

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7010854号

(P7010854)

(45)発行日 令和4年1月26日(2022.1.26)

(24)登録日 令和4年1月17日(2022.1.17)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 19 (全176頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-565349(P2018-565349)

(86)(22)出願日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(65)公表番号 特表2019-525738(P2019-525738
A)

(43)公表日 令和1年9月12日(2019.9.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/037555

(87)国際公開番号 WO2017/218707

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月15日(2020.6.15)

(31)優先権主張番号 62/353,511

(32)優先日 平成28年6月22日(2016.6.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/350,145

(32)優先日 平成28年6月14日(2016.6.14)

最終頁に続く

(73)特許権者 510089100

ゼンコア インコーポレイテッド

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9

1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン

アベニュー 1 1 1

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 バーネット, マシュー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二重特異性チェックポイント阻害剤抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 第1の単量体であって、

i) 第1の変異体ヒトIgG1Fcドメインと、

ii) 第1の抗原に結合する単鎖Fv領域(s c F v)であって、前記s c F v領域は、第1の可変重ドメイン(heavy domain)、第1の可変軽ドメイン(light domain)、および帯電s c F vリンカーを含み、前記帯電s c F vリンカーは、前記第1の可変重ドメインと前記可変軽ドメインを共有結合している、単鎖Fv領域と、を含む、第1の単量体と、

b) V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 単量体を含む第2の単量体であって、V H は、第2の可変重ドメインであり、C H 2 - C H 3 は、第2の変異体ヒトIgG1Fcドメインである、第2の単量体と、

c) 第2の可変軽ドメインおよび軽定常ドメインを含む、軽鎖と、を含み、前記第2の単量体のC H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 は、アミノ酸置換N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 Dを含み、前記第1および第2の変異体ヒトIgG1Fcドメインは各々、アミノ酸置換E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 Kを含み、前記第1の変異体ヒトIgG1Fcドメインは、アミノ酸置換S 3 6 4 K / E 3 5 7 Qを含み、第2の変異体ヒトIgG1Fcドメインは、アミノ酸置換L 3 6 8 D / K 3 7 0 Sを含み、前記第1の可変重ドメインおよび第1の可変軽ドメインは、それぞれ配列番号1 1 3 7 6および配列番号1 1 3 7 7を有し、番号付けは

、KabatのEUインデックスによる、ヘテロ二量体抗体。

【請求項2】

前記第2の単量体の前記CH1-ヒンジーCH2-CH3構成要素が、配列番号37725を有し、前記第1の変異体ヒトIgG1Fcドメインが、配列番号37726を有し、前記定常軽ドメインが、配列番号37727を有する、請求項1に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項3】

前記第2の可変重ドメインおよび前記第2の可変軽ドメインが、ヒトCTLA-4、ヒトLAG-3、ヒトTIM-3、およびヒトTIGITの群由来のヒトチェックポイント受容体に結合する抗原結合ドメインを形成している、請求項1に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項4】

a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の第1の単量体をコードする第1の核酸と、
b) 請求項1～3のいずれか一項に記載の第2の単量体をコードする第2の核酸と、
c) 請求項1～3のいずれか一項に記載の軽鎖をコードする第3の核酸と、をそれぞれ含む、核酸組成物。

【請求項5】

a) 請求項4に記載の第1の核酸を含む、第1の発現ベクターと、
b) 請求項4に記載の第2の核酸を含む、第2の発現ベクターと、
c) 請求項4に記載の第3の核酸を含む、第3の発現ベクターと、を含む、発現ベクター組成物。

【請求項6】

請求項5に記載の発現ベクター組成物を含む、宿主細胞。

【請求項7】

請求項1～3のいずれか一項に記載のヘテロ二量体抗体を作製する方法であって、前記抗体が発現する条件下で、請求項6に記載の宿主細胞を培養することと、前記抗体を回収することと、を含む、方法。

【請求項8】

抗PD1 単鎖Fv領域(scFv)を含む組成物であって、前記抗PD1 scFvは、配列番号11376の配列を有する可変重ドメイン、および配列番号11377の配列を有する可変軽ドメインを含む、組成物。

【請求項9】

前記scFvは、N末端からC末端に向けて、VH-scFvリンカー-VLの式で表され、VHは、前記可変重ドメインであり、VLは、前記可変軽ドメインである、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記scFvが、N末端からC末端に向けて、VL-scFvリンカー-VHの式で表され、VHが前記可変重ドメインであり、VLが前記可変軽ドメインである、請求項8に記載の組成物。

【請求項11】

請求項8～10のいずれか一項に記載の抗PD-1 scFvをコードする、核酸。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項13】

請求項12に記載の発現ベクターの組成物を含む、宿主細胞。

【請求項14】

請求項13に記載の宿主細胞を、前記抗PD1 scFvが発現される条件下で培養することと、前記抗PD1 scFvを回収することとを含む、抗PD-1 scFvを作製する方法。

【請求項15】

a) 配列番号38518のアミノ酸配列を有する第1の単量体；

b) 配列番号 3 8 5 2 3 のアミノ酸配列を有する第 2 の単量体；および
c) 配列番号 3 8 5 3 3 のアミノ酸配列を有する第 3 の単量体
を含む、ヘテロ二量体抗体。

【請求項 1 6】

a) 請求項 1 5 に記載の第 1 の単量体をコードする第 1 の核酸；
b) 請求項 1 5 に記載の第 2 の単量体をコードする第 2 の核酸；および
c) 請求項 1 5 に記載の第 3 の単量体をコードする第 3 の核酸
を含む、核酸組成物。

【請求項 1 7】

a) 請求項 1 6 に記載の第 1 の核酸を含む第 1 の発現ベクター；
b) 請求項 1 6 に記載の第 2 の核酸を含む第 2 の発現ベクター；および
c) 請求項 1 6 に記載の第 3 の核酸を含む第 3 の発現ベクター
を含む、発現ベクター組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の発現ベクター組成物を含む、宿主細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の宿主細胞を、前記ヘテロ二量体抗体が発現される条件下で培養すること、および、前記ヘテロ二量体抗体を回収することを含む、ヘテロ二量体抗体を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年6月14日出願の米国仮特許出願第62／350，145号、2016年6月22日出願の同第62／353，511号、および2016年11月10日出願の同第62／420，500号の優先権を主張するものであり、これらの内容は、それらの全体が本明細書に参照により明示的かつ完全に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出され、その全体が本明細書に参照により組み込まれる配列表を含む。2017年6月9日作成のこのA S C I I の複製は、0 6 7 4 6 1 _ 5 1 9 1 W O _ S L . t x t という名前であり、サイズは、3 2 , 4 4 2 , 1 4 5 キロバイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

C T L A - 4、P D - 1（プログラム細胞死1）、T I M - 3（T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン3）、L A G - 3（リンパ球活性化遺伝子3）、T I G I T（I g および I T I M ドメインを有するT細胞免疫受容体）などのチェックポイント受容体は、T細胞および他の細胞型の活性化、増殖、および／またはエフェクター活性を阻害する。チェックポイント受容体が、腫瘍細胞に対する内因性T細胞応答を抑制するという仮説に導かれて、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブ、およびトレメリムマブを含む抗C T L A 4 および抗P D 1 抗体の前臨床研究および臨床研究では、確かに、様々な悪性腫瘍を有するごく一部の患者において、チェックポイント遮断により、優れた抗腫瘍応答がもたらされ、内因性T細胞が刺激されて腫瘍細胞が攻撃され、長期の癌の寛解がもたらされることが示された。残念ながら、患者の一部のみがこれらの療法への応答を示し、その応答率は、適応症および他の要因に応じて、通常、10～30%の範囲であり、各単剤療法に関してはそれよりも高いときもある。これらの作用剤の治療的組み合わせ、例えば、イピリムマブにニボルマブを加えた組み合わせは、場合によっては60%近く、さらにより高い応答率をもたらす。前臨床研究では、抗P D - 1 抗体および／または抗C T L A - 4 抗体と、L A G - 3、T I M - 3、B T L A、およびT I G I Tを含む、最近になっ

10

20

30

40

50

て同定されたチェックポイント受容体の遮断との間の付加的相乗効果が示された。複数のチェックポイント遮断の潜在能力が極めて有望である一方で、そのような作用剤との組み合わせ療法では、重い経済的負担を背負うことが求められる。さらに、組み合わせ療法、例えば、ニボルマブにイピリムマブを加えた療法の自己免疫毒性は、単剤療法と比較して大幅に上昇し、多くの患者を療法の停止へと至らしめる。

【0004】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を調査したいくつかの研究（Ahmadzadeh et al., Blood 114:1537（2009）、Matsuzaki et al., PNAS 107（17）:7875-7880（2010）、Fourcade et al., Cancer Res. 72（4）:887-896（2012）、および Gros et al., J. Clinical Invest. 124（5）:2246（2014））では、TILは一般的に複数のチェックポイント受容体を発現することが示された。さらに、複数のチェックポイントを発現するTILは、おそらく、実際に最も腫瘍応答性であろう。これとは対比的に、末梢にある非腫瘍応答性T細胞は、単一のチェックポイントを発現する可能性が高い。単一特異性の完全長抗体を用いたチェックポイント遮断は、自己免疫毒性に寄与すると思われる自己抗原応答性の単一発現T細胞に対する腫瘍応答性TILの抑制解除に関して、おそらく、無差別的である。

【0005】

したがって、本発明は、2つの異なるチェックポイント阻害剤タンパク質に結合する二重特異性抗体を対象とするものである。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、ヒトPD-1、ヒトCTLA-4、ヒトTIM-3、ヒトLAG-3、およびヒトTIGITなどの2つの異なるチェックポイント細胞表面受容体に結合する二重特異性ヘテロ二量体抗体を提供する。したがって、いくつかの態様では、好適な二重特異性抗体は、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびTIM-3、PD-1およびLAG-3、PD-1およびTIGIT、PD-1およびBTLA、CTLA-4およびTIM-3、CTLA-4およびLAG-3、CTLA-4およびTIGIT、CTLA-4およびBTLA、TIM-3およびLAG-3、TIM-3およびTIGIT、TIM-3およびBTLA、LAG-3およびTIGIT、LAG-3およびBTLA、ならびにTIGITおよびBTLAに結合する。

【0007】

一態様では、本発明は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電scFvリンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）を使用して連結された可変重ドメインおよび可変軽ドメインを有するscFv、非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kを含むFcドメイン、ならびに本明細書で概説するチェックポイント受容体に結合するFvを含む第1の単量体（時として「scFv重鎖」と称される「scFv単量体」）と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kを有するFcドメイン、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント受容体に結合するFvを作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「Fab単量体」または「重鎖」）と、c) 軽鎖と、を含む。この特定の実施形態では、好適な単量体Fvの対としては、（Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する）PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3 X PD1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBTLA、BTLAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBTLA、

B T L AおよびC T L A-4、T I M-3およびL A G-3、L A G-3およびT I M-3、T I M-3およびT I G I T、T I G I TおよびT I M-3、T I M-3およびB T L A、B T L AおよびT I M-3、L A G-3およびT I G I T、T I G I TおよびL A G-3、L A G-3およびB T L A、B T L AおよびL A G-3、B T L AおよびT I G I T、ならびにT I G I TおよびB T L Aが挙げられる。

【0008】

本発明の他の態様を、本明細書に提供する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A-I】本発明のいくつかの型を示す。最初の型は、「栓抜き」型であり、第1および第2の抗原結合ドメインを有する。加えて、m A b-F v、m A b-s c F v、中心-s c F v、中心-F v、片腕中心-s c F v、1 s c F v-m A b、s c F v-m A b、および二重s c F v型全てが示されている。示されるs c F vドメインの全てについて、それらは、NからC末端可変重-（任意のリンカー）-可変軽、またはその逆のいずれかであり得る。加えて、片腕s c F v-m A bについて、s c F vは、重鎖単量体のN末端または軽鎖のN末端のいずれかに結合され得る。

【図2】（図2A、2B、2C、および2D）臨床開発がしやすいようにヒトおよびカニクイザルの配列の両方に結合する抗原結合ドメインの開発を容易にするために、多くの場合ヒトおよびカニクイザルの両方を含む、本発明において使用するいくつかの抗原の抗原配列を示す。

【図3A-3F】ヘテロ二量体化変異体のセットの有用な対（非対称変異体およびp I変異体を含む）を示す。図3Eでは、対応する「単量体2」の変異体が存在しない変異体が存在する。これらはどちらかの単量体で単独で使用されるか、または栓抜きのF a b側に含まれ得るp I変異体であり、例えば、適切な帯電s c F vリンカーが第2の抗原結合ドメインとしてs c F vを利用する第2の単量体で使用され得る。好適な帯電リンカーは、図7に示される。

【図4】等配電子変異体抗体定常領域およびそれらのそれぞれの置換のリストを示す。p I₋（-）は、より低いp I変異体を示し、一方でp I₊（+）は、より高いp I変異体を示す。これらは、本発明の他の二量体化変異体と、（かつ本明細書に概説されるように、他の変異体の型と）任意選択かつ独立に組み合わせることができる。

【図5】F c γ R結合を切断する有用な切断変異体（「ノックアウト」または「K O」変異体と呼ばれることがある）を示す。一般に、切断変異体は、両方の単量体に見られるが、場合によっては、それらは、1つの単量体にしか存在しなくもよい。

【図6】図1Aまたは図1Fの型のいずれかに使用することができる本発明の2つの特に有用な実施形態を示す。図1Aの型について、この実施形態の「非F v」構成要素が図37Aに示されるが、他の型も（および図38のものも）同様に使用することができる。

【図7】1つ以上のs c F vを構成要素として利用するヘテロ二量体抗体のp Iを増加または減少させることにおいて有用であるいくつかの帯電s c F vリンカーを示す。（+H）陽性リンカーは、本明細書に示される特に抗C D 3 v lおよびv h配列と共に、本明細書において特に有用である。単一電荷を有する、単一の先行技術s c F vリンカーは、W h i t l o w e t a l., P r o t e i n E n g i n e e r i n g 6 (8): 989-995 (1993) にちなんで、「W h i t l o w」と呼ばれる。このリンカーは、s c F vにおいて、凝集の低減、およびタンパク質分解に対する安定性の増強に向けて使用されることに留意されたい。

【図8】操作されたヘテロ二量体非対称F c変異体のリストをヘテロ二量体の収率（H P L C-C I E Xにより決定）および熱安定性（D S Cにより決定）と共に示す。未決定の熱安定性は、「n. d.」と示される。

【図9A-E】配列番号6209~11464、配列番号11465~17134、配列番号33003~33072、配列番号33073~35394、および配列番号36127~36146としてリストに記載される追加の抗P D-1 A B Dと共に、選択され

10

20

30

40

50

たいいくつかのPD-1 ABDを示す。CDRは下線が付され、scFvリンカーは二重下線が付され（配列において、scFvリンカーは正帯電scFv（GKPGS）4リンカー（配列番号37755）であるが、当業者に理解されるように、このリンカーは、非帯電または負帯電リンカーを含む他のリンカーに置き換えられてもよく、その一部が図7に示される）、斜線は可変ドメインの境界（複数可）を示す。加えて、命名規則は、NからC末端のscFvの配向を図示する。すなわち、「H1.279__L1.194」は、配向がvh-scFvリンカー-vlである（NからC末端、使用される型に応じて、任意選択のドメインリンカーが片側または両側にある）ことを示すが、これらの配列は、反対の配向の（NからC末端）vl-リンカー-vhでも使用することができる。同様に、「L1.194__H1.279」は、配向がvl-scFvリンカー-vhである（NからC末端、同様に、任意選択のドメインリンカーを有する）ことを示し、反対の配向も本発明内に含まれる。本明細書に記載され、CDRを含有する本明細書の全ての配列に当てはまるように、CDR位置の正確な同定は、表1に示されるように、使用される番号付けに応じてわずかに異なる場合があり、したがって、下線が付されているCDRだけでなく、他の番号付けシステムを使用するvhおよびvlドメイン内に含まれるCDRも本明細書に含まれる。さらに、図の全ての配列に関して、これらのvhおよびvl配列は、scFv型またはFab型のいずれかで使用され得る。

【図10A-PP】配列番号21~2918、配列番号2919~6208、配列番号36739~36818、および配列番号35395~35416としてリストに記載される追加の抗CTLA-4 ABDと共に、いくつかのCTLA-4 ABDを示す。CDRは下線が付され、scFvリンカーは二重下線が付され（配列において、scFvリンカーは正帯電scFv（GKPGS）4リンカー（配列番号37755）であるが、当業者に理解されるように、このリンカーは、非帯電または負帯電リンカーを含む他のリンカーに置き換えられてもよく、そのうちのいくつかは図7に示される）、斜線は可変ドメインの境界（複数可）を示す。上記のように、命名規則は、NからC末端のscFvの配向を図示する。この図のリストに記載される配列において、それらは全て、vh-scFvリンカー-vl（NからC末端）のように配向されるが、これらの配列は、反対の配向の（NからC末端）vl-リンカー-vhでも使用することができる。加えて、配列番号21~2918、配列番号：2919~6208、配列番号36739~36818、および配列番号35395~35416の配列のうちのいくつかは、反対の配向にある。本明細書に記載され、CDRを含有する本明細書の全ての配列に当てはまるように、CDR位置の正確な同定は、表1に示されるように、使用される番号付けに応じてわずかに異なる場合があり、したがって、下線が付されているCDRだけでなく、他の番号付けシステムを使用するvhおよびvlドメイン内に含まれるCDRも本明細書に含まれる。さらに、図の全ての配列に関して、これらのvhおよびvl配列は、scFv型またはFab型のいずれかで使用され得る。特に、図の多くは、scFv型およびFab型の両方のXENP識別子を含み、例えば、XENP19235がFab型を使用する分子であり、XENP19769がscFv分子であることを示す図10Aを参照されたい。

【図11A-N】配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号35417~35606、配列番号25194~32793、および配列番号32794~33002としてリストに記載される追加の抗LAG-3 ABDと共に、いくつかのLAG-3 ABDを示す。CDRは下線が付され、scFvリンカーは二重下線が付され（配列において、scFvリンカーは正帯電scFv（GKPGS）4リンカーであるが、当業者に理解されるように、このリンカーは、非帯電または負帯電リンカーを含む他のリンカーに置き換えられてもよく、そのうちのいくつかは図7に示される）、斜線は可変ドメインの境界（複数可）を示す。上記のように、命名規則は、NからC末端のscFvの配向を図示する。この図のリストに記載される配列において、それらは全て、vh-scFvリンカー-vl（NからC末端）のように配向されるが、これらの配列は、反対の配向の（NからC末端）vl-リンカー-vhでも使用することができる。加えて、配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号3

5 4 1 7 ~ 3 5 6 0 6、配列番号 2 5 1 9 4 ~ 3 2 7 9 3、および配列番号 3 2 7 9 4 ~ 3 3 0 0 2 の配列のうちのいくつかは、反対の配向にある。本明細書に記載され、C D R を含有する本明細書の全ての配列に当てはまるように、C D R 位置の正確な同定は、表 1 に示されるように、使用される番号付けに応じてわずかに異なる場合があり、したがって、下線が付されている C D R だけでなく、他の番号付けシステムを使用する v h および v l ドメイン内に含まれる C D R も本明細書に含まれる。さらに、図の全ての配列に関して、これらの v h および v l 配列は、s c F v 型または F a b 型のいずれかで使用され得る。

【図 1 2 A - C】配列番号 2 0 8 8 5 ~ 2 1 5 0 3 および配列番号 3 6 7 0 7 ~ 3 6 7 3 8 としてリストに記載される追加の抗 B T L A A B D と共に、いくつかの B T L A A B D を示す。C D R は下線が付され、s c F v リンカーは二重下線が付され（配列において、s c F v リンカーは正帯電 s c F v (G K P G S) 4 リンカーであるが、当業者に理解されるように、このリンカーは、非帯電または負帯電リンカーを含む他のリンカーに置き換えられてもよく、そのうちのいくつかは図 7 に示される）、斜線は可変ドメインの境界（複数可）を示す。上記のように、命名規則は、N から C 末端の s c F v の配向を図示する。この図のリストに記載される配列において、それらは全て、v h - s c F v リンカー - v l (N から C 末端) のように配向されるが、これらの配列は、反対の配向の (N から C 末端) v l - リンカー - v h でも使用することができる。加えて、配列番号 2 0 8 8 5 ~ 2 1 5 0 3 および配列番号 3 6 7 0 7 ~ 3 6 7 3 8 の配列のうちのいくつかは、反対の配向にある。本明細書に記載され、C D R を含有する本明細書の全ての配列に当てはまるように、C D R 位置の正確な同定は、表 1 に示されるように、使用される番号付けに応じてわずかに異なる場合があり、したがって、下線が付されている C D R だけでなく、他の番号付けシステムを使用する v h および v l ドメイン内に含まれる C D R も本明細書に含まれる。さらに、図の全ての配列に関して、これらの v h および v l 配列は、s c F v 型または F a b 型のいずれかで使用され得る。

【図 1 3 A - I】配列番号 2 0 7 6 5 ~ 2 0 8 8 4、配列番号 3 7 5 8 7 ~ 3 7 6 9 8、および配列番号 3 6 3 4 7 ~ 3 6 7 0 6 としてリストに記載される追加の抗 T I M - 3 A B D と共に、いくつかの T I M - 3 A B D を示す。C D R は下線が付され、s c F v リンカーは二重下線が付され（配列において、s c F v リンカーは正帯電 s c F v (G K P G S) 4 リンカーであるが、当業者に理解されるように、このリンカーは、非帯電または負帯電リンカーを含む他のリンカーに置き換えられてもよく、そのうちのいくつかは図 7 に示される）、斜線は可変ドメインの境界（複数可）を示す。上記のように、命名規則は、N から C 末端の s c F v の配向を図示する。この図のリストに記載される配列において、それらは全て、v h - s c F v リンカー - v l (N から C 末端) のように配向されるが、これらの配列は、反対の配向の (N から C 末端) v l - リンカー - v h でも使用することができる。加えて、配列番号 2 0 7 6 5 ~ 2 0 8 8 4、配列番号 3 7 5 8 7 ~ 3 7 6 9 8、および配列番号 3 6 3 4 7 ~ 3 6 7 0 6 の配列のうちのいくつかは、反対の配向にある。本明細書に記載され、C D R を含有する本明細書の全ての配列に当てはまるように、C D R 位置の正確な同定は、表 1 に示されるように、使用される番号付けに応じてわずかに異なる場合があり、したがって、下線が付されている C D R だけでなく、他の番号付けシステムを使用する v h および v l ドメイン内に含まれる C D R も本明細書に含まれる。さらに、図の全ての配列に関して、これらの v h および v l 配列は、s c F v 型または F a b 型のいずれかで使用され得る。

【図 1 4 A - I】栓抜き型の特定の抗 C T L A - 4 X 抗 P D - 1 抗体 (F a b - s c F v - F c) のアミノ酸配列を示す。抗体は、最初に F a b 可変領域、次に s c F v 可変領域、ダッシュ記号で分離され、続いて鎖指定 (F a b - F c 重鎖、s c F v - F c 重鎖、または軽鎖) を使用して命名される。C D R は下線が付され、斜線は可変領域の境界（複数可）を示す。s c F v ドメインは、示されるように、v h - リンカー - v l または v l - リンカー - v h のいずれかの異なる配向 (N から C 末端) を有するが、これは逆にすることができる。加えて、血清中のより長い半減期をもたらす本明細書に概説される各配列は、1 つ、または好ましくは両方の F c ドメインに M 4 2 8 L / N 4 3 4 S 変異体を含む

10

20

30

40

50

か、または除外することができる。

【図15A-I】特定の抗LAG-3 X抗PD-1 Fab-scfv-Fc二重特異性抗体のアミノ酸配列を示す。抗体は、最初にFab可変領域、次にscfv可変領域、ダッシュ記号で分離され、続いて鎖指定(Fab-Fc重鎖、scfv-Fc重鎖、または軽鎖)を使用して命名される。CDRは下線が付され、斜線は可変領域の境界(複数可)を示す。scfvドメインは、配向(NからC末端)vh-リンカー-vlを有するが、これは逆にすることができる。加えて、血清中のより長い半減期をもたらす本明細書に概説される各配列は、1つ、または好ましくは両方のFcドメインにM428L/N434S変異体を含むか、または除外することができる。

【図16】特定の抗BTLA X抗PD-1 Fab-scfv-Fc二重特異性抗体のアミノ酸配列を示す。抗体は、最初にFab可変領域、次にscfv可変領域、ダッシュ記号で分離され、続いて鎖指定(Fab-Fc重鎖、scfv-Fc重鎖、または軽鎖)を使用して命名される。CDRは下線が付され、斜線は可変領域の境界(複数可)を示す。scfvドメインは、配向(NからC末端)vh-リンカー-vlを有するが、これは逆にすることができる。加えて、血清中のより長い半減期をもたらす本明細書に概説される各配列は、1つ、または好ましくは両方のFcドメインにM428L/N434S変異体を含むか、または除外することができる。

【図17】特定の抗LAG-3 X抗CTLA-4 Fab-scfv-Fc二重特異性抗体のアミノ酸配列を示す。抗体は、最初にFab可変領域、次にscfv可変領域、ダッシュ記号で分離され、続いて鎖指定(Fab-Fc重鎖、scfv-Fc重鎖、または軽鎖)を使用して命名される。CDRは下線が付され、斜線は可変領域の境界(複数可)を示す。scfvドメインは、配向(NからC末端)vh-リンカー-vlを有するが、これは逆にすることができる。加えて、血清中のより長い半減期をもたらす本明細書に概説される各配列は、1つ、または好ましくは両方のFcドメインにM428L/N434S変異体を含むか、または除外することができる。

【図18】いくつかの抗LAG-3ハイブリドーマスクリーニングの結果を示す。10μL中1μgのヒトLAG-3-hIgを、室温で20分間、50μLのハイブリドーマ上清(2倍希釈、10%FBSを含むRPMI培地において8回)と混合した。40μLのDauidまたはRamos細胞(内因的にMHC-IIを発現する)を添加し、4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、抗ヒトFc-Alexa647二次抗体と共に30分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、FACSによりAlexa647について分析した。

【図19A-B】ヒトPBMCのSEB刺激および抗CTLA-4 X抗PD-1二重特異性抗体での処置後のサイトカイン放出アッセイ(A:IL-2、B:IFNγ)を示す。

【図20A-C】ヒトPBMCが0日目にNSGマウスに移植され、続いて、1日目に示される試験物品を投与した後の、14日目のCD45+事象およびCD8+事象を示す。

【図21A-B】抗TIM-3ハイブリドーマから生成されるキメラ抗体によるSEB刺激PBMCアッセイにおけるT細胞結合を示す。

【図22】3つの実験からのいくつかの抗TIM-3抗原結合ドメイン技術データを示す。これは、二価の実施形態のXENPコード、誘導体クローン、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトTIM-3に対するKD結合定数、会合定数、ならびに解離定数を示す。

【図23A-N】いくつかの抗PD-1抗原結合ドメイン技術データを示す。これは、二価およびscfvの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、scfv配向(NからC末端)、Octetにより測定される、ヒトPD-1に対するKD結合定数、ならびにscfvのTmを示す。

【図24A-G】いくつかの抗CTLA-4 Fabスクリーニングの結果を示す。これは、Fabおよびscfvの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトおよびcynoCTLA-4に対するKD結合定数、ならびにscfvおよびFabのTmを示す。加えて、少なくとも1つのヒ

10

20

30

40

50

トV HまたはV L生殖系列と正確に一致した配列9量体の数は、F a bおよびs c F vの両方の可変領域のヒト性の尺度として示される。

【図25A-B】ニボルマブ（抗PD-1モノクローナル抗体、Opdivo（登録商標）として販売されている）単独、イピリムマブ単独（抗CTLA-4モノクローナル抗体、Yervoy（登録商標）として販売されている）、ニボルマブおよびイピリムマブアームに基づくプロトタイプ抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体、および「片腕」組み合わせ対照によるIL-2放出の増強を見る混合リンパ球反応を示す。

【図26】変異体CTLA-4 F a bアームおよび変異体抗PD-1 s c F vアームを有する抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体、ならびにニボルマブ単独、イピリムマブ単独、ならびに対照としてニボルマブおよびイピリムマブアームに基づくプロトタイプ抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体によるIL-2放出の増強を見る混合リンパ球反応を示す。

10

【図27】抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体がヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着（ヒトCD45計数によって測定される）を増強することを示す。増強は、ニボルマブ（XENP16432）単独（破線）で見られるよりも大きい。

【図28】移植片対宿主病における体重とCD45細胞計数との間の相関を示し、CD45細胞レベルが疾患を予測することを示す。

【図29】図27に示される研究におけるCD45細胞計数とIFN γ 放出との間の相関を示す。

【図30】抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体がヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着（ヒトCD45計数によって測定される）を増強することを示す。増強は、ニボルマブ（XENP16432）単独（破線）で見られるよりも大きい。

