との使用は、相乗的に作用して、腫瘍または癌を低減または除去し得、または腫瘍または癌の増殖および / または進行および / または転移を遅らせ得る。種々の実施形態では、本発明の PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、CAR T 細胞分裂を誘導する。種々の実施形態では、本発明の PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、CAR T 細胞増殖を誘導する。種々の実施形態では、本発明の PD - 1 または PD - L 1 結合物質は、CAR T 細胞増のアナジーを防止する。

20

#### 【0523】

種々の実施形態では、CAR T 細胞療法は、抗原 (例えば、腫瘍抗原)、例えば、限定されないが、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、5T4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD47、CS1、CD138、Lewis - Y、L1 - CAM、MUC16、ROR - 1、IL13R2、gp100、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、B 細胞成熟抗原 (BCMA)、ヒトパピローマタイプ 16 E6 (HPV - 16 E6)、CD171、葉酸受容体アルファ (FR)、GD2、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2)、メソテリン、EGFRvIII、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、癌胎児抗原 (CEA)、および血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (VEGFR2)、ならびに当該技術分野において周知のその他の腫瘍抗原を標的とする CAR T 細胞を含む。追加の腫瘍抗原の例としては、MART - 1 / Melan - A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV)、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質 (ADAbp)、シクロフィリン b、結腸直腸関連性抗原 (CRC) - 0017 - 1A / GA733、癌胎児抗原 (CEA) およびその免疫原性エピトープ CAP - 1 および CAP - 2、etv6、aml1、前立腺特異抗原 (PSA) およびその免疫原性エピトープ PSA - 1、PSA - 2、および PSA - 3、T 細胞受容体 / CD3 - ゼータ鎖、MAGE ファミリーの腫瘍抗原 (例えば、MAGE - A1、MAGE - A2、MAGE - A3、MAGE - A4、MAGE - A5、MAGE - A6、MAGE - A7、MAGE - A8、MAGE - A9、MAGE - A10、MAGE - A11、MAGE - A12、MAGE - Xp2 (MAGE - B2)、MAGE - Xp3 (MAGE - B3)、MAGE - Xp4 (MAGE - B4)、MAGE - C1、MAGE - C2、MAGE - C3、MAGE - C4、MAGE - C5)、GAGE ファミリーの腫瘍抗原 (

30

40

50

例えば、GAGE - 1、GAGE - 2、GAGE - 3、GAGE - 4、GAGE - 5、GAGE - 6、GAGE - 7、GAGE - 8、GAGE - 9)、BAGE、RAGE、LAGE - 1、NAG、GnT - V、MUM - 1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 $\alpha$ -フェトプロテイン、E-cadherin、 $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -cateninおよび $\gamma$ -catenin、p120ctn、gp100、Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質(APC)、フォドリン、コネキシン37、Ig-イデオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルススタンパク質などのウイルス産物、Smadファミリーの腫瘍抗原、Imp-1、NA、EBV-コード化核内抗原(EBNA)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、c-erbB-2、CD19、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、およびPD-L2が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0524】

代表的CAR T細胞療法としては、JCAR014(Juno Therapeutics)、JCAR015(Juno Therapeutics)、JCAR017(Juno Therapeutics)、JCAR018(Juno Therapeutics)、JCAR020(Juno Therapeutics)、JCAR023(Juno Therapeutics)、JCAR024(Juno Therapeutics)、CTL019(Novartis)、KTE-C19(Kite Pharma)、BPX-401(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-501(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-601(Bellicum Pharmaceuticals)、bb2121(Bluebird Bio)、CD-19 Sleeping Beauty cells(眠れる森の美女細胞)(Ziopharm Oncology)、UCART19(Collectis)、UCART123(Collectis)、UCART38(Collectis)、UCARTCS1(Collectis)、OXB-302(Oxford BioMedica)、MB-101(Mustang Bio)およびInnovative Cellular Therapeuticsにより開発されたCAR T細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0525】

いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、限定されないが、3-インターフェロン、酢酸グラチラマー、T-インターフェロン、IFN- $\gamma$ 2(米国特許出願公開第2002/0025304号)、スピロゲルマニウム(例えば、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-2-アザ-8,8-ジメチル-8-ゲルマスピロ[4:5]デカン、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-2-アザ-8,8-ジエチル-8-ゲルマスピロ[4:5]デカン、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-2-アザ-8,8-ジブチル-8-ゲルマスピロ[4:5]デカン、およびN-(3-ジメチルアミノプロピル)-2-アザ-8,8-ジブチル-8-ゲルマスピロ[4:5]デカン)、ビタミンD類似体(例えば、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 、(例えば、米国特許第5,716,946号を参照))、プロスタグランジン(例えば、ラタノプロスト、プリモニジン、PGE1、PGE2およびPGE3、例えば、米国特許出願公開第2002/0004525号を参照)、テトラサイクリンと誘導体(例えば、ミノサイクリンおよびドキシサイクリン、例えば、米国特許出願公開第2002/0022608号を参照)、VLA-4結合抗体(例えば、米国特許出願公開第2009/0202527号を参照)、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質ステロイド、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、2-クロロデオキシアデノシン、ミトキサントロン、スルファサラジン、メトトレキサート、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、フマレート、抗CD20抗体(例えば、リツキシマブ)、およびチザニジン塩酸塩を含むMS治療薬のうちの1つまたは複数と組み合わせて多発性

10

20

30

40

50

硬化症（MS）の治療方法で使用される。

【0526】

いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、MSの1つまたは複数の症状または副作用を治療する1種類または複数種類の治療薬と組み合わせて使用される。このような薬剤としては、アマンタジン、バクロフェン、パパベリン、メクリジン、ヒドロキシジン、スルファメトキサゾール、シプロフロキサシン、ドクセート、ペモリン、ダントロレン、デスモプレシン、デキサメタゾン、トルテロジン、フェニトイン（phenytoin）、オキシブチニン、ピサコジル、ベンラファキシン、アミトリプチリン、メテナミン、クロナゼパム、イソニアジド、バルデナフィル、ニトロフランチン、車前子親水性粘漿薬、アルプロスタジル、ガバペンチン、ノルトリプチリン、パロキセチン、プロパンテリンブロミド、モダフィニル、フルオキセチン、フェナゾピリジン、メチルプレドニゾロン、カルバマゼピン、イミプラミン、ジアゼパム、シルデナフィル、ブプロピオン、およびセルトラリンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0527】

いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1種類または複数種類の本明細書に記載の疾患修飾治療薬（DMT）（例えば、表Aの物質）と組み合わせて多発性硬化症の治療方法で使用される。いくつかの実施形態では、本発明は、1種または複数種類の開示結合物質を含まない場合の、1つまたは複数の本明細書に記載の類DMT（例えば、下表に挙げた物質）と比べて、改善された治療効果を提供する。ある実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質と1種類または複数種類のDMTの組み合わせは、相乗的治療効果をもたらす。

20

30

40

50



【表 1】

## 疾患修飾治療薬の例

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
テリフルノミド	AUBAGIO (GENZYME)	毎日；丸薬の経口摂取；7 mg または14 mg
インターフェロン $\beta$ -1a	AVONEX (BIOGEN IDEC)	週1回；筋肉内（筋肉中）注射；30 mcg
インターフェロン $\beta$ 1b	BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)	隔日；皮下（皮膚の下）注射；250 mcg
酢酸グラチラマー	COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)	毎日；皮下（皮膚の下）注射；20 mg (20,000 mcg) または週3回；皮下（皮膚の下）注射；40 mg (40,000 mcg)
インターフェロン $\beta$ 1b	EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	隔日；皮下（皮膚の下）注射；250 mcg
フィンゴリモド	GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	毎日；カプセル剤の経口摂取；0.5 mg
アレムツズマブ（抗CD52 モノクローナル抗体）	LEMTRADA (GENZYME)	5日間連続静脈内注入、その後、1年後に3日間連続静脈内注入（12 mg）
ミトキサントロン	NOVANTRONE (EMD SERONO)	医療施設で年4回IV注入。2～3年間で約8～12用量の生涯累積投与量許容限度（140 mg/m <sup>2</sup> ）
ペグ化インターフェロン $\beta$ 1a	PLEGRIDY (BIOGEN IDEC)	14日毎；皮下（皮膚の下）注射；125 mcg
インターフェロン $\beta$ 1a	REBIF (EMD SERONO, INC.)	週3回；皮下（皮膚の下）注射；44 mcg
ジメチル fumarate (BG-12)	TECFIDERA (BIOGEN IDEC)	1日2回；カプセル剤の経口摂取；1週間は120 mg、その後240 mg
ナタリズマブ（ヒト化モノクローナル抗体VLA-4アンタゴニスト）	TYSABRI (BIOGEN IDEC)	4週毎に登録注入施設中でIV注入；300 mg
開発中のDMT		
アミロライド（酸感受性イオンチャネル $\alpha$ 1、上皮型ナトリウムチャネル、Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交換輸送体を標的とする）	PAR PHARMACEUTICAL, PERRIGO COMPANY, SIGMAPHARM LABORATORIES	経口
ATX-MS-1467（主要組織適合抗原クラスII、ミエリン塩基性タンパク質に対するT細胞応答を標的とする）	APITOPE / MERCK SERONO	皮内、皮下
BAF312（スフィンゴシン1-ホスファート（S1P）受容体サブタイプS1P1およびS1P5、B細胞分布、T細胞分布を標的とする）	NOVARTIS PHARMA	経口

10

20

30

40

50

【表 2】

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
BGC20-0134（炎症促進性および抗炎症性サイトカインを標的とする）	BTG PLC	経口
BLIB033（LINGO-1（「ロイシンリッチ反復および免疫グロブリン様ドメイン含有Nogo受容体相互作用タンパク質」）を標的とする）	BIOGEN	静脈内注入を第1相・第2相臨床試験で使用、皮下注射を第1相臨床試験で使用
クラドリビン（CD4+ T細胞、DNA合成および修復、E-セレクチン細胞内接着性分子-1、炎症促進性サイトカイン、インターロイキン2およびインターロイキン2R、炎症促進性サイトカイン、インターロイキン8およびRANTESサイトカイン分泌単球およびリンパ球移動を標的とする）	MERCK SERONO	経口
シクロホスファミド（T細胞、特にCD4+ヘルパーT細胞、B細胞を標的とする）	BAXTER HEALTHCARE CORPORATION	経口、月1回の静注パルス療法
ダクリズマブ（CD25、T細胞の免疫調節物質を標的とするヒト化モノクローナル抗体）	BIOGEN IDEC/ABBVIE BIOTHERAPEUTICS	月1回のIM注射が計画されている
ダルファムブリジン（電位作動型カリウムチャネル、デジエネリン／上皮ナトリウムチャネル、サブユニットCavbet a3を含むL型カルシウムチャネルを標的とする）	ACORDA THERAPEUTICS / BIOGEN IDEC	12時間毎に1錠（持続放出）、10 mgを1日2回
ドロナビノール（カンナビノイド受容体CB1、カンナビノイド受容体CB2を標的とする）	ABBVIE INC.	経口
フィラテグラスト（ $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンを標的とする）	GLAXOSMITHKLINE	経口
GNbAC1MSRV-Env（MS関連レトロウイルスのエンベロープタンパク質を標的とする）	GENEURA SA / SERVIER	静脈内注入
イデベノン（活性酸素種を標的とする）	SANTHERA PHARMACEUTICALS	PPMSに対する臨床試験での経口投与量は、2250 mg／日（750 mg用量、1日3回）
イミレクルーセルT（ミエリン特異的自己反応性T細胞を標的とする）	OPEXA THERAPEUTICS / MERCK SERONO	皮下に年5回投与（製造業者の情報による）
ラキニモド	TEVA	毎日、0.6 mgまたは1.2 mgの経口錠剤の摂取が計画されている