20

【図31】図30に示される研究におけるCD45細胞計数とIFN γ 放出との間の相関を示す。

【図32】ニボルマブ単独よりも抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性チェックポイント抗体が一貫して優れていることを示す図27および30に示される研究間の試験物品効果の比較を示す。

【図33A-B】抗CTLA-4 x 抗PD-1、抗LAG-3 x 抗PD-1、および抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体を評価するための混合リンパ球反応の結果を示す。分析物レベルを、ニボルマブ単独により誘導されたレベルに標準化した（1より大きい値はニボルマブに対する増強を表す）。

30

【図34】抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体を評価するためのSEB反応を示す。抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性自体は対照に対するIL-2応答を増強するが、ニボルマブ単独よりも劣っている。しかしながら、ニボルマブと組み合わされた抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体は、どちらかの単独よりも著しく高いIL-2応答をもたらす。

【図35】抗CTLA-4 x 抗PD-1、抗LAG-3 x 抗PD-1、抗BTLA x 抗PD-1、および抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体は、ヒトPBMC移植NSGマウスにおける生着（ヒトCD45計数によって測定される）を増強する。増強は、ニボルマブ（XENP16432）単独で見られるよりも大きい。また、抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体は、ニボルマブと組み合わされて、最高生着レベルをもたらす。

40

【図36A-B】抗BTLA x 抗PD-1二重特異性体は、ニボルマブと同等の非抑制（de-repressive）活性を有するためにHVEM/BTLA相互作用の破壊を必要とすることを示す。

【図37A-E】Fv配列を含まない（例えば、s c F v、ならびにF a b側のv hおよびv l）、ヒトIgG1に基づくいくつかの有用な栓抜き型骨格の配列を示す。栓抜き骨格1は、ヒトIgG1（356E/358Mアロタイプ）に基づき、F a b側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体および両鎖上にE233P/L234V/L235A/G236del/S267K切断変異体のS364K/E357Q:L368D/K370S非対称変異体を含む。栓抜き骨格2は、ヒトI

50

g G 1 (3 5 6 E / 3 5 8 M アロタイプ) に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の異なる非対称変異体を含む。栓抜き骨格3は、ヒト I g G 1 (3 5 6 E / 3 5 8 M アロタイプ) に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の異なる非対称変異体を含む。栓抜き骨格4は、ヒト I g G 1 (3 5 6 E / 3 5 8 M アロタイプ) に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の異なる非対称変異体を含む。栓抜き骨格5は、ヒト I g G 1 (3 5 6 D / 3 5 8 L アロタイプ) に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 非対称変異体を含む。栓抜き骨格6は、ヒト I g G 1 (3 5 6 E / 3 5 8 M アロタイプ) に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 非対称変異体、ならびに両鎖上に N 2 9 7 A 変異体を含む。栓抜き骨格7は、変異が N 2 9 7 S であることを除いて6と同一である。栓抜き骨格6および7の代替型は、両鎖の切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K を除外することができる。骨格8は、ヒト I g G 4 に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体および両鎖上に E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 切断変異体の S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 非対称変異体、ならびに両鎖上に S 2 2 8 P (E U 番号付け、これは K a b a t において S 2 4 1 P である) 変異体 (当該技術分野に既知であるように、F a b アーム交換を切断する) を含む。栓抜き骨格8の代替型は、両鎖の切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K を除外することができる。骨格9は、ヒト I g G 2 に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体である S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 非対称変異体を含む。骨格10は、ヒト I g G 2 に基づき、F a b 側上に N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D p I 変異体の S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 非対称変異体、ならびに両鎖上に S 2 6 7 K 変異体を含む。当業者に理解されるように、また以下に概説されるように、これらの配列は、一方の単量体が s c F v を含み (任意選択で帯電 s c F v リンカーを含む)、もう一方の単量体が F a b 配列 (例えば、v h が「F a b 側重鎖」に結合され、v l が「定常軽鎖」に結合される) を含んで、本明細書に概説される任意の v h および v l 対で 사용할ことができる。すなわち、抗 C T L A - 4、抗 P D - 1、抗 L A G - 3、抗 T I M - 3、抗 T I G I T、および抗 B T L A について本明細書に概説される任意の F v 配列は、s c F v (同様に、任意選択で帯電 s c F v リンカーを有する) または F a b としてにかかわらず、任意の組み合わせでこれらの図37の骨格に組み込むことができる。図37Aに示される定常軽鎖は、図中の構築物のすべてに使用され得るが、カップ定常軽鎖も置換され得る。これらの栓抜き骨格は、第1の F a b と同じ抗原結合を有する追加の第2の F a b (v h - C H 1 および v l 定常軽) が「栓抜き側」上の s c F v の N 末端に付加される場合、図1Fの中心 - s c F v 型において有用であることに留意されたい。列挙される配列に対して90、95、98、および99%同一 (本明細書に定義される) であり、かつ/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のさらなるアミノ酸置換 (当業者に理解されるように、親ヒト I g G 1 (または骨格に応じて I g G 2 または I g G 4 と比較して、既にいくつかのアミノ酸改変を含有する図の「親」と比較して) を含有する配列は、これらのそれぞれの骨格内に含まれる。すなわち、列挙される骨格は、この図の骨格内に含有される非対称、p I、および切断変異体に加えて、追加のアミノ酸改

10

20

30

40

50

変（一般にアミノ酸置換）を含有し得る。

【図38A-D】本発明のFv配列が付加される、本発明に使用されるmAb-scfv骨格の配列を示す。mAb-scfv骨格1は、ヒトIgG1（356E/358Mアロタイプ）に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体および両鎖上にE233P/L234V/L235A/G236del/S267K切断変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体を含む。骨格2は、ヒトIgG1（356D/358Lアロタイプ）に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体および両鎖上にE233P/L234V/L235A/G236del/S267K切断変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体を含む。骨格3は、ヒトIgG1（356E/358Mアロタイプ）に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体および両鎖上にE233P/L234V/L235A/G236del/S267K切断変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体、ならびに両鎖上にN297A変異体を含む。骨格4は、変異がN297Sであることを除いて3と同一である。mAb-scfv骨格3および4の代替型は、両鎖の切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kを除外することができる。骨格5は、ヒトIgG4に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体および両鎖上にE233P/L234V/L235A/G236del/S267K切断変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体、ならびに両鎖上にS228P（EU番号付け、これはKababにおいてS241Pである）変異体（当該技術分野に既知であるように、Fabアーム交換を切断する）を含む。骨格6は、ヒトIgG2に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体を含む。骨格7は、ヒトIgG2に基づき、Fab側上にN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI変異体のS364K/E357Q：L368D/K370S非対称変異体、ならびに両鎖上にS267K変異体を含む。当業者に理解されるように、また以下に概説されるように、これらの配列は、一方の単量体がFabおよびscfvの両方を含み（任意選択で帯電scfvリンカーを含む）、もう一方の単量体がFab配列（例えば、vhが「Fab側重鎖」に結合され、vlが「定常軽鎖」に結合される）を含んで、本明細書に概説される任意のvhおよびvl対で 사용할ことができる。すなわち、抗CTLA-4、抗PD-1、抗LAG-3、抗TIM-3、抗TIGIT、および抗BTLAについて本明細書に概説される任意のFv配列は、scfv（同様に、任意選択で帯電scfvリンカー）またはFabとしてにかかわらず、任意の組み合わせでこの図38の骨格に組み込むことができる。単量体1側は、Fab-scfv pI陰性側であり、ヘテロ二量体化変異体L368D/K370S、等配電子pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K（全てIgG1に対して）を含む。モノマー2側は、scfv pI陽性側であり、ヘテロ二量体化変異体364K/E357Qを含む。しかしながら、他の非対称変異体対、特に、[S364K/E357Q：L368D/K370S]、[L368D/K370S：S364K]、[L368E/K370S：S364K]、[T411T/E360E/Q362E：D401K]、[L368D/K370S：S364K/E357L]、[K370S：S364K/E357Q]、[T366S/L368A/Y407V：T366W]、および[T366S/L368A/Y407V/Y394C：T366W/S354C]が置換され得る。図38Aに示される定常軽鎖は、図中の構築物のすべてに使用され得るが、カップ定常軽鎖も置換され得る。これらのmAb-scfv骨格は、図1HのmAb-Fv型（一方の単量体がC末端にvlを含み、もう一方がC末端にvhを含む）ならびに図1Eのscfv-mAb型（scfvドメインが単量体のうちの1つのC末端に付加される）の両方に有用であることに留意されたい。列挙される配列に対して90、95、9

10

20

30

40

50

8、および99%同一（本明細書に定義される）であり、かつ／または1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のさらなるアミノ酸置換（当業者に理解されるように、親ヒトIgG1（または骨格に応じてIgG2またはIgG4と比較して、既にいくつかのアミノ酸改変を含有する図の「親」と比較して）を含有する配列は、これらのそれぞれの骨格内に含まれる。すなわち、列挙される骨格は、この図の骨格内に含有される非対称、pI、および切断変異体に加えて、追加のアミノ酸改変（一般にアミノ酸置換）を含有し得る。

【図39A-B】本発明の二重特異性チェックポイント抗体の可能な組み合わせのマトリックスを示す。図39Aにおいて、組み合わせは型に拘束されず、図1の任意の型を使用することができる。ボックス内の「A」は、第1のABDからのCDR（X軸に列記される）が第2のABDのCDR（Y軸に列記される）と組み合わせられ得ることを意味する。ボックス内の「B」は、第1のABDからのvhおよびvl鎖が第2のABDからのvhおよびvl鎖と組み合わせられ得ることを意味する。ボックス内の「C」は、第1のABDからのCDRが第2のABDからのvhおよびvl鎖と組み合わせられ得ることを意味する。ボックス内の「D」は、第1のABDからのvhおよびvl鎖が第2のABDからのCDRと組み合わせられ得ることを意味する。ボックス内の「E」は、PD-1 ABDが、1G6_H1.279_L1.194、1G6_H1.280_L1.224、1G6_L1.194_H1.279、1G6_L1.210_H1.288、および2E9_H1L1の群から選択されることを意味する。ボックス内の「F」は、CTLA-4 ABDが、[CTLA-4]_H0.25_L0、[CTLA-4]_H0.26_L0；[CTLA-4]_H0.27_L0、[CTLA-4]_H0.29_L0、[CTLA-4]_H0.38_L0、[CTLA-4]_H0.39_L0、0[CTLA-4]_H0.40_L0、[CTLA-4]_H0.70_L0、[CTLA-4]_H0_L0.22、[CTLA-4]_H2_L0、[CTLA-4]_H3.21_L0.124、[CTLA-4]_H3.21_L0.129、[CTLA-4]_H3.21_L0.132、[CTLA-4]_H3.23_L0.124、[CTLA-4]_H3.23_L0.129、[CTLA-4]_H3.23_L0.132、[CTLA-4]_H3.25_L0.124、[CTLA-4]_H3.25_L0.129、[CTLA-4]_H3.25_L0.132、[CTLA-4]_H3.4_L0.118、[CTLA-4]_H3.4_L0.119、[CTLA-4]_H3.4_L0.12、[CTLA-4]_H3.4_L0.121、[CTLA-4]_H3.4_L0.122、[CTLA-4]_H3.4_L0.123、[CTLA-4]_H3.4_L0.124、[CTLA-4]_H3.4_L0.125、[CTLA-4]_H3.4_L0.126、[CTLA-4]_H3.4_L0.127、[CTLA-4]_H3.4_L0.128、[CTLA-4]_H3.4_L0.129、[CTLA-4]_H3.4_L0.130、[CTLA-4]_H3.4_L0.131、[CTLA-4]_H3.4_L0.132、[CTLA-4]_H3.5_L2.1、[CTLA-4]_H3.5_L2.2、[CTLA-4]_H3.5_L2.3、[CTLA-4]_H3_L0、[CTLA-4]_H3_L0.22、[CTLA-4]_H3_L0.44、[CTLA-4]_H3_L0.67、および[CTLA-4]_H3_L0.74の群から選択されることを意味する。ボックス内の「G」は、TIM-3 ABDが、1D10_H0L0、1D12_H0L0、3H3_H1_L2.1、6C8_H0L0、6D9_H0_1D12_L0；7A9_H0L0、7B11_H0L0、7B11var_H0L0、および7C2_H0L0の群から選択されることを意味する。ボックス内の「H」は、LAG-3 ABDが、識別子2A11_H0L0、2A11_H1.125_L2.113、2A11_H1.144_L2.142、2A11_H1_L2.122、2A11_H1_L2.123、2A11_H1_L2.124、2A11_H1_L2.25、2A11_H1_L2.47、2A11_H1_L2.50、2A11_H1_L2.91、2A11_H1_L2.93、2A11_H1_L2.97、2A11_H1L1、2A11_H1L2、2A11_H2L2、2A11_H3L1、2A

10

20

30

40

50

1 1 __ H 3 L 2、2 A 1 1 __ H 4 L 1、2 A 1 __ H 4 L 2、7 G 8 __ H 0 L 0、7 G 8 __ H 1 L 1、7 G 8 __ H 3 . 1 8 __ L 1 . 1 1、7 G 8 __ H 3 . 2 3 __ L 1 . 1 1、7 G 8 __ H 3 . 2 8 __ L 1、7 G 8 __ H 3 . 2 8 __ L 1 . 1 1、7 G 8 __ H 3 . 2 8 __ L 1 . 1 3、7 G 8 __ H 3 . 3 0 __ L 1 . 3 4、7 G 8 __ H 3 . 3 0 __ L 1 . 3 4、および 7 G 8 __ H 3 L 1 の群から選択されることを意味する。ボックス内の「I」は、ボックス内の「J」は、B T L A A B D が、9 C 6 __ H 0 L 0、9 C 6 __ H 1 . 1 __ L 1、および 9 C 6 __ H 1 . 1 1 __ L 1 から選択されることを意味する。図 3 9 B は、図 3 9 B が栓抜き型に特異的であることを除いて、図 3 9 A と同一である。B において、第 1 の A B D が P D - 1 に結合するとき、第 1 の A B D は s c F v 単量体であり、他の A B D (C T L A - 4、L A G - 3、T I G I T、T I M - 3、および B T L A) は F a b 単量体にある。B において、第 1 の A B D が C T L A - 4 に結合するとき、それは s c F v 単量体であり (P D - 1 と組み合わされるとき、F a b 側であるときを除く)、他の A B D (C T L A - 4、L A G - 3、T I G I T、T I M - 3、および B T L A) は F a b 単量体にある。

10

【図 4 0】可能な栓抜き型の組み合わせのマトリックスを示す。ボックス内の「Q」は、第 1 の A B D ドメイン (同様に、X 軸に列記される) が s c F v であり、第 2 の A B D (再度、Y 軸に列記される) が F a b 側であることを意味する。ボックス内の「R」は、第 1 の A B D が F a b 側であり、第 2 の A B D が s c F v であることを意味する。ボックス内の「S」は、第 1 の A B D が抗 P D - 1 であり、s c F v 側であることを意味する。ボックス内の「T」は、第 1 の A B D が抗 C T L A - 4 であり、s c F v 側であることを意味する。ボックス内の「U」は、第 1 の A B D が抗 T I M - 3 であり、s c F v 側であることを意味する。ボックス内の「V」は、第 1 の A B D が抗 L A G - 3 であり、s c F v 側であることを意味する。ボックス内の「W」は、第 1 の A B D が抗 T I G I T であり、s c F v 側であることを意味する。ボックス内の「X」は、第 1 の A B D が抗 B T L A であり、s c F v 側であることを意味する。加えて、図 3 9 に概説される各組み合わせは、図 3 8 の C D R、s c F v、ならびに v h および v l の組み合わせを使用することができる。加えて、図 3 9 の栓抜き骨格の特定の実施形態は、図 3 6 の配列である。

20

【図 4 1 A - B】二重特異性チェックポイント抗体が 2 つの異なる抗体または薬物を使用する組み合わせ療法で提供することができる利益と関連する概略図を示す。

【図 4 2】腫瘍 T I L が複数のチェックポイントを共発現するため、二価結合が活性を増加させ、抗腫瘍活性を増強し、末梢毒性を回避することを示す、類似の概略図を示す。

30

【図 4 3】本発明の二重特異性チェックポイント抗体 (例えば、抗 L A G - 3 x 抗 C T L A - 4) が他の単一特異性チェックポイント抗体 (例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブ) と組み合わせられ得ることを示す。

【図 4 4】P D - 1 および C T L A - 4 が、膀胱癌、乳癌、結腸癌、前立腺癌、肺癌、黒色腫、および卵巣癌を含む様々な腫瘍型において共発現されることを示す。

【図 4 5 A - C】B) 抗 P D - 1 二価および抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1、ならびに C) および S E B 刺激 P B M C アッセイにおける片腕抗 P D - 1 + 片腕抗 C T L A - 4 および抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1、ならびに C) S E B 刺激なしの対照実験による I L - 2 の増強の比較を示す。

40

【図 4 6 A - B】片腕抗 P D - 1 および片腕抗 C T L A - 4 抗体と比較した、例示的な抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1 二重特異性体による P D - 1 のリガンド P D - L 1 および P D - L 2 の遮断を示す。

【図 4 7】例示的な抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1 二重特異性抗体による S E B 刺激 P B M C アッセイにおける T 細胞結合を示す。

【図 4 8】抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1 二重特異性体がヒト P B M C 移植 N S G マウスにおいて生着 (ヒト C D 4 5 計数によって測定される) を増強することを示す。増強は、ニボルマブ (X E N P 1 6 4 3 2) 単独で見られるよりも大きい。

【図 4 9】抗 B T L A x 抗 P D - 1 二重特異性候補が、S E B 刺激 P B M C アッセイにおける「片腕」対照と比較して、T 細胞により強力に結合することを示す。

【図 5 0 A - B】抗 B T L A x 抗 P D - 1 キメラ二重特異性体が S E B 刺激 P B M C から

50

のIL-2分泌を促進することを示す。PBMCを、示される試験物品と共に10 ng/mLのSEBで3日間刺激した。細胞上清を収集し、示される分析物についてMSDでアッセイした。A: 20 µg/mLの試験物品; B: 5 µg/mLの試験物品。

【図51A-B】抗BTLA x 抗PD-1キメラ二重特異性体がSEB刺激PBMCからのIFNγ分泌を促進することを示す。PBMCを、示される試験物品と共に10 ng/mLのSEBで3日間刺激した。細胞上清を収集し、示される分析物についてMSDでアッセイした。A: 20 µg/mLの試験物品; B: 5 µg/mLの試験物品。

【図52A-B】抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体（キメラおよびヒト化/最適化抗BTLA Fabアーム）がSEB刺激PBMCからのIL-2分泌およびIFN-γを促進することを示す。両パネルを、示される20 µg/mLの試験物品と共に10 ng/mLのSEBで3日間PBMC刺激した。72時間後に細胞上清を収集し、示される分析物についてアッセイした。

【図53A-F】GVHD研究における例示的な抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体によるCD45細胞計数およびIFNγ分泌の経時変化（10、14、および22日目）の増強を示す。

【図54】ある9C6抗BTLA抗原結合ドメイン技術データを示す。これは、二価の実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、ならびにOctetにより測定される、ヒトBTLAに対するKD結合定数を示す。

【図55A-E】ある2A11抗LAG-3抗原結合ドメイン技術データを示す。これは、Fabの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトLAG-3に対するKD結合定数、ならびにFabのTmを示す。

【図56A-K】ある7G8抗LAG-3抗原結合ドメイン技術データを示す。これは、Fabの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトLAG-3に対するKD結合定数、ならびにFabのTmを示す。

【図57A-B】Octetにより測定される、最適化2A11または7G8抗LAG-3 Fabアームのいずれかに基づく抗LAG-3 X 抗CTLA-4二重特異性ヘテロ二量体栓抜き型のKdを示す。

【図58】抗LAG-3（7G8）×抗CTLA-4および抗LAG-3（2A11）×抗CTLA-4二重特異性体が片腕抗LAG-3対照よりも強力に結合することを示す。PBMCを、100 ng/mLのSEBで3日間刺激した。次いで、細胞を、4℃で30分間、示される試験物品で処理し、2回洗浄した。次いで、細胞を抗CD3-FITCおよび抗ヒトFc-APC抗体で処理した。次いで、細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。

【図59A-B】IL-2およびIFNγ放出における増強によって示されるように、7G8に基づく抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体がPBMCで2A11に基づく抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体よりも選択的な機能を呈することを示す。PBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞を培養培地で2回洗浄し、示される量の試験物品と組み合わせて500 ng/mLのSEBで刺激した。細胞を、処理の24時間後に、示される分析物（IL-2またはIFN-γのいずれか）についてアッセイした。各点は、技術的一重項で試験した固有のドナーを表す。

【図60A-B】抗LAG-3 X 抗CTLA-4二重特異性抗体との混合リンパ球反応（MLR）を示す。40の固有のMLR反応を、20 µg/mLの示される試験物品の存在下で行った。次いで、細胞上清を、A: IL-2およびB: IFNγについて、処理の6日後に、MSDによりアッセイした。

【図61A-B】SEBアッセイにおける追加の抗LAG-3 X 抗CTLA-4候補によるIL-2およびIFNγ放出の増強を示す。PBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞を培養培地で2回洗浄し、示される量の試験物品と組み合わせて500 ng/mLのSEBで刺激した。細胞を、処理の24時間後に、示される

10

20

30

40

50

分析物（IL-2またはIFN-γのいずれか）についてアッセイした。各点は、技術的一重項で試験した固有のドナーを表す。

【図62A-B】Octetにより測定される、最適化2A11または7G8抗LAG-3 Fabアームのいずれかに基づく抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性ヘテロ二量体栓抜き型のKdを示す。

【図63A-B】内因的にMHC-IIを発現するDaudi細胞へのLAG-3結合を遮断するヒト化／最適化7G8および2A11抗LAG-3クローンの能力を示す。

【図64A-B】SEB刺激T細胞に対する抗LAG-3 x 抗PD-1候補機能を示す。PBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞を培養培地で2回洗浄し、示される量の試験物品と組み合わせて500 ng/mLのSEBで刺激した。細胞を、処理の24時間後に、示される分析物についてアッセイした。各点は、技術的一重項で試験した固有のドナーを表す。

【図65】腫瘍浸潤リンパ球（TIL）が様々な腫瘍において複数のチェックポイント受容体を共発現することを示すグラフである。特に、グラフは、様々な腫瘍がPD-1およびCTLA-4、PD-1およびBTLA、PD-1およびLAG-3、ならびにLAG-3およびCTLA-4を共発現することを示す。示される結果は、TCGA Research network: <http://cancergenome.nih.gov/>によって生成されるデータに基づく。

【図66】本明細書に提供される対象二重特異性抗体が二重チェックポイント陽性T細胞を選択的に標的とすることを示す。二重特異性PD-1 x LAG-3抗体は、陰性対照と比較して、staphylococcalエンテロトキシンB（SEB）で刺激されたCD3+T細胞におけるPD-1およびLAG-3受容体占有率を示すために使用される。

【図67A-F】本明細書に提供される対象抗体の構成要素抗体ドメインがチェックポイント受容体／リガンド相互作用を遮断することが可能であることを示すグラフである。特に、1G6抗PD-1 scFvアームを含む二重特異性抗体は、PD-1／PD-L1およびPD-1／PD-L2相互作用を遮断することが可能であり、7G8抗LAG-3片腕は、LAG-3／MHC-II相互作用を遮断することが可能であり、例示的な抗PD-1 Fabアームを含む二重特異性抗体は、CTLA-4／CD80およびCTLA-4／CD86相互作用を遮断することが可能であり、9C6抗BTLA Fabアームを含む二重特異性抗体は、BTLA／HVEM相互作用を遮断することが可能である。

【図68】例示的な抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体およびニボルマブによるIL-2放出の増強を比較する。

【図69】例示的な抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体、ニボルマブと組み合わせた同じ二重特異性抗体、およびニボルマブ単独によるIL-2放出の増強を比較する。

【図70】例示的な抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性抗体およびニボルマブによるIL-2放出の増強を比較する。

【図71】例示的な抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体およびニボルマブによるIL-2放出の増強を比較する。

【図72】例示的な抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性抗体、ニボルマブ単独、およびイピリムマブと組み合わせたニボルマブによるGVHD（CD45細胞計数によって示される）の増強を比較する。

【図73】例示的な抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体およびニボルマブによるGVHD（CD45細胞計数によって示される）の増強を比較する。

【図74】例示的な抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体、ニボルマブと組み合わせた同じ二重特異性抗体、およびニボルマブ単独によるGVHD（CD45細胞計数によって示される）の増強を比較する。

【図75】例示的な抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性抗体およびニボルマブによるGVHD（CD45細胞計数によって示される）の増強を比較する。

【図76A-D】抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体がインビボT細胞媒介抗腫瘍効力を促進し得ることを示す2つの研究を示す。KG1a-lucがん細胞をマウスに

10

20

30

40

50

移植した。21日後、h u P M Cを同じマウスに移植し、毎週抗体処置（抗 C T L A - 4 x 抗 P D - 1 二重特異性抗体、抗 P D - 1 二価抗体、または抗 P D - 1 二価抗体 + 抗 C T L A - 4 二価抗体）を施した。I V I S がん細胞撮像をマウスに対して行って、腫瘍束の変化によって決定される腫瘍サイズを評価した。

【発明を実施するための形態】

【0010】

A. 資料の組み込み

1. 図および凡例

米国特許出願第62, 350, 145号、同第62 / 353, 511号、および同第62 / 420, 500号のすべての図およびそれに付随する凡例は、特に本明細書に示されるアミノ酸配列に関して、その全体が本明細書に参照により明示的かつ独立して組み込まれる。

【0011】

2. 配列

添付の配列表に関して、以下の通り説明する：A B Dとして使用するのに好適な抗 P D - 1 配列としては、配列番号6209～11464（P D - 1 s c の F v 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、F a b の形式になっている場合がある）、配列番号11465～17134（P D - 1 の F a b 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号33003～33072（追加の P D - 1 の F a b 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号33073～35394（追加の P D - 1 の s c F v 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、F a b の形式になっている場合がある）、および配列番号36127～36146（P D - 1 の二価の構築物、これらは、s c F v または F a b のいずれかの形式になっている場合がある）が挙げられる。A B Dとして使用するのに好適な抗 C T L A - 4 の配列としては、配列番号21～2918（C T L A - 4 の s c F v 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、F a b の形式になっている場合がある）、配列番号2919～6208（C T L A - 4 の F a b 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号36739～36818（追加の C T L A - 4 の F a b 配列ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、および配列番号35395～35416（C T L A - 4 の片腕構築物、これらは、F a b または s c F v のいずれかの形式になっている場合がある）が挙げられる。A B Dとして使用するのに好適な抗 L A G - 3 の配列としては、配列番号17135～20764（L A G - 3 の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号36819～36962（追加の L A G - 3 の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号35417～35606（追加の L A G - 3 の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号25194～32793（追加の L A G - 3 の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、および配列番号32794～33002（片腕 L A G - 3 の構築物、これらは F a b または s c F v のいずれかの形式になっている場合がある）が挙げられる。A B Dとして使用するのに好適な抗 T I M - 3 の配列としては、配列番号20765～20884（T I M - 3 の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、配列番号37587～37698（追加の T I M - 3 の F a b 、 F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、および配列番号36347～36706（二価の T I M - 3 の構築物、これらは、F a b または s c F v のいずれかの形式になっている場合がある）が挙げられる。A B Dとして使用するのに好適な抗 B T L A の配列としては、配列番号20885～21503（B T L A の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）、および配列番号36707～36738（追加の B T L A の F a b ではあるが、それらの中の F v 配列は、s c F v の形式になっている場合がある）が挙げられる。A B Dとして使用するのに

10

20

30

40

50

好適な抗TIGITの配列としては、配列番号21504～21523（TIGITのFabではあるが、それらの中のFv配列は、scFvの形式になっている場合がある）、および配列番号37435～37586（追加のTIGITのFabではあるが、それらの中のFv配列は、scFvの形式になっている場合がある）が挙げられる。

【0012】

本発明の二重特異性抗体には、配列番号35607～35866および配列番号21524～22620のLAG3とCTLA4との構築物が含まれる。PD-1とCTLA4との構築物には、配列番号36167～36346および配列番号23316～23735としてリストに記載されるものが含まれる。PD-1とTIM3との構築物には、配列番号25174～25193としてリストに記載されるものが含まれる。PD-1とLAG3との構築物には、配列番号35867～36126および配列番号23736～25133としてリストに記載されるものが含まれる。PD-1とTIGITとの構築物には、配列番号25134～25173としてリストに記載されるものが含まれる。PD-1とBTLAとの構築物には、配列番号22724～23315および配列番号36147～36166としてリストに記載されるものが含まれる。CTLA4とBTLAとの構築物には、配列番号22624～22723としてリストに記載されるものが含まれる。最後に、XENP23552、XENP22841、XENP22842、XENP22843、XENP22844、XENP22845、XENP22846、XENP22847、XENP22848、XENP22849、XENP22850、XENP22851、XENP22852、XENP22858、XENP22854、XENP22855の名前はすべて、不注意に省かれた「M428L／N434S」の表示をタイトルに含むべきであった。

【0013】

B. 概要

PD-1などの免疫チェックポイント阻害剤に向けられる治療抗体は、癌治療の限定された状況では、大いに期待できる。癌は、患者が癌性細胞を認識し、排除することができないとみなされ得る。多くの事例において、これらの形質転換（例えば、癌性）細胞は、免疫監視を弱める。制御されていないT細胞活性を防止するために、体内でT細胞の活性化を制限する天然制御機構があり、これは、免疫応答を回避または抑制するために、癌性細胞によって利用され得る。癌を認識および排除するために、免疫エフェクター細胞、特にT細胞の能力を回復させることが、免疫療法の目標である。時折「免疫療法」と称される免疫腫瘍学の分野は、Yervoy、Keytruda、およびOpdivoなどのT細胞チェックポイント阻害抗体のいくつかの最近の承認により、急速に展開している。これらの抗体は一般に、T細胞免疫の負の制御因子を遮断するため、「チェックポイント阻害物質」と称される。一般に、共刺激および共阻害性の両方の様々な免疫調節シグナルを使用して、最適な抗原特異的免疫応答を調整することができることが理解されている。

【0014】

一般に、これらのモノクローナル抗体は、CTLA-4およびPD-1等のチェックポイント阻害タンパク質に結合し、これにより、通常の場合であれば、細胞傷害性T細胞（CTL）の活性化が予防または抑制される。例えば、これらのタンパク質に結合する抗体の使用によりチェックポイントタンパク質を阻害することによって、腫瘍に対するT細胞応答の増加が達成され得る。すなわち、これらの癌チェックポイントタンパク質は、免疫応答を抑制し、例えば、チェックポイントタンパク質に対して抗体を使用して、これらのタンパク質が遮断されたとき、免疫系が活性化され、癌および感染性疾患などの病態の治療をもたらす。

【0015】

しかしながら、上述のように、TILは一般的に複数のチェックポイント受容体を発現することが研究により明らかになっており、これは、単一のチェックポイント遮断では、完全なT細胞応答を促進するのに十分ではないことを示唆している可能性がある。さらに、複数のチェックポイントを発現するTILは、実際には、最も腫瘍反応性である可能性が

高く、したがって、2つ以上のチェックポイント抗原を塞ぐ療法が非常に有用であり得ることを示唆するものである。

【0016】

したがって、本発明は、2つの抗原を発現する細胞に結合する二重特異性チェックポイント抗体と、T細胞および／またはNK細胞を活性化させて、癌および感染性疾患などの疾患、または免疫活性を高めることによって治療される他の病態を治療する方法と、を提供する。

【0017】

したがって、本発明は、場合によっては、単一細胞上で2つの異なるチェックポイント阻害剤分子に結合する二重特異性抗体を提供し、有利に1つの治療物質のみの投与を必要とすることにより、毒性の問題および複数の抗体投与の費用を解決することを対象とする。

【0018】

2つの異なる標的を同時に結合することができる二重特異性抗体は、TIL対末梢T細胞標的の選択性を改善する可能性を提供し、一方で療法の費用も低減する。細胞表面上の2つの標的との抗体の二価相互作用は、場合によっては、一度に1つの標的との一価相互作用に対してより高い結合力をもたらすはずである。このため、通常の二価抗体は、細胞表面上のそれらの標的に高い結合力を有する傾向がある。二重特異性抗体では、両方の標的への同時結合によって得られるより高い結合力を利用して、2つの異なる標的を同時に発現する細胞に対してより高い選択性を創出する可能性がある。

【0019】

したがって、本発明は、例えば、二重特異性結合を可能にするために、2つ以上のチェックポイント抗原またはリガンドへの結合を可能にするヘテロ二量体抗体を提供するための新規構築物を対象とする。したがって、例えば、抗PD1×抗CTLA4 (PD1×CTLA4) 二重特異性抗体は、PD1+CTLA4+二重陽性TIL対単一陽性PD1のみまたはCTLA4のみT細胞により選択的であると予想される。したがって、二重陽性TIL対単一陽性T細胞の選択的遮断は、組み合わせられたチェックポイント遮断の治療指数を改善することが予想される。これは、本明細書に概説されるように、他の可能な組み合わせに関して同様に当てはまる。したがって、本発明の好適な二重特異性抗体は、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびTIM-3、PD-1およびLAG-3、PD-1およびTIGIT、PD-1およびBTLA、CTLA-4およびTIM-3、CTLA-4およびLAG-3、CTLA-4およびTIGIT、CTLA-4およびBTLA、TIM-3およびLAG-3、TIM-3およびTIGIT、TIM-3およびBTLA、LAG-3およびTIGIT、LAG-3およびBTLA、ならびにTIGITおよびBTLAに結合する。一般に、これらの二重特異性抗体は、各対について、「抗PD-1×抗CTLA-4」、または一般に単純化して、または簡単にするために（よって互換的に）、「PD-1×CTLA-4」等と命名されることに留意する。

【0020】

本発明のヘテロ二量体二重特異性チェックポイント抗体は、様々な種類の癌を治療するのに有用である。当業者に理解されるように、腫瘍抗原に結合する従来のモノクローナル抗体、または例えばCD3および腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体のより新しいクラス（例えば、USN15/141, 350に記載されるような）とは対照的に、チェックポイント抗体は、免疫応答を高めるために使用されるが、一般に、それらの作用において腫瘍特異的ではない。すなわち、本発明の二重特異性チェックポイント抗体は、免疫系の抑制を阻害し、一般にT細胞活性化につながり、これはがん性細胞に対するより大きな免疫応答、したがって、治療につながる。したがって、そのような抗体は、多種多様な腫瘍型の治療のための有用性を見出すことが予想され得る。例えば、FDAは、腫瘍型ではなく遺伝子特徴に基づいた抗PD-1単一特異性抗体であるKeytruda（登録商標）を最近認可した。

【0021】

以下で論じるように、T細胞活性化を測定することができる様々な方法がある。NKおよ

10

20

30

40

50

びT細胞に対する二重特異性チェックポイント抗体の機能効果は、次のパラメータ：増殖、サイトカイン放出、および細胞表面マーカーの変化を測定することによって、インビトロで（および以下により完全に記載されるように、場合によっては、インビボで）評価され得る。NK細胞について、細胞増殖の増加、細胞傷害性（CD107a、グランザイム、パーフォリン発現の増加によって測定される標的細胞を殺傷させる能力、または標的細胞殺傷を直接測定することによって）、サイトカイン産生（例えば、IFN- γ およびTNF）、および細胞表面受容体発現（例えば、CD25）は、免疫調節、例えばがん細胞の増強された殺傷の指標となる。T細胞について、増殖の増加、活性化の細胞表面マーカーの発現の増加（例えば、CD25、CD69、CD137、およびPD1）、細胞傷害性（標的細胞を殺傷する能力）、およびサイトカイン産生（例えば、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17A）は、免疫調節、例えばがん細胞の増強された殺傷の指標となる。したがって、治療の評価は、次のうちの1つ以上を評価するアッセイを使用して行うことができる：（i）免疫応答の増加、（ii） $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞の活性化の増加、（iii）細胞傷害性T細胞活性の増加、（iv）NKおよび／またはNKT細胞活性の増加、（v） $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞抑制の軽減、（vi）炎症誘発性サイトカイン分泌の増加、（vii）IL-2分泌の増加、（viii）インターフェロン γ 産生の増加、（ix）Th1応答の増加、（x）Th2応答の減少、（xi）制御性T細胞および細胞のうちの少なくとも1つの細胞数および／または活性の減少、（xii）腫瘍免疫浸潤物の増加。

【0022】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、（a）炎症誘発性サイトカインの上方制御、（b）T細胞の増殖、拡大、もしくは腫瘍浸潤の増加、（c）T細胞によるインターフェロン γ 、TNF- α 、および他のサイトカイン産生の増加、（d）IL-2分泌の増加、（e）抗体応答の刺激、（f）癌細胞成長の阻害、（g）抗原特異的T細胞免疫の促進、（h）CD4+および／もしくはCD8+T細胞活性化の促進、（i）T細胞抑制の低減、（j）NK細胞活性化の促進、（k）癌細胞のアポトーシスまたは溶解の促進、ならびに／または（l）癌細胞に対する細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制効果を必要とする対象に、これらのうちの1つ以上を実施するための、二重特異性チェックポイント抗体の使用を提供する。

【0023】

したがって、本発明は、二重特異性ヘテロ二量体チェックポイント抗体を提供する。ヘテロ二量体抗体構築物は、抗体の重鎖の2つのFcドメイン、例えば、「二量体」に組織化する2つの「単量体」の自己組織化の性質に基づく。ヘテロ二量体抗体は、以下により完全に論じられる各単量体のアミノ酸配列を変えることによって作製される。したがって、本発明は、一般に、いくつかの方法で、チェックポイント抗原を共捕捉することができるヘテロ二量体抗体の創出を対象とし、それぞれの鎖で異なる、定常領域のアミノ酸変異体に依存することで、ヘテロ二量体形成を促進し、かつ／またはホモ二量体に関してヘテロ二量体精製の容易化を可能にする。

【0024】

したがって、本発明は、二重特異性チェックポイント抗体を提供する。抗体技術における継続問題は、2つ（以上）の異なる抗原に同時に結合し、一般に、そのようにして、異なる抗原を近接させることを可能にし、新しい機能性および新しい治療をもたらす「二重特異性」抗体が、切望されていることである。一般に、これらの抗体は、各重鎖および軽鎖の遺伝子を宿主細胞（一般に、本発明において、本明細書に概説される2つの重鎖単量体および軽鎖の遺伝子）に含めることによって作られる。これにより、一般に、所望のヘテロ二量体（A-B）、ならびに2つのホモ二量体（A-AおよびB-B）の形成がもたらされる。しかしながら、二重特異性抗体形成における主な障壁は、ヘテロ二量体抗体を精製してホモ二量体抗体を除去すること、および／またはホモ二量体形成を上回るようにヘテロ二量体形成に偏らせることが困難であるということである。

【0025】

この問題を解決するために、本発明のヘテロ二量体を生成するために使用することができる機構がいくつか存在する。加えて、当業者に理解されるように、これらの機構は、高いヘテロ二量体化を確実にするために組み合わせることができる。したがって、ヘテロ二量体抗体の産生につながるアミノ酸変異体は、「ヘテロ二量体化変異体」と呼ばれる。以下に論じられるように、ヘテロ二量体化変異体は、立体変異体（例えば、以下に記載される「ノブアンドホール」または「非対称」変異体、および以下に記載される「電荷対」変異体）、ならびにヘテロ二量体を除去してホモ二量体の精製を可能にする「pI変異体」を含み得る。

【0026】

ヘテロ二量体形成を好み、ホモ二量体形成を好まないように立体および／または静電影響を創出するアミノ酸操作を指す、一般に当該技術分野において「ノブアンドホール」（「KIH」）と呼ばれるか、または本明細書において「非対称」変異体と呼ばれることがある1つの機構を任意選択で使用することもでき、Ridgway et al., Protein Engineering 9 (7): 617 (1996)、Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270: 26、米国特許第8,216,805号、US 2012/0149876に記載されるとおりである（それらの全ては参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。図において、「ノブアンドホール」アミノ酸置換を含むいくつかの「単量体A-単量体B」の対が同定されている。加えて、Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677 (1998)において記載されるように、これらの「ノブアンドホール」変異は、ジスルフィド結合と組み合わせて、形成をヘテロ二量体化へと非対称にすることができる。本発明において使用されるものは、特に以下に概説されるpI変異体を含む他のヘテロ二量体化変異体と組み合わせて、T366Wと対であるT366S/L368A/Y407V、ならびに架橋ジスルフィドを伴うこの変異体、T366W/S354Cと対であるT366S/L368A/Y407V/Y349Cである。

【0027】

ヘテロ二量体抗体の生成において有用である追加の機構は、「静電操縦」または「電荷対」と呼ばれることがあり、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (25): 19637 (2010)において記載されるとおりである（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。これは、本明細書において「電荷対」と呼ばれることがある。この実施形態では、静電気が、形成をヘテロ二量体化へと非対称にするために使用される。当業者であれば、これらは、pIに対しても効果を有し得、そうすることで、精製に対しても効果を有し得、したがって、場合によっては、pI変異体と考えられ得ることを理解するであろう。しかしながら、これらは、ヘテロ二量体化を押し進めるために生成され、精製手段としては使用されなかったため、それらは、「立体変異体」として分類される。これらには、限定されないが、D221R/P228R/K409Rと対であるD221E/P228E/L368E（例えば、これらは、「単量体が対応するセットである」）およびC220R/E224R/P228R/K409Rと対であるC220E/P228E/L368Eが含まれ、他は図に示される。

【0028】

本発明において、いくつかの実施形態では、pI変異体は、単量体のうちの1つまたは両方のpIを変えるために使用され、そうすることで、A-A二量体タンパク質、A-B二量体タンパク質、およびB-B二量体タンパク質の等電点分離を可能にする。

【0029】

本発明において、ヘテロ二量体タンパク質の精製を容易にすることができるいくつかの基礎的な機構が存在する。すなわち、pI変異体の使用に依存し、その結果、単量体は、それぞれが異なるpIを有し、そうすることで、A-A二量体タンパク質、A-B二量体タンパク質、及びB-B二量体タンパク質の等電点精製を可能にする。あるいは、「三重F」型などのいくつかの足場型は、サイズに基づく分離も可能にする。以下にさらに概説されるように、ヘテロ二量体形成が、ホモ二量体を上回るようにする「非対称」も可能であ

10

20

30

40

50

る。したがって、立体二量体化変異体、および p I 変異体または電荷対変異体の組み合わせは、本発明において、特に有用である。加えて、以下にさらに概説されるように、三重 F 型などの s c F v (複数可) を利用する足場は、精製目的に向けて、さらなる p I の増大を与える帯電 s c F v リンカー (正か負のいずれか) を含むことができる。当業者に理解されるように、三重 F 型によっては、帯電 s c F v リンカーのみを有し、追加の p I 調整無しでも有用であるが、本発明は、帯電 s c F v リンカー (および本明細書に論じられる F c、F c R n、および K O の組み合わせ) を有する非対称変異体の使用も提供する。

【0030】

ヘテロ二量体タンパク質の精製を可能にするための分離機構として p I を利用する本発明において、アミノ酸変異体は、単量体ポリペプチドのうちの 1 つまたは両方に導入されてもよい。すなわち、単量体のうちの 1 つの p I (本明細書において、単に「単量体 A」と呼ばれる) が単量体 B を除去するために操作され得るか、または単量体 A および B の両方が帯電され、単量体 A の p I を増加させ、単量体 B の p I を減少させることができる。以下に、より完全に概説されるように、単量体のいずれか、または両方の p I の変化は、帯電残基を除去もしくは追加 (例えば、中性アミノ酸は、正もしくは負に帯電したアミノ酸残基によって置き換えられ、例えば、グリシンからグルタミン酸への置き換えである) するか、帯電残基を正もしくは負から反対の電荷へと変化 (例えば、アスパラギン酸からリジンへ) させるか、または帯電残基を中性残基へと変化 (例えば、リジンからセリンへであり、これにより帯電が消失する) させることによって行うことができる。いくつかのこれらの変異体が、図に示される。加えて、本明細書のヘテロ二量体抗体の創出に使用するための好適な p I 変異体は、例えば、著しい免疫原性を導入することなく p I を変化させるように、異なる I g G アイソタイプから p I 変異体を移入する、アイソタイプのものであり、米国公開第 2014/0288275 号の図 29 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0031】

したがって、本発明のこの実施形態において、単量体のうちの少なくとも 1 つにおいて、p I の十分な変化の創出を提供し、その結果、ヘテロ二量体は、ホモ二量体から分離され得る。当業者に理解されるように、そして、以下にさらに論じられるように、これは、「野生型」重鎖定常領域と、その p I が増加もしくは減少 ($w t \ A - + B$ もしくは $w t \ A - - B$) のいずれかとなるように操作された変異体領域と、を使用することによって行うことができるか、または一方の領域を増加させ、もう一方の領域を減少させること ($A + - B -$ もしくは $A - B +$) によって行うことができる。

【0032】

したがって、一般に、本発明のいくつかの実施形態の構成要素は、抗体の定常領域におけるアミノ酸変異体であり、このアミノ酸変異体は、アミノ酸置換 (「p I 変異体」または「p I 置換」) を単量体のうちの 1 つまたは両方へ組み込むことによって、「p I 二量体」 (タンパク質が抗体であるとき、これらは「p I 抗体」と呼ばれる) を形成するために、二量体タンパク質の単量体の両方か、もし両方でないなら少なくとも 1 つの等電点 (p I) を変えることに向けられる。本明細書で示されるように、2 つのホモ二量体からのヘテロ二量体の分離は、2 つの単量体の p I が、わずか 0.1 pH 単位でも異なれば達成でき、0.2、0.3、0.4、および 0.5、またはそれより大きな差異は、すべて本発明において有用である。

【0033】

当業者に理解されるように、良好な分離を得るために単量体 (複数可) のそれぞれまたは両方に含まれる p I 変異体の数は、対象の s c F v および F a b の出発 p I に依存する部分がある。すなわち、どの単量体を操作するか、またはどの「方向」 (例えば、より正、もしくはより負) にするかを決定するために、2 つの標的抗原の F v 配列が計算され、そこから決定がなされる。当該技術分野で知られるように、異なる F v であれば、本発明で活用される異なる出発 p I を有する。一般に、本明細書に概説されるように、p I が操作されることにより、それぞれの単量体で、少なくとも約 0.1 log の総 p I 差異がもた

らされ、本明細書に概説されるように当該総 p I 差異は、0.2～0.5であることが好ましい。

【0034】

さらに、当業者に理解され、本明細書に概説されるように、場合によっては（型による）、ヘテロ二量体は、サイズ（例えば分子量）に基づいてホモ二量体から分離することができる。例えば、図1のいくつかの実施形態に示されるように、型によって、異なるサイズのホモ二量体およびヘテロ二量体をもたらす（例えば、栓抜きについて、1つのホモ二量体は「二重 s c F v」型であり、1つのホモ二量体は標準抗体であり、ヘテロ二量体は1つの F a b および 1つの s c F v を有する。

【0035】

加えて、図1に示されるように、いくつかの抗原が二価で結合されることが可能である（例えば、単一抗原に対して2つの抗原結合部位）ことを認識する。理解されるように、F a b および s c F v の任意の組み合わせを利用して、所望の結果および組み合わせを達成することができる。

【0036】

p I 変異体が、重鎖（複数可）の定常領域（複数可）を使用することによって、ホモ二量体を上回るヘテロ二量体精製を達成するために使用される場合は、抗体を含む多重特異性タンパク質の設計および精製に対する、よりモジュール型の手法が提供される。したがって、いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化変異体（非対称ヘテロ二量体化変異体および精製ヘテロ二量体化変異体を含む）は、可変領域に含まれておらず、その結果、個々の抗体は、それぞれ操作されなければならない。加えて、いくつかの実施形態では、p I 変異体からもたらされる免疫原性の可能性は、異なる I g G アイソタイプ由来の p I 変異体を移入することによって、著しく低減され、その結果、著しい免疫原性を導入することなく p I を変化させる。したがって、解決すべき追加の問題は、ヒト配列含量が高い低 p I 定常ドメインの解明であり、例えば、何らかの特定位置における非ヒト残基の最小化または回避である。

【0037】

この p I 操作で起こり得る付帯利点は、血清半減期の延長および F c R n 結合の増加でもある。すなわち、U S S N 1 3 / 1 9 4 , 9 0 4 に記載されるように（参照によりその全体が組み込まれる）、抗体定常ドメイン（抗体および F c 融合体においてみられるものを含む）の p I を下げることは、インビボにおいて、血清での保持が長期化することにつながり得る。血清半減期の増加に向けた、これらの p I 変異体によって、精製に向けた p I 変化も容易となる。

【0038】

加えて、ホモ二量体が存在する場合に、排除、最小化、および区別するいずれかの能力が顕著であるため、ヘテロ二量体化変異体の p I 変異体が、二重特異性抗体の分析論および品質管理工程に追加の利点をもたらすことに留意されたい。同様に、ヘテロ二量体タンパク質産生の再現性を確実に試験する能力が重要である。

【0039】

当業者に理解され、以下により完全に論じられるように、本発明のヘテロ二量体融合タンパク質は、一般に、図1に示されるように、多種多様の立体配置をとることができる。いくつかの図は、分子の一方の「アーム」上に1種類の特異性、およびもう一方の「アーム」上に異なる特異性がある「シングルエンド化（single ended）」立体配置を示す。他の図は、分子の「上部」に少なくとも1種類の特異性、および分子の「下部」に1つ以上の異なる特異性がある「二重エンド化（dual ended）」立体配置を示す。したがって、本発明は、第1の抗原および第2の抗原を共捕捉する新規の免疫グロブリン組成物を対象とする。本発明の第1および第2の抗原は、本明細書において、それぞれ、抗原-1および抗原-2（または「チェックポイント-1」および「チェックポイント-2」）と称される。

【0040】

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、「三重F」または図1Aに示される「栓抜き」足場型である。この実施形態では、抗体の一方の重鎖は、単鎖Fv（以下に定義される「scFv」）を含み、もう一方の重鎖は、「定型的な（regular）」FAb型であって、可変重鎖および軽鎖を含む。この構造は、本明細書で「三重F」型（scFv-FAb-Fc）、または栓抜きにおおよそ視覚的に類似している（図1A参照）ことから「栓抜き」型と呼ばれることがある。2つの鎖は、ヘテロ二量体抗体の形成を促進する定常領域（例えば、Fcドメインおよび／またはヒンジ領域）において、アミノ酸変異体を使用することによって一緒にまとめられており、以下に、より完全に記載される。

【0041】

本「三重F」型には、いくつかの明確に異なる利点が存在する。当該技術分野で知られるように、2つのscFv構築物に依存する抗体類似体は、安定性および凝集の問題を有することが多いが、本発明においては、「定型的な」重鎖および軽鎖の対を追加することによって、こうした問題を軽減することができる。加えて、2つの重鎖および2つの軽鎖に依存する型とは対照的に、重鎖および軽鎖が、不正確に対になる（例えば、重1が、軽2と対になる等）という問題は存在しない。

【0042】

さらに、本明細書で概説されるように、追加のアミノ酸変異体は、追加の機能性を追加するために、本発明の二重特異性抗体に導入することができる。例えば、Fc領域内のアミノ酸変化は、ADCCまたはCDCの増加を容易にするため（例えば、Fcγ受容体への結合を変える）、ならびにFcRnへの結合を増加し、かつ／または得られる分子の血清半減期を増加させるために（1つの単量体または両方の単量体のいずれかに）付加され得る。本明細書にさらに記載され、当業者に理解されるように、本明細書に概説されるすべての変異体が任意選択かつ独立して他の変異体と組み合わせることができる。

【0043】

同様に、機能性変異体の別のカテゴリーは、「Fcγ切断変異体」または「Fcノックアウト（FcKOもしくはKO）変異体である。これらの実施形態では、いくつかの治療用途に向け、Fcγ受容体（例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa等）のうちの1つ以上またはすべてに対するFcドメインの通常の結合を低減または除去して、作用の付加的な機構を回避することが望ましい。すなわち、例えば、一般に、FcγRIIIa結合を切断して、ADCC活性を排除または著しく低減することが望ましい。好適な切断変異体は、図5に示される。

【0044】

C. 命名法

本発明の二重特異性抗体は、いくつかの異なる型でリストに記載される。各ポリペプチドは固有の「XENP」番号を与えられるが、当技術分野で理解されるように、より長い配列がより短い番号を含む場合がある。例えば、所与の配列の栓抜き型のscFv側単量体の重鎖は、第1のXENP番号を有し、一方でscFvドメインは異なるXENP番号を有する。分子によっては3つのポリペプチドを有し、そのため、構成要素と共にXENP番号が名称として使用される。したがって、栓抜き型である分子XENP20717は、一般に、「XENP20717 HC-Fab」、「XENP20717 HC-scFv」、および「XENP20717 LC」と称される3つの配列、または等価物を含むが、当業者は、配列アライメントによりこれらを容易に同定することができるだろう。これらのXENP番号ならびに識別子は、配列表にあり、図で使用されている。加えて、3つの構成要素を含む1つの分子は、複数の配列識別子をもたらす。例えば、Fab単量体のリストは、完全長配列、可変重配列、および可変重配列の3つのCDRを有し、軽鎖は、完全長配列、可変軽配列、および可変軽配列の3つのCDRを有し、scFv-Fcドメインは、完全長配列、scFv配列、可変軽配列、3つの軽CDR、scFvリンカー、可変重配列、および3つの重CDRを有する。scFvドメインを有する本明細書のすべての分子が単一の帯電scFvリンカー（+H）を使用するが、他が使用され得ることに留意

10

20

30

40

50

する。加えて、特定の可変ドメインの命名法は、「Hx.xx_Ly.yy」の種類の形式を使用し、番号は特定の可変鎖配列に対する固有の識別子である。したがって、XEN P22841のFab側の可変ドメインは、「7G8_H3.30_L1.34」であり、これは、可変重ドメインH3.30が軽ドメインL1.34と組み合わせられたことを示す。これらの配列がscFvsとして使用される場合、指定「7G8_H3.30_L1.34」は、可変重ドメインH3.30が軽ドメインL1.34と組み合わせられ、NからC末端のvh-リンカー-vl配向にあることを示す。重可変ドメインおよび軽可変ドメインの同一の配列を有するが逆の順序であるこの分子は、「7G8_L1.34_H3.30」と命名されるであろう。同様に、異なる構築物は、配列表および図から明らかであるように、重鎖および軽鎖を「うまく組み合わせる」ことができる。

10

【0045】

D. 定義

本出願をより完全に理解し得るために、いくつかの定義を以下に示す。そのような定義は、文法的に等価であるものを包含することを意図する。

【0046】

本明細書では、「切断」とは、活性の低減または除去を意味する。したがって、例えば、「FcγR結合の切断」は、特定の変異体を含むしないFc領域と比較して、Fc領域アミノ酸変異体が、出発結合の50%未満を有することを意味し、活性を70~80~90~95~98%超喪失していることが好ましく、一般に、活性は、Biacore、SPR、またはBLIアッセイにおいて、検出可能な結合レベルを下回る。FcγR結合の切断において特に使用されるものは、図5に示されるものであり、これらは一般に両単量体に付加される。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「ADCC」または「抗体依存性細胞傷害性」とは、細胞が媒介する反応であり、FcγRを発現する非特異的細胞傷害性の細胞が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後に標的細胞の溶解を引き起こすことを意味する。ADCCは、FcγRIIIaに対する結合と相関しており、FcγRIIIaに対する結合の増加は、ADCC活性の増加につながる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「ADCP」または抗体依存性細胞貪食とは、細胞が媒介する反応であり、FcγRを発現する非特異的貪食細胞が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後に標的細胞の貪食を引き起こすことを意味する。

30

【0049】

本明細書では、「抗原結合ドメイン」または「ABD」とは、ポリペプチド配列の一部として存在するとき、本明細書で論じられるように、標的抗原に特異的に結合する6つの相補性決定領域(CDR)のセットを意味する。したがって、「チェックポイント抗原結合ドメイン」は、本明細書に概説される標的チェックポイント抗原に結合する。当該技術分野で知られるように、これらのCDRは、一般に、可変重CDR(vhCDRまたはVHCDR)の第1のセット、および可変軽CDR(vlCDRまたはVLCDR)の第2のセットとして存在し、それぞれが、3つのCDR:重鎖のvhCDR1、vhCDR2、vhCDR3、ならびに軽鎖のvlCDR1、vlCDR2、およびvlCDR3を含む。CDRは、それぞれ、可変重ドメインおよび可変軽ドメインに存在し、一緒にFv領域を形成する。(表1およびCDR番号付けスキームについての上記の関連する考察を参照されたい)。したがって、場合によっては、抗原結合ドメインの6つのCDRは、可変重ドメインおよび可変軽ドメインにより寄与される。「Fab」型において、6つのCDRのセットは、2つの異なるポリペプチド配列である、可変重ドメイン(vhまたはVH; vhCDR1、vhCDR2、およびvhCDR3を含む)および可変軽ドメイン(vlまたはVL; vlCDR1、vlCDR2、およびvlCDR3を含む)により寄与され、vhドメインのC末端が重鎖のCH1ドメインのN末端に結合され、vlドメインのC末端が定常軽ドメインのN末端に結合する(したがって、軽鎖を形成する)。s

40

50

c F v型において、v hおよびv lドメインは、本明細書に概説されるように、一般にリンカー（「s c F vリンカー」の使用により、単一ポリペプチド配列に共有結合され、これは、（N末端から開始して）v hーリンカーーv lまたはv lーリンカーーv hのいずれかであってよく、前者が一般に好ましい（使用される型（例えば図1から）により、各側に任意選択のドメインリンカーを含む。一般に、s c F vドメインのC末端は、第2の単量体のヒンジのN末端に結合される。