10

20

30

40

50

【表 3】

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
マシチニブ（KIT（幹細胞因子、（c-KITとも呼ばれる））受容体を標的とし、加えて、その他のチロシンキナーゼ、マスト細胞を選択する）	AB SCIENCE	経口
MEDI-551（CD19（B細胞受容体複合体の一部でありB細胞活性化のための閾値を決定する作用をするB細胞特異的抗原）、B細胞形質芽細胞、CD19を発現するがCD20は発現せず、大量の抗体を分泌するB細胞を標的とする；形質芽細胞の枯渇は病原性自己抗体を含む自己免疫疾患に有用であり得る）	MEDIIMMUNE	皮内、皮下
ミノサイクリン（T細胞、ミクログリア、白血球移動、マトリックスメタロプロテアーゼを標的とする）	VARIOUS	ペレット充填カプセル剤および経口懸濁剤として経口利用可能
MIS416（自然免疫系、自然免疫系の病原体関連分子パターン認識受容体、自然免疫系の骨髄性細胞を標的とし、これは、SPMSで発生する調節解除された免疫系活性を再構築できると思われる）	INNATE IMMUNOTHERAPEUTICS	静脈内
ミコフェノール酸モフェチル（プリン合成を標的とする）	MANUFACTURED BY GENENTECH	経口
ナルトレキソン（オピオイド受容体、トール様受容体4を標的とする）	VARIOUS	「低用量ナルトレキソン」（または「LDN」）として経口剤形で低用量にて投与（3～4.5 mg／日）
オクレリズマブおよびオファツムマブ（CD20を標的とするヒト化モノクローナル抗体、B細胞の抑制）	ROCHE / GSK	IV輸注が計画されている
ONO-4641（スフィンゴシン1-ホスフェート受容体を標的とする）	ONO PHARMACEUTICAL CO.	経口
フェニトイン（ナトリウムチャネルを標的とする）	PFIZER	静脈内、筋肉内（あまり好ましくない選択肢）経口

10

20

30

40

50

【表 4】

一般名	商標名／会社	頻度／送達経路／通常投与量
ボネシモド	ACTELION	未決定
ラルテグラビル（レトロウイルスのインテグラーゼ、ヘルペスウイルスDNAパッケージングターミナーゼを標的とする）	MERCK	経口400 mg錠剤を毎日2回（製造業者の情報による）
RHB-104	REDHILL BIOPHARMA LIMITED	95 mgクラリスロマイシン、45 mgリファブチン、および10 mgクロファジミン
リルゾール（グルタミン酸神経伝達、グルタミン酸取り込みおよび放出、電位依存性ナトリウムチャネル、プロテインキナーゼCを標的とする）	COVIS PHARMA / SAN OFI	経口

10

## 【0528】

MS疾患進行は、疾患進行の最初期段階で、最も激しく、最も多くの損害を与え得る。したがって、例えば、コストと副作用緩和を考慮した多くの償還方針および医療業務とは逆に、例えば、いわゆる二次治療として、最も強力なDMTを用いて治療を開始することが患者の長期疾患状態にとって最も有益である可能性がある。いくつかの実施形態では、患者は二次治療と組み合わせたPD-1またはPD-L1結合物質の投与計画により治療される。このような組み合わせを用いて、1種類または複数種類の二次治療の副作用プロファイルが低減される。いくつかの実施形態では、この組み合わせを用いて、1種類または複数種類の二次治療の投与頻度用量が低減される。例えば、組み合わせた場合、上記表に列挙された物質の用量を、約50%、または約40%、または約30%、または約25%低減し得、および/または投与頻度を通常の半分、または通常の1/3に、または例えば、毎日から隔日もしくは毎週に、隔日から毎週もしくは2週毎に、毎週から2週毎もしくは毎月に、等々減らせ得る。したがって、いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、より都合のよい治療計画を可能にすることにより、患者のアドヒアランスを高める。さらに、いくつかのDMTは、例えば、ミトキサントロンに対する生涯の投与量限度として、140 mg/m<sup>2</sup>の生涯累積投与量、または2、3年の治療に厳密に制限されるべきことが示唆されている。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質を補充し、このDMTのより低い用量またはより少ない頻度の投与を可能にすることにより、患者のミトキサントロンへの接触が維持される。

20

30

## 【0529】

いくつかの実施形態では、患者は、1種類または複数種類のDMTでの治療を受けていない未処置患者であり、PD-1またはPD-L1結合物質が二次治療の副作用を和らげるために使用される。したがって、未処置患者は、疾患の最初に、二次治療の長期間の効果から利益を得ることができる。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、二次治療の使用の前のエントリー治療として使用される。例えば、PD-1またはPD-L1結合物質が、第一の約3ヶ月の治療期間投与されて疾患を安定化し、その後患者は二次薬剤の維持療法に移行され得る。

40

## 【0530】

未処置患者は、1種類または複数種類のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者に比べて、治療に应答する可能性が大きいと一般に考えられる。いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1種類または複数種類のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者に使用される。例えば、いくつかの実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質は、1種類または複数種類のDMTを受けたことがありかつおそらく失敗した患者の治療効果を高め、これらの患者が未処置患者のように应答

50

することを可能にし得る。

【0531】

いくつかの実施形態では、患者は1種類または複数種類のDMTを受けたことがあるか受けているが、十分に応答していない。例えば、患者は1種類または複数種類のDMTに対し、不応性であるか、または応答が不十分であり得る。いくつかの実施形態では、患者は、テリフルノミド(AUBAGIO(GENZYME)); インターフェロン 1a(AVONEX(BIOGEN IDEC)); インターフェロン 1b(BETASERON(BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)); 酢酸グラチラマー(COPAXONE(TEVA NEUROSCIENCE)); インターフェロン 1b(EXTAVIA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)); フィンゴリモド(GILENYA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)); アレムツズマブ(LEMTRADA(GENZYME)); ミトキサントロン(NOVANTRONE(EMD SERONO)); ペグ化インターフェロン 1a(PEGGRIDY(BIOGEN IDEC)); インターフェロン 1a(REBIF(EMD SERONO, INC.)); フマル酸ジメチル(BG-12)(TECFIDERA(BIOGEN IDEC)); およびナタリズマブ(TYSABRI(BIOGEN IDEC))のうちの1つまたは複数に対し、不応性であるか、または応答が不十分である。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、患者における1種類または複数種類のDMTの治療効果をもたらし、したがって、DMTに対する非応答性を低減または除去する。例えば、これは、より高い用量または頻度での1種類または複数のDMTを用いる治療から患者を免れさせ得る。

10

20

【0532】

より侵襲性の疾患の患者では、1つの手法は、誘導治療モデルであり、この場合、強力な効力があるが安全性の懸念の強い治療を最初に投与し、続いて、維持療法を行う。このようなモデルの例は、アレムツズマブによる最初の治療に続けて、IFN、GA、またはBG-12による治療を含み得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質を用いて、療法を維持療法に切り替える必要性をなくす。いくつかの実施形態では、二次治療を含み、1種類または複数種類の開示結合物質を、1種類または複数のDMTに対する維持療法として用いる。いくつかの実施形態では、1種類または複数の開示結合物質を、例えば、一次治療などの、誘導療法での第一の治療として用い、続けて維持療法として別のDMTを用いる。

30

【0533】

いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質を、約3ヶ月の初期治療期間の間投与して疾患を安定させ、その後患者を一次治療薬による維持療法に移行し得る。

【0534】

種々の実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質を用いて、限定されないが、本明細書で開示のうちのいずれかの物質を含む、DMTの1種類または複数種類の副作用を低減する。例えば、1種類または複数種類の開示結合物質は、1種類または複数のDMTの用量を節約可能にし、したがって、より少ない副作用とする投与計画で使用し得る。例えば、いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、AUBAGIOまたは関連物質の1種類または複数の副作用を低減させ得る。この副作用は、毛髪菲薄化、下痢、インフルエンザ、悪心、異常な肝臓検査および手または足の異常な痺れまたは刺痛(知覚異常)、白血球のレベル(感染症のリスクの増大の可能性); 血圧の増大; および重篤な肝障害を含み得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、AVONEXまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、うつ、軽度の貧血、肝障害、アレルギー反応および心臓障害を含む1種類または複数の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、BETASERONまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、アレルギー反応、うつ、肝障害、および低白血球数を含む1種類または複数種類の副作用を低減

40

50

し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、COPAXONEまたは関連物質の、注射部位反応、血管拡張（血管の拡張）；胸部痛；不安症、胸部痛、動悸、息切れおよび顔面紅潮を含む注射直後の反応を含む、1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、EXTAVIAまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、アレルギー反応、うつ、肝障害、および低白血球数を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、GILENIAまたは関連物質の、頭痛、インフルエンザ、下痢、背部痛、肝臓酵素上昇、咳、最初の投与後の遅い心拍数、感染症、および眼の膨潤を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、  
10  
発疹、頭痛、発熱、鼻詰まり、悪心、尿路感染症、疲労、不眠、上気道感染症、じん麻疹、そう痒、甲状腺障害、真菌感染、関節、四肢および背中の痛み、下痢、嘔吐、顔面紅潮、および輸注反応（悪心、じん麻疹、そう痒、不眠、悪寒、顔面紅潮、疲労、息切れ、味覚の変化、消化障害、眩暈、疼痛を含む）を含むLEMTADAまたは関連物質の1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、ノバントロンまたは関連物質の、投与の24時間後の緑色尿；感染症、骨髄抑制（疲労、紫斑、低血液細胞数）、悪心、毛髪菲薄化、膀胱感染症、口のびらん、および深刻な肝障害および心臓障害を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、PLEGRIDYまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、うつ、軽度の貧血、  
20  
肝障害、アレルギー反応および心臓障害を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、REBIFまたは関連物質の、注射後のインフルエンザ様症状、注射部位反応、肝障害、うつ、アレルギー反応、および低赤血球数または白血球数を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、TECFIDERAまたは関連物質の、顔面紅潮（熱またはそう痒の感覚、皮膚の紅潮）、消化管障害（悪心、下痢、腹痛）、発疹、尿中タンパク、肝酵素の上昇；および血中のリンパ球（白血球）数の減少を含む1種類または複数種類の副作用を低減し得る。いくつかの実施形態では、1種類または複数種類の開示結合物質は、頭痛、疲労、尿路感染症、うつ、気道感染症、関節痛、胃もたれ、腹部不快感、下痢、膣炎、腕または脚部痛、発疹、輸注の2  
30  
時間以内のアレルギー性反応または過敏症反応（眩暈、発熱、発疹、そう痒、悪心、顔面紅潮、低血圧、呼吸困難、胸部痛）を含むTYSABRIまたは関連物質の1種類または複数種類の副作用を低減し得る。