【0050】

本明細書では、「改変」とは、ポリペプチド配列における、アミノ酸の置換、挿入、および／もしくは欠失、またはタンパク質に化学的に連結された部分に対する変更を意味する。例えば、改変は、糖質の変更またはタンパク質に結合されたPEG構造であってよい。本明細書では、「アミノ酸改変」とは、ポリペプチド配列における、アミノ酸の置換、挿入、および／または欠失を意味する。明確化のために、別段の記載が無い限り、アミノ酸改変は、常に、DNAによってコードされるアミノ酸への改変であり、例えば、DNAおよびRNAにおいてコドン有する20個のアミノ酸である。

【0051】

本明細書では、「アミノ酸置換」または「置換」とは、親ポリペプチド配列における特定位置で、アミノ酸を異なるアミノ酸と置き換えることを意味する。特に、いくつかの実施形態では、置換は、特定位置で自然発生しないアミノ酸に対するものであり、生物内において、または何らかの生物において、いずれでも自然発生しない。例えば、置換E 2 7 2 Yは、変異体ポリペプチドを指し、この場合、位置2 7 2で、グルタミン酸が、チロシンで置き換えられているFc変異体である。明確化のために、核酸コード配列を変化させるが、出発アミノ酸を変化させないように操作されたタンパク質（例えば、CGG（アルギニンをコードする）をCGA（依然としてアルギニンをコードする）に交換して、宿主生物の発現レベルを増加させる）は、「アミノ酸置換」ではない。すなわち、同じタンパク質をコードする新たな遺伝子の創出にかかわらず、タンパク質が、それが開始した特定の位置で同じアミノ酸を有する場合、それはアミノ酸置換ではない。

【0052】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸挿入」または「挿入」とは、親ポリペプチド配列における特定位置でのアミノ酸配列の追加を意味する。例えば、- 2 3 3 Eまたは2 3 3 Eは、位置2 3 3の後かつ位置2 3 4の前でのグルタミン酸の挿入を指定する。さらに、- 2 3 3 A D EまたはA 2 3 3 A D Eは、位置2 3 3の後かつ位置2 3 4の前でのAla Asp Gluの挿入を指定する。

【0053】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸欠失」または「欠失」とは、親ポリペプチド配列における特定位置でのアミノ酸配列の除去を意味する。例えば、E 2 3 3 -またはE 2 3 3 #、E 2 3 3 ()またはE 2 3 3 d e lは、位置2 3 3でグルタミン酸の欠失を指定する。加えて、E D A 2 3 3 -またはE D A 2 3 3 #は、位置2 3 3から始まる配列Glu Asp Alaの欠失を指定する。

【0054】

本明細書で使用される場合、「変異体タンパク質」または「タンパク質変異体」または「変異体」は、少なくとも1つのアミノ酸改変の理由によって、親タンパク質のそれとは異なるタンパク質を意味する。タンパク質変異体は、親タンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸改変を有するが、それほど多くはなく、変異体タンパク質は、以下に記載されるようなアライメントプログラムを用いて親タンパク質と整列しない。一般に、変異体タンパク質（本明細書で概説される変異体Fcドメインなどは、一般に、BLASTなどの以下に記載されるアライメントプログラムを使用して、親タンパク質に対して少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%同一である。

【0055】

以下に記載されるとおり、いくつかの実施形態では、親ポリペプチド、例えば、Fc親ポ

10

20

30

40

50

リペプチドは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4由来の重定常ドメインまたはF c領域などのヒト野生型配列であるが、変異体を有するヒト配列は、「親ポリペプチド」として機能することもでき、例えば、米国公開第2006/0134105号のI g G 1/2ハイブリッドが含まれ得る。本明細書のタンパク質変異体配列は、好ましくは、親タンパク質配列と、少なくとも約80%の同一性、最も好ましくは少なくとも約90%の同一性、より好ましくは少なくとも95~98~99%の同一性を有する。したがって、本明細書で使用される場合、「抗体変異体」または「変異体抗体」とは、少なくとも1つのアミノ酸改変の理由によって、親抗体とは異なる抗体を意味し、本明細書で使用される場合、「I g G変異体」または「変異体I g G」は、少なくとも1つのアミノ酸改変の理由によって、親I g G（同様に、多くの場合、ヒトI g G配列から）とは異なる抗体を意味し、本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン変異体」または「変異体免疫グロブリン」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾の理由によって親免疫グロブリン配列とは異なる免疫グロブリン配列を意味する。本明細書で使用される場合、「F c変異体」または「変異体F c」は、ヒトI g G 1、I g G 2、またはI g G 4のF cドメインと比較して、F cドメインにアミノ酸改変を含むタンパク質を意味する。

【0056】

本発明のF c変異体は、それを構成するアミノ酸改変に従って定義される。したがって、例えば、N434Sまたは434Sは、親F cポリペプチドに対して、位置434で置換セリンを有するF c変異体であり、番号付けは、E Uインデックスに従うものである。同様に、M428L/N434Sは、親F cポリペプチドに対して、置換M428L及び置換N434Sを有するF c変異体を定義する。WTアミノ酸の同一性が、特定されていなくてもよく、その場合、先に記載した変異体は、428L/434Sと呼ばれる。置換が提供される規則は任意であることに留意されたい。つまり、例えば、N434S/M428Lは、M428L/N434Sと同一のF c変異体である等である。本発明において論じられ、抗体に関連する位置のすべてで、別段の記載が無い限り、アミノ酸位置の番号付けは、E Uインデックスに従うものである。E UインデックスまたはK a b a tもしくはE U番号付けスキームにあるようなE Uインデックスは、E U抗体の番号付けを指す。K a b a tらは、重鎖および軽鎖の可変領域の多数の一次配列を収集した。配列保存の程度に基づき、彼らは、個々の一次配列をC D Rおよびフレームワークへと分類し、そのリストを作製した（S E Q U E N C E S O F I M M U N O L O G I C A L I N T E R E S T, 5 t h e d i t i o n, N I H p u b l i c a t i o n, N o. 91-3242, E. A. K a b a t e t a l. を参照されたい。参照によって、全体が組み込まれる）。E d e l m a n e t a l., 1969, P r o c N a t l A c a d S c i U S A 63:78-85も参照されたい。参照により全体が組み込まれる。改変は、追加、欠失、または置換であり得る。

【0057】

本明細書では、「タンパク質」とは、少なくとも2つの共有結合したアミノ酸を意味し、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチドが含まれる。加えて、本発明の抗体を作りあげるポリペプチドは、1つ以上の側鎖または末端の合成誘導体化、グリコシル化、P E G化、円順列、環化、他の分子へのリンカー、タンパク質またはタンパク質ドメインへの融合、およびペプチドタグまたはペプチド標識の追加を含んでよい。

【0058】

本明細書で使用される場合、「残基」とは、タンパク質における位置を意味し、アミノ酸同一性と関連する。例えば、アスパラギン297（A s n 297またはN 297とも呼ばれる）は、ヒト抗体I g G 1における位置297の残基である。

【0059】

本明細書で使用される場合、「F a b」または「F a b領域」とは、一般に、2つの異なるポリペプチド鎖上にV H、C H 1、V L、およびC L免疫グロブリンドメイン（例えば、一方の鎖上にV H-C H 1、そしてもう一方の鎖上にV L-C L）を含むポリペプチドを意味する。F a bは、この領域を単独で、または本発明の二重特異性抗体の文脈におい

てこの領域を指してよい。F a bの文脈において、F a bは、C H 1およびC Lドメインに加えてF v領域を含む。

【0060】

本明細書で使用される場合、「F v」または「F v断片」または「F v領域」は、A B DのV LドメインおよびV Hドメインを含むポリペプチドを意味する。F v領域は、F a b（上述のように、一般に、上記に概説される定常領域も含む2つの異なるポリペプチド）およびs c F vの両方として形式化されてよく、ここで、v lおよびv hドメインは組み合わされて（一般に、本明細書で論じられるリンカーで）、s c F vを形成する。

【0061】

本明細書では、「単鎖F v」または「s c F v」とは、s c F vまたはs c F vドメインを形成するために、一般に本明細書に論じられるs c F vリンカーを使用して、可変軽ドメインに共有結合した可変重ドメインを意味する。s c F vドメインは、NからC末端のいずれかの配向（v hーリンカーーv lまたはv lーリンカーーv h）であってよい。配列表および図に示される配列において、v hドメインおよびv lドメインの順序は名称で示され、例えば、H．X__L．Yは、NからC末端がv hーリンカーーv lであることを意味し、L．Y__H．Xはv lーリンカーーv hである。

【0062】

本明細書で使用される場合、「I g Gサブクラス改変」または「アイソタイプ改変」は、1つのI g Gアイソタイプの1個のアミノ酸を、異なる、整列されたI g Gアイソタイプにおいて、対応するアミノ酸に変換するアミノ酸改変を意味する。例えば、E U位置296に、I g G 1は、チロシンを含み、I g G 2は、フェニルアラニンを含むため、I g G 2におけるF 296 Y置換は、I g Gサブクラス改変であると考えられる。

【0063】

本明細書で使用される場合、「非自然発生改変」とは、アイソタイプではないアミノ酸改変を意味する。例えば、ヒトI g Gのいずれも位置434にセリンを含まないため、I g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくはI g G 4（またはそのハイブリッド）における置換434 Sは、非自然発生改変であると考えられる。

【0064】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」および「アミノ酸同一性」は、D N AおよびR N Aによってコードされる自然発生する20個のアミノ酸のうちの1つを意味する。

【0065】

本明細書で使用される場合、「エフェクター機能」とは、抗体F c領域と、F c受容体またはF cリガンドとの相互作用からもたらされる生化学的事象を意味する。エフェクター機能には、限定されないが、A D C C、A D C P、およびC D Cが含まれる。

【0066】

本明細書で使用される場合、「I g G F cリガンド」とは、I g G抗体のF c領域に結合し、F c／F cリガンド複合体を形成する、何らかの生物由来の分子、好ましくは、ポリペプチドを意味する。F cリガンドには、限定されないが、F c γ R I、F c γ R I I、F c γ R I I I、F c R n、C 1 q、C 3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、s t a p h y l o c o c c a l プロテインA、s t r e p t o c o c c a l プロテインG、およびウイルスF c γ Rが含まれる。F cリガンドは、F c γ Rに相同性のF c受容体のファミリーであるF c受容体相同体（F c R H）（D a v i s e t a l . , 2002, I m m u n o l o g i c a l R e v i e w s 190:123-136、参照により全体が組み込まれる）も含む。F cリガンドには、F cに結合する未発見分子が含まれてよい。特定のI g G F cリガンドは、F c R nおよびF cガンマ受容体である。本明細書で使用される場合、「F cリガンド」とは、抗体のF c領域に結合し、F c／F cリガンド複合体を形成する、何らかの生物由来の分子、好ましくはポリペプチドを意味する。

【0067】

本明細書で使用される場合、「F cガンマ受容体」、「F c γ R」、または「F cガンマR」とは、I g G抗体のF c領域に結合するタンパク質ファミリーの何らかのメンバーを

10

20

30

40

50

意味し、FcγR遺伝子によってコードされる。ヒトにおいては、このファミリーには、限定されないが、アイソフォームFcγRIa、アイソフォームFcγRIb、およびアイソフォームFcγRIcを含むFcγRI(CD64)、アイソフォームFcγRIIa(アロタイプH131およびアロタイプR131を含む)、アイソフォームFcγRIIb(FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む)、ならびにアイソフォームFcγRIIcを含むFcγRII(CD32)、ならびにアイソフォームFcγRIIIa(アロタイプV158およびアロタイプF158を含む)、およびアイソフォームFcγRIIIb(アロタイプFcγRIIIb-NA1およびアロタイプFcγRIIIb-NA2を含む)を含むFcγRIII(CD16)(Jefferies et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65の全体が、参照によって組み込まれる)、ならびに何らかの未発見のヒトFcγRまたはFcγRアイソフォームもしくはFcγRアロタイプが含まれる。FcγRは、何らかの生物由来であってよく、限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルが含まれる。マウスFcγRには、限定されないが、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)、およびFcγRIII-2(CD16-2)、ならびに何らかの未発見のマウスFcγRまたはFcγRアイソフォームもしくはFcγRアロタイプが含まれる。

【0068】

本明細書で使用される場合、「FcRn」または「新生児型Fc受容体」とは、IgG抗体のFc領域に結合するタンパク質を意味し、少なくとも一部がFcRn遺伝子によってコードされる。FcRnは、何らかの生物由来であってよく、限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルが含まれる。当該技術分野で知られるように、機能性FcRnタンパク質は、2つのポリペプチドを含み、重鎖および軽鎖と呼ばれることが多い。軽鎖は、ベーター2-ミクログロブリンであり、重鎖は、FcRn遺伝子によってコードされる。別段の記載が無い限り、FcRnまたはFcRnタンパク質は、FcRn重鎖のベーター2-ミクログロブリンとの複合体を指す。FcRn受容体への結合の増加に使用され、場合によっては、血清半減期の増加に使用される様々なFcRn変異体。「FcRn変異体」は、FcRn受容体への結合を増加させるものであり、好適なFcRn変異体は以下に示される。

【0069】

本明細書で使用される場合、「親ポリペプチド」とは、後に改変されて変異体を生成する出発ポリペプチドを意味する。親ポリペプチドは、自然発生するポリペプチド、または自然発生するポリペプチドの変異体もしくは操作された型であってよい。したがって、本明細書で使用される場合、「親免疫グロブリン」とは、変異体を生成するように改変される未改変免疫グロブリンポリペプチドを意味し、本明細書で使用される場合、「親抗体」とは、変異体抗体を生成するように改変される未改変抗体を意味する。「親抗体」は、以下に概説されるように、既知の市販の組換え産生抗体を含むことに留意されたい。この文脈において、「親Fcドメイン」は、列記される変異体に対してであり、したがって、「変異体ヒトIgG1 Fcドメイン」は、ヒトIgG1の親Fcドメインと比較され、「変異体ヒトIgG4 Fcドメイン」は、親FcドメインヒトIgG4等と比較される。

【0070】

本明細書で使用される場合、「Fc」または「Fc領域」または「Fcドメイン」とは、IgG分子のCH2-CH3ドメインを含み、場合によっては、ヒンジを含むポリペプチドを意味する。ヒトIgG1のEU番号付けにおいて、CH2-CH3ドメインは、アミノ酸231~447を含み、ヒンジは216~230である。したがって、「Fcドメイン」の定義は、アミノ酸231~447(CH2-CH3)もしくは216~447(ヒンジ-CH2-CH3)の両方、またはその断片を含む。この文脈において、「Fc断片」は、NおよびC末端のいずれか、または両方からのより少ないアミノ酸を含有し得るが、一般にサイズに基づく(例えば、非変性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等)標準的な方法を使用して検出され得るとき、依然として別のFcドメインもしくはFc断片を有する二量体を形成する能力を保持する。ヒトIgG Fcドメインは、

本発明において、特定の使用のものであり、ヒト I g G 1、I g G 2、または I g G 4 由来の F c ドメインであり得る。

【0071】

「変異体 F c ドメイン」は、親 F c ドメインと比較してアミノ酸改変を含有する。したがって、「変異体ヒト I g G 1 F c ドメイン」は、ヒト I g G 1 F c ドメインと比較して、アミノ酸改変（一般に、アミノ酸置換だが、切断変異体の場合、アミノ酸欠失が含まれる）を含有するものである。一般に、変異体 F c ドメインは、対応する親ヒト I g G F c ドメインに対して少なくとも約 80、85、90、95、97、98、または 99 パーセントの同一性を有する（以下に論じられる同一性アルゴリズムを使用し、一実施形態では、デフォルトパラメータを使用して、当該技術分野で知られる B L A S T アルゴリズムを利用する）。あるいは、変異体 F c ドメインは、親 F c ドメインと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個のアミノ酸改変を有し得る。加えて、本明細書で論じられるように、本明細書において変異体 F c ドメインは、非変性ゲル電気泳動などの本明細書に記載される既知の技法を使用して測定されるように、依然として別の F c ドメインを有する二量体を形成する能力を保持する。

10

【0072】

本明細書において、「重鎖定常領域」とは、可変重ドメインを除く抗体（またはその断片）の C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 部分を意味し、ヒト I g G 1 の E U 番号付けにおいて、これはアミノ酸 118 ~ 447 である。本明細書では、「重鎖定常領域断片」とは、N および C 末端のいずれか、または両方からのより少ないアミノ酸を含有するが、依然として別の重鎖定常領域を有する二量体を形成する能力を保持する、重鎖定常領域を意味する。

20

【0073】

本明細書で使用される場合、「位置 (p o s i t i o n) 」とは、タンパク質の配列における場所 (l o c a t i o n) を意味する。位置は、連続して番号付けされるか、または確立された形式に従ってよく、例えば、抗体の番号付けのための E U インデックスに従ってよい。

【0074】

本明細書で使用される場合、「標的抗原」とは、所与の抗体の可変領域を含む抗原結合ドメインによって特異的に結合される分子を意味する。以下に論じられるように、本事例において、標的抗原はチェックポイント阻害剤タンパク質である。

30

【0075】

本明細書において、本発明のヘテロ二量体抗体の単量体の構成における「鎖性 (s t r a n d e d n e s s) 」とは、「適合」する DNA の 2 つの鎖 (s t r a n d) と同様に、ヘテロ二量体化変異体が、「適合」してヘテロ二量体を形成する能力を保つように、それぞれの単量体へと取り込まれることを意味する。例えば、いくつかの p I 変異体が、単量体 A へと操作される（例えば、p I を高くする）のであれば、「電荷対」である立体変異体も利用することができ、p I 変異体を妨害しない。例えば、p I を高くする電荷変異体を、同一「鎖」または同一「単量体」に加えることにより、両機能性が保持される。同様に、以下により完全に概説されるセットの対で起こる「非対称」変異体については、当業者は、p I 分離も非対称の p I を使用して最大になるように、どの鎖または単量体を 1 セットの対に組み込むかを決定するときに p I を考慮する。

40

【0076】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」は、標的抗原を発現している細胞を意味する。

【0077】

本明細書において、本発明に従う二重特異性抗体を産生する文脈において、「宿主細胞」とは、二重特異性抗体の構成要素をコードする外来核酸を含有し、好適な条件下で二重特異性抗体を発現することができる細胞を意味する。好適な宿主細胞を以下に論じる。

【0078】

50

本明細書で使用される場合、「可変領域」または「可変ドメイン」とは、それぞれ、カップ免疫グロブリン、ラムダ免疫グロブリン、および重鎖免疫グロブリンの遺伝子座を作りあげるV κ 遺伝子、V λ 遺伝子、および／またはVH遺伝子のいずれかによって実質的にコードされる1つ以上のIgドメインを含み、抗原特異性を付与するCDRを含有する免疫グロブリンの領域を意味する。したがって、「可変重ドメイン」は「可変軽ドメイン」と対となり、抗原結合ドメイン（「ABD」）を形成する。加えて、各可変ドメインは、3つの超可変領域（「相補性決定領域」、「CDR」）（可変重ドメインについてvhCDR1、vhCDR2、およびvhCDR3、ならびに可変軽ドメインについてvlCDR1、vlCDR2、およびvlCDR3）と、4つのフレームワーク（FR）領域とを含み、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

10

【0079】

本明細書では、「野生型またはWT」は、自然界にみられるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を意味し、対立遺伝子変動を含む。WTタンパク質は、意図的に改変されていないアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有する。

【0080】

本発明は、ヒト抗体ドメインに対して配列同一性を有するいくつかの抗体ドメインを提供する。2つの類似する配列（例えば、抗体可変ドメイン）間の配列同一性は、Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981) "Comparison Of Biosequences," Adv. Appl. Math. 2:482 [局地的相同性アルゴリズム]、Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970) "A General Method Applicable To The Search For Similarities In The Amino Acid Sequence Of Two Proteins," J. Mol. Biol. 48:443 [相同性アライメントアルゴリズム]、Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988) "Improved Tools For Biological Sequence Comparison," Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444 [類似検索法]、またはAltschul, S. F. et al., (1990) "Basic Local Alignment Search Tool," J. Mol. Biol. 215:403-10（「BLAST」アルゴリズム）（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>を参照されたい）などのアルゴリズムにより測定することができる。前述のアルゴリズムのうちのいずれかを使用する場合、デフォルトパラメータ（ウィンドウの長さ、ギャップペナルティ等）が使用される。一実施形態では、配列同一性は、デフォルトパラメータを使用して、BLASTアルゴリズムを使用して行われる。

20

30

【0081】

本発明の抗体は、一般に、単離されているか、または組換え体である。「単離された」が、本明細書に開示される様々なポリペプチドについての説明に使用されるとき、それが発現される細胞または細胞培養から、同定され、分離され、および／または回収されたポリペプチドを意味する。通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製段階によって調製されることになる。「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。「組換え体」は、抗体が、外来宿主細胞において組換え核酸技法を使用して生成されることを意味し、それらも単離され得る。

40

【0082】

「特異的結合（Specific binding）」、または特定の抗原もしくはエピトープ「に特異的に結合する（specifically bind to）」、または特定の抗原もしくはエピトープ「に向けた特異的（specific for）」は、非特異的相互作用とは、測定可能な程に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般に、結合活性を有さない類似構造の分子である対照分子の結合と比較した分子の結合を決定することによって、測定することができる。例えば、特異的結合は、標的に類似した対

50

照分子との競合によって決定することができる。

【0083】

特定の抗原またはエпитープに向けた特異的結合は、例えば、抗原またはエпитープに向けて、抗体が、少なくとも約 10^{-4} MのKD、少なくとも約 10^{-5} MのKD、少なくとも約 10^{-6} MのKD、少なくとも約 10^{-7} MのKD、少なくとも約 10^{-8} MのKD、少なくとも約 10^{-9} MのKD、あるいは、少なくとも約 10^{-10} MのKD、少なくとも約 10^{-11} MのKD、少なくとも約 10^{-12} MのKD以上のKDを有することによって示すことができ、KDは、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指す。典型的には、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原またはエпитープに対して、対照分子が、20倍～、50倍～、100倍～、500倍～、1000倍～、5,000倍～、10,000倍～、またはこれらを上回る倍数のKDを有する。

10

【0084】

また、特定の抗原またはエпитープに向けた特異的結合は、例えば、対照に対して、抗体が、そのエпитープに向けて、少なくとも20倍～、50倍～、100倍～、500倍～、1000倍～、5,000倍～、10,000倍～、またはこれらを上回る倍数の、抗原またはエпитープに向けたKAまたはKaを有することによって示すことができ、KAまたはKaは、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指す。結合親和性は一般に、Biacore、SPR、またはBLIアッセイを使用して測定される。

【0085】

E. 抗体

20

本発明は、本明細書で論じられるように、2つの異なるチェックポイント抗原に結合する二重特異性チェックポイント抗体の生成に関する。以下に論じられるように、「抗体」という用語が、一般に使用される。本発明において有用である抗体は、本明細書に記載されるいくつかの型を呈し、伝統的な抗体、ならびに本明細書に記載され、図に示される抗体の誘導体、断片、および模倣体が含まれる。

【0086】

伝統的な抗体構造単位は、典型的には、四量体を含む。それぞれの四量体は、典型的には、ポリペプチド鎖の2つの同一対からなり、それぞれの対が、1つの「軽」鎖（典型的には、約25 kDaの分子量を有する）、および1つの「重」鎖（典型的には、約50～70 kDaの分子量を有する）を有する。ヒト軽鎖は、カッパ軽鎖およびラムダ軽鎖として分類される。本発明は、一般に、IgGクラスに基づいた二重特異性抗体を対象とし、IgGクラスは、いくつかのサブクラスを有し、限定されないが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4が含まれる。一般に、IgG1、IgG2、およびIgG4がIgG3よりも頻繁に使用される。IgG1は、356（DまたはE）および358（LまたはM）に多型を有する異なるアロタイプを有することに留意されたい。本明細書に示される配列は、356 E / 358 Mアロタイプを使用しているが、他のアロタイプも本明細書に含まれる。すなわち、本明細書に含まれるIgG1 Fcドメインを含む任意の配列は、356 E / 358 Mアロタイプを置き換える356 D / 358 Lを有し得る。

30

【0087】

加えて、本明細書の抗体の多くは、位置220にセリンに置き換えられるシステインのうちの少なくとも1つを有し、一般に、これは、本明細書に示される配列の大半に関して「scFv単量体」側にあるが、ジスルフィド形成を低減するために、「Fab単量体」側にあるか、またはその両方にあってもよい。置き換えられたこれらのシステイン（C220S）の一方または両方が本明細書の配列内に具体的に含まれる。

40

【0088】

したがって、本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、その定常領域の化学的特性および抗原特性によって定義される免疫グロブリンのサブクラスのいずれかを意味する。治療用抗体は、アイソタイプおよび／またはサブクラスのハイブリッドも含み得ることを理解されたい。例えば、参照によって組み込まれる米国公開第2009/0163699号に示されるように、本発明は、ヒトIgG1 / G2ハイブリッドの使用。

50

【0089】

超可変領域は、軽鎖可変領域における、約アミノ酸残基24～34（LCDR1；「L」は軽鎖を示す）、50～56（LCDR2）、および89～97（LCDR3）、重鎖可変領域における、およそ約31～35B（HCDR1；「H」は、重鎖を示す）、約50～65（HCDR2）、および約95～102（HCDR3）のアミノ酸残基；Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)、ならびに／または超可変ループを形成するそれらの残基（例えば、軽鎖可変領域における残基26～32（LCDR1）、50～52（LCDR2）、および91～96（LCDR3）、ならびに重鎖可変領域における26～32（HCDR1）、53～55（HCDR2）、および96～101（HCDR3）；Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917、由来のアミノ酸残基を包含することが一般的である。本発明の特定のCDRは、以下に記載される。

【0090】

当業者に理解されるように、CDRの正確な番号付けおよび配置は、異なる番号付けシステム間で異なり得る。しかしながら、可変重および／または可変軽配列の開示は関連する（固有）CDRの開示を含むことを理解されたい。したがって、各可変重領域の開示は、vhCDR（例えば、vhCDR1、vhCDR2、およびvhCDR3）の開示であり、各可変軽領域の開示は、vlCDR（例えば、vlCDR1、vlCDR2、およびvlCDR3）の開示である。CDR番号付けの有用な比較は、以下のとおりであり、Lafayette et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003)：を参照されたい。

【表1】

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact	Xencor
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35	27-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58	54-61
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101	103-116
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36	27-38

vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55	56-62
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96	97-105

【0091】

本明細書を通して、可変ドメイン（およそ、軽鎖可変領域の残基1～107、および重鎖可変領域の残基1～113）における残基を指すときは、Kabat番号付けシステムが一般に使用され、Fc領域についてはEU番号付けシステムが一般に使用される（例えば、Kabat et al., 上記(1991)）。

【0092】

重鎖のIgドメインの別の型は、ヒンジ領域である。本明細書では、「ヒンジ」または「

ヒンジ領域」または「抗体ヒンジ領域」または「ヒンジドメイン」は、抗体の第1の定常ドメインと第二定常ドメインとの間にアミノ酸を含む可動性のポリペプチドを意味する。構造的に、IgG CH1ドメインは、EU位置215で終了し、IgG CH2ドメインは、残基EU位置231から始まる。したがって、IgGについて、抗体ヒンジは、本明細書において、位置216（IgG1においてE216）～230（IgG1においてp230）を含むように定義され、番号付けは、KababtにあるようにEUインデックスに従う。場合によっては、「ヒンジ断片」が使用され、これは、ヒンジドメインのNおよびC末端のいずれか、または両方により少ないアミノ酸を含有する。本明細書に示されるように、pI変異体は、ヒンジ領域においても作製することができる。

【0093】

軽鎖は、一般に、2つのドメイン、可変軽ドメイン（軽鎖CDRを含み、可変重ドメインと共にFv領域を形成する）および定常軽鎖領域（CLまたはCκと呼ばれることが多い）を含む。

【0094】

以下に概説される、追加の置換のための別の関心領域は、Fc領域である。

【0095】

本発明は、多数の異なるCDRのセットを提供する。この場合、「完全なCDRのセット」は、3つの可変軽CDRおよび3つの可変重CDR、例えば、vLCDR1、vLCDR2、vLCDR3、vLCDR1、vLCDR2、およびvLCDR3を含む。これらは、それぞれより大きい可変軽ドメインまたは可変重ドメインの一部であり得る。加えて、より完全に本明細書に概説されるように、可変重ドメインおよび可変軽ドメインは、重鎖および軽鎖が使用される場合（例えば、Fabが使用される場合）別個のポリペプチド鎖上に、またはscFv配列の場合は単一ポリペプチド鎖上にあり得る。

【0096】

CDRは、抗原結合の形成、またはより具体的には、抗体のエピトープ結合部位の形成に寄与する。「エピトープ」は、パラトープとして知られる、抗体分子の可変領域における特定の抗原結合部位と相互作用する決定基を指す。エピトープは、アミノ酸または糖側鎖などの分子の分類であり、通常、特定の構造特性、および特定の電荷特性を有する。単一抗原が2つ以上のエピトープを有してよい。