#### 【0535】

いくつかの実施形態では、本発明は、国際公開第2013/10779号、国際公開第2015/007536号、国際公開第2015/007520号、国際公開第2015/007542号、および国際公開第2015/007903号に記載の1種類または複数種類のキメラ物質との併用療法に関する。これらの特許の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0536】

限定されないが、感染症適用を含む、いくつかの実施形態では、本発明は、追加の治療薬としての抗感染薬に関する。いくつかの実施形態では、抗感染薬は、抗ウイルス薬であり、これは、限定されないが、アバカビル、アシクロビル、アデホビル、アンブレナビル、アタザナビル、シドフォビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エファビレンツ、エルビテグラビル、エムトリシタピン、エンフビルチド、エトラピリン、ファムシクロビル、およびホスカルネットを含む。いくつかの実施形態では、抗感染薬は抗菌剤であり、これは、限定されないが、セファロスポリン系抗生物質（セファレキシン、セフロキシム、セファドロキシム、セファゾリン、セファロチン、セファクロール、セファマンドール、セフォキシチン、セフprozil、およびセフトピブロール）；フルオロキノロン系抗生物質（シプロ、レヴァキン、フロキシム、テクイン、アベロックス  
40  
50

およびノルフロックス)；テトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびドキシサイクリン)；ペニシリン系抗生物質(アモキシシリン、アンピシリン、ペニシリンV、ジクロキサシリン、カルベニシリン、バンコマイシン、およびメチシリン)；モノバクタム系抗生物質(アズトレオナム)；およびカルバペネム系抗生物質(エルタペネム、ドリベネム、イミベネム/シラスタチン、およびメロペネム)を含む。いくつかの実施形態では、抗感染薬は、抗マラリア薬(例えば、クロロキン、キニーネ、メフロキン、プリマキン、ドキシサイクリン、アーテメータノルメファントリン、アトバクオン/プログアニルおよびスルファドキシシン/ピリメタミン)、メトロニダゾール、チニダゾール、イベルメクチン、パモ酸ピランテル、およびアルベンダゾールを含む。

10

#### 【0537】

限定されないが、自己免疫疾患適用を含むいくつかの実施形態では、追加の治療薬は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、ステロイド性抗炎症剤または非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)などの抗炎症剤である。ステロイド、特に副腎皮質ホルモン剤およびそれらの合成類似体は当該技術分野においてよく知られている。本発明で有用な副腎皮質ステロイドの例としては、ヒドロキシトリウムシノロン、-メチルデキサメタゾン、-メチル-メタゾン、ベクロメタゾンジプロピオネート、-メタゾンベンゾエート、-メタゾンジプロピオネート、-メタゾンバレレート、クロベタゾールバレレート、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラソンジアセテート、ジフルコルトロンバレレート、フルアドレノロン、フルクロロロンアセトニド、フルメタゾンピバレート、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルコルチンブチルエステル、フルオコルトロン、フルブレドニデン(フルブレドニリデン)アセテート、フルアンドレノロン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチゾンブチレート、メチルブレドニゾロン、トリウムシノロンアセトニド、コルチゾン、コルトドキソン、フルセトニド、フルドコルチゾン、ジフルオロゾンジアセテート、フルラドレノロンアセトニド、メドリゾン、アムシナフェル、アムシナフィド、ベタメタゾンおよびその残りのエステル、クロロブレドニソン、クロコルテロン、クレシノロン、ジクロリゾン、ジフルブレドネート、フルクロロニド、フルニソリド、フルオロメタロン、フルペロロン、フルブレドニソロン、ヒドロコルチゾン、メブレドニゾン、パラメタゾン、ブレドニゾロン、ブレドニゾン、ベクロメタゾンジプロピオネートが挙げられるが、これらに限定されない。本発明で使用するよい(NSAIDS)としては、限定されないが、サリチル酸、アセチルサリチル酸、サリチル酸メチル、グリコールサリチレート、サリチルアミド、ベンジル-2,5-ジアセトキシ安息香酸、イブプロフェン、スリダク(fulindac)、ナプロキセン、ケトプロフェン、エトフェナメート、フェニルブタゾン、およびインドメタシンが挙げられる。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、アルキル化剤、代謝拮抗物質(例えば、アザチオプリン、メトトレキセート)、細胞傷害性抗生物質、抗体(バシリキシマブ、ダクリズマブ、およびムロモナブ)、抗イムノフィリン剤(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス)、インターフェロン、オピオイド、TNF結合タンパク質、ミコフェノレート、および小分子生物学的製剤(例えば、フィンゴリモド、ミリオシン)などの細胞分裂阻害薬であってよい。追加の抗炎症剤は、例えば、米国特許第4,537,776号に記載され、この特許の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

#### 【0538】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載のPD-1またはPD-L1結合物質は、修飾されている誘導体、すなわち、共有結合が組成物の活性を妨げないようにして、任意のタイプの分子の、組成物への共有結合により修飾されている誘導体を含む。例えば、限定するものではないが、誘導体は、特に、グリコシル化、脂質化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたはその他のタンパク質への結合、などにより修飾されている組成物を含む。多くの化学修飾のうちのいずれかを既知の技術、例えば、限定されないが、特異的切断、

50

アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成、などを使って行うことができる。

【 0 5 3 9 】

さらにその他の実施形態では、本明細書に記載の P D - 1 または P D - L 1 結合物質は、例示的实施形態では、毒素、化学療法剤、放射性同位元素、およびアポトーシスまたは細胞死を引き起こす物質を含む細胞傷害薬をさらに含む。このような物質は、本明細書に記載の組成物に複合化され得る。

【 0 5 4 0 】

本明細書で記載の P D - 1 または P D - L 1 結合物質をこのように翻訳後修飾して、化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば、蛍光染料、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、および化学発光部分などの検出可能な部分、または、例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒、細胞傷害性薬、および放射性物質などの機能的部分を付加し得る。

【 0 5 4 1 】

細胞傷害薬の例としては、メトトレキサート、アミノプテリン、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン；アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ（*thioepa*）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（*BSNU*）、マイトマイシン C、ロムスチン（*CCNU*）、1 - メチルニトロソウレア、シクロホスファミド（*cyclophosphamide*）、メクロレタミン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、シス - ジクロロジアミン白金（*II*）（*DDP*）シスプラチンおよびカルボプラチン（パラプラチン）；アントラサイクリン（ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン（アドリアマイシン）、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロンおよびピサントレンを含む）；抗生物質（ダクチノマイシン（アクチノマイシン D）、ブレオマイシン、カリチアマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（*AMC*）を含む）；有糸分裂阻害薬（*antimytotic agent*）（例えば、ピンカアルカロイドピンカアルカロイド、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。その他の細胞傷害薬としては、パクリタキセル（タキソール）、リシン、緑膿菌外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、副腎皮質ステロイド、ミトタン（*mytotan*）（*O*, *P*' - （*DDD*））、インターフェロン、およびこれらの細胞傷害薬の混合物が挙げられる。

【 0 5 4 2 】

さらなる細胞傷害薬としては、化学療法剤、例えば、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリチアマイシン、ドキソルビシン、5 - フルオロウラシル、マイトマイシン C、アクチノマイシン D、シクロホスファミド、ピンクリスチン、ブレオマイシン、VEGF アンタゴニスト、EGFR アンタゴニスト、プラチン、タキソール、イリノテカン、5 - フルオロウラシル、ゲムシタビン（*gemcytabine*）、ロイコボリン、ステロイド類、シクロホスファミド、メルファラン、ピンカアルカロイド（例えば、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシンおよびピノレルビン）、ムスチン、チロシンキナーゼ阻害剤、放射線療法、性ホルモン拮抗薬、選択的アンドロゲン受容体調節薬、選択的エストロゲン受容体調節薬、PDGF アンタゴニスト、TNF アンタゴニスト、IL1 アンタゴニスト、インターロイキン（例えば、IL12 または IL2）、IL12R アンタゴニスト、毒素複合化モノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体、アービタックス、アバスチン、ペルツズマブ、抗 CD20 抗体、リツキサン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、DXL625、ハーセプチン（登録商標）、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。リシン、ジフテリア毒素およびシュードモナス毒素などの植物および細菌由来の毒性酵素は、治療薬（例えば

10

20

30

40

50



、抗体)と複合体形成して、細胞型特異的殺作用剤を生成し得る(Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483(1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539(1980); Krollick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419(1980))。

【0543】

他の細胞傷害薬としては、Goldenbergによる米国特許第6,653,104号に記載される細胞傷害性リボヌクレアーゼが挙げられる。本発明の実施形態はまた、放射性免疫複合体に関し、複合体形成剤を使用してまたは使用せずに、アルファまたはベータ粒子を放出する放射性核種がPD-1またはPD-L1結合物質に安定に結合される。このような放射性核種としては、例えば、リン-32、スカンジウム-47、銅-67、ガリウム-67、イットリウム-88、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、サマリウム-153、ルテチウム-177、レニウム-186またはレニウム-188などの放射体、およびアスタチン-211、鉛-212、ビスマス-212、ビスマス-213またはアクチニウム-225などの放射体が挙げられる。

10

【0544】

検出可能な部分の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光材料のさらなる例としては、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリンおよびダンシルクロリドが挙げられるが、これらに限定されない。化学発光部分のさらなる例としては、ルミノールが挙げられるが、これに限定されない。生物発光材料のさらなる例としては、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられるが、これらに限定されない。放射性材料のさらなる例としては、ヨウ素-125、炭素-14、硫黄-35、トリチウムおよびリン-32が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0545】

治療方法

本明細書に記載の方法および組成物は、限定されないが、癌、感染症、免疫異常、および炎症性疾患または状態を含む、種々の疾患および障害を治療する用途がある。

【0546】

30

さらに、本発明の物質は、限定されないが、癌、感染症、免疫異常、炎症性疾患または状態、および自己免疫疾患を含む、種々の疾患および障害の治療、または治療用の薬物の製造において使用し得る。

【0547】

いくつかの実施形態では、本発明は、癌の治療、または癌の患者に関する。本明細書で使用される場合、癌は、身体の器官およびシステムの正常な機能動作を妨害し得る任意の制御されない細胞増殖を指し、原発性および転移性の腫瘍の両方を含む。元の位置から移動し重要な器官に播種される原発性腫瘍または癌は、罹患した器官の機能劣化により対象の死を最終的にもたらす場合がある。転移は、原発腫瘍部位のものとは異なる癌細胞または一群の癌細胞であり、原発腫瘍から身体の他の部位への癌細胞の播種から生ずる。転移は、最終的に対象の死をもたらす場合がある。例えば、癌は、良性および悪性の癌、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移を含み得る。

40

【0548】

治療され得る癌の例としては、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌(胃腸癌を含む)、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎臓癌(kidney or renal cancer)、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌)、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌(唇、舌状、舌、口内、および咽頭)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器

50

系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘤病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびメグズ症候群に関連する異常血管増殖が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0549】

種々の実施形態では、本発明は、癌の治療のための改変シグナル伝達物質をさらに含むキメラの一部であるPD-1またはPD-L1結合物質を提供する。いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、腫瘍を大きく低減および／または除去する。いくつかの実施形態では、本発明のPD-1またはPD-L1結合物質は、他の抗癌剤、例えば、化学療法剤、チェックポイント阻害剤、および免疫抑制剤と併せて対象に投与されると、腫瘍を大きく低減および／または除去する。種々の実施形態では、PD-1またはPD-L1結合物質と他の抗癌剤の組み合わせは、腫瘍サイズを相乗的に低減するおよび／または腫瘍細胞を除去する。

20

#### 【0550】

種々の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の標的化部分および1種類または複数種類の改変シグナル伝達物質を含むキメラの一部であるPD-1またはPD-L1結合物質を用いる癌併用療法に関する。したがって、本発明は、例えば、PD-1またはPD-L1に対する標的化部分および1種類または複数種類のシグナル伝達物質を含むキメラまたは融合タンパク質および抗癌剤と組み合わせたその使用を提供する。

#### 【0551】

例えば、種々の実施形態では、本発明は、限定されないが、本明細書に記載のPD-1またはPD-L1結合物質と、ヒトインターフェロナルファ2を含むIFNアルファなどの変異ヒトインターフェロンを含む改変シグナル伝達物質とのキメラを含む癌の併用療法剤に関する。

30

#### 【0552】

いくつかの実施形態では、本発明は、微生物感染症および／または慢性感染症の治療、またはそれらの感染症を罹患している患者に関する。感染症の例としては、HIV/AIDS、結核、骨髄炎、B型肝炎、C型肝炎、エプスタイン・バーウイルスまたはパルボウイルス感染症、T細胞白血病ウイルス感染症、細菌過剰症候群、真菌または寄生虫感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0553】

種々の実施形態では、本発明の組成物は、炎症、急性炎症、慢性炎症、呼吸器疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、敗血性ショック、関節リウマチ、炎症性腸疾患、炎症性骨盤疾患、痛み、眼の炎症性疾患、セリアック病、リー症候群、グリセロールキナーゼ欠損症、家族性好酸球増加症（FE）、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、炎症性喉頭疾患、結核、慢性胆嚢炎、気管支拡張症、珪肺症および他の塵肺症などの1種類または複数種類の炎症性疾患または状態を治療または予防するために使用される。

40

#### 【0554】

種々の実施形態では、本発明の組成物は、MS、糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェグナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性硬化性胆管炎、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群

50

(Menier's syndrome)、移植拒絶反応(例えば、移植片拒絶の防止)、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、紅斑性狼瘡、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、およびその他の自己免疫疾患などの1種類または複数種類の自己免疫疾患および/または神経変性疾患または状態の治療または予防に使用される。

【0555】

種々の実施形態では、本発明は、自己免疫疾患および/または神経変性疾患を治療または予防するために用いられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患および/または神経変性疾患は、MS(限定されないが、本明細書に記載のサブタイプを含む)、アルツハイマー病(限定されないが、早期発症型アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、および家族性アルツハイマー病(FAD)を含む)、パーキンソン病およびパーキンソニズム(限定されないが、特発性パーキンソン病、脳血管性パーキンソニズム、薬剤誘発性パーキンソニズム、レヴィー小体型痴呆、遺伝性パーキンソン病、若年性パーキンソン病を含む)、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS、限定されないが、突発性ALS、家族性ALS、西太平洋ALS、若年性ALS、平山病(Hirabayama disease))から選択される。

【0556】

キット

本発明はまた、本明細書に記載のうちのいずれかのPD-1またはPD-L1結合物質の投与(例えば、追加の治療薬を含み、または含まず)のためのキットを提供する。キットは、本明細書に記載の少なくとも1種類の本発明の医薬組成物を含む、材料または成分の集合体である。したがって、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の少なくとも1種類の医薬組成物を含む。

【0557】

キットを構成する成分の明確な性質は、その意図される目的に依存する。一実施形態では、キットは、ヒト対象用を治療する目的のために構成される。

【0558】

使用説明書をキット中に含めてもよい。使用説明書は、通常、癌の治療などの望まれる治療結果を達成するために、キットの成分を使用する際に採用すべき技術を説明する明確な表現を含む。必要に応じ、キットは、他の有用な成分、例えば、希釈剤、緩衝剤、薬学的に許容可能な担体、シリンジ、カテーテル、塗布具、ピペット操作または測定用ツール、包帯材料または当業者なら容易に気付くような他の有用な備品一式も含む。

【0559】

キットに組込まれる材料および成分は、それらの操作性および有用性を維持する任意の便利で適切な方法で保管され開業医に提供され得る。例えば、成分は、室温、冷蔵温度、または凍結温度で提供できる。成分は通常、適切な梱包材料に收容される。種々の実施形態では、梱包材料は、よく知られた方法、好ましくは、無菌の、混入物のない環境を与える方法で構築される。梱包材料は、内容物および/またはキットの目的および/またはその成分を表示する外部ラベルを有してよい。

【0560】

定義

本明細書で使用される場合、「a」、「an」、または「the」は、1つ(1種類)または2つ以上(2種類以上)を意味し得る。

【0561】

さらに、参照数値表示に関連して使われる用語の「約」は、参照数値表示±参照数値表示の最大で10%を意味する。例えば、用語の「約50」は、45~55の範囲を含む。

【0562】

「有効量」という用語は、医学的使用に関連して使用される場合、測定できるほどの目的の疾患の治療、予防、または発病速度の低下をもたらすのに効果的である量である。

【0563】

本明細書で使用される場合、物質または刺激の存在下で、このような調節の非存在下に比べて、活性および／または効果の出力値がかなりの量、例えば、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、またはそれを超えて、少なくとも最大約 100 %（約 100 %を含む）低減されるとき、何かが「減少され」ている。当業者により理解されるように、いくつかの実施形態では、活性は減少され、かついくつかの下流の出力値は減少されるが、他のものは増加し得る。

【0564】

逆に、物質または刺激の存在下で、このような物質または刺激の非存在下に比べて、活性および／または効果の出力値がかなりの量、例えば、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、またはそれを超えて、最大少なくとも約 100 %（約 100 %を含む）またはそれを超えて、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 6 倍、少なくとも約 7 倍、少なくとも約 8 倍、少なくとも約 9 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍増加する場合、活性は「増加され」る。

【0565】

本明細書において、参照される場合、全ての組成物に関するパーセンテージは、特に指定がない限り、総組成物の重量による。本明細書で使用する場合、「含む（include）」という単語とその変形物は、非限定であることを意図し、それにより、リスト中の項目の記載は、この技術の組成物および方法に有用である可能性を同様に有する他の類似項目の除外を意図するものではない。同様に、用語の「can」および「may」およびその変形物は、非限定であることを意図し、それにより、ある実施形態が特定の要素または特徴を含むことが「できる（can）」または含んでも「よい（may）」という記載は、これらの要素または特徴を含まない本発明の技術のその他の実施形態を排除するものではない。

【0566】

including、containing、またはhavingなどの用語の同義語としてのオープンエンド用語の「含む（comprising）」を本明細書でを使用して本発明を記載および請求するが、本発明、またはその実施形態は、「からなる（consisting of）」または「から本質的になる（consisting essentially of）」などの代替用語を使って、代わりに記載することができる。

【0567】

本明細書で使用される場合、用語の「好ましい」および「好ましくは」は、特定の状況下で、特定の利点をもたらす本技術の実施形態を指す。しかしながら、同じまたは他の環境下で、他の実施形態も好ましい場合がある。さらに、1つまたは複数の好ましい実施形態の記載は、他の実施形態が有用でないことを示すものではなく、また、本技術の範囲から他の実施形態を排除することを意図するものではない。

【0568】

治療効果の達成に必要な本明細書で記載の組成物の量は、特定目的のための従来の手順に従って経験的に決定されてよい。一般に、治療目的のために治療薬を投与する場合、治療薬は薬理学的有効量で投与される。「薬理学的有効量」、「薬理学的有効用量」、「治療有効量」、または「有効量」は、特に障害または疾患を治療するために、目的の生理的な効果を生み出すのに十分な量または目的の結果を達成することができる量を意味する。本明細書で使用される場合、有効量は、例えば、障害または疾患の症状の進展を遅らせる、障害または疾患の症状の経過を変える（例えば、疾患の症状の進展を遅らせる）、障害または疾患のうちの1つまたは複数の症状または発症を減らすまたはなくす、および障害または疾患の症状を回復させるのに十分な量を含んでよい。治療効果はまた、改善が実現

10

20

30

40

50

されるかどうかにかかわらず、根底にある疾患または障害の進行を止めるまたは遅らせることも含む。

#### 【 0 5 6 9 】

有効量、毒性、および治療効果は、例えば、細胞培養または実験動物により LD 50（集団の約 50％に対する致死用量）および ED 50（集団の約 50％での治療的有效量）を測定するための標準的薬学的手順により決定できる。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて変化し得る。毒性と治療効果との間の用量比率は、治療指数であり、比率 LD 50 / ED 50 で表すことができる。いくつかの実施形態では、大きな治療指数を示す組成物および方法が好ましい。治療有効量は、最初は、例えば、細胞培養アッセイを含むインビトロアッセイから推測することができる。また、用量は、細胞培養または適切な動物モデルで決定した IC 50 などの循環血漿中濃度を達成するように動物モデルで処方することができる。記載の組成物の血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。いずれかの特定の投与量の効果は、適切なバイオアッセイによりモニターすることができる。投与量は医師により決定されてよく、必要に応じて、観察された治療の効果に適合するように調節できる。

10

#### 【 0 5 7 0 】

特定の実施形態では、効果は、少なくとも約 10％、少なくとも約 20％、少なくとも約 30％、少なくとも約 50％、少なくとも約 70％、または少なくとも約 90％の定量可能な変化をもたらすであろう。いくつかの実施形態では、効果は、約 10％、約 20％、約 30％、約 50％、約 70％、またはさらに約 90％以上の定量化可能な変化をもたらすであろう。治療効果はまた、改善が実現されるかどうかにかかわらず、根底にある疾患または障害の進行を止めるまたは遅らせることも含む。

20

#### 【 0 5 7 1 】

本明細書で使用される場合、「治療方法」は、本明細書に記載の疾患または障害の治療のための組成物および／または本明細書に記載の疾患または障害の治療のための薬剤の製造での使用および／または複数使用のための組成物に等しく適用可能である。

#### 【実施例】

#### 【 0 5 7 2 】

本明細書では、場合により、インターフェロンベータスキメラに言及するために、用語の「AcT a f e r o n」（AFN）が使われる。

30

#### 【 0 5 7 3 】

下記の実施例では、特に断りのない限り、IFN に対する変異は、ヒト IFN 2 に対するものである。

#### 【 0 5 7 4 】

実施例 1 . 単一特異性ヒトキメラのヒト PD - 1 または PD - L 1 標的化の効率

PD - 1 または PD - L 1 抗体を含むヒト AcT a f e r o n アルファによる標的化の効率を、STAT 1 リン酸化の FACS ベース定量化により調べた。具体的には、標的化を、一次末梢血単核球（PBMC）、遺伝子導入 He k 2 9 3 T 細胞（PD - 1 標的化について）、またはヒト乳癌細胞株 MDA - MB - 3 2 1（PD - L 1 標的化について）で分析した。以下の抗体を使用した：