【0097】

エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基（エピトープの免疫優性構成要素とも呼ばれる）、および特異的な抗原結合ペプチドによって、効果的に遮断されるアミノ酸残基などの、結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含んでよい。換言すれば、アミノ酸残基は、特異的な抗原結合ペプチドのフットプリントの範疇である。

【0098】

エピトープは、立体構造的、または直線的のいずれでもよい。立体構造的エピトープは、空間的に並置されたアミノ酸によって、直線的ポリペプチド鎖の異なるセグメントから産生される。直線的エピトープは、ポリペプチド鎖における隣接アミノ酸残基によって産生されるものである。立体構造的エピトープおよび非立体構造的エピトープは、前者に対する結合であって、後者に対するものではない結合が、変性溶媒の存在下で消失するという点で区別されてよい。

【0099】

エピトープは、固有の空間的立体構造において、典型的には少なくとも3個のアミノ酸を含み、より一般的には、少なくとも5または8～10個のアミノ酸を含む。同一エピトープを認識する抗体は、1つの抗体が、標的抗原に対する別の抗体の結合を遮断する能力を示す単純な免疫アッセイにおいて検証することができ、例えば、「ビニング（binning）」である。以下に概説されるように、本発明は、本明細書において列挙される抗原結合ドメインおよび抗体を含むだけでなく、列挙される抗原結合ドメインによって結合されるエピトープと結合について競合するものも含む。

【0100】

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、異なる抗体ドメインを提供する。本明細書に記載され、当該技術分野で知られるように、本発明のヘテロ二量体抗体は、鎖および軽鎖内に異なるドメインを含み、そのドメインはまた、重複し得る。これらのドメインには、限定されないが、Fcドメイン、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、ヒンジドメイン、重定常ドメイン（CH1-ヒンジ-FcドメインまたはCH1-ヒンジ-CH2-CH3）、可変重ドメイン、可変軽ドメイン、軽定常ドメイン、FAbドメイン、およびscFvドメインが含まれる。

【0101】

したがって、「Fcドメイン」は、-CH2-CH3ドメイン、および任意選択でヒンジドメイン（-H-CH2-CH3）を含む。本明細書の実施形態では、scFvがFcドメインに結合されるとき、それは、Fcドメインのヒンジのすべてまたは一部に結合されるscFv構築物のC末端であり、例えば、それは一般に、ヒンジの開始である配列EPKSに結合される。重鎖は、可変重ドメインおよび定常ドメインを含み、CH2-CH3を含むCH1-任意選択のヒンジ-Fcドメインを含む。軽鎖は、可変軽鎖および軽定常ドメインを含む。scFvは、可変重鎖、scFvリンカー、および可変軽ドメインを含む。本明細書に概説される構築物および配列の大半において、可変重鎖のC末端は、scFvリンカーのN末端に結合され、そのC末端は、可変軽鎖のN末端に結合される（N-vh-リンカー-vl-C）が、それは交換することができる（N-vl-リンカー-vh-C）。

【0102】

本発明のいくつかの実施形態は、自然に発生しないが、一般に、scFvリンカーによって一緒に連結される可変重ドメインおよび可変軽ドメインを含む少なくとも1つのscFvドメインを含む。本明細書で概説されるように、scFvドメインは、一般に、vh-scFvリンカー-vlのようにNからC末端に配向されるが、これは、scFvドメインのいずれか（またはFabからのvhおよびvl配列を使用して構築されるもの）に関して逆にすることができ、一端または両端の任意選択のリンカーは型（一般に図1を参照されたい）に依存する。

【0103】

本明細書に示されるように、使用され得るいくつかの好適なリンカー（ドメインリンカーまたはscFvリンカーのいずれかとして使用するための）があり、それらのリンカーは、組換え技術によって生成される伝統的なペプチド結合を含む、列記されるドメインを共有結合するために使用され得る。いくつかの実施形態では、リンカーペプチドは、次のアミノ酸残基を主に含み得る：Gly、Ser、Ala、またはThr。リンカーペプチドは、2つの分子を連結するために適切な長さを有するべきであり、そのようにして、それらは、お互いに対して正しい立体構造をとり、その結果、それらは、所望の活性を保持する。一実施形態では、リンカーは、長さが、アミノ酸で約1~50個、好ましくは、長さが、アミノ酸で約1~30個である。一実施形態では、長さが、アミノ酸で1~20個であるリンカーを、いくつかの実施形態において有用である約5~約10個のアミノ酸と共に使用してよい。有用なリンカーには、グリシン-セリン重合体（例えば、(GS)n、(GSGGS)n（配列番号37756）、(GGGGS)n（配列番号37757）、および(GGGS)n（配列番号37758）を含み、ここで、nは、少なくとも1（かつ一般に3~4）である整数である）、グリシン-アラニン重合体、アラニン-セリン重合体、および他の可動性リンカーが含まれる。あるいは、限定されないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールの共重合体を含む様々な非タンパク質性の重合体、リンカーとして有用であり得る。

【0104】

他のリンカー配列は、CL/CH1ドメインのすべての残基ではないが、CL/CH1ドメインの何らかの長さの何らかの配列を含んでよく、例えば、CL/CH1ドメインの最初の5~12個のアミノ酸残基を含んでよい。リンカーは、免疫グロブリン軽鎖由来であ

10

20

30

40

50

り得、例えば、C κ またはC λ である。リンカーは、何らかのアイソタイプの免疫グロブリン重鎖由来であり得、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ 、およびC μ が含まれる。リンカー配列は、Ig様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR）、ヒンジ領域由来の配列、および他のタンパク質由来の他の天然の配列などの他のタンパク質に由来してもよい。

【0105】

いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書と一緒に概説されるあらゆる2つのドメインを連結させるために使用される「ドメインリンカー」である。例えば、図1Fにおいて、FabのCH1ドメインのC末端をscFvのN末端に結合させるドメインリンカーが存在してよく、別の任意選択のドメインリンカーが、scFvのC末端をCH2ドメインに結合させる（しかし、多くの実施形態では、ヒンジがこのドメインリンカーとして使用される）。いずれの好適なリンカーが使用され得るが、多くの実施形態は、ドメインリンカーとして、グリシン-セリン重合体を利用し、これには、例えば、(GS) n 、(SGGS) n （配列番号37756）、(GGGS) n （配列番号37757）、および(GGGS) n （配列番号37758）（ここで、 n は、少なくとも1（かつ一般に3〜4〜5）である整数である）、ならびに各ドメインがその生物学的機能を保持することを可能にするのに十分な長さおよび柔軟性を有する、2つのドメインの組換え結合を可能にするあらゆるペプチド配列を含む。場合によっては、および以下に概説されるように「鎖性」に注目すると、scFvリンカーのいくつかの実施形態において使用されるように、帯電ドメインリンカーが使用され得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書で論じられるように、vhおよびvlドメインを共有結合させるために使用されるscFvリンカーである。多くの場合では、scFvリンカーは、帯電scFvリンカーであり、そのいくつかは、

【0107】

図7に示される。したがって、本発明は、第1の単量体と第2の単量体との間でpIにおける分離を容易にするために帯電scFvリンカーをさらに提供する。すなわち、帯電scFvリンカーを組み込むことによって、正であっても、負であっても（あるいは異なる単量体上でscFvを使用する足場の場合には両方）、これは、帯電リンカーを含む単量体が、Fcドメインをさらに変更することなくpIを変えることを可能にする。これらの帯電リンカーは、標準リンカーを含有するあらゆるscFvに置換され得る。かさねて、当業者に理解されるように、帯電scFvリンカーは、pIにおける所望の変更に従って、正しい「鎖」または単量体上に使用される。例えば、本明細書で論じられるように、三重F型のヘテロ二量体抗体を作製するために、所望の抗原結合ドメインのそれぞれについてのFv領域の最初のpIが計算され、1つがscFvを作製するために選択され、pIによって、正または負のリンカーいずれかが選択される。

【0108】

帯電ドメインリンカーはまた、本発明の単量体のpI分離を増加するためにも使用することができ、したがって、

【0109】

図7に含まれるものは、リンカーが利用される本明細書のいずれの実施形態においても使用され得る。

【0110】

具体的には、図1に示される型は、通常「ヘテロ二量体抗体」と呼ばれる抗体であり、タンパク質が、ヘテロ二量体Fcドメインに自己組織化される少なくとも2つの関連Fc配列、および少なくとも2つのFv領域（FabとしてまたはscFvとしてにかかわらず）を有することを意味する。

【0111】

キメラ抗体およびヒト化抗体

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、特定の生殖系列重鎖免疫グロブリン遺伝子由

10

20

30

40

50

来の重鎖可変領域および／または特定の生殖系列軽鎖免疫グロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。例えば、そのような抗体は、特定の生殖系列配列「の産物」であるか、または特定の生殖系列配列「に由来する」重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含むヒト抗体を含むか、またはそれからなり得る。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列「の産物」であるか、またはヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、配列がヒト抗体の配列に最も近い（すなわち、最大の同一性％）ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択する（本明細書に概説される方法を使用する）ことによってそのように同定され得る。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列「の産物」であるか、または特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」ヒト抗体は、例えば、自然発生する体細胞変異または部位指向変異の意図的な導入により、生殖系列配列と比較してアミノ酸差異を含有し得る。しかしながら、ヒト化抗体は典型的には、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも90％同一であり、他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖系列配列）と比較したとき、ヒト配列に由来するものとして抗体を同定するアミノ酸残基を含有する。ある特定の場合では、ヒト化抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも95、96、97、98、または99％同一であるか、またはさらには少なくとも96％、97％、98％、もしくは99％同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト化抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と10～20個以上のアミノ酸差異を示さない（本明細書の任意の非対称、pI、および切断変異体の導入前、すなわち、本発明の変異体の導入前の変異体の数は、一般に少ない）。ある特定の場合では、ヒト化抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と5個以上、またはさらには4、3、2、もしくは1個以上のアミノ酸差異を示さない（同様に、本明細書の任意の非対称、pI、および切断変異体の導入前、すなわち、本発明の変異体の導入前の変異体の数は、一般に少ない）。

【0112】

一実施形態では、親抗体は、親和性が成熟しており、当該技術分野で知られるとおりである。構造に基づく方法が、ヒト化および親和性の成熟に用いられてよく、例えば、US N 11 / 004, 590において説明されるとおりである。抗体可変領域のヒト化および／または親和性成熟のために、選択に基づく方法が用いられてよく、限定されないが、Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162、Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684、Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37):22611-22618、Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915、Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759において説明される方法が含まれ、これらはすべて、参照により全体が組み込まれる。他のヒト化方法は、CDRの一部のみの移植を伴うものでよく、限定されないが、US N 09 / 810, 510、Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125、De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084において説明される方法が含まれ、これらはすべて、参照により全体が組み込まれる。

【0113】

IV. ヘテロ二量体抗体

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、自己組織化してヘテロ二量体Fcドメインおよびヘテロ二量体抗体を形成する、2つの異なる重鎖変異体Fc配列の使用に依存するヘテロ二量体チェックポイント抗体を提供する。

【0114】

したがって、本発明は、例えば、二重特異性結合を可能にするために、2つ以上のチェッ

クポイント抗原またはリガンドへの結合を可能にするヘテロ二量体抗体を提供するための新規構築物を対象とする。ヘテロ二量体抗体構築物は、抗体の重鎖の2つのFcドメイン、例えば、「二量体」に組織化する2つの「単量体」の自己組織化の性質に基づく。ヘテロ二量体抗体は、以下により完全に論じられる各単量体のアミノ酸配列を変えることによって作製される。したがって、本発明は、一般に、いくつかの方法で、抗原を共捕捉することができるヘテロ二量体チェックポイント抗体の創出を対象とし、それぞれの鎖で異なる、定常領域のアミノ酸変異体に依存することで、ヘテロ二量体形成を促進し、かつ／またはホモ二量体に関してテロ二量体精製の容易化を可能にする。

【0115】

したがって、本発明は、二重特異性抗体を提供する。抗体技術における継続問題は、2つの異なる抗原に同時に結合し、一般に、そのようにして、異なる抗原を近接させることを可能にし、新しい機能性および新しい治療をもたらす「二重特異性」抗体が、切望されていることである。一般に、これらの抗体は、重鎖および軽鎖それぞれの遺伝子を宿主細胞に含めることによって作られる。これにより、一般に、所望のヘテロ二量体(A-B)、ならびに2つのホモ二量体(A-A及びB-B(軽鎖ヘテロ二量体の問題を含まない))の形成がもたらされる。しかしながら、二重特異性抗体形成における主な障壁は、ヘテロ二量体抗体を精製してホモ二量体抗体を除去すること、および／またはホモ二量体形成を上回るようにヘテロ二量体形成に偏らせることが困難であるということである。

【0116】

本発明のヘテロ二量体を生成するために使用することができる機構がいくつか存在する。加えて、当業者に理解されるように、これらの機構は、高いヘテロ二量体化を確実にするために組み合わせることができる。したがって、ヘテロ二量体の産生につながるアミノ酸変異体は、「ヘテロ二量体化変異体」と呼ばれる。以下に論じられるように、ヘテロ二量体化変異体は、立体変異体(例えば、以下に記載される「ノブアンドホール」または「非対称」変異体、および以下に記載される「電荷対」変異体)、ならびにヘテロ二量体を除去してホモ二量体の精製を可能にする「pI変異体」を含み得る。これにより、参照によりその全体が組み込まれ、特に「ヘテロ二量体化変異体」の議論について以下のようにWO2014/145806において一般に記載されるように、ヘテロ二量体化の有用な機構には、「ノブアンドホール」(「KIH」、時に本明細書では「非対称」変異体として(WO2014/145806の議論参照)、WO2014/145806に記載される「静電操縦」または「電荷対」、WO2014/145806に記載されるpI変異体、ならびにWO2014/145806および以下に概説される一般的な追加のFc変異体が含まれる。

【0117】

本発明には、ヘテロ二量体抗体の精製を容易にすることができるいくつかの基礎的な機構が存在する。すなわち、pI変異体の使用に依存し、その結果、単量体は、それぞれが異なるpIを有し、そうすることで、A-A二量体タンパク質、A-B二量体タンパク質、及びB-B二量体タンパク質の等電点精製を可能にするものである。あるいは、「三重F」型などのいくつかの足場型は、サイズに基づく分離も可能にする。以下にさらに概説されるように、ヘテロ二量体形成が、ホモ二量体を上回るようにする「非対称」も可能である。したがって、立体二量体化変異体、およびpI変異体または電荷対変異体の組み合わせは、本発明において、特に有用である。

【0118】

一般に、本発明において特に有用な実施形態は、非対称変異体を含む変異体のセットに依存し、この変異体は、2つの単量体間でpI差異を増加させるpI変異体と共に、ホモ二量体化形成より優先してヘテロ二量体化形成を促し、ホモ二量体を除去してヘテロ二量体の精製を容易にする。

【0119】

加えて、以下により完全に概説されるように、ヘテロ二量体抗体の型に応じて、pI変異体は、単量体の定常および／またはFcドメイン内のいずれかに含有され得るか、あるいは

はドメインリンカーまたはs c F vリンカーのいずれかである帯電リンカーが使用され得る。すなわち、三重F型などのs c F v（複数可）を利用する足場は、精製目的に向けて、さらなるp Iの増大を与える帯電s c F vリンカー（正か負のいずれか）を含むことができる。当業者に理解されるように、三重F型によっては、帯電s c F vリンカーのみを有し、追加のp I調整無しでも有用であるが、本発明は、単量体のうちの1つまたは両方にあるp I変異体、および／または帯電ドメインリンカーも提供する。加えて、代替機能性のために操作する追加のアミノ酸はまた、F c、F c R n、およびK O変異体などのp I変化を与え得る。

【0120】

ヘテロ二量体タンパク質の精製を可能にするための分離機構としてp Iを利用する本発明において、アミノ酸変異体は、単量体ポリペプチドのうちの1つまたは両方に導入されてもよい。すなわち、単量体のうちの1つのp I（本明細書において、単に「単量体A」と呼ばれる）が単量体Bを除去するために操作され得るか、または単量体AおよびBの変化の両方が帯電され、単量体Aのp Iを増加させ、単量体Bのp Iを減少させることができる。論じられるように、単量体のいずれか、または両方のp Iの変化は、帯電残基を除去もしくは追加（例えば、中性アミノ酸は、正もしくは負に帯電したアミノ酸残基によって置き換えられ、例えば、グリシンからグルタミン酸への置き換えである）するか、帯電残基を正もしくは負から反対の電荷へと変化（例えば、アスパラギン酸からリジンへ）させるか、または帯電残基を中性残基へと変化（例えば、リジンからセリンへであり、これにより帯電が消失する）させることによって行うことができる。いくつかのこれらの変異体が、図に示される。

【0121】

したがって、本発明のこの実施形態は、単量体のうちの少なくとも1つにおいて、p Iの十分な変化の創出を提供し、その結果、ヘテロ二量体は、ホモ二量体から分離され得る。当業者に理解されるように、そして、以下にさらに論じられるように、これは、「野生型」重鎖定常領域と、そのp Iが増加もしくは減少（ $w t \ A - + B$ もしくは $w t \ A - - B$ ）のいずれかとなるように操作された変異体領域と、を使用することによって行うことができるか、または一方の領域を増加させ、もう一方の領域を減少させること（ $A - + B -$ もしくは $A - B +$ ）によって行うことができる。

【0122】

したがって、一般に、本発明のいくつかの実施形態の構成要素は、抗体の定常領域におけるアミノ酸変異体であり、このアミノ酸変異体は、アミノ酸置換（「p I変異体」または「p I置換」）を単量体のうちの1つまたは両方へ組み込むことによって、「p I抗体」を形成するために、二量体タンパク質の単量体の両方か、もし両方でないなら少なくとも1つの等電点（p I）を変えることに向けられる。本明細書で示されるように、2つのホモ二量体からのヘテロ二量体の分離は、2つの単量体のp Iが、わずか0.1 pH単位でも異なれば達成でき、0.2、0.3、0.4、および0.5、またはそれより大きな差異は、すべて本発明において有用である。

【0123】

当業者に理解されるように、良好な分離を得るために単量体（複数可）のそれぞれまたは両方に含まれるp I変異体の数は、構成要素の出発p I、例えば、三重F型で、対象のs c F vおよびF a bの出発p Iに依存する部分がある。すなわち、どの単量体を操作するか、またはどの「方向」（例えば、より正、もしくはより負）にするかを決定するために、2つの標的抗原のF v配列が計算され、そこから決定がなされる。当該技術分野で知られるように、異なるF vであれば、本発明で活用される異なる出発p Iを有する。一般に、本明細書に概説されるように、p Iが操作されることにより、それぞれの単量体で、少なくとも約0.1 logの総p I差異がもたらされ、本明細書に概説されるように当該総p I差異は、0.2～0.5であることが好ましい。

【0124】

さらに、当業者に理解され、本明細書に概説されるように、いくつかの実施形態では、ヘ

10

20

30

40

50

テロ二量体は、サイズに基づいてホモ二量体から分離することができる。例えば図 1 に示されるように、型のいくつかは、サイズに基づくヘテロ二量体及びホモ二量体の分離を可能にする。

【0125】

A. ヘテロ二量体化変異体

本発明は、ヘテロ二量体タンパク質を提供し、これには、ホモ二量体を除去してヘテロ二量体形成および／または精製を可能にするためにヘテロ二量体変異体を利用する様々な型のヘテロ二量体抗体を含む。

【0126】

いくつかの好適なヘテロ二量体化非対称変異体のセットの対がある。これらの変異体は、「セット」の「対」で起こる。すなわち、対の一方のセットは、第 1 の単量体に組み込まれ、対のもう一方のセットは、第 2 の単量体に組み込まれる。これらのセットは、一方の単量体上の残基ともう一方の単量体上の残基との間の 1 対 1 の対応を有する「ノブインホール」変異体として必ずしも機能せず、すなわち、これらの対のセットは、ヘテロ二量体形成を促し、ホモ二量体形成を防止する 2 つの単量体の間で境界面を形成し、生物学的条件下で自発的に形成するヘテロ二量体のパーセンテージが、予想された 50 % よりもむしろ 90 % を超えることを可能にする（25 % のホモ二量体 A / A : 50 % のヘテロ二量体 A / B : 25 % のホモ二量体 B / B）ことに留意されたい。

【0127】

B. 立体変異体

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体の形成は、立体変異体の追加によって容易になる場合がある。すなわち、それぞれの重鎖におけるアミノ酸を変化させることによって、同一 Fc アミノ酸配列を有するホモ二量体を形成するよりも、異なる重鎖が、会合してヘテロ二量体構造を形成する可能性が高くなる。好適な立体変異体は、図に含まれる。

【0128】

ヘテロ二量体形成を促し、ホモ二量体形成を防止するように立体的影響を創出するアミノ酸操作を指す、当該技術分野で一般に「ノブアンドホール」と呼ばれる 1 つの機構も任意選択で使用され得る。これは、USSN 61 / 596, 846、Ridgway et al., Protein Engineering 9 (7) : 617 (1996) ; Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270 : 26、米国特許第 8, 216, 805 号（それらの全ては参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、「ノブアンドホール」と呼ばれる場合がある。「ノブアンドホール」に依存するいくつかの「単量体 A - 単量体 B」の対が図において同定されている。加えて、Merchant et al., Nature Biotech. 16 : 677 (1998) に記載されるように、これらの「ノブアンドホール」変異は、ジスルフィド結合と組み合わせ、ヘテロ二量体化へと形成を非対称にすることができる。

【0129】

ヘテロ二量体の生成に有用である追加の機構は、「静電操縦」と呼ばれることがあり、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (25) : 19637 (2010)（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるとおりである。これは、本明細書で「電荷対」と呼ばれることがある。この実施形態では、静電気が、ヘテロ二量体化へと形成を非対称とするために使用される。当業者であれば、これらは、pI に対しても効果を有し得、そうすることで、精製に対しても影響を有し得、したがって、場合によっては、pI 変異体であり得るとも考えられることを理解するであろう。しかしながら、これらは、ヘテロ二量体化を押し進めるために生成され、精製手段としては使用されなかったため、それらは、「立体変異体」として分類される。これらには、限定されないが、D221R / P228R / K409R と対である D221E / P228E / L368E（例えば、これらは、「単量体が対応するセットである」）および C220R / E224R / P228R / K409R と対である C220E / P228E / 368E が含まれる。

【0130】

追加の単量体A変異体および単量体B変異体を、本明細書に概説されるpI変異体、またはUS2012/0149876の図37に示される他のこの当該特許文献の図および説明文ならびに配列番号は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0131】

いくつかの実施形態では、本明細書に概説される立体変異体を、何らかのpI変異体（またはFc変異体、FcRn変異体等の他の変異体）と共に1つまたは両方の単量体へ、任意選択かつ独立して、組み込むことができ、本発明のタンパク質を独立かつ任意選択で含むか、またはこのタンパク質から除外することができる。

【0132】

好適な非対称変異体のリストは図3にみられ、図8は、多くの実施形態における特定の有用性のいくつかの対を示す。多くの実施形態において特に使用されるものは、限定されないが、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、およびT366S/L368A/Y407V:T366W（任意選択で架橋ジスルフィド、T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C）を含む、セットの対である。命名法の点から、上記のように、対「S364K/E357Q:L368D/K370S」は、単量体のうちの一方が二重変異体セットS364K/E357Qを有し、もう一方が二重変異体セットL368D/K370Sを有することを意味し、これらの対の「鎖性」は出発pIに依存する。

【0133】

C. ヘテロ二量体のpI（等電点）変異体

一般に、当業者に理解されるように、pI変異体には2つの一般的なカテゴリー：タンパク質のpIを増加させるもの（塩基性の変化）、およびタンパク質のpIを減少させるもの（酸性の変化）が存在する。本明細書に記載されるように、これらの変異体のすべての組み合わせを行うことができる、つまり、一方の単量体が、野生型、または野生型と顕著に異なるpIを示さない変異体であり得、もう一方は、より塩基性、またはより酸性であり得る。あるいは、それぞれの単量体を、1つはより塩基性へ、1つはより酸性へと変化させる。

【0134】

pI変異体の好ましい組み合わせは図4に示される。本明細書に概説され、図に示されるように、これらの変化は、IgG1に対して示されるが、すべてのアイソタイプおよびアイソタイプハイブリッドを、このように変えることができる。重鎖定常ドメインが、IgG2~4由来である場合は、R133EおよびR133Qも使用することができる。

【0135】

一実施形態では、例えば、図1A、E、F、G、H、およびI型では、pI変異体の好ましい組み合わせは、208D/295E/384D/418E/421D変異体（ヒトIgG1に対しての場合、N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D）を含む1つの単量体と、正の帯電scFvリンカー（（GKPGS）₄を含む）（配列番号37755）を含む第2の単量体（正のscFv側）とを有する。しかしながら、当業者に理解されるように、第1のモノマーは、位置208を含むCH1ドメインを含む。したがって、CH1ドメインを含まない構築物において（例えば、ドメインのうちの1つにCH1ドメインを利用しない抗体のため、例えば、図1B、C、またはDに示されるものなどの二重scFv型または「片腕」型において）、好ましい負のpI変異体Fcセットは、295E/384D/418E/421D変異体（ヒトIgG1に対しての場合、Q295E/N384D/Q418E/N421D）を含む。

【0136】

したがって、いくつかの実施形態では、一方の単量体は図4からの置換のセットを有し、もう一方の単量体は帯電リンカー（型が指示するように、その単量体がscFvまたは帯

10

20

30

40

50

電ドメインリンカーを含むため、帯電 s c F v リンカーの形態のいずれかで、これは図 7 に示されるものから選択され得る) を有する。

【0137】

1. アイソタイプ変異体

加えて、本発明の多くの実施形態が、1つの I g G アイソタイプから別のものへの、特定位置での p I アミノ酸の「取り込み」に依存しており、したがって、変異体へ導入される不要な免疫原性の可能性を低下または除去している。これらのいくつかは、米国公開第 2014/0370013 号の図 21 に示され、参照により本明細書に組み込まれる。すなわち、I g G 1 は、高いエフェクター機能を含む様々な理由で、治療用抗体のための共通のアイソタイプである。しかしながら、I g G 1 の重定常領域は、I g G 2 のそれと比較して、より高い p I を有している (8.10 対 7.31)。特定位置で、I g G 2 残基を、I g G 1 骨格に導入することによって、得られる単量体の p I は低下 (または増加) し、付加的に血清半減期の長期化を示す。例えば、I g G 1 は、位置 137 にグリシン (p I 5.97) を有し、I g G 2 は、グルタミン酸 (p I 3.22) を有している。つまり、グルタミン酸の取り込みは、得られるタンパク質の p I に影響を与えることになる。以下に記載されるように、いくつかのアミノ酸置換は、一般に、変異体抗体の p I に顕著な影響を与えることが必要とされている。しかしながら、以下に論じられるように、I g G 2 分子における変化でさえ、血清半減期の増加を可能にすることに留意されるべきである。

【0138】

以下にさらに記載されるように、他の実施形態では、得られるタンパク質の全体の電荷状態を低下 (例えば、より高い p I アミノ酸を、より低い p I アミノ酸へと変化させることによって) させるか、または安定に向けた構造の適応を可能にする等のいずれかのために、非アイソタイプアミノ酸変化がなされる。

【0139】

加えて、重定常ドメインおよび軽定常ドメインの両方の p I 操作によって、ヘテロ二量体のそれぞれの単量体において、顕著な変化をみることができる。本明細書で論じられるように、2つの単量体の p I を少なくとも 0.5 異なるようにすることで、イオン交換クロマトグラフィーもしくは等電点電気泳動、または等電点感受性の他の方法よっての分離が可能になる。

【0140】

D. p I の計算

それぞれの単量体の p I は、変異体重鎖定常ドメインおよび融合相手を含む、可変重鎖定常領域および総単量体の p I に依存し得る。したがって、いくつかの実施形態では、米国公開第 2014/0370013 号の図 19 中のチャートを使用して、変異体重鎖定常ドメインに基づいて、p I の変化が計算される。本明細書で論じられるように、どの単量体を操作するかは、一般に、F v および足場領域の固有 p I によって決定される。あるいは、それぞれの単量体の p I を、比較することができる。

【0141】

E. より良好な F c R n インビボ結合も付与する p I 変異体

p I 変異体が、単量体の p I を減少させる場合、インビボでの血清における保持の改善という利点が追加され得る。

【0142】

未だ試験中であるが、F c 領域は、インビボにおいてより長い半減期を有すると考えられ、これは、エンドソームにおける、p H 6 での F c R n に対する結合が、F c を隔離するためである (Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today. 18 (12): 592-598 の全体が参照により組み込まれる)。その後、エンドソームの区画は、細胞表面へと F c を再循環させる。区画が、より高い p H である約 7.4 の細胞外空間へと一旦開くと、F c の放出が誘導され、血液へ戻る。マウスにおいて、Dall'Aquilaらは、p H 6 および p H 7.4 での F c R n 結合が増加した F c 変異型 (F c mutant) が、実際は、血清濃度を低下させ、野生型 F c と同一の半減期を有

10

20

30

40

50

することを示した (Dall'Acqua et al., 2002, J. Immunol., 169: 5171-5180 の全体が参照により組み込まれる)。pH 7.4 での FcRn に向けた Fc の親和性の増加は、Fc が放出されて血流へ戻ることを妨げると考えられる。それ故に、インビボにおける Fc の半減期を増加させるであろう Fc 変異は、より高い pH での Fc の放出を、可能なままにしつつ、より低い pH で FcRn 結合を理想的に増加させる。アミノ酸であるヒスチジンは、6.0~7.4 の pH 範囲において、その電荷状態が変化する。したがって、His 残基が、Fc/FcRn 複合体において、重要な位置を占めるという発見は、驚くべきことではない。

【0143】

最近、より低い等電点を有する可変領域を有する抗体が、より長い血清半減期も有し得ることが示唆された (Igawa et al., 2010 PEDS, 23 (5): 385-392 の全体が参照により組み込まれる)。しかしながら、この機構の理解は、依然として不十分である。その上、可変領域は、抗体毎に異なる。本明細書に記載されるように、pI が低下し、半減期が延長している定常領域変異体は、抗体の薬物動態特性の改善に対する、よりモジュール型の手法を提供する。

【0144】

F. 追加の機能性のための追加の Fc 変異体

pI アミノ酸変異体に加えて、様々な理由から実施することのできる、いくつかの有用な Fc アミノ酸改変が存在し、限定されないが、1 つ以上の FcγR 受容体に対する結合の変更、FcRn 受容体に対する結合の変更等が含まれる。

【0145】

したがって、本発明のタンパク質は、アミノ酸改変を含むことができ、これには、pI 変異体および立体変異体を含む、本明細書に概説されるヘテロ二量体化変異体が含まれる。変異体の各セットは、任意の特定のヘテロ二量体タンパク質を独立かつ任意選択で含むか、またはこのタンパク質から除外することができる。

【0146】

G. FcγR 変異体

したがって、FcγR 受容体のうちの 1 つ以上への結合を変えるために行うことができる有用な Fc 置換がいくつか存在する。結合の増加、および結合の減少をもたらす置換が有用であり得る。例えば、FcγRIIIa に対する結合の増加は、ADCC (抗体依存性細胞傷害。これは、細胞が媒介する反応であって、FcγR を発現している、非特異性である細胞傷害性の細胞が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後に標的細胞の溶解を引き起こす反応である) の増加をもたらすことが知られている。同様に、FcγRIIb (抑制性受容体) に対する結合の減少も、状況によっては、有益であり得る。本発明において有用であるアミノ酸置換には、USSN11/124, 620 (特に図 41)、USSN11/174, 287、USSN11/396, 495、USSN11/538, 406 においてリストに記載されるものが含まれ、これらはすべて、参照により全体が明確に本明細書に組み込まれ、特に、そこで開示される変異体に向けて組み込まれる。有用な特定の變異体には、限定されないが、236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D、332E/330L、243A、243L、264A、264V、および 299T が含まれる。

【0147】

加えて、FcRn 受容体に対する結合増加、および血清半減期の増加において有用な追加の Fc 置換が存在し、参照により全体が組み込まれる USSN12/341, 769 において具体的に開示されるとおりであって、限定されないが、434S、434A、428L、308F、259I、428L/434S、259I/308F、436I/428L、436I、または V/434S、436V/428L、および 259I/308F/428L が含まれる。

【0148】

H. 切断変異体

同様に、機能性変異体の別のカテゴリーは、「Fcγ切断変異体」または「Fcノックアウト（FcKOもしくはKO）」変異体である。これらの実施形態では、いくつかの治療用途に向け、Fcγ受容体（例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa等）のうちの1つ以上またはすべてに対するFcドメインの通常の結合を低減または除去して、作用の付加的な機構を回避することが望ましい。すなわち、例えば、多くの実施形態では、特に、Fcドメインのうちの1つが1つ以上のFcγ受容体切断変異体を含むように、FcγRIIIa結合を切断して、ADCC活性を排除するか、またはADCCを大幅に低減することが望ましい二重特異性チェックポイント抗体の使用において、これらの切断変異体は、図5に示され、それぞれは、G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G、およびE233P/L234V/L235A/G236delからなる群から選択される切断変異体を利用する好ましい態様と共に独立かつ任意選択で含むか、または除外することができる。本明細書において参照される切断変異体が、一般に、FcRn結合ではなくFcγR結合を切断することに留意されたい。

【0149】

当該技術分野で知られるように、ヒトIgG1のFcドメインは、Fcγ受容体への結合が最高であり、したがって、ヘテロ二量体抗体の骨格における定常ドメイン（またはFcドメイン）がIgG1である場合、切断変異体が使用され得る。あるいは、またはIgG1バックグラウンドにおける切断変異体に加えて、グリコシル化位置297における変異（一般に、AまたはSに）は、例えば、FcγRIIIaへの結合を顕著に切断することができる。ヒトIgG2およびIgG4は、Fcγ受容体への自然に低減された結合を有し、したがって、これらの骨格は、切断変異体と共に、または切断変異体を伴わずに使用することができる。

【0150】

I. ヘテロ二量体およびFc変異体の組み合わせ

当業者に理解されるように、「鎖性」または「単量体区分（monomer partition）」が保持される限り、列記されるヘテロ二量体化変異体（非対称および／またはpI変異体を含む）はすべて、任意選択かつ独立して、何らかの方法で組み合わせることができる。加えて、これらの変異体はすべて、ヘテロ二量体化型のいずれかに組み入れることができる。

【0151】

pI変異体の場合、特に有用な実施形態は、図に示されているが、精製の容易化のために2つの単量体間のpI差異を変える基礎的な規則に従って、他の組み合わせを生成することができる。

【0152】

加えて、ヘテロ二量体化変異体、非対称、およびpIのうちのいずれかはまた、一般的に本明細書に概説されるように、Fc切断変異体、Fc変異体、FcRn変異体と独立かつ任意選択で組み合わせられる。

【0153】

V. 本発明の有用な型

当業者に理解され、以下により完全に論じられるように、本発明の二重特異性ヘテロ二量体抗体は、一般に、図1に示されるように、多種多様の立体配置をとることができる。いくつかの図は、分子の一方の「アーム」上に1種類の特異性、およびもう一方の「アーム」上に異なる特異性がある「シングルエンド化（single ended）」立体配置を示す。他の図は、分子の「上部」に少なくとも1種類の特異性、および分子の「下部」に1つ以上の異なる特異性がある「二重エンド化（dual ended）」立体配置を示す。したがって、本発明は、異なる第1の抗原および第2の抗原を共捕捉する新規の免

10

20

30

40

50

疫グロブリン組成物を対象とする。

【0154】

当業者に理解されるように、本発明のヘテロ二量体型は、異なる結合価を有し、かつ二重特異性であってよい。すなわち、本発明のヘテロ二量体抗体は、二価かつ二重特異性であってよく、一方のチェックポイント標的が、1つのABDによって結合され、もう一方のチェックポイント標的が、第2のABDによって結合される。ヘテロ二量体抗体はまた、三価かつ二重特異性であってよく、第1の抗原が、2つのABDによって結合され、第2の抗原が、第2のABDによって結合される。

【0155】

A. 栓抜き型

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、「三重F」または図1Aに示される「栓抜き」足場型である。この実施形態では、抗体の一方の重鎖は、単鎖Fv（以下に定義される「scFv」）を含有し、もう一方の重鎖は、「定型的な」Fab型であって、可変重鎖および軽鎖を含む。この構造は、本明細書で「三重F」型（scFv-Fab-Fc）、または栓抜きにおおよそ視覚的に類似している（図1A参照）ことから「栓抜き」型と呼ばれることがある。2つの鎖は、ヘテロ二量体抗体の形成を促進する定常領域（例えば、Fcドメイン、CH1ドメイン、および／またはヒンジ領域）において、アミノ酸変異体を使用することによって一緒にまとめられており、以下に、より完全に説明される。

【0156】

本「三重F」型には、いくつかの明確に異なる利点が存在する。当該技術分野で知られるように、2つのscFv構築物に依存する抗体類似体は、安定性および凝集の問題を有することが多いが、本発明においては、「定型的な」重鎖および軽鎖の対を追加することによって、こうした問題を軽減することができる。加えて、2つの重鎖および2つの軽鎖に依存する型とは対照的に、重鎖および軽鎖が、不正確に対になる（例えば、重1が、軽2と対になる等）という問題は存在しない。

【0157】

本明細書に概説される実施形態の多くは、一般に、scFvを含む第1の単量体を含む栓抜き型に依存し、このscFvは、scFvリンカー（全ての場合ではないが、多くの場合において帯電している）を使用して共有結合される可変重ドメインおよび可変軽ドメインを含み、scFvは、通常ドメインリンカー（本明細書に概説されるように、非帯電であるか、または帯電されているかのいずれかであってよい）を介して、第1のFcドメインのN末端に共有結合され、また外因性または内因性（例えば、ネイティブヒンジドメインすべてまたはその一部）であり得る。栓抜き型の第2の単量体は重鎖であり、組成物は、軽鎖をさらに含む。

【0158】

加えて、栓抜き型のFcドメインは、一般に、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q：L368D/K370S、L368D/K370S：S364K、L368E/K370S：S364K、T411T/E360E/Q362E：D401K、L368D/K370S：S364K/E357L、K370S：S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V：T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C：T366W/S354Cからなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）、任意選択で帯電scFvリンカー（図7に示されるものを含む）を含み、重鎖はpI変異体を含む（図4に示されるものを含む）。

【0159】

いくつかの実施形態では、栓抜き型は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電scFvリンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G23

10

20

30

40

50

6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに本明細書で概説するチェックポイント受容体に結合する F v を含む第 1 の単量体 (「s c F v 単量体」) と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント受容体に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体 (「F a b 単量体」) と、c) 軽鎖と、を含む。この特定の実施形態では、好適な単量体 F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) P D - 1 および C T L A - 4、C T L A - 4 および P D - 1、P D - 1 および T I M - 3、T I M - 3 および P D - 1、P D - 1 および L A G - 3、L A G - 3 X P D 1、P D - 1 および T I G I T、T I G I T および P D - 1、P D - 1 および B T L A、B T L A および P D - 1、C T L A - 4 および T I M - 3、T I M - 3 および C T L A - 4、C T L A - 4 および L A G - 3、L A G - 3 および C T L A - 4、C T L A - 4 および T I G I T、T I G I T および C T L A - 4、C T L A - 4 および B T L A、B T L A および C T L A - 4、T I M - 3 および L A G - 3、L A G - 3 および T I M - 3、T I M - 3 および T I G I T、T I G I T および T I M - 3、T I M - 3 および B T L A、B T L A および T I M - 3、L A G - 3 および T I G I T、T I G I T および L A G - 3、L A G - 3 および B T L A、B T L A および L A G - 3、B T L A および T I G I T、ならびに T I G I T および B T L A が挙げられる。この特定の実施形態では、これらの変異体を有する栓抜きは、P D - 1 に結合する A B D 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を含む s c F v 側を有し、特に有用である。この特定の
10
20
実施形態では、これらの変異体を有する栓抜きは、C T L A - 4 に結合する [C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 9 A B D を含む s c F v 側を有し、特に有用である。

【0160】

いくつかの実施形態、特に栓抜き型における特定の使用ものは、C T L A - 4 X P D - 1、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、T I M - 3 X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 である。

【0161】

これらの組み合わせの A B D 配列は、配列リストに開示されるか、または図 9 ~ 1 3 に示されるとおりであり、図 3 9 および図 4 0 に示される任意の組み合わせであり得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、栓抜き型は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電 s c F v リンカー (いくつかの実施形態では、図 7 の + H 配列が好ましい)、非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する F v を含む第 1 の単量体 (「s c F v 単量体」) と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体 (「F a b 単量体」) と、c) 軽鎖と、を含む。この特定の実施形態では、好適な F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) P D - 1 および C T L A - 4、C T L A - 4 および P D - 1、P D - 1 および T I M - 3、T I M - 3 および P D - 1、P D - 1 および L A G - 3、L A G - 3 X P D 1、P D - 1 および T I G I T、T I G I T および P D - 1、P D - 1 および B T L A、B T L A および P D - 1、C T L A - 4 および T I M - 3、T I M - 3 および C T L A - 4、C T L A - 4 および L A G - 3、L A G - 3 および C T L A - 4、C T L A - 4 および T I G I T、T I G I T および C T L A - 4、C T L A - 4 および B T L A、B T L A および C T L A - 4、T I M - 3 および L A G - 3、L A G - 3 および T I M - 3、T I M - 3 および T I G I T、T I G I T および T I
30
40
50

M-3、TIM-3およびBTLA、BTLAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBTLA、BTLAおよびLAG-3、BTLAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBTLA。この特定の実施形態では、これらの変異体を有する栓抜きは、PD-1に結合するABD 1G6__L1.194__H1.279を含むscFv側を有し、特に有用である。この特定の実施形態では、これらの変異体を有する栓抜きは、CTLA-4に結合する[CTLA-4]__H3.23__L0.129 ABDを含むscFv側を有し、特に有用である。

【0163】

いくつかの実施形態、特に栓抜き型における特定の使用ものは、CTLA-4 X PD-1、LAG-3 X PD-1、BTLA X PD-1、TIM-3 X PD-1、およびLAG-3 X CTLA-4である。

【0164】

具体的には、図37は、本発明に使用され得るFv配列を欠くいくつかの栓抜き「骨格」配列を示す。すなわち、scFv部分およびFab部分のFv配列は、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびTIM-3、PD-1およびLAG-3、PD-1およびTIGIT、PD-1およびBTLA、CTLA-4およびTIM-3、CTLA-4およびLAG-3、CTLA-4およびTIGIT、CTLA-4およびBTLA、TIM-3およびLAG-3、TIM-3およびTIGIT、TIM-3およびBTLA、LAG-3およびTIGIT、LAG-3およびBTLA、ならびにTIGITおよびBTLAのいずれの組み合わせから使用され得る。配列は、本明細書において配列表および／または図9～13に開示されるもののうちのいずれかであり得る。

【0165】

図37の栓抜き骨格1について、本発明における特定のFvの使用の組み合わせとしては、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびTIM-3、PD-1およびLAG-3、PD-1およびTIGIT、PD-1およびBTLA、CTLA-4およびTIM-3、CTLA-4およびLAG-3、CTLA-4およびTIGIT、CTLA-4およびBTLA、TIM-3およびLAG-3、TIM-3およびTIGIT、TIM-3およびBTLA、LAG-3およびTIGIT、LAG-3およびBTLA、ならびにTIGITおよびBTLAが挙げられる。配列は、本明細書において配列表および／または図9～13に開示されるもののうちのいずれかであり得る。

【0166】

図37の栓抜き骨格1について、本発明における特定のFvの使用の組み合わせとしては、CTLA-4 (Fab) X PD-1 (scFv)、PD-1 (Fab) X CTLA-4 (scFv)、LAG-3 (Fab) X PD-1 (scFv)、BTLA (Fab) X PD-1 (scFv)、およびLAG-3 (Fab) X CTLA-4 (scFv)が挙げられる。

【0167】

図37の栓抜き骨格1（任意選択で428L／434S変異体を含む）について、ヒトPD-1に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1、ならびに配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146のリストに記載されるものが挙げられる。

【0168】

図37の栓抜き骨格1（任意選択で428L／434S変異体を含む）について、ヒトCTLA-4に結合する特定のABDとしては、限定されないが、[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA

10

20

30

40

50

-4] __H0.70__L0、[CTLA-4] __H0__L0.22、[CTLA-4] __H2__L0、[CTLA-4] __H3.21__L0.124、[CTLA-4] __H3.21__L0.129、[CTLA-4] __H3.21__L0.132、[CTLA-4] __H3.23__L0.124、[CTLA-4] __H3.23__L0.129、[CTLA-4] __H3.23__L0.132、[CTLA-4] __H3.25__L0.124、[CTLA-4] __H3.25__L0.129、[CTLA-4] __H3.25__L0.132、[CTLA-4] __H3.4__L0.118、[CTLA-4] __H3.4__L0.119、[CTLA-4] __H3.4__L0.12、[CTLA-4] __H3.4__L0.121、[CTLA-4] __H3.4__L0.122、[CTLA-4] __H3.4__L0.123、[CTLA-4] __H3.4__L0.124、[CTLA-4] __H3.4__L0.125、[CTLA-4] __H3.4__L0.126、[CTLA-4] __H3.4__L0.127、[CTLA-4] __H3.4__L0.128、[CTLA-4] __H3.4__L0.129、[CTLA-4] __H3.4__L0.130、[CTLA-4] __H3.4__L0.131、[CTLA-4] __H3.4__L0.132、[CTLA-4] __H3.5__L2.1、[CTLA-4] __H3.5__L2.2、[CTLA-4] __H3.5__L2.3、[CTLA-4] __H3__L0、[CTLA-4] __H3__L0.22、[CTLA-4] __H3__L0.44、[CTLA-4] __H3__L0.67、および [CTLA-4] __H3__L0.74、ならびに配列番号21~2918、配列番号2919~6208、配列番号36739~36818、および配列番号35395~35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0169】

図37の栓抜き骨格1（任意選択で428L／434S変異体を含む）について、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号35417~35606、配列番号25194~32793、および配列番号32794~33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0170】

図37の栓抜き骨格1（任意選択で428L／434S変異体を含む）について、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885~21503および配列番号36707~36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0171】

図37の栓抜き骨格1（任意選択で428L／434S変異体を含む）について、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765~20884、配列番号37587~37698、および配列番号36347~36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0172】

具体的な栓抜きの実施形態を以下に概説する。

【0173】

10

20

30

40

50

B. mAb-Fv型

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Hに示されるmAb-Fv型である。この実施形態では、型は、一方の単量体に対する「余分な」可変重ドメインのC末端結合、およびもう一方の単量体に対する「余分な」可変軽ドメインのC末端結合の使用に依存し、したがって、第3の抗原結合ドメインを形成し、2つの単量体のFab部分は、1つのチェックポイント標的に結合し、「余分な」scFvドメインは、異なるチェックポイント標的に結合する。

【0174】

この実施形態では、第1の単量体は、第1の可変重ドメインおよび第1の定常重ドメインを含む第1の重鎖を含み、この第1の定常重ドメインは、ドメインリンカーを使用して第1のFcドメインのC末端に共有結合される第1の可変軽ドメインを有する第1のFcドメインを含む(vh1-CH1-ヒンジ-CH2-CH3-[任意選択のリンカー]-vl2)。第2の単量体は、第2のFcドメインを含む第2の定常重ドメインの第2の可変重ドメインと、ドメインリンカーを使用して第2のFcドメインのC末端に共有結合される第3の可変重ドメインとを含む(vh1-CH1-ヒンジ-CH2-CH3-[任意選択のリンカー]-vh2)。2つのC末端に結合された可変ドメインは、scFvを作りあげる。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む共通の軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、2つの同一Fabを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、pI変異体、切断変異体、追加のFc変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なFvの対としては、(Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する)PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3XPD1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBTLA、BTLAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBTLA、BTLAおよびCTLA-4、TIM-3およびLAG-3、LAG-3およびTIM-3、TIM-3およびTIGIT、TIGITおよびTIM-3、TIM-3およびBTLA、BTLAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBTLA、BTLAおよびLAG-3、BTLAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBTLA。

【0175】

これらの組み合わせのABD配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0176】

加えて、mAb-Fv型のFcドメインは、非対称変異体(例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354Cからなる群から選択される)、任意選択で切断変異体(図5に示されるものを含む)、任意選択で帯電scFvリンカー(図7に示されるものを含む)を含み、重鎖はpI変異体を含む(図4に示されるものを含む)。

【0177】

いくつかの実施形態では、mAb-Fv型は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a)非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに軽鎖の第1の可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に

10

20

30

40

50

結合するFvを作りあげる第1の変重ドメイン、および第2の変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに第1の変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の変重ドメイン、および第2の変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv(ABD)を形成する第2の変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1の変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(Fab-scFvの順)CTLA-4XPD-1、LAG-3XPD-1、BTLAXPD-1、およびLAG-3XCTLA-4である。

10

【0178】

いくつかの実施形態では、mAb-Fv型は、非対称変異体、pI変異体、切断変異体、およびFcRn変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに軽鎖の第1の変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の変重ドメイン、および第2の変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに第1の変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の変重ドメイン、および第2の変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv(ABD)を形成する第2の変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1の変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(Fab-scFvの順)CTLA-4XPD-1、LAG-3XPD-1、BTLAXPD-1、およびLAG-3XCTLA-4である。

20

【0179】

図38のmAb-scFv骨格1(任意選択でM428L/N434Sを含む)に類似するmAb-Fv配列について、ヒトPD-1に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1、ならびに配列番号6209~11464、配列番号11465~17134、配列番号33003~33072、配列番号33073~35394、および配列番号36127~36146のリストに記載されるものが挙げられる。

30

【0180】

図38のmAb-scFv骨格1(任意選択でM428L/N434Sを含む)に類似するmAb-Fv配列について、ヒトCTLA-4に結合する特定のABDとしては、限定されないが、[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA-4]__H0.70__L0、[CTLA-4]__H0__L0.22、[CTLA-4]__H2__L0、[CTLA-4]__H3.21__L0.124、[CTLA-4]__H3.21__L0.129、[CTLA-4]__H3.21__L0.132、[CTLA-4]__H3.23__L0.124、[CTLA-4]__H3.23__L0.129、[CTLA-4]__H3.23__L0.132、[CTLA-4]__H3.25__L0.124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.

40

50

12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.122、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74、ならびに配列番号21~2918、配列番号2919~6208、配列番号36739~36818、および配列番号35395~35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0181】

図38のmAb-s c F v骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）に類似するmAb-s c F v配列について、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号35417~35606、配列番号25194~32793、および配列番号32794~33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0182】

図38のmAb-s c F v骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）に類似するmAb-F v配列について、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1、および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885~21503および配列番号36707~36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0183】

図38のmAb-s c F v骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）に類似するmAb-F v配列について、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765~20884、配列番号37587~37698、および配列番号36347~36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0184】

C. mAb-s c F v

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Iに示されるmAb-s c F v型である。この実施形態では、型は、単量体のうちの1つに対するs c F vのC末端結合の使用に依存し、したがって、第3の抗原結合ドメインを形成し、2つの単量体のFab部分は、1つのチェックポイント標的に結合し、「余分な」s c F vドメインは、異なるチェックポイント標的に結合する。

【0185】

この実施形態では、第1の単量体は第1の重鎖を含み（可変重ドメインおよび定常ドメインを含む）、C末端共有結合されるs c F vは、いずれかの配向（v h 1－C H 1－ヒンジ－C H 2－C H 3－[任意選択のリンカー]－v h 2－s c F vリンカー－v l 2またはv h 1－C H 1－ヒンジ－C H 2－C H 3－[任意選択のリンカー]－v l 2－s c F vリンカー－v h 2）で、s c F v可変軽ドメイン、s c F vリンカー、およびs c F v可変重ドメインを含む。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む共通の軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、標的抗原のうちの1つに結合する2つの同一F a bを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、p I変異体、切断変異体、追加のF c変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なF vの対としては、（F a bを最初に記載し、次にs c F vを記載する）P D－1およびC T L A－4、C T L A－4およびP D－1、P D－1およびT I M－3、T I M－3およびP D－1、P D－1およびL A G－3、L A G－3 X P D 1、P D－1およびT I G I T、T I G I TおよびP D－1、P D－1およびB T L A、B T L AおよびP D－1、C T L A－4およびT I M－3、T I M－3およびC T L A－4、C T L A－4およびL A G－3、L A G－3およびC T L A－4、C T L A－4およびT I G I T、T I G I TおよびC T L A－4、C T L A－4およびB T L A、B T L AおよびC T L A－4、T I M－3およびL A G－3、L A G－3およびT I M－3、T I M－3およびT I G I T、T I G I TおよびT I M－3、T I M－3およびB T L A、B T L AおよびT I M－3が挙げられる。L A G－3およびT I G I T、T I G I TおよびL A G－3、L A G－3およびB T L A、B T L AおよびL A G－3、B T L AおよびT I G I T、ならびにT I G I TおよびB T L A。

【0186】

これらの組み合わせのA B D配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0187】

加えて、m A b－s c F v型のF cドメインは、一般に、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S 3 6 4 K／E 3 5 7 Q：L 3 6 8 D／K 3 7 0 S、L 3 6 8 D／K 3 7 0 S：S 3 6 4 K、L 3 6 8 E／K 3 7 0 S：S 3 6 4 K、T 4 1 1 T／E 3 6 0 E／Q 3 6 2 E：D 4 0 1 K、L 3 6 8 D／K 3 7 0 S：S 3 6 4 K／E 3 5 7 L、K 3 7 0 S：S 3 6 4 K／E 3 5 7 Q、T 3 6 6 S／L 3 6 8 A／Y 4 0 7 V：T 3 6 6 W、およびT 3 6 6 S／L 3 6 8 A／Y 4 0 7 V／Y 3 4 9 C：T 3 6 6 W／S 3 5 4 Cからなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）、任意選択で帯電s c F vリンカー（図7に示されるものを含む）を含み、重鎖はp I変異体を含む（図4に示されるものを含む）。

【0188】

いくつかの実施形態では、m A b－s c F v型は、非対称変異体、p I変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体S 3 6 4 K／E 3 5 7 Q、切断変異体E 2 3 3 P／L 2 3 4 V／L 2 3 5 A／G 2 3 6 d e l／S 2 6 7 K、ならびに軽鎖の第1の可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するF vを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L 3 6 8 D／K 3 7 0 S、p I変異体N 2 0 8 D／Q 2 9 5 E／N 3 8 4 D／Q 4 1 8 E／N 4 2 1 D、切断変異体E 2 3 3 P／L 2 3 4 V／L 2 3 5 A／G 2 3 6 d e l／S 2 6 7 K、ならびに第1の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するF vを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するF v（A B D）を形成する第2の可変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、（F a b－s c F vの順）C T L A－4 X P D－1、L A G－3 X P D－1、B T L A X P D－1、およびL A G－3 X C T

LA-4である。

【0189】

いくつかの実施形態では、mAb-scFv型は、非対称変異体、pI変異体、切断変異体、およびFcRn変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに軽鎖の第1の可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに第1の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv(ABD)を形成する第2の可変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。mAb-scFv型において、本発明における特定のFvの使用の組み合わせとしては、CTLA-4(Fab)XPD-1(scFv)、PD-1(Fab)XCTLA-4(scFv)、LAG-3(Fab)XPD-1(scFv)、BTLA(Fab)XPD-1(scFv)、およびLAG-3(Fab)XCTLA-4(scFv)が挙げられる。

【0190】

図38のmAb-scFv骨格1(任意選択でM428L/N434Sを含む)において、ヒトPD-1に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1G6_H1.279_L1.194、1G6_H1.280_L1.224、1G6_L1.194_H1.279、1G6_L1.210_H1.288、および2E9_H1L1、ならびに配列番号6209~11464、配列番号11465~17134、配列番号33003~33072、配列番号33073~35394、および配列番号36127~36146のリストに記載されるものが挙げられる。

【0191】

図38のmAb-scFv骨格1(任意選択でM428L/N434Sを含む)において、ヒトCTLA-4に結合する特定のABDとしては、限定されないが、[CTLA-4]_H0.25_L0、[CTLA-4]_H0.26_L0、[CTLA-4]_H0.27_L0、[CTLA-4]_H0.29_L0、[CTLA-4]_H0.38_L0、[CTLA-4]_H0.39_L0、[CTLA-4]_H0.40_L0、[CTLA-4]_H0.70_L0、[CTLA-4]_H0_L0.22、[CTLA-4]_H2_L0、[CTLA-4]_H3.21_L0.124、[CTLA-4]_H3.21_L0.129、[CTLA-4]_H3.21_L0.132、[CTLA-4]_H3.23_L0.124、[CTLA-4]_H3.23_L0.129、[CTLA-4]_H3.23_L0.132、[CTLA-4]_H3.25_L0.124、[CTLA-4]_H3.25_L0.129、[CTLA-4]_H3.25_L0.132、[CTLA-4]_H3.4_L0.118、[CTLA-4]_H3.4_L0.119、[CTLA-4]_H3.4_L0.12、[CTLA-4]_H3.4_L0.121、[CTLA-4]_H3.4_L0.122、[CTLA-4]_H3.4_L0.123、[CTLA-4]_H3.4_L0.124、[CTLA-4]_H3.4_L0.125、[CTLA-4]_H3.4_L0.126、[CTLA-4]_H3.4_L0.127、[CTLA-4]_H3.4_L0.128、[CTLA-4]_H3.4_L0.129、[CTLA-4]_H3.4_L0.130、[CTLA-4]_H3.4_L0.131、[CTLA-4]_H3.4_L0.132、[CTLA-4]_H3.5_L2.1、[CTLA-4]_H3.5_L2.2、[CTLA-4]_H3.5_L2.3、[CTLA-4]_H3_L0、[CTLA-

4] __H3__L0.22、[CTLA-4] __H3__L0.44、[CTLA-4] __H3__L0.67、および[CTLA-4] __H3__L0.74、ならびに配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0192】