40

抗 PD - 1 抗体：

- P e m : ペムブロリズマブ / キイトルーダ ( M e r c k )
- N i v : ニボルマブ / オプジーボ ( B M S )

抗 PD - L 1 抗体：

- A t e : アテゾリズマブ / テセントリク / MPDL 3 2 8 0 ( R o c h e / G e n e t e c h )
- D u r : デュルバルマブ / MEDI 4 7 3 6 ( C e l g e n e / A s t r a Z e n e c a )
- A v e : アベルマブ / MSB 0 0 1 0 7 1 8 C ( M e r c k / P f i z e r )
- B m s : B M S - 9 3 6 5 5 9 / MDX - 1 1 0 5 ( B M S )

50

## 【0575】

これらの抗体の配列は、本明細書の別の場所に記載されている。抗PD-L1 BMS-936559/MDX-1105抗体に関しては特に、この抗体の可変ドメインを、一般的なヒトIgGにグラフト化した。したがって、本明細書で提供される方法で使用するためのBMS-936559またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1242のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および/または配列番号1243のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

## 【0576】

可変ドメインのヒトIgGへの生着後に、次の重鎖および軽鎖配列が得られた：

重鎖：配列番号1244

軽鎖：配列番号1245

## 【0577】

種々の抗体重鎖を、pMTW発現ベクター中でフレキシブル20\*GGSLinkerを介してhIFNa2\_\_R149配列（例えば、R149A変異を有するヒトIFN $\gamma$ 2）に遺伝的に融合した（得られたベクター：pMTW-SIgK-重鎖-(GGSL)<sub>20</sub>-hIFNa2\_\_R149A-GGS-(His)<sub>9</sub>）。軽鎖を同じベクターに挿入した（得られたベクター：pMTW-SIgK-軽鎖）。クローニング方法を模式的に図1に示す。PD-L1 AFNを、標準的プロトコルに従い25K PEI（ポリエチレンジイミン）を用いるFreeStyle 293F細胞（ThermoFisher）中での両方のプラスミドの一時的遺伝子導入により産生した。培地を採取し、細胞を遠心分離により除去し、濾過滅菌した。組換えタンパク質を、製造業者の説明書に従いNi Excel樹脂（GE Healthcare）を用いて精製し、イミダゾールを、PD10カラム（GE Healthcare）を用いて試料から除去した。

## 【0578】

遺伝子導入HeK293T細胞へのPD-L1 Ab-AFNの結合

HeK293T細胞に、リン酸カルシウムを用いて膜結合型のPD-1またはPD-L1を遺伝子導入した。遺伝子導入の2日後に、細胞を再懸濁し、PD-L1 Ab-AFN（FACS緩衝液：2% FBS；0.5 mM EDTAを補充したPBS中1  $\mu$ g/ml）と4 で2時間インキュベートした。2回の洗浄後に、細胞をFITC標識THE HIS抗体（GenScript；4 で1時間）とインキュベートした。結合を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア（BD Biosciences）を使用して、FACSCalibur測定器（BD Biosciences）で測定した。図2中のデータは、PD-L1 AFNがPD-L1遺伝子導入細胞に選択的に結合し、一方でPD-1 AFNがPD-1発現細胞のみに結合したことを示す。

## 【0579】

PD-1 標的化：末梢血単核球（PBMC）中のpSTAT1

健康なドナーのバフィーコート由来のPBMCを、Lymphoprep（StemCell Technologies）を用いる密度勾配遠心分離により単離した。細胞をFACS緩衝液（2% FBS、PBS中0.5 mM EDTA）で2回洗浄し、FITC結合抗ヒトPD-1（クローンPD-1.3.1.3；Miltenyi Biotec）を用いて4 で20分間染色した。2回の洗浄後に、細胞を段階希釈PD-1 Ab-AFNを用いて37 で15分間刺激した。固定（10分間、37 、Fix Buffer I；BD Biosciences）および透過処理（30分、氷上、Perm III Buffer I；BD Biosciences）および洗浄後に、細胞を抗STAT1 pY701 Ab（BD Biosciences）で染色した。試料を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア（BD Biosciences）を使用して、FACSCalibur（BD Biosciences）で取得した。図3のデータは、ペムプロリズマブおよびニボルマブ結合AcTafteronはPD-1陽性PBMC中でSTAT1をリン酸化できたが、PD-1陰性PBMC中ではリン酸化できなかったことを示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 8 0 】

P D - 1 標的化：遺伝子導入 H e k 2 9 3 T 細胞中の p S T A T 1

H e k 2 9 3 T 細胞に、リン酸カルシウムを用いてヒト P D - 1 または空のベクターを遺伝子導入した。2 日後に、細胞を再懸濁し、段階希釈 P D - 1 A F N で刺激した（1 5 分、3 7 ）。p S T A T 1 を上述のように定量化した。図 4 のデータは、P D - 1 A b A F N が、P D - 1 発現 H e k 2 9 3 T 細胞では S T A T 1 リン酸化を効率的に誘導するが、モック遺伝子導入細胞ではリン酸化を誘導しないことを示す。

## 【 0 5 8 1 】

P D - L 1 標的化：M D A - M B - 2 3 1 細胞中の p S T A T 1

M D A - M B - 3 2 1 細胞を、1 0 % F B S を補充した D M E M 培地中で、P D - ( L ) 1 A F N を用いて 3 7 で 1 5 分間刺激した。刺激後、p S T A T 1 を上述のように定量化した。P D - L 1 結合 A F N は、S T A T 1 を効率的にリン酸化でき、それにより P D - L 1 標的化作用を示すが、P D - 1 結合 A F N はそうではなかった（図 5）。

## 【 0 5 8 2 】

実施例 2 . ヒト P D - 1 または P D - L 1 に対し特異的な V H H の構築と評価

E L I S A アッセイを、P D - 1 抗原に対して本明細書の別の場所で記載のように行って種々の P D - 1 V H H の結合親和性を評価した。P D - 1 V H H の親和性を、以下の表 1 に表す（列 A / 対照を参照）：

【表 5】

表 1

クローン	収集番号	ファミリー	ELISA A	ELISA 対照	A / 対照
2PD23	6418	1	0.9399	0.2061	4.56041
2PD26	6419	1	0.7177	0.1708	4.20199
2PD90	6423	1	1.3425	0.2566	5.23188
2PD106	6424	1	1.462	0.2118	6.90274
2PD16	6417	2	1.8255	0.475	3.84316
2PD71	6421	2	2.5085	0.6984	3.59178
2PD152	6425	2	2.3148	0.3628	6.38037
2PD12	6416	3	3.8075	0.1775	21.4507
3PD55	6427	3	3.578	0.0886	40.3837
3PD82	6428	3	4	0.0886	45.1467
2PD8	6415	4	0.7629	0.2521	3.02618
2PD27	6420	4	1.1358	0.329	3.45228
2PD82	6422	5	2.9666	0.6775	4.37875
3PD36	6426	6	3.9512	0.0957	41.2874

## 【 0 5 8 3 】

P D - L 1 抗原に対して本明細書で記載のように種々の P D - L 1 V H H の結合親和性も同様に、E L I S A により評価した。P D - 1 V H H の親和性を、以下の表 2 に示す（列 A / 対照を参照）；

10

20

30

40

50

【表 6】

表 2

クローン	収集番号	ファミリー	ELISA A	ELISA 対照	A／対照
2LIG2	6283	5	0.5099	0.1322	3.85703
2LIG3	6284	1	1.4632	0.15	9.75467
2LIG16	6285	3	3.0203	0.1144	26.4012
2LIG22	6286	6	0.4687	0.1031	4.54607
2LIG27	6287	1	0.4289	0.1134	3.78219
2LIG29	6288	2	3.772	0.109	34.6055
2LIG30	6289	7	1.1105	0.1158	9.58981
2LIG34	6290	1	0.5681	0.1581	3.5933
2LIG35	6291	2	0.8438	0.1031	8.18429
2LIG48	6292	3	4	0.1204	33.2226
2LIG65	6293	4	2.108	0.0892	23.6323
2LIG85	6294	10	2.6661	0.1182	22.5558
2LIG86	6295	9	3.803	0.1133	33.5658
2LIG89	6296	4	2.8804	0.106	27.1736
2LIG97	6297	1	1.0302	0.201	5.12537
2LIG99	6298	1	2.1105	0.2304	9.16016
2LIG109	6299	2	3.5455	0.1088	32.5873
2LIG127	6300	4	3.7303	0.1079	34.5718
2LIG139	6301	4	4	0.1202	33.2779
2LIG176	6302	11	0.4153	0.0983	4.22482
2LIG189	6303	7	2.2343	0.1726	12.945
3LIG3	6304	5	0.5797	0.081	7.15679
3LIG7	6305	2	3.6414	0.0968	37.6178
3LIG8	6306	1	0.4292	0.0978	4.38855
3LIG9	6307	2	3.6634	0.0972	37.6893
3LIG18	6308	4	3.505	0.0877	39.9658
3LIG20	6309	8	0.5131	0.1179	4.35199
3LIG28	6310	6	3.0276	0.0913	33.161
3LIG29	6311	2	3.9596	0.0967	40.9473
3LIG30	6312	3	4	0.0845	47.3373
3LIG33	6313	5	1.7581	0.0921	19.089

## 【0584】

PD-L1 VHHの遺伝子導入Hek293T細胞への結合も調べた。具体的には、ヒトPD-L1遺伝子導入Hek293T細胞をPD-L1 VHH (2 µg/ml; 4 で2時間) およびFITC標識抗ヒス抗体 (GenScript; 4 で1時間) で染色した。結合を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア (BD Biosciences) を使用して、FACSCalibur測定器 (BD Biosciences) で測定した。結合アッセイの試験結果を図6に示す。

## 【0585】

実施例3. ヒトPD-L1 VHH AcTαferonの特性評価

抗ヒトPD-L1 VHHの、PD-1との相互作用を阻害するそれらの能力についての最初のスクリーニング後に、次のPD-L1 VHHをさらなる特性評価用を選択した: 2LIG3 (配列番号287)、2LIG27 (配列番号290)、2LIG97 (配列番号300)、2LIG99 (配列番号301)、3LIG8 (配列番号309)、2LIG189 (配列番号306)、および2LIG176 (配列番号305)。

## 【0586】

10

20

30

40

50



PD-L1 VHH: 2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2LIG189、および2LIG176をpHEN6C発現ベクター中で次のようにクローン化した: pHEN6C-Pe1B-PD-L1 VHH-(His)<sub>6</sub>。タンパク質をIPTG刺激により大腸菌中で一晚産生し、製造業者の説明書に従いTALON金属親和性樹脂(Clontech)を用いてペリプラズム抽出物から精製した。