図38のmAb-scFv骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）において、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0193】

図38のmAb-scFv骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）において、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1、および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0194】

図38のmAb-scFv骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）において、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0195】

D. 中心scFv

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Fに示される中心scFv型である。この実施形態では、型は、挿入scFvドメインの使用に依存し、したがって、第3の抗原結合ドメインを形成し、2つの単量体のFab部分は、一方のチェックポイント標的に結合し、「余分な」scFvドメインは、もう一方のチェックポイント標的に結合する。scFvドメインは、単量体のうちの1つのFcドメインとCH1-Fv領域との間に挿入され、したがって、第3の抗原結合ドメインを提供する。

【0196】

この実施形態では、1つの単量体は、第1的可変重ドメイン、CH1ドメイン（および任意選択のヒンジ）、およびFcドメインを含む第1の重鎖を含み、scFvは、scFv可変軽ドメイン、scFvリンカー、およびscFv可変重ドメインを含む。scFvは、任意選択のドメインリンカーを使用して、重定常ドメインのCH1ドメインのC末端と第1のFcドメインのN末端との間で共有結合される（vh1-CH1-〔任意選択のリンカー〕-vh2-scFvリンカー-vl2-〔ヒンジを含む任意選択のリンカー〕-CH2-CH3、またはscFvのための反対の配向、vh1-CH1-〔任意選択の

リンカー]－v l 2－s c F v リンカー－v h 2－[ヒンジを含む任意選択のリンカー]－C H 2－C H 3)。他の単量体は標準的な F a b 側である。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む共通の軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、チェックポイント阻害剤に結合する 2 つの同一 F a b を形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、追加の F c 変異体などが含まれる。この実施形態では、好適な F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) P D－1 および C T L A－4、C T L A－4 および P D－1、P D－1 および T I M－3、T I M－3 および P D－1、P D－1 および L A G－3、L A G－3 X P D 1、P D－1 および T I G I T、T I G I T および P D－1、P D－1 および B T L A、B T L A および P D－1、C T L A－4 および T I M－3、T I M－3 および C T L A－4、C T L A－4 および L A G－3、L A G－3 および C T L A－4、C T L A－4 および T I G I T、T I G I T および C T L A－4、C T L A－4 および B T L A、B T L A および C T L A－4、T I M－3 および L A G－3、L A G－3 および T I M－3、T I M－3 および T I G I T、T I G I T および T I M－3、T I M－3 および B T L A、B T L A および T I M－3 が挙げられる。L A G－3 および T I G I T、T I G I T および L A G－3、L A G－3 および B T L A、B T L A および L A G－3、B T L A および T I G I T、ならびに T I G I T および B T L A。

【0197】

これらの組み合わせの A B D 配列は、配列表に開示されるか、または図 9～13 に示されるとおりであり、図 39 および図 40 に示される任意の組み合わせであり得る。

【0198】

加えて、中心 s c F v 型の F c ドメインは、一般に、非対称変異体（例えば、図 3 および図 8 に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、L 3 6 8 E / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、T 4 1 1 T / E 3 6 0 E / Q 3 6 2 E : D 4 0 1 K、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 L、K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V : T 3 6 6 W、および T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C : T 3 6 6 W / S 3 5 4 C からなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図 5 に示されるものを含む）、任意選択で帯電 s c F v リンカー（図 7 に示されるものを含む）を含み、重鎖は p I 変異体を含む（図 4 に示されるものを含む）。

【0199】

いくつかの実施形態では、中心 s c F v 型は、非対称変異体、p I 変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適な F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) C T L A－4 X P D－1、P D－1 X C T L A－4、L A G－3 X P D－1、B T L A X P D－1、および L A G－3 X C T L A－4 を含む。

【0200】

いくつかの実施形態では、中心 s c F v 型は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S

10

20

30

40

50

3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、FcRn 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、FcRn 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適な F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) C T L A - 4 X P D - 1、P D - 1 X C T L A - 4、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 を含む。

【0201】

図 37 の栓抜き骨格 1 に類似する／栓抜き骨格を利用する中心 s c F v 配列（任意選択で M 4 2 8 L / N 4 3 4 S を含む）について、本発明における特定の F v の使用の組み合わせとしては、C T L A - 4 (F a b) X P D - 1 (s c F v)、P D - 1 (F a b) X C T L A - 4 (s c F v)、L A G - 3 (F a b) X P D - 1 (s c F v)、B T L A (F a b) X P D - 1 (s c F v)、および L A G - 3 (F a b) X C T L A - 4 (s c F v) が挙げられる。

【0202】

図 37 の栓抜き骨格 1 に類似する／栓抜き骨格を利用する中心 s c F v 配列（任意選択で M 4 2 8 L / N 4 3 4 S を含む）について、ヒト P D - 1 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、1 G 6 _ H 1 . 2 7 9 _ L 1 . 1 9 4、1 G 6 _ H 1 . 2 8 0 _ L 1 . 2 2 4、1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9、1 G 6 _ L 1 . 2 1 0 _ H 1 . 2 8 8、および 2 E 9 _ H 1 L 1、ならびに配列番号 6 2 0 9 ~ 1 1 4 6 4、配列番号 1 1 4 6 5 ~ 1 7 1 3 4、配列番号 3 3 0 0 3 ~ 3 3 0 7 2、配列番号 3 3 0 7 3 ~ 3 5 3 9 4、および配列番号 3 6 1 2 7 ~ 3 6 1 4 6 のリストに記載されるものが挙げられる。

【0203】

図 37 の栓抜き骨格 1 に類似する／栓抜き骨格を利用する中心 s c F v 配列（任意選択で M 4 2 8 L / N 4 3 4 S を含む）について、ヒト C T L A - 4 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 5 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 6 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 7 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 8 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 4 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 7 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 _ L 0 . 2 2、[C T L A - 4] _ H 2 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 3、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 5、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 6、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 7、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 5 _ L 2 . 1、[

CTLA-4] __H3.5 __L2.2、[CTLA-4] __H3.5 __L2.3、[CTLA-4] __H3 __L0、[CTLA-4] __H3 __L0.22、[CTLA-4] __H3 __L0.44、[CTLA-4] __H3 __L0.67、および[CTLA-4] __H3 __L0.74、ならびに配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0204】

図37の栓抜き骨格1に類似する／栓抜き骨格を利用する中心scFv配列（任意選択でM428L／N434Sを含む）について、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11 __H0L0、2A11 __H1.125 __L2.113、2A11 __H1.144 __L2.142、2A11 __H1 __L2.122、2A11 __H1 __L2.123、2A11 __H1 __L2.124、2A11 __H1 __L2.25、2A11 __H1 __L2.47、2A11 __H1 __L2.50、2A11 __H1 __L2.91、2A11 __H1 __L2.93、2A11 __H1 __L2.97、2A11 __H1L1、2A11 __H1L2、2A11 __H2L2、2A11 __H3L1、2A11 __H3L2、2A11 __H4L1、2A11 __H4L2、7G8 __H0L0、7G8 __H1L1、7G8 __H3.18 __L1.11、7G8 __H3.23 __L1.11、7G8 __H3.28 __L1、7G8 __H3.28 __L1.11、7G8 __H3.28 __L1.13、7G8 __H3.30 __L1.34、7G8 __H3.30 __L1.34、および7G8 __H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0205】

図37の栓抜き骨格1に類似する／栓抜き骨格を利用する中心scFv配列（任意選択でM428L／N434Sを含む）について、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6 __H0L0、9C6 __H1.1 __L1、および9C6 __H1.11 __L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0206】

図37の栓抜き骨格1に類似する／栓抜き骨格を利用する中心scFv配列（任意選択でM428L／N434Sを含む）について、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10 __H0L0、1D12 __H0L0、3H3 __H1 __L2.1、6C8 __H0L0、6D9 __H0 __1D12 __L0、7A9 __H0L0、7B11 __H0L0、7B11var __H0L0、および7C2 __H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0207】

E. 中心Fv型

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Gに示される中心Fv型である。この実施形態では、型は、挿入scFvドメインの使用に依存し、したがって、第3の抗原結合ドメインを形成し、2つの単量体のFab部分は、一方のチェックポイント標的に結合し、「余分な」scFvドメインは、もう一方のチェックポイント標的に結合する。scFvドメインは、単量体のFcドメインとCH1-Fv領域との間に挿入され、したがって、第3の抗原結合ドメインを提供し、各単量体は、scFvの構成要素を含有する（例えば、一方の単量体は、可変重ドメインを含み、もう一方は、可変軽ドメインを含む）。

【0208】

この実施形態では、一方の単量体は、第1の可変重ドメイン、CH1ドメイン、およびFcドメイン、ならびに追加の可変軽ドメインを含む第1の重鎖を含む。軽ドメインは、ドメインリンカーを使用して重定常ドメインのCH1ドメインのC末端と第1のFcドメイ

ンのN末端との間で共有結合される（ $v h 1 - C H 1 - [任意選択のリンカー] - v l 2 -$ ヒンジ- $C H 2 - C H 3$ ）。もう一方の単量体は、第1の可変重ドメイン、 $C H 1$ ドメイン、およびFcドメイン、ならびに追加の可変重ドメインを含む第1の重鎖を含む（ $v h 1 - C H 1 - [任意選択のリンカー] - v h 2 -$ ヒンジ- $C H 2 - C H 3$ ）。軽ドメインは、ドメインリンカーを使用して重定常ドメインの $C H 1$ ドメインのC末端と第1のFcドメインのN末端との間で共有結合される。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む共通の軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、TTAに結合する2つの同一Fabを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、pI変異体、切断変異体、追加のFc変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なFvの対としては、（Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する）PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3 X PD1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBTLA、BTLAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBTLA、BTLAおよびCTLA-4、TIM-3およびLAG-3、LAG-3およびTIM-3、TIM-3およびTIGIT、TIGITおよびTIM-3、TIM-3およびBTLA、BTLAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBTLA、BTLAおよびLAG-3、BTLAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBTLA。

【0209】

これらの組み合わせのABD配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0210】

中心scFv型において、本発明における特定のFvの使用の組み合わせとしては、CTLA-4（Fab）XPD-1（scFv）、PD-1（Fab）XCTLA-4（scFv）、LAG-3（Fab）XPD-1（scFv）、BTLA（Fab）XPD-1（scFv）、およびLAG-3（Fab）XCTLA-4（scFv）が挙げられる。

【0211】

中心scFv型において、ヒトPD-1に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1、ならびに配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146のリストに記載されるものが挙げられる。

【0212】

中心scFv型において、ヒトCTLA-4に結合する特定のABDとしては、限定されないが、[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA-4]__H0.70__L0、[CTLA-4]__H0__L0.22、[CTLA-4]__H2__L0、[CTLA-4]__H3.21__L0.124、[CTLA-4]__H3.21__L0.129、[CTLA-4]__H3.21__L0.132、[CTLA-4]__H3.23__L0.124、[CTLA-4]__H3.23__L0.129、[CTLA-4]__H3.23__L0.132、[CTLA-4]__H3.25__L0.124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.1

22、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74、ならびに配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のリストに記載されるものが挙げられる。

10

【0213】

中心s c F v型において、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

20

【0214】

中心s c F v型において、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0；9C6__H1.1__L1および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

30

【0215】

中心s c F v型において、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

40

【0216】

F. 片腕中心s c F v

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Cに示される片腕中心s c F v型である。この実施形態では、一方の単量体は、Fcドメインのみを含み、もう一方の単量体は、挿入s c F vドメインを使用し、したがって、第2の抗原結合ドメインを形成する。この型では、Fab部分のいずれかが1つのチェックポイント標的に結合し、s c F vは別のチェックポイント標的に結合する。s c F vドメインは、単量体のうちの1つのFcドメインとCH1-Fv領域との間に挿入される。

【0217】

この実施形態では、1つの単量体は、s c F v可変軽ドメイン、s c F vリンカー、およびs c F v可変重ドメインを含むs c F vを有する第1の可変重ドメイン、CH1ドメイ

50

ン、およびFcドメインを含む第1の重鎖を含む。scFvは、ドメインリンカーを使用して重定常ドメインのCH1ドメインのC末端と第1のFcドメインのN末端との間で共有結合される。第2の単量体は、Fcドメインを含む。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、Fabを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、pI変異体、切断変異体、追加のFc変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なFvの対としては、(Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する)PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3XPD1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBTLA、BTLAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBTLA、BTLAおよびCTLA-4、TIM-3およびLAG-3、LAG-3およびTIM-3、TIM-3およびTIGIT、TIGITおよびTIM-3、TIM-3およびBTLA、BTLAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBTLA、BTLAおよびLAG-3、BTLAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBTLA。

【0218】

これらの組み合わせのABD配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0219】

加えて、片腕中心scFv型のFcドメインは、一般に、非対称変異体(例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W、およびT366S/L368A/Y407V Y349C:T366W/S354Cからなる群から選択される)、任意選択で切断変異体(図5に示されるものを含む)、任意選択で帯電scFvリンカー(図7に示されるものを含む)を含み、重鎖はpI変異体を含む(図4に示されるものを含む)。

【0220】

いくつかの実施形態では、片腕中心scFv型は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a)非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに軽鎖の第1の可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重ドメインを含む第1の単量体と、b)非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに第1の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv(ABD)を形成する第2の可変軽鎖を含む第2の単量体と、c)第1の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適なFvの対としては、(Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する)CTLA-4XPD-1、PD-1XCTLA-4、LAG-3XPD-1、BTLA XPD-1、およびLAG-3XCTLA-4を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、片腕中心scFv型は、非対称変異体、pI変異体、切断変異体、およびFcRn変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a)非対称変異

10

20

30

40

50

体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、FcRn 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、FcRn 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適な F v の対としては、(F a b を最初に記載し、次に s c F v を記載する) C T L A - 4 X P D - 1、P D - 1 X C T L A - 4、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 を含む。

【0222】

片腕中心 s c F v 型において、ヒト P D - 1 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、1 G 6 _ H 1 . 2 7 9 _ L 1 . 1 9 4、1 G 6 _ H 1 . 2 8 0 _ L 1 . 2 2 4、1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9、1 G 6 _ L 1 . 2 1 0 _ H 1 . 2 8 8、および 2 E 9 _ H 1 L 1、ならびに配列番号 6 2 0 9 ~ 1 1 4 6 4、配列番号 1 1 4 6 5 ~ 1 7 1 3 4、配列番号 3 3 0 0 3 ~ 3 3 0 7 2、配列番号 3 3 0 7 3 ~ 3 5 3 9 4、および配列番号 3 6 1 2 7 ~ 3 6 1 4 6 のリストに記載されるものが挙げられる。

【0223】

片腕中心 s c F v 型において、ヒト C T L A - 4 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 5 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 6 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 7 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 8 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 4 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 7 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 _ L 0 . 2 2、[C T L A - 4] _ H 2 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 3、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 5、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 6、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 7、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 5 _ L 2 . 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 5 _ L 2 . 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 5 _ L 2 . 3、[C T L A - 4] _ H 3 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 2 2、[C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 4 4、[C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 6 7、および [C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 7 4、ならびに配列番号 2 1 ~ 2 9 1 8、配列番号 2 9 1 9 ~ 6 2 0 8、配列番号 3 6 7 3 9 ~ 3 6 8 1 8、および配列番号 3 5 3 9 5 ~ 3 5 4 1 6 のリストに記載されるものが挙げられる。

【0224】

片腕中心 s c F v 型において、ヒト L A G - 3 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、2 A 1 1 _ H 0 L 0、2 A 1 1 _ H 1 . 1 2 5 _ L 2 . 1 1 3、2 A 1 1 _ H

10

20

30

40

50

1. 144__L2. 142、2A11__H1__L2. 122、2A11__H1__L2. 123、2A11__H1__L2. 124、2A11__H1__L2. 25、2A11__H1__L2. 47、2A11__H1__L2. 50、2A11__H1__L2. 91、2A11__H1__L2. 93、2A11__H1__L2. 97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3. 18__L1. 11、7G8__H3. 23__L1. 11、7G8__H3. 28__L1、7G8__H3. 28__L1. 11、7G8__H3. 28__L1. 13、7G8__H3. 30__L1. 34、7G8__H3. 30__L1. 34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

10

【0225】

片腕中心scFv型において、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1. 1__L1、および9C6__H1. 11__L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0226】

片腕中心scFv型において、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2. 1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

20

【0227】

G. 片腕scFv-mAb

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Dに示される片腕scFv-mAb型である。この実施形態では、一方の単量体はFcドメインのみを含み、もう一方の単量体は、一般にリンカー：vh-scFvリンカー-vl- [任意選択のドメインリンカー] -CH1-ヒンジ-CH2-CH3または（逆の配向において）vl-scFvリンカー-vh- [任意選択のドメインリンカー] -CH1-ヒンジ-CH2-CH3の使用により、重鎖のN末端で結合されるscFvドメインを使用する。この型では、Fab部分のいずれかが1つのチェックポイント標的に結合し、scFvは別のチェックポイント標的に結合する。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、Fabを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、pI変異体、切断変異体、追加のFc変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なFvの対としては、（Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する）PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3XPD1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBTLA、BTLAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBTLA、BTLAおよびCTLA-4、TIM-3およびLAG-3、LAG-3およびTIM-3、TIM-3およびTIGIT、TIGITおよびTIM-3、TIM-3およびBTLA、BTLAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBTLA、BTLAおよびLAG-3、BTLAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBTLA。

30

40

【0228】

50

これらの組み合わせのABD配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0229】

加えて、のFcドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q：L368D/K370S、L368D/K370S：S364K、L368E/K370S：S364K、T411T/E360E/Q362E：D401K、L368D/K370S：S364K/E357L、K370S：S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V：T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C：T366W/S354Cからなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）、任意選択で帯電scFvリンカー（図7に示されるものを含む）を含み、重鎖はpI変異体を含む（図4に示されるものを含む）。

10

【0230】

いくつかの実施形態では、片腕scFv-mAb型は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに軽鎖の第1的可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1的可変重ドメイン、および第2的可変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに第1的可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1的可変重ドメイン、および第2的可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv（ABD）を形成する第2的可変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1的可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適なFvの対としては、（Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する）CTLA-4XPD-1、PD-1XCTLA-4、LAG-3XPD-1、BTLAXPD-1、およびLAG-3XCTLA-4を含む。

20

【0231】

いくつかの実施形態では、片腕scFv-mAb型は、非対称変異体、pI変異体、切断変異体、およびFcRn変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに軽鎖の第1的可変軽ドメインと一緒に、第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1的可変重ドメイン、および第2的可変重ドメインを含む第1の単量体と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに第1的可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第1のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる第1的可変重ドメイン、および第2的可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv（ABD）を形成する第2的可変軽鎖を含む第2の単量体と、c) 第1的可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この実施形態では、好適なFvの対としては、（Fabを最初に記載し、次にscFvを記載する）CTLA-4XPD-1、PD-1XCTLA-4、LAG-3XPD-1、BTLAXPD-1、およびLAG-3XCTLA-4を含む。

30

40

【0232】

片腕scFv-mAb型において、ヒトPD-1に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1、ならびに配列番号6209～11464、配列番号11465～1

50

7134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146のリストに記載されるものが挙げられる。

【0233】

片腕scFv-mAb型において、ヒトCTLA-4に結合する特定のABDとしては、限定されないが、[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA-4]__H0.70__L0、[CTLA-4]__H0__L0.22、[CTLA-4]__H2__L0、[CTLA-4]__H3.21__L0.124、[CTLA-4]__H3.21__L0.129、[CTLA-4]__H3.21__L0.132、[CTLA-4]__H3.23__L0.124、[CTLA-4]__H3.23__L0.129、[CTLA-4]__H3.23__L0.132、[CTLA-4]__H3.25__L0.124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.122、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74、ならびに配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0234】

片腕scFv-mAb型において、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0235】

片腕scFv-mAb型において、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1、および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0236】

片腕scFv-mAb型において、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限

10

20

30

40

50

定されないが、1D10__H0L0；1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12 L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0237】

H.s c F v-m A b 型

本発明において特に有用な1つのヘテロ二量体足場は、図1Eに示されるm A b-s c F v型である。この実施形態では、型は、単量体のうちの1つに対するs c F vのN末端結合の使用に依存し、したがって、第3の抗原結合ドメインを形成し、2つの単量体のF a b部分は、1つのチェックポイント標的に結合し、「余分な」s c F vドメインは、異なるチェックポイント標的に結合する。

【0238】

この実施形態では、第1の単量体は第1の重鎖を含み（可変重ドメインおよび定常ドメインを含む）、N末端共有結合されるs c F vは、いずれかの配向（（v h 1-s c F v リンカー-v l 1-[任意選択のドメインリンカー]-v h 2-CH1-ヒンジ-CH2-CH3）または（逆の配向でs c F vで）（（v l 1-s c F v リンカー-v h 1-[任意選択のドメインリンカー]-v h 2-CH1-h i n g e-CH2-CH3））で、s c F v可変軽ドメイン、s c F vリンカー、およびs c F v可変重ドメインを含む。この実施形態は、可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む共通の軽鎖をさらに利用し、この軽鎖は、標的抗原のうちの1つに結合する2つの同一F a bを形成するために重鎖に関連する。本明細書の実施形態の多くについては、これらの構築物には、本明細書で所望され説明される非対称変異体、p I変異体、切断変異体、追加のF c変異体などが含まれる。この実施形態では、好適なF vの対としては、（F a bを最初に記載し、次にs c F vを記載する）PD-1およびCTLA-4、CTLA-4およびPD-1、PD-1およびTIM-3、TIM-3およびPD-1、PD-1およびLAG-3、LAG-3XP D1、PD-1およびTIGIT、TIGITおよびPD-1、PD-1およびBT LA、BT LAおよびPD-1、CTLA-4およびTIM-3、TIM-3およびCTLA-4、CTLA-4およびLAG-3、LAG-3およびCTLA-4、CTLA-4およびTIGIT、TIGITおよびCTLA-4、CTLA-4およびBT LA、BT LAおよびCTLA-4、TIM-3およびLAG-3、LAG-3およびTIM-3、TIM-3およびTIGIT、TIGITおよびTIM-3、TIM-3およびBT LA、BT LAおよびTIM-3が挙げられる。LAG-3およびTIGIT、TIGITおよびLAG-3、LAG-3およびBT LA、BT LAおよびLAG-3、BT LAおよびTIGIT、ならびにTIGITおよびBT LA。

【0239】

これらの組み合わせのA B D配列は、配列表に開示されるか、または図9～13に示されるとおりであり、図39および図40に示される任意の組み合わせであり得る。

【0240】

加えて、s c F v-m A b型のF cドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q：L368D/K370S、L368D/K370S：S364K、L368E/K370S：S364K、T411T/E360E/Q362E：D401K、L368D/K370S：S364K/E357L、K370S：S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V：T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C：T366W/S354Cからなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）、任意選択で帯電s c F vリンカー（図7に示されるものを含む）を含み、重鎖はp I変異体を含む（図4に示されるものを含む）。

【0241】

いくつかの実施形態では、m A b-s c F v型は、非対称変異体、p I変異体、および切

10

20

30

40

50

断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(F a b - s c F v の順) C T L A - 4 X P D - 1、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 である。

【0242】

いくつかの実施形態では、m A b - s c F v 型は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(F a b - s c F v の順) C T L A - 4 X P D - 1、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 である。

【0243】

図 38 の m A b - s c F v 型骨格 1 (任意選択で M 4 2 8 L / N 4 3 4 S を含む) について、ヒト P D - 1 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、1 G 6 _ H 1 . 2 7 9 _ L 1 . 1 9 4、1 G 6 _ H 1 . 2 8 0 _ L 1 . 2 2 4、1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9、1 G 6 _ L 1 . 2 1 0 _ H 1 . 2 8 8、および 2 E 9 _ H 1 L 1、ならびに配列番号 6 2 0 9 ~ 1 1 4 6 4、配列番号 1 1 4 6 5 ~ 1 7 1 3 4、配列番号 3 3 0 0 3 ~ 3 3 0 7 2、配列番号 3 3 0 7 3 ~ 3 5 3 9 4、および配列番号 3 6 1 2 7 ~ 3 6 1 4 6 のリストに記載されるものが挙げられる。

【0244】

図 38 の m A b - s c F v 型骨格 1 (任意選択で M 4 2 8 L / N 4 3 4 S を含む) について、ヒト C T L A - 4 に結合する特定の A B D としては、限定されないが、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 5 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 6 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 7 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 8 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 4 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 7 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 _ L 0 . 2 2、[C T L A - 4] _ H 2 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0

. 124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.122、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74、ならびに配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のリストに記載されるものが挙げられる。

【0245】

図38のmAb-scFv型骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）について、ヒトLAG-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1、ならびに配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のリストに記載されるものが挙げられる。

【0246】

図38のmAb-scFv型骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）について、ヒトBTLAに結合する特定のABDとしては、限定されないが、9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1、および9C6__H1.11__L1、ならびに配列番号20885～21503および配列番号36707～36738のリストに記載されるものが挙げられる。

【0247】

図38のmAb-scFv型骨格1（任意選択でM428L/N434Sを含む）について、ヒトTIM-3に結合する特定のABDとしては、限定されないが、1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H01D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0、ならびに配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のリストに記載されるものが挙げられる。

【0248】

I. 二重scFv型

本発明はまた、当該技術分野で知られ、図1Bに示される二重scFv型も提供する。この実施形態では、ヘテロ二量体二重特異性抗体は、2つのscFv-Fc単量体（両方とも（vh-scFvリンカー-vl-[任意選択のドメインリンカー]-CH2-CH3

10

20

30

40

50

型または (v l - s c F v リンカー - v h - [任意選択のドメインリンカー] - C H 2 - C H 3) 型のいずれかで、または一方の単量体が一方の配向、そしてもう一方が他方の配向で構成される。

【0249】

この場合、全ての A B D は s c F v 型であり、P D - 1 および C T L A - 4、P D - 1 および T I M - 3、P D - 1 および L A G - 3、P D - 1 および T I G I T、P D - 1 および B T L A、C T L A - 4 および T I M - 3、C T L A - 4 および L A G - 3、C T L A - 4 および T I G I T、C T L A - 4 および B T L A、T I M - 3 および L A G - 3、T I M - 3 および T I G I T、T I M - 3 および B T L A、L A G - 3 および T I G I T、L A G - 3 および B T L A、ならびに T I G I T および B T L A のいずれの組み合わせが有用である。これらの組み合わせの A B D 配列は、配列表に開示されるか、または図 9 ～ 13 に示されるとおりであり、図 39 および図 40 に示される任意の組み合わせであり得る。

10

【0250】

加えて、二重 s c F v 型の F c ドメインは、非対称変異体（例えば、図 3 および図 8 に示されるアミノ酸置換のセット、特に有用な非対称変異体は、S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、L 3 6 8 E / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、T 4 1 1 T / E 3 6 0 E / Q 3 6 2 E : D 4 0 1 K、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 L、K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V : T 3 6 6 W、および T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C : T 3 6 6 W / S 3 5 4 C からなる群から選択される）、任意選択で切断変異体（図 5 に示されるものを含む）、任意選択で帯電 s c F v リンカー（図 7 に示されるものを含む）を含み、重鎖は p I 変異体を含む（図 4 に示されるものを含む）。

20

【0251】

いくつかの実施形態では、二重 s c F v 型は、非対称変異体、p I 変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重鎖と一緒に、第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v (A B D) を形成する第 2 の可変軽鎖を含む第 2 の単量体と、c) 第 1 の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(F a b - s c F v の順) C T L A - 4 X P D - 1、L A G - 3 X P D - 1、B T L A X P D - 1、および L A G - 3 X C T L A - 4 である。

30

【0252】

いくつかの実施形態では、二重 s c F v 型は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、a) 非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに軽鎖の第 1 の可変軽ドメインと一緒に、第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる第 1 の可変重ドメイン、および第 2 の可変重ドメインを含む第 1 の単量体と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに第 1 の可変軽ドメインと一緒に、本明細書に概説する第 1 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作り

40

50

あげる第1の可変重ドメイン、および第2の可変重鎖と一緒に、第2のチェックポイント阻害剤に結合するFv(ABD)を形成する第2の可変軽鎖を含む第2の単量体と、c)第1の可変軽ドメインおよび定常軽ドメインを含む軽鎖とを含む、栓抜き型を含む。この型のいくつかの実施形態における特定の使用のものは、(Fab-scFvの順)CTLA-4XPD-1、LAG-3XPD-1、BTLAXPD-1、およびLAG-3XCTLA-4である。

【0253】

J. 非ヘテロ二量体二重特異性抗体

当業者に理解されるように、本明細書に概説されるFv配列は、単一特異性抗体(例えば、「従来のモノクローナル抗体」)または非ヘテロ二量体二重特異性型の両方で使用することもできる。

【0254】

好適な非ヘテロ二量体二重特異性型は、当該技術分野で知られており、一般にSpies *et al.*, *Molecular Immunology* (67):95-106 (2015) およびKontermann, *mAbs* 4:2, 182-197 (2012) (それらの両方が参照により、特に、その中の型に対する図、凡例、および引用に関して明確的に組み込まれる)に示されるいくつかの異なる型を含む。