【0587】

PD-1とPD-L1の間の相互作用に対するPD-L1 VHHの効果、プレート結合アッセイで試験した。PD-L1の組換え細胞外ドメインを、そのC末端FLAGタグおよびM2抗FLAG Ab(Sigma)を用いて、Maxisorpプレート(Nunc)上に一晚固定した。プレートをブロッキングし(PBS+0.1%カゼイン)、段階希釈VHHの存在下または非存在下でhPD-1-hFc融合タンパク質(Sino Biologicals)とインキュベートした。洗浄後、結合PD-1を、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)結合抗ヒトAb(Jackson ImmunoResearch)およびTMBペルオキシダーゼ基質(KPL)を用いて測定した。

【0588】

PD-L1 VHHのヒトおよびカニクイザルPD-L1に対する親和性を、バイオレイヤー干渉法: Octet RED96 system(ForteBio)を用いて測定した。VHHをペンタ-His(HIS1K)バイオセンサー(ForteBio)上に固定し、段階希釈ヒトPD-L1-FcまたはカニクイザルPD-L1-Fcタンパク質(両方とも、Sino Biologicalから入手)中に浸漬した。親和性を、Octetソフトウェア(ForteBio)を用いて計算した。

【0589】

表3は、試験した全てのPD-L1 VHHがPD-L1/PD-1相互作用を強力に抑制できたことを示す。さらに、全てのPD-L1 VHHは、ヒトおよびカニクイザルPD-L1に対し類似の結合親和性を示した。

【表7】

表3

クローン	EC50中和濃度 PD1-PDL1 (ng/ml)	ヒトPD-L1親和性			カニクイザルPD-L1親和性			HL116細胞中のEC50ルシフェラーゼ (ng/ml)
		KD(M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD(M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	
2LIG3	18.87	1.19E-09	3.73E+05	4.48E-04	8.90E-10	3.58E+05	3.18E-04	0.0220
2LIG27	9.57	7.51E-09	4.72E+05	3.50E-03	8.74E-09	3.21E+05	2.80E-03	1.0380
2LIG97	4.81	4.35E-09	4.23E+05	1.98E-03	9.16E-09	3.19E+05	2.93E-03	1.1100
2LIG99	6.21	8.75E-10	7.29E+05	6.34E-04	1.01E-09	5.84E+05	5.85E-04	0.0062
3LIG8	12.79	8.77E-09	4.84E+05	4.19E-03	5.98E-09	5.12E+05	3.05E-03	0.2400
2LIG189	8.81	3.03E-09	1.74E+05	5.24E-04	3.80E-09	1.14E+05	4.37E-04	0.4900
2LIG176	5.68	6.87E-09	1.18E+06	8.05E-03	1.13E-08	5.08E+05	5.73E-03	0.2300

【0590】

PD-L1 VHH(すなわち、2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2LIG189、および2LIG176)を次に、pHEN6C発現ベクター中でAcTaferon(AFN)フォーマットにクローン化した(すなわち、pHEN6C-Pe1B-PD-L1\_\_VHH-(GGG)<sub>20</sub>-hIFN $\alpha$ 2\_\_R149A-GGS-(His)<sub>6</sub>)、式中、PD-L1\_\_VHHは、2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2LIG189、および2LIG176から選択される)。タンパク質を、IPTG刺激により大腸菌中で一晚産生し、製造業者の説明書に従いTALON金属親和性樹脂(Clontech)を用いてペリプラズム抽出物から精製した。

【0591】

生物活性を、親HL116細胞(p6-16ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子

導入したIFN応答性細胞株)で測定した。細胞を一晩播種し、過剰量(20 µg/ml)の対応するVHHの存在下または非存在下(この後者は、非標的化状況を模倣する)で、段階希釈PD-L1 AFNで6時間刺激した。ルシフェラーゼ活性を、EnSight Multimode Plate Reader(Perkin Elmer)で測定した。  
【0592】

図7A~Gに示すように、AcTaféronとしてフォーマットされた全てのPD-L1 VHHは、HL116細胞中でIFNルシフェラーゼレポーターを誘導することができた。AcTaféron活性の特異性を、IFN部分に連結されないそれぞれのPD-L1 VHHの過剰量の存在下でルシフェラーゼレポーター活性を比較することにより評価した(図7A~G参照)。

10

【0593】

実施例4．ヒトPD-L1抗体AcTaféronのインビトロ効力

PD-L1標的化モノクローナル抗体であるモノクローナル抗体アテゾリズマブ(Ate)を、標的細胞に対するインターフェロン活性の特異性を評価するための試料として選択した。

【0594】

アテゾリズマブをInvivoGenから入手した。アテゾリズマブ\_\_hIFNa2(R149A)(Ate-IFNa2mut)を次のようにして生成した：Ab重鎖を、pMTW発現ベクター中でフレキシブル20\*GGSLinkerを介してhIFNa2\_\_R149配列に遺伝的に融合した(得られたベクター：pMTW-SIgK-重鎖-(GGSL)<sub>20</sub>-hIFNa2\_\_R149A-GGS-(His)<sub>9</sub>)。軽鎖を同じベクターにクローン化した(得られたベクター：pMTW-SIgK-軽鎖)。両方のプラスミドを、製造者ガイドラインに従ってExpichO細胞(ThermoFisher)に同時遺伝子導入した。得られたAte-IFNa2mutを、Niセファロースexcel樹脂(GE Healthcare)を用いて培地から精製した。Ate-IFNa2mutの効果を、特異性を示すために過剰量のアテゾリズマブ(Ate)(50 µg/ml)を使って前の実施例3で記載した同じアッセイを用いてインビトロで実証した(図8参照)。

20

【0595】

図8は、Ate-IFNa2mutがHL116細胞中でIFNルシフェラーゼレポーターを誘導できたことを示す。Ate-IFNa2mut活性の特異性を、IFN部分に連結されないアテゾリズマブ(Ate)の過剰量の存在下でルシフェラーゼレポーター活性を比較することにより評価した。

30

【0596】

実施例5．ヒトPD-L1抗体AcTaféronのインビボ効力

PD-L1 VHH 2LIG99を、ヒトPD-L1 VHH標的化AcTaféron(AFN)のインビボ抗腫瘍効力を評価するために選択した。

【0597】

ヒト化免疫系を有するマウスでのヒトRL濾胞性リンパ腫細胞株(RL)腫瘍モデル：ヒト化免疫系を有するマウスを次記のプロトコルに従って生成した。単核球を、HLA-A2+ヒト臍帯血試料からLymphoprepを用いる密度勾配遠心分離後に収集した。その後、ヒトCD34+造血幹細胞(HSC)をMACS技術により単離し、FACSを用いてCD34+純度およびCD3+混入について検査した。次に、80%を超える純度のCD34含有HSCを2~3日齢の100cGyの骨髄破壊的照射処理を受けたNSGマウスの肝内に注入した。HSC注入後8~12週で、ヒト細胞生着を、FACSを用いてpanleukocyteヒトおよびマウスCD45マーカーで分析し、総生存血中のリンパ球の5%を超えるヒトCD45細胞を有するマウスを、腫瘍埋め込みのために選択した。HSC注入の12週後に、マウスの皮下に2x10<sup>6</sup>個のRL腫瘍細胞を注射した。5日後、マウスをFlt3Lの腹膜注入により18日目まで毎日治療した。PBS(対照)または2LIG99ベースAFN(すなわち、hIFNa2\_\_R149Aに連結された2LIG99を含むAFN)による治療を、腫瘍注射の9日目(腫瘍が約10mm<sup>2</sup>

40

50

のサイズに到達した時点)より病変周囲への投与により開始した。

【0598】

図9に示すように、2LIG99ベースAFNは、インビボで抗腫瘍効果を有した。

【0599】

実施例6．ヒトPD-1 AcTaferonのインビトロ効力

AcTaferon (AFN) のヒトPD-1 (プログラム死1) 標的化の効率を、FACSにおけるPD-1または空のベクター遺伝子導入HeK293T細胞中のSTAT1リン酸化の定量化により調べた。

【0600】

下記の2種類の異なるPD-1 VHHを分析のために選択した：

102C3：

QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSI FSIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAAITWSGGITYYEDSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAADRAESSWYDYWGQG GTQVTVSS (配列番号1246)；および

102C12：

QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSI ASIHAMGWFRQA  
PGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVY  
LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQG GTQVTVSS (配列番号1247)。

【0601】

これらのPD-1 VHHをAcTaferon (AFN) に挿入した：AFNをpHEN6c発現ベクター中で次のようにクローン化した：pHEN6C - PelB - PD-1\_\_VHH - (GGG)<sub>20</sub> - hIFNa2\_\_R149A - GGS - (His)<sub>6</sub> (PD-1\_\_VHHは、102C3または102C12；すなわち、102C3 AFNおよび102C12 AFNである)。タンパク質を、IPTG刺激により大腸菌中で一晚産生し、製造業者の説明書に従いTALON金属親和性樹脂 (Clontech) を用いてペリプラズム抽出物から精製した。

【0602】

HeK293T細胞に、標準的リン酸カルシウム技術を用いて空のベクターまたはヒトPD-1発現プラスミドを遺伝子導入した。遺伝子導入の2日後に、細胞をFACS緩衝液 (2% FBS、PBS中1mMのEDTA) で2回洗浄し、段階希釈の102C3 AFNまたは102C12 AFNまたは野生型IFNa2 (陽性対照) を用い、37℃で15分間刺激した。固定 (10分間、37℃、Fix Buffer I；BD Biosciences) および透過処理 (30分、氷上、Perm III Buffer；BD Biosciences) および洗浄後に、細胞を抗STAT1 pY701 Ab (BD Biosciences) で染色した。試料を、CellQuest Pro Version 4.0.2ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて、FACS Calibur (BD Biosciences) で取得し、FlowJoソフトウェア (FlowJo) を用いて分析した。

【0603】

pSTAT1陽性細胞のパーセンテージをFACSで定量化し、濃度の関数としてプロットした。図10A~Cは、102C3 AFNおよび102C12 AFNが、PD-1発現HeK293T細胞のSTAT1リン酸化を効率的に誘導するが、モック遺伝子導入細胞では遙かに少ない程度にしか誘導しないことを示す。これは、PD-1およびモック遺伝子導入HEK293T細胞に対し等しく活性である野生型IFNa2とは対照的である。

【0604】

等価物

本発明をその特定の実施形態と関連付けて説明してきたが、その実施形態はさらに修正

が可能であり、本出願は、一般的に、本発明の原理に従った本発明の任意の変形、使用、または改変を包含することが意図され、本発明が属する技術内の既知のまたは日常的な実施の範囲に入る、および上に示されるおよび以下の添付の請求項の範囲に入る本質的な特徴に該当し得る本開示からの乖離を含むものと理解されよう。

【0605】

当業者は、本明細書で具体的に記載された特定の実施形態に対する多数の等価物を、ルーチン実験のみを用いて認識し、確認できるであろう。このような等価物は、次の請求項の範囲内に包含されることが意図されている。

【0606】

参照による組み込み

本明細書で引用されている全ての特許および刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0607】

本明細書で考察された出版物は、単に本出願の出願日に先行してそれらが開示されているという理由で提供されている。本明細書のいずれも、本発明が、先行発明の理由でこのような出版物に先行する権利がないことを容認すると解釈されるべきではない。

【0608】

本明細書で使用されている全ての見出しは、単に構成上の理由によるものであり、どんな形にせよ、本開示を限定することを意図するものではない。任意の個別のセクションの内容は、等しく全てのセクションに適用できる。

本発明の態様は以下を含む。

[付記1]

配列番号301、287、290、300、305、306、および309のうちの1つと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むPD-L1結合物質。

[付記2]

3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)を含む少なくとも1つの標的化部分を含むPD-L1結合物質であって、

(a) CDR1が、配列番号199、181、178、183、189、196、201、および206のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；

(b) CDR2が、配列番号259、260、241、242、245、246、263、および264のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；ならびに

(c) CDR3が、配列番号268、272、および277のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む、

PD-L1結合物質。

[付記3]

前記標的化部分が、単ドメイン抗体である、付記1または2に記載のPD-L1結合物質。

[付記4]

前記標的化部分が、VHH、ヒト化VHH、またはラクダ化VHHを含む、付記3に記載のPD-L1結合物質。

[付記5]

1種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、付記1～4のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質。

[付記6]

前記シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの1つまたは複数から選択され、これらはいずれも任意に改変されていてもよい、付記5に記載のPD-L1結合物質。

[付記7]

1種類または複数種類の追加のシグナル伝達物質を含む、付記1～6のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質。

10

20

30

40

50

[ 付記 8 ]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原を認識し、任意に腫瘍抗原を機能的に調節してもよい、付記 7 に記載の P D - L 1 結合物質。

[ 付記 9 ]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が免疫細胞上の抗原を認識し、任意に免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、付記 8 に記載の P D - L 1 結合物質。

[ 付記 10 ]

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、および N K 細胞から選択される、付記 9 に記載の P D - L 1 結合物質。

[ 付記 11 ]

細胞傷害性 T 細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、付記 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質。

[ 付記 12 ]

P D - L 1 を認識して P D - L 1 に結合し、その活性を実質的に機能的に調節するかあるいはその活性を実質的に機能的に調節しない、付記 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質。

[ 付記 13 ]

付記 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の P D - L 1 結合物質をコードする組換え核酸組成物。

[ 付記 14 ]

付記 13 に記載の核酸を含む宿主細胞。

[ 付記 15 ]

3 つの相補性決定領域 ( C D R 1、C D R 2、および C D R 3 ) を含む少なくとも 1 つの標的化部分を含む P D - 1 結合物質であって、

( a ) C D R 1 が、配列番号 2 ~ 23 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；

( b ) C D R 2 が、配列番号 24 ~ 54 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

( c ) C D R 3 が、配列番号 55 ~ 69 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む、

P D - 1 結合物質。

[ 付記 16 ]

3 つの相補性決定領域 ( C D R 1、C D R 2、および C D R 3 ) を含む少なくとも 1 つの標的化部分を含む P D - L 1 結合物質であって、

( a ) C D R 1 が、配列番号 177 ~ 207 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；

( b ) C D R 2 が、配列番号 208 ~ 266 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

( c ) C D R 3 が、配列番号 267 ~ 285 のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸配列を含む、

P D - L 1 結合物質。

[ 付記 17 ]

前記標的化部分が、単ドメイン抗体である、付記 15 または 16 に記載の P D - 1 または P D - L 1 結合物質。

[ 付記 18 ]

前記標的化部分が、V<sub>H</sub>H、ヒト化 V<sub>H</sub>H、またはラクダ化 V<sub>H</sub>H を含む、付記 17 に記載の P D - 1 または P D - L 1 結合物質。

[ 付記 19 ]

配列番号 70 ~ 83、1246、または 1247 のうちの 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、付記 18 に記載の P D - 1 結合物質。

[ 付記 20 ]

配列番号 286 ~ 316 のうちの 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、付記 18 に記載の PD - L1 結合物質。

[ 付記 21 ]

1 種類または複数種類のシグナル伝達物質を含む、付記 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 22 ]

前記シグナル伝達物質が、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択され、これらはいずれも任意に改変されていてもよい、付記 21 に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 23 ]

1 つまたは複数の追加の標的化部分を含む、付記 15 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 24 ]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が腫瘍抗原を認識し、任意に腫瘍抗原を機能的に調節してもよい、付記 23 に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 25 ]

前記 1 つまたは複数の追加の標的化部分が免疫細胞上の抗原を認識し、任意に免疫細胞上の抗原を機能的に調節してもよい、付記 24 に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 26 ]

前記免疫細胞が、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球、および NK 細胞から選択される、付記 25 に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 27 ]

細胞傷害性 T 細胞を腫瘍細胞にまたは腫瘍環境に動員する、付記 15 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 28 ]

PD - 1 または PD - L1 を認識して結合し、その活性を実質的に機能的に調節するかあるいはその活性を実質的に機能的に調節しない、付記 15 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 29 ]

付記 15 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質をコードする組換え核酸組成物。

[ 付記 30 ]

付記 29 に記載の核酸を含む宿主細胞。

[ 付記 31 ]

癌、感染症、免疫異常、および / または自己免疫疾患のうちの 1 つまたは複数に有する患者における使用に適している、付記 15 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質。

[ 付記 32 ]

PD - 1 または PD - L1 を標的とする抗原または受容体認識ドメインを含む標的化部分ならびにインターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子のうちの 1 つまたは複数から選択されるシグナル伝達物質を含むキメラの有効量を、投与を必要とする患者に投与することを含む、癌を治療または予防するための方法。

[ 付記 33 ]

前記シグナル伝達物質が、改変されている、付記 32 に記載の方法。

[ 付記 34 ]

前記 PD - 1 または PD - L1 結合物質が、付記 1 ~ 12 または付記 15 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の PD - 1 または PD - L1 結合物質である、付記 32 または付記 33 に記載の方法。

[ 付記 35 ]

前記 PD - 1 結合物質が、3 つの相補性決定領域 ( CDR1、CDR2、および CDR3

10

20

30

40

50

を含む少なくとも1つの標的化部分を含み、

(a) CDR 1が、配列番号2～23のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；

(b) CDR 2が、配列番号24～54のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

(c) CDR 3が、配列番号55～69のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む、

付記32～34のいずれか1項に記載の方法。

[付記36]

前記PD-L1結合物質が、3つの相補性決定領域(CDR 1、CDR 2、およびCDR 3)を含む少なくとも1つの標的化部分を含み、

(a) CDR 1が、配列番号177～207のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；

(b) CDR 2が、配列番号208～266のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含み；および

(c) CDR 3が、配列番号267～285のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む、

付記32～34のいずれか1項に記載の方法。

[付記37]

前記癌が、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌(胃腸癌を含む)、神経膠芽腫、肝癌、ヘパトーマ、上皮内腫瘍、腎臓癌または腎性癌(kidney or renal cancer)、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌)、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌(唇、舌状、舌、口内、および咽頭)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌腫、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系の癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫を含むリンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)を含む)、小リンパ球性(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL、巨大腫瘍病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ性白血病(CLL)、急性リンパ性白血病(ALL)、毛様細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、ならびに他の癌腫および肉腫、および移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)、ならびに母斑症、浮腫(例えば脳腫瘍に関連するもの)、およびメグズ症候群に関連する異常血管増殖のうちの1つまたは複数から選択される、付記32～36のいずれか1項に記載の方法。

[付記38]

癌、感染症、免疫異常、および/または自己免疫疾患のうちの1つまたは複数の治療における使用のための付記1～37のいずれか1項に記載のPD-1またはPD-L1結合物質。

[付記39]

癌、感染症、免疫異常、および/または自己免疫疾患のうちの1つまたは複数を経済するための薬物の製造のための付記1～38のいずれか1項に記載のPD-1またはPD-L1結合物質の使用。

[付記40]

(a) 付記1～12または16～28のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質；および

(b) 野生型IFN 2に比べて改善された安全性を付与する1つまたは複数の変異を有する改変ヒトIFN 2

を含むキメラタンパク質であって、

10

20

30

40

50

前記標的化部分および前記改変シグナル伝達物質が、任意に1つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、キメラタンパク質。

[付記41]

前記改変ヒトIFN 2が、位置R120、M148、R149、およびL153に1つまたは複数の変異を含む、付記40に記載のキメラタンパク質。

[付記42]

前記改変ヒトIFN 2が、R120E、R149A、およびL153Aから選択される1つまたは複数の変異を含む、付記40に記載のキメラタンパク質。

[付記43]

前記改変ヒトIFN 2が、R120E変異と、R149AまたはL153A変異のいずれかとを含む、付記40に記載のキメラタンパク質。

10

[付記44]

(a) 付記1~12または付記16~28のいずれか1項に記載のPD-L1結合物質；および

(b) 野生型IFN に比べて改善された安全性を付与する1つまたは複数の変異を有する改変ヒトIFN

を含むキメラタンパク質であって、

前記標的化部分および前記改変シグナル伝達物質が、任意に1つまたは複数のリンカーにより連結されていてもよい、キメラタンパク質。

[付記45]

20

前記改変ヒトIFN が、位置W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152、およびY155に1つまたは複数の変異を含む、付記44に記載のキメラタンパク質。

[付記46]

前記改変ヒトIFN が、W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152Gから選択される1つまたは複数の変異を含む、付記45に記載のキメラタンパク質。