【0255】

K. 単一特異性モノクローナル抗体

当業者に理解されるように、本明細書に概説される新規Fv配列は、単一特異性抗体(例えば、「従来のモノクローナル抗体」)または非ヘテロ二量体二重特異性型の両方で使用することもできる。したがって、本発明は、一般に、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4定常領域を有する、6つのCDR、ならびに／または図のvh配列およびvl配列を含むモノクローナル(単一特異性)抗体を提供し、IgG1、IgG2、およびIgG4(S228Pアミノ酸置換を含むIgG4定常領域を含む)がいくつかの実施形態において特に有用である。すなわち、「H₁L」指定を有する本明細書の任意の配列は、ヒトIgG1抗体の定常領域に連結され得る。

【0256】

VI. 抗原を標的とする抗原結合ドメイン

本発明の二重特異性抗体は、一般に図1に示されるように、二価の二重特異性型、または三価の二重特異性型のいずれかで、2つの異なる標的チェックポイント抗原(「標的対」)に結合する2つの異なる抗原結合ドメイン(ABD)を有する。好適な標的チェックポイント抗原としては、ヒト(および時としてcyano)PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、およびBTLAが含まれ、それらの配列は図2に示される。したがって、好適な二重特異性抗体は、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびTIM-3、PD-1およびLAG-3、PD-1およびTIGIT、PD-1およびBTLA、CTLA-4およびTIM-3、CTLA-4およびLAG-3、CTLA-4およびTIGIT、CTLA-4およびBTLA、TIM-3およびLAG-3、TIM-3およびTIGIT、TIM-3およびBTLA、LAG-3およびTIGIT、LAG-3およびBTLA、ならびにTIGITおよびBTLAに結合する。一般に、これらの二重特異性抗体は、各対について、「抗PD-1X抗CTLA-4」、または一般に単純化して、または簡単にするために(よって互換的に)、「PD-1XCTLA-4」等と命名されることに留意する。本明細書において指定されない限り、名称における抗原リストの順序は、構造を付与しないことに留意されたい。すなわち、PD-1XCTLA-4栓抜き抗体はPD-1またはCTLA-4に結合するscFvを有し得るが、場合によっては、順序は示されるように構造を指定する。

【0257】

本明細書でより完全に概説されるように、ABDのこれらの組み合わせは、以下に概説されるように、様々な型であってよく、一般に、一方のABDがFab型であり、もう一方がscFv型である組み合わせである。本明細書で論じられ、図1に示されるように、い

10

20

30

40

50

くつかの型は、単一の F a b および単一の s c F v (図 1 A、C、および D) を使用し、いくつかの型は、2 つの F a b および単一の s c F v (図 1 E、F、G、H、および I) を使用する。

【0258】

A. 抗原結合ドメイン

本明細書で論じられるように、本発明の二重特異性チェックポイントヘテロ二量体抗体は、2 つの抗原結合ドメイン (A B D) を含み、それらのそれぞれが異なるチェックポイントタンパク質に結合する。本明細書で概説されるように、これらのヘテロ二量体抗体は、二重特異性および二価 (各抗原が、例えば図 1 A に示される型で、単一の A B D によって結合される) であるか、または二重特異性および三価 (例えば図 1 F に示されるように、一方の抗原が単一の A B D によって結合され、もう一方が 2 つの A B D によって結合される) であり得る。

【0259】

加えて、一般に、A B D のうちの 1 つは、v h - s c F v リンカー - v l または v l - s c F v リンカー - v h の N から C 末端の配向で、本明細書に概説される s c F v を含む。型により、他の A B D の一方または両方は、一般に F a b であり、一方のタンパク質鎖 (一般に、重鎖の構成要素として) 上に v h ドメインを含み、そして別のタンパク質鎖 (一般に、軽鎖の構成要素として) 上に v l を含む。

【0260】

本発明は、以下に概説されるように、いくつかの異なるチェックポイントタンパク質に結合するいくつかの A B D を提供する。当業者に理解されるように、6 つの C D R または v h および v l ドメインの任意のセットは、s c F v 型または F a b 型であり得、これは、次いで、重定常ドメインおよび軽定常ドメインに付加され、ここで、重定常ドメインは変異体を含む (C H 1 ドメインならびに F c ドメイン内に含まれる)。配列表に含まれる s c F v 配列は特定の帯電リンカーを利用するが、本明細書で概説されるように、非帯電または他の帯電リンカーを使用することができ、図 7 に示されるものを含む。

【0261】

加えて、上述のように、C D R の識別配列表で使用される番号付けは K a b a t であるが、異なる番号付けを使用することができ、表 1 に示されるように、C D R のアミノ酸配列が変化する。

【0262】

本明細書のリストに記載される可変重ドメインおよび可変軽ドメインの全てについて、さらなる変異体が作製され得る。本明細書で概説されるように、いくつかの実施形態では、6 つの C D R のセットは、フレームワーク (C D R を除く) が米国特許第 7, 657, 380 号の図 1 (図および凡例は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) のリストに記載されるものから選択されるヒト生殖系列配列に対して少なくとも 80、85、または 90% の同一性を保持する限り、0、1、2、3、4、または 5 つのアミノ酸改変 (アミノ酸置換が特に有用である)、ならびに可変重ドメインおよび可変軽ドメインのフレームワーク領域に変化を有することができる。したがって、例えば、本明細書に記載される同一の C D R は、フレームワーク領域が米国特許第 7, 657, 380 号の図 1 のリストに記載されるものから選択されるヒト生殖系列配列に対して少なくとも 80、85、または 90% の同一性を保持する限り、ヒト生殖系列配列からの異なるフレームワーク配列と組み合わせることができる。あるいは、C D R は、アミノ酸改変 (例えば、C D R のセットにおいて 1、2、3、4、または 5 つのアミノ酸改変 (すなわち、6 つの C D R のセットにおける総変化数が 6 未満のアミノ酸改変である限り、C D R を改変することができ、C D R の任意の組み合わせが変化する。例えば、v l C D R 1 において 1 つの変化、v h C D R 2 において 2 つの変化、v h C D R 3 において変化なしなどであってよい) を有し、またフレームワーク領域が米国特許第 7, 657, 380 号の図 1 のリストに記載されるものから選択されるヒト生殖系列配列に対して少なくとも 80、85、または 90% の同一性を保持する限り、フレームワーク領域の変化を有することができる。

【0263】

B. PD-1 抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはPD-1に結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvlドメイン、ならびにscFv配列は、配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146に示される。いくつかの実施形態における特定の目的のABD配列は、図9に示され、識別子1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1を有する、配列表のそれらの配列を含む。

10

【0264】

当業者に理解されるように、好適な抗PD-1 ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146のvhおよびvl配列内の他のアライメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、scFvまたはFabとして使用される、これらの配列および図に示されるvhおよびvl配列全体も含み得る。Fv対PD-1を含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、PD-1に結合するのはscFv単量体である。本明細書で論じられるように、PD-1が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、CTLA-4（好適な配列は、配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、TIM-3（好適な配列は、配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、LAG-3（好適な配列は、配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、BTLA（好適な配列は、配列番号20885～21503および配列番号36707～36738（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、およびTIGIT（好適な配列は、配列番号21504～21523および配列番号37435～37586（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））から選択される。

20

30

【0265】

ヒトPD-1に結合する特に有用なABDには、限定されないが、1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1が含まれる。

【0266】

ABD対PD-1を形成する配列表に開示される親CDRセットに加えて、本発明は変異体CDRセットを提供する。一実施形態では、6つのCDRのセットは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（biolayer interferometry：バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親CDRから1、2、3、4、または5つのアミノ酸変化を有することができる。

40

【0267】

ABD対PD-1を形成する本明細書に開示される親可変重ドメインおよび可変軽ドメインに加えて、本発明は、変異体vhおよびvlドメインを提供する。一実施形態では、変異体vhおよびvlドメインはそれぞれ、Biacore、表面プラズモン共鳴（SP

50

R)、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つで測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親vhおよびvldメインから1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸変化を有することができる。別の実施形態では、変異体vhおよびvliは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、それぞれの親vhまたはvliに対して少なくとも90、95、97、98、または99%同一である。

10

【0268】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の1G6__L1.194__H1.279抗PD-1 Fvが挙げられる。

【0269】

具体的な好ましい実施形態としては、図38のmAb-scFv型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の1G6__L1.194__H1.279抗PD-1 Fvが挙げられる。

【0270】

C. CTLA-4 抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはCTLA-4に結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvldメイン、ならびにscFv配列は、配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416に示される。いくつかの実施形態における特定の目的のABD配列は、図10に示され、識別子[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、0[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA-4]__H0.70__L0、[CTLA-4]__H0__L0.22、[CTLA-4]__H2__L0、[CTLA-4]__H3.21__L0.124、[CTLA-4]__H3.21__L0.129、[CTLA-4]__H3.21__L0.132、[CTLA-4]__H3.23__L0.124、[CTLA-4]__H3.23__L0.129、[CTLA-4]__H3.23__L0.132、[CTLA-4]__H3.25__L0.124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.122、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74を有する、配列表のそれらの配列も含む。

20

30

40

【0271】

当業者に理解されるように、好適な抗CTLA-4 ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416のvhおよびvli配列内の他のアラ

50

イメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、scFvまたはFabとして使用される、これらの配列および図に示されるvhおよびvl配列全体も含み得る。Fv対CTLA-4を含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、CTLA-4に結合するのはscFv単量体である。本明細書で論じられるように、CTLA-4が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、PD-1（好適な配列は、配列番号6209~11464、配列番号11465~17134、配列番号33003~33072、配列番号33073~35394、および配列番号36127~36146（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、TIM-3（好適な配列は、配列番号20765~20884、配列番号37587~37698、および配列番号36347~36706（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、LAG-3（好適な配列は、配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号35417~35606、配列番号25194~32793、および配列番号32794~33002（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、BTLA（好適な配列は、配列番号20885~21503および配列番号36707~36738（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、およびTIGIT（好適な配列は、配列番号21504~21523および配列番号37435~37586（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））から選択される。

【0272】

ABD対CTLA-4を形成する配列表に開示される親CDRセットに加えて、本発明は変異体CDRセットを提供する。一実施形態では、6つのCDRのセットは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（biolayer interferometry：バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親CDRから1、2、3、4、または5つのアミノ酸変化を有することができる。

【0273】

ABD対CTLA-4を形成する本明細書に開示される親可変重ドメインおよび可変軽ドメインに加えて、本発明は、変異体vhおよびvlドメインを提供する。一実施形態では、変異体vhおよびvlドメインはそれぞれ、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親vhおよびvlドメインから1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸変化を有することができる。別の実施形態では、変異体vhおよびvlは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、それぞれの親vhまたはvlに対して少なくとも90、95、97、98、または99%同一である。

【0274】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、Fab型の[CTLA-4]__H3__L0.22抗CTLA-4 Fvが挙げられる。

【0275】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の[CTLA-4]__H3__L0.22抗CTLA-4 Fvが挙げられる。

【0276】

具体的な好ましい実施形態としては、図38のmAb-scFv型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の[CTLA-4]__H3__L0.22抗CTLA-4 Fvが挙

げられる。

【0277】

具体的な好ましい実施形態としては、図38のmAb-scFv型骨格のいずれかの中に含まれる、Fab型の[CTLA-4]__H3__L0.22抗CTLA-4 Fvが挙げられる。

【0278】

D.TIM-3抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはTIM-3に結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvlドメイン、ならびにscFv配列は、配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706に示される。いくつかの実施形態における特定の目的のABD配列は、識別子1D10__H0L0、1D12__H0L0、3H3__H1__L2.1、6C8__H0L0、6D9__H0__1D12__L0、7A9__H0L0、7B11__H0L0、7B11var__H0L0、および7C2__H0L0を有する、配列表のそれらの配列を含む。

【0279】

当業者に理解されるように、好適な抗TIM-3ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706のvhおよびvl配列内の他のアライメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、scFvまたはFabとして使用される、これらの配列および図に示されるvhおよびvl配列全体も含み得る。Fv対TIM-3を含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、TIM-3に結合するのはFab単量体である。本明細書で論じられるように、TIM-3が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、PD-1（好適な配列は、配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、CTLA-4（好適な配列は、配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、LAG-3（好適な配列は、配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、BTLA（好適な配列は、配列番号20885～21503および配列番号36707～36738（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））、およびTIGIT（好適な配列は、配列番号21504～21523および配列番号37435～37586（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る））から選択される。

【0280】

ABD対TIM-3を形成する配列表に開示される親CDRセットに加えて、本発明は変異体CDRセットを提供する。一実施形態では、6つのCDRのセットは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（biolayer interferometry：バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親CDRから1、2、3、4、または5つのアミノ酸変化を有することができる。

【0281】

ABD対TIM-3を形成する本明細書に開示される親可変重ドメインおよび可変軽ドメインに加えて、本発明は、変異体vhおよびvlドメインを提供する。一実施形態では、変異体vhおよびvlドメインはそれぞれ、Biacore、表面プラズモン共鳴（SP

10

20

30

40

50

R)、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つで測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親vhおよびvldメインから1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸変化を有することができる。別の実施形態では、変異体vhおよびvliは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、それぞれの親vhまたはvliに対して少なくとも90、95、97、98、または99%同一である。

【0282】

LAG-3抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはLAG-3に結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvldメイン、ならびにscFv配列は、配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002に示される。いくつかの実施形態における特定の目的のABD配列は、図11に示され、識別子2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122、2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1を有する、配列表のそれらの配列も含む。

【0283】

当業者に理解されるように、好適な抗LAG-3ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、配列番号17135～20764、配列番号36819～36962、配列番号35417～35606、配列番号25194～32793、および配列番号32794～33002のvhおよびvli配列内の他のアライメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、scFvまたはFabとして使用される、これらの配列および図に示されるvhおよびvli配列全体も含み得る。Fv対LAG-3を含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、LAG-3に結合するのはFab単量体である。本明細書で論じられるように、LAG-3が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、PD-1（好適な配列は、配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvli配列であり得る））、CTLA-4（好適な配列は、配列番号21～2918、配列番号2919～6208、配列番号36739～36818、および配列番号35395～35416（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvli配列であり得る））、TIM-3（好適な配列は、配列番号20765～20884、配列番号37587～37698、および配列番号36347～36706（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvli配列であり得る））、BTLA（好適な配列は、配列番号20885～21503および配列番号36707～36738（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvli配列であり得る））、およびTIGIT（好適な配列は、配列番号215

10

20

30

40

50

04～21523および配列番号37435～37586（scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る）から選択される。

【0284】

ABD対LAG-3を形成する配列表に開示される親CDRセットに加えて、本発明は変異体CDRセットを提供する。一実施形態では、6つのCDRのセットは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（bio layer interferometry：バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親CDRから1、2、3、4、または5つのアミノ酸変化を有することができる。

10

【0285】

ABD対LAG-3を形成する本明細書に開示される親可変重ドメインおよび可変軽ドメインに加えて、本発明は、変異体vhおよびvlドメインを提供する。一実施形態では、変異体vhおよびvlドメインはそれぞれ、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親vhおよびvlドメインから1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸変化を有することができる。別の実施形態では、変異体vhおよびvlは、Biacore、表面プラズモン共鳴（SPR）、および／またはBLI（バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき（多くの実施形態において後者が得に有用である）、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、それぞれの親vhまたはvlに対して少なくとも90、95、97、98、または99%同一である。

20

【0286】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、Fab型の7G8__H3.30__L1.34抗LAG-3 Fvが挙げられる。

【0287】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の7G8__H3.30__L1.34抗LAG-3 Fvが挙げられる。

30

【0288】

E. BTLA抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはBTLAに結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvlドメイン、ならびにscFv配列は、配列番号20885～21503および配列番号36707～36738に示される。いくつかの実施形態における特定の目的のABD配列は、図12に示され、識別子9C6__H0L0；9C6__H1.1__L1および9C6__H1.11__L1を有する、配列表のそれらの配列も含む。

【0289】

当業者に理解されるように、好適な抗BTLA ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、vhおよびvl配列の配列番号20885～21503および配列番号36707～36738の内の他のアライメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、scFvまたはFabとして使用される、これらの配列および図に示されるvhおよびvl配列全体も含み得る。Fv対BTLAを含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、BTLAに結合するのはFab単量体である。本明細書で論じられるように、LAG-3が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、PD-1（好適な配列は、配列番号6209～11464、配列番号11465～17134、配列番号33003～33072、配列番号33073～35394、および配列番号36127～36146（sc

40

50

Fv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る))、CTLA-4 (好適な配列は、配列番号21~2918、配列番号2919~6208、配列番号36739~36818、および配列番号35395~35416 (scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る))、TIM-3 (好適な配列は、配列番号20765~20884、配列番号37587~37698、および配列番号36347~36706 (scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る))、LAG-3 (好適な配列は、配列番号17135~20764、配列番号36819~36962、配列番号35417~35606、配列番号25194~32793、および配列番号32794~33002 (scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る))、およびTIGIT (好適な配列は、配列番号21504~21523および配列番号37435~37586 (scFv配列、CDR配列セット、またはvhおよびvl配列であり得る))から選択される。

【0290】

ABD対BTLAを形成する配列表に開示される親CDRセットに加えて、本発明は変異体CDRセットを提供する。一実施形態では、6つのCDRのセットは、Biacore、表面プラズモン共鳴 (SPR)、および／またはBLI (bio layer interferometry: バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ) アッセイのうちの少なくとも1つで測定されるとき (多くの実施形態において後者が得に有用である)、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親CDRから1、2、3、4、または5つのアミノ酸変化を有することができる。

【0291】

ABD対BTLAを形成する本明細書に開示される親可変重ドメインおよび可変軽ドメインに加えて、本発明は、変異体vhおよびvlドメインを提供する。一実施形態では、変異体vhおよびvlドメインはそれぞれ、Biacore、表面プラズモン共鳴 (SPR)、および／またはBLI (バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ) アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき (多くの実施形態において後者が得に有用である)、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、親vhおよびvlドメインから1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸変化を有することができる。別の実施形態では、変異体vhおよびvlは、Biacore、表面プラズモン共鳴 (SPR)、および／またはBLI (バイオレイヤー干渉、例えば、Octetアッセイ) アッセイのうちの少なくとも1つによって測定されるとき (多くの実施形態において後者が得に有用である)、ABDが依然として標的抗原に結合することができる限り、それぞれの親vhまたはvlに対して少なくとも90、95、97、98、または99%同一である。

【0292】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、Fab型の9C6__H1.1__L1抗LAG-3 Fvが挙げられる。

【0293】

具体的な好ましい実施形態としては、図37の栓抜き型骨格のいずれかの中に含まれる、scFv型の7G8__H3.30__L1.34抗LAG-3 Fvが挙げられる。

【0294】

F.TIGIT抗原結合ドメイン

いくつかの実施形態では、ABDのうちの1つはTIGITに結合する。好適な6つのCDRのセットならびに／またはvhおよびvlドメイン、ならびにscFv配列は、配列番号21504~21523および配列番号37435~37586に示される。

【0295】

当業者に理解されるように、好適な抗TIGIT ABDは、下線が付されているように、または本明細書に記載され、表1に示されるように異なる番号付けスキームが使用される場合、配列番号21504~21523および配列番号37435~37586のvhおよびvl配列内の他のアライメントを使用して同定されるCDRとしてのいずれかで、

これらの配列および図に示される6つのCDRのセットを含み得る。好適なABDはまた、s c F vまたはF a bとして使用される、これらの配列および図に示されるv hおよびv l配列全体も含み得る。F v対T I G I Tを含有する本明細書の実施形態の多くにおいて、T I G I Tに結合するのはF a b単量体である。本明細書で論じられるように、L A G-3が抗原のうちの1つであるときの標的対の他方は、P D-1（好適な配列は、配列番号6 2 0 9～1 1 4 6 4、配列番号1 1 4 6 5～1 7 1 3 4、配列番号3 3 0 0 3～3 3 0 7 2、配列番号3 3 0 7 3～3 5 3 9 4、および配列番号3 6 1 2 7～3 6 1 4 6（s c F v配列、CDR配列セット、またはv hおよびv l配列であり得る））、C T L A-4（好適な配列は、配列番号2 1～2 9 1 8、配列番号2 9 1 9～6 2 0 8、配列番号3 6 7 3 9～3 6 8 1 8、および配列番号3 5 3 9 5～3 5 4 1 6（s c F v配列、CDR配列セット、またはv hおよびv l配列であり得る））、T I M-3（好適な配列は、配列番号2 0 7 6 5～2 0 8 8 4、配列番号3 7 5 8 7～3 7 6 9 8、および配列番号3 6 3 4 7～3 6 7 0 6（s c F v配列、CDR配列セット、またはv hおよびv l配列であり得る））、L A G-3（好適な配列は、配列番号1 7 1 3 5～2 0 7 6 4、配列番号3 6 8 1 9～3 6 9 6 2、配列番号3 5 4 1 7～3 5 6 0 6、配列番号2 5 1 9 4～3 2 7 9 3、および配列番号3 2 7 9 4～3 3 0 0 2（s c F v配列、CDR配列セット、またはv hおよびv l配列であり得る））、およびB T L A（好適な配列は、配列番号2 0 8 8 5～2 1 5 0 3および配列番号3 6 7 0 7～3 6 7 3 8（s c F v配列、CDR配列セット、またはv hおよびv l配列であり得る））から選択される。

【0 2 9 6】

G. 具体的な二重特異性実施形態

本発明は、以下に概説されるように、いくつかの特定の二重特異性抗体を提供する。

【0 2 9 7】

1. L A G-3 X C T L A-4

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトL A G-3に結合する第1のABDと、ヒトC T L A-4に結合する第2のABDとを含む二重特異性ヘテロ二量体抗体を提供し、図1に示される任意の型であり得る。本開示のほとんどは、F a bがL A G-3側であり、C T L A-4側がs c F v側である栓抜き型を指すが、これは、本明細書の実施形態のすべてについて逆であってもよい。

【0 2 9 8】

一実施形態では、L A G-3 X C T L A-4二重特異性抗体は、図1 Aの栓抜き型であり、C T L A-4 ABDはs c F vである。別の実施形態では、L A G-3 X C T L A-4二重特異性抗体は、図1 Fの中心s c F v型であり、L A G-3 ABDはF a b構成要素である。別の実施形態では、L A G-3 X C T L A-4二重特異性抗体は、図1 Fの中心s c F v型であり、C T L A-4 ABDはs c F vである。

【0 2 9 9】

L A G-3 X C T L A-4二重特異性抗体（栓抜き型または中心s c F v型のいずれか）は一般に、本明細書に概説される非対称変異体、p I変異体、および切断変異体を含む。すなわち、いずれかの型において、2つの単量体のF cドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）を含み、F a b側を含む単量体（例えば、重鎖定常ドメイン）は、p I変異体（図4に示されるものを含む）を含む。

【0 3 0 0】

いくつかの実施形態では、L A G-3 X C T L A-4二重特異性抗体は、非対称変異体を有するF cドメインを含み、特に有用な非対称変異体は、S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、L 3 6 8 E / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K、T 4 1 1 T / E 3 6 0 E / Q 3 6 2 E : D 4 0 1 K、L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 L、K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V : T 3 6 6 W、およびT 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C : T 3 6 6 W / S 3 5 4 Cからなる群から選択される。

【0301】

いくつかの実施形態では、LAG-3 XCTLA-4 抗体は、非対称変異体、pI 変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電 scFv リンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体 S364K/E357Q、切断変異体 E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する Fv を含む第1の単量体（「scFv 単量体」）と、b) 非対称変異体 L368D/K370S、pI 変異体 N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体 E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合する Fv を作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「Fab 単量体」）と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、LAG-3 Fab 7G8__H3.30__L1.34 および CTLA-4 scFv [CTLA-4]__H3.23__L0.129 を利用するが、配列表中の CTLA-4 または LAG-3 Fv のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

10

【0302】

いくつかの実施形態では、LAG-3 XCTLA-4 抗体は、非対称変異体、pI 変異体、切断変異体、および FcRn 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電 scFv リンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体 S364K/E357Q、切断変異体 E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn 変異体 M428L/N434S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する Fv を含む第1の単量体（「scFv 単量体」）と、b) 非対称変異体 L368D/K370S、pI 変異体 N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体 E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn 変異体 M428L/N434S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合する Fv を作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「Fab 単量体」）と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、LAG-3 Fab 7G8__H3.30__L1.34 および CTLA-4 scFv [CTLA-4]__H3.23__L0.129 を利用するが、配列表中の CTLA-4 または LAG-3 Fv のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

20

30

【0303】

さらなる実施形態は、LAG-3 Fab 7G8__H3.30__L1.34 および CTLA-4 scFv [CTLA-4]__H3.23__L0.129 を有する、図37からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0304】

さらなる実施形態は、LAG-3 Fab 7G8__H3.30__L1.34 および CTLA-4 scFv [CTLA-4]__H3.23__L0.129 を有する、図38からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0305】

いくつかの実施形態では、LAG-3 XCLTA-4 二重特異性抗体について、LAG-3 Fab 側の Fv は、識別子 2A11__H0L0、2A11__H1.125__L2.113、2A11__H1.144__L2.142、2A11__H1__L2.122；2A11__H1__L2.123、2A11__H1__L2.124、2A11__H1__L2.25、2A11__H1__L2.47、2A11__H1__L2.50、2A11__H1__L2.91、2A11__H1__L2.93、2A11__H1__L2.97、2A11__H1L1、2A11__H1L2、2A11__H2L2、2A11__H3L1、2A11__H3L2、2A11__H4L1、2A11__H4L2、7G8__H0L0、7G8__H1L1、7G8__H3.18__L1.11、7G8__H3.23__L1.11、7G8__H3.28__L1、7G8__H3.28__L1.11、7G8__H3.28__L1.13、7G8__

40

50

H3.30__L1.34、7G8__H3.30__L1.34、および7G8__H3L1を有する、配列表のそれらの配列から選択される。CTLA-4 scFv側のFvは、識別子[CTLA-4]__H0.25__L0、[CTLA-4]__H0.26__L0、[CTLA-4]__H0.27__L0、[CTLA-4]__H0.29__L0、[CTLA-4]__H0.38__L0、[CTLA-4]__H0.39__L0、0[CTLA-4]__H0.40__L0、[CTLA-4]__H0.70__L0、[CTLA-4]__H0__L0.22、[CTLA-4]__H2__L0、[CTLA-4]__H3.21__L0.124、[CTLA-4]__H3.21__L0.129、[CTLA-4]__H3.21__L0.132、[CTLA-4]__H3.23__L0.124、[CTLA-4]__H3.23__L0.129、[CTLA-4]__H3.23__L0.132、[CTLA-4]__H3.25__L0.124、[CTLA-4]__H3.25__L0.129、[CTLA-4]__H3.25__L0.132、[CTLA-4]__H3.4__L0.118、[CTLA-4]__H3.4__L0.119、[CTLA-4]__H3.4__L0.12、[CTLA-4]__H3.4__L0.121、[CTLA-4]__H3.4__L0.122、[CTLA-4]__H3.4__L0.123、[CTLA-4]__H3.4__L0.124、[CTLA-4]__H3.4__L0.125、[CTLA-4]__H3.4__L0.126、[CTLA-4]__H3.4__L0.127、[CTLA-4]__H3.4__L0.128、[CTLA-4]__H3.4__L0.129、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74を有する、配列表のそれらの配列から選択される。

【0306】

いくつかの実施形態では、LAG-3XCTLA-4二重特異性抗体は、配列番号35607～35866および配列番号21524～22620のリストに記載されるそれらの構築物から選択される。

【0307】

いくつかの実施形態では、LAG-3XCTLA-4二重特異性抗体は、XENP20206、XENP21582、XENP21584、XENP21588、XENP22123、XENP22124、XENP22125、XENP22604、XENP22672、XENP22847、XENP22847、XENP22841、およびXENP22849から選択される。

【0308】

2. BTLAXPD-1

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトBTLAに結合する第1のABDと、ヒトPD-1に結合する第2のABDとを含む二重特異性ヘテロ二量体抗体を提供し、図1に示される任意の型であり得る。本開示のほとんどは、FabがBTLA側であり、PD-1側がscFv側である栓抜き型を指すが、これは、本明細書の実施形態のすべてについて逆であってもよい。

【0309】

一実施形態では、BTLAXPD-1二重特異性抗体は、図1Aの栓抜き型であり、PD-1 ABDはscFvである。別の実施形態では、BTLAXPD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心scFv型であり、BTLA ABDはFab構成要素である。別の実施形態では、BTLAXPD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心scFv型であり、PD-1 ABDはscFvである。

【0310】

BTLAXPD-1二重特異性抗体（栓抜き型または中心scFv型のいずれか）は一般に、本明細書に概説される非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。すなわ

ち、いずれかの型において、2つの単量体のFcドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）を含み、Fab側を含む単量体（例えば、重鎖定常ドメイン）は、pI変異体（図4に示されるものを含む）を含む。

【0311】

いくつかの実施形態では、BTLA XPD-