30

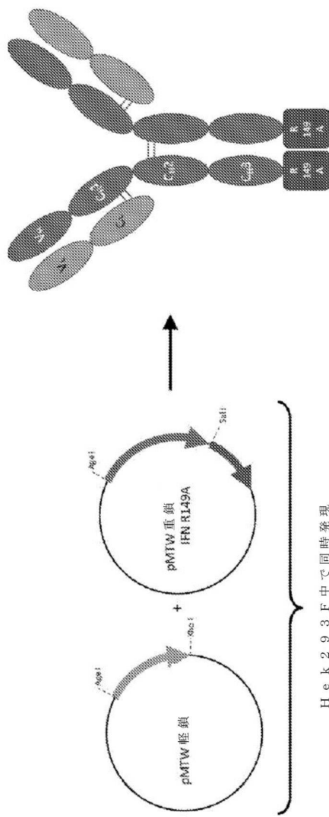
40

50



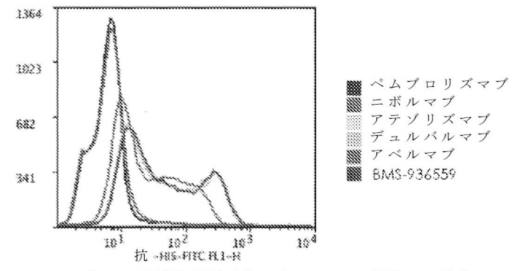
【図面】

【図 1】

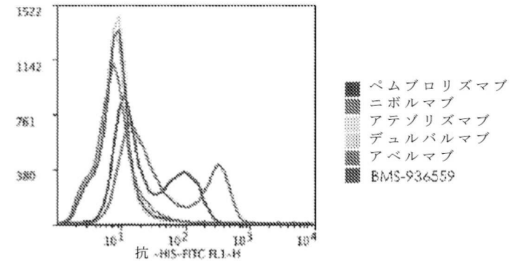


【図 2】

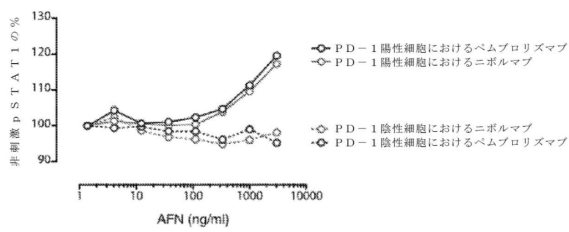
PD-L1遺伝子導入HeK293T細胞への結合



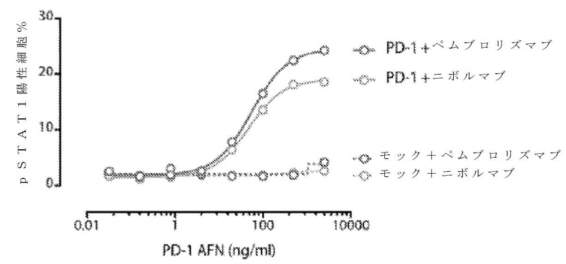
PD-1遺伝子導入HeK293T細胞への結合



【図 3】



【図 4】



10

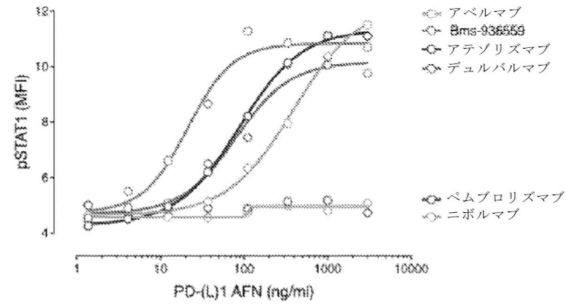
20

30

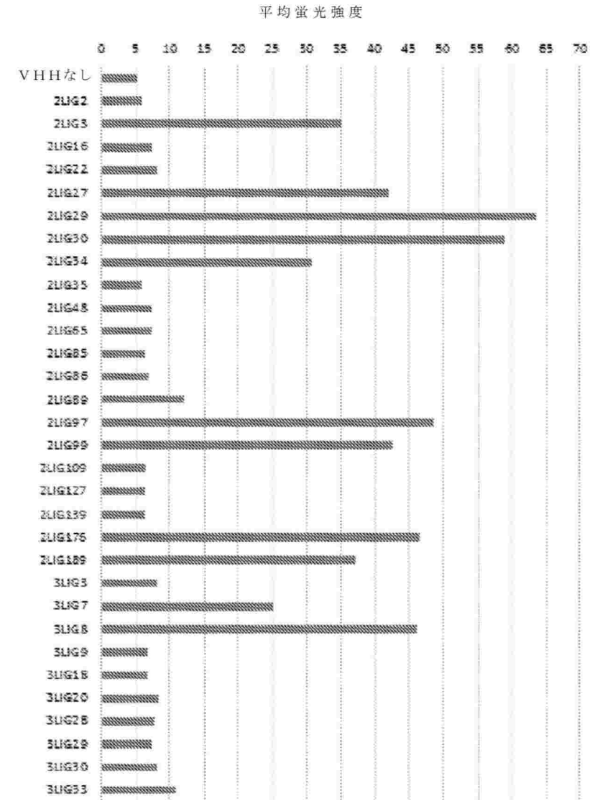
40

50

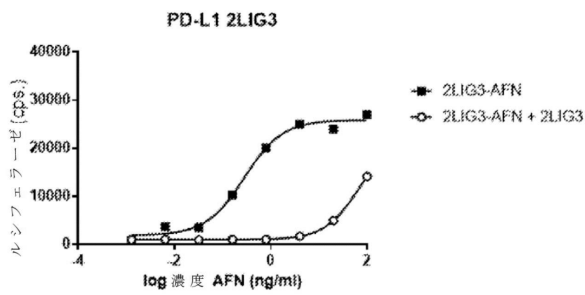
【図 5】



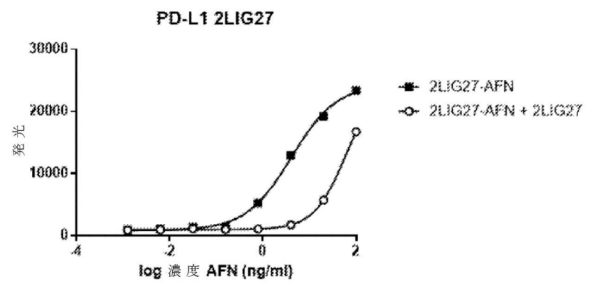
【図 6】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

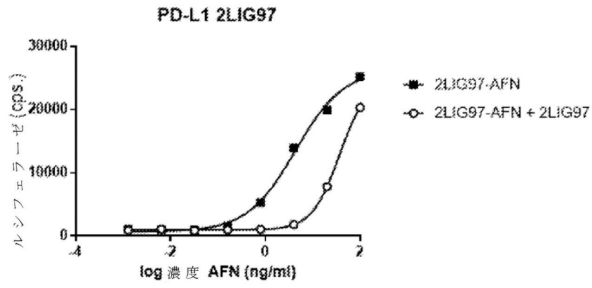
20

30

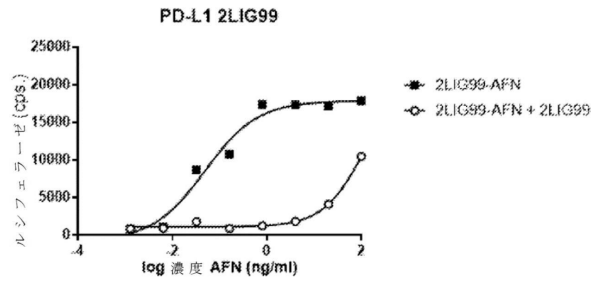
40

50

【図 7 C】

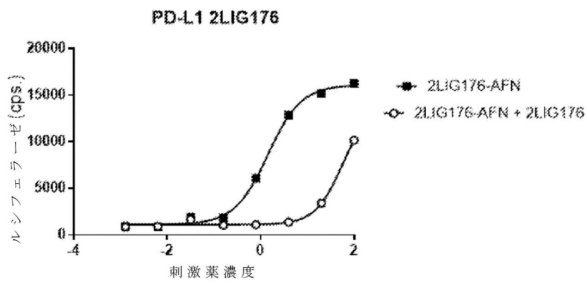


【図 7 D】

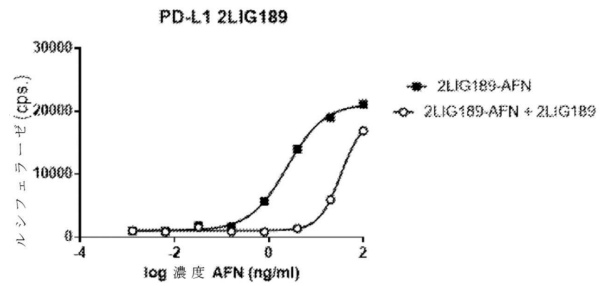


10

【図 7 E】

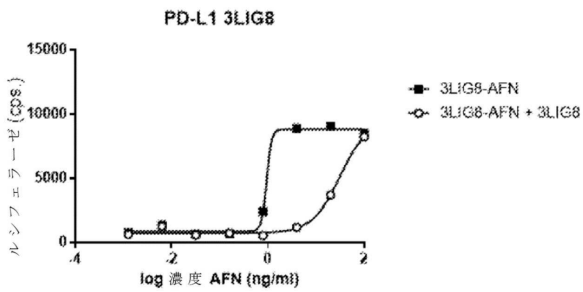


【図 7 F】

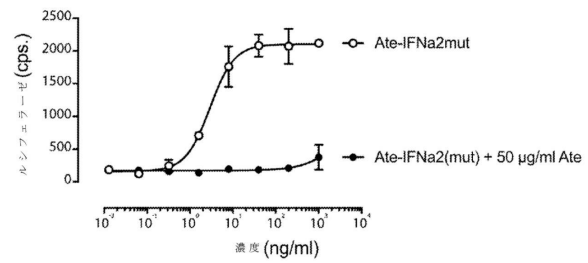


20

【図 7 G】



【図 8】

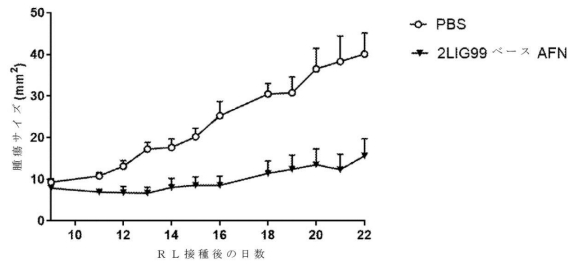


30

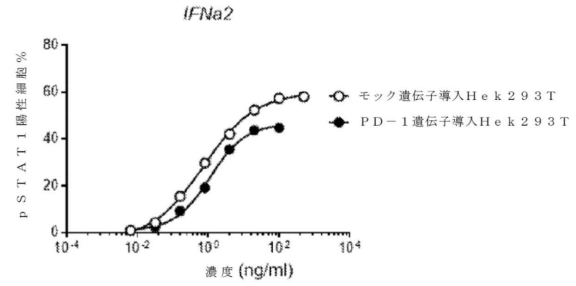
40

50

【図 9】

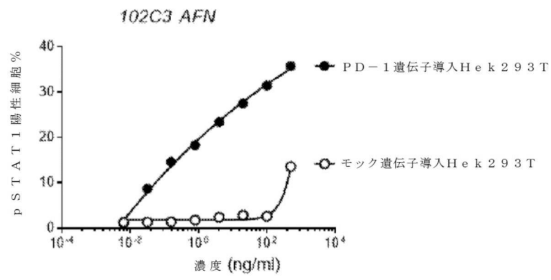


【図 10 A】

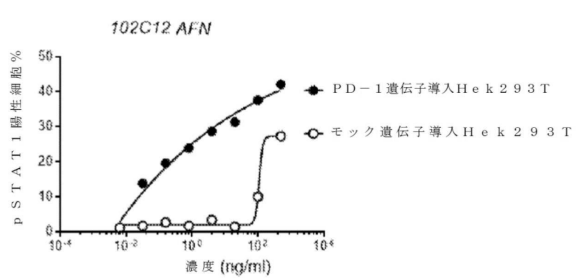


10

【図 10 B】



【図 10 C】



20

【配列表】

[0007423511000001.app](#)

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

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	
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	
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	37/02	
		A 6 1 P	43/00	1 2 1
		A 6 1 K	47/68	

ート 2 7 5 オリオンズ バイオサイエンス インコーポレーテッド 内

## (72)発明者

タベルニエ、ジャン

ベルギー王国 ビー - 9 8 6 0 バエーゲーム ボッテルウェーク 2

## (72)発明者

ザベアウ、レナルト

ベルギー王国 ビー - 9 0 5 2 ズウェイナールデ レイフィセストラート 1 2 0 オリオンズ バイオサイエンス エヌバイ 内

## (72)発明者

デプラ、エリク

ベルギー王国 ビー - 9 0 5 2 ズウェイナールデ レイフィセストラート 1 2 0 オリオンズ バイオサイエンス エヌバイ 内

審査官 斉藤 貴子

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 7 3 8 2 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 8 / 0 7 7 8 9 3 ( W O , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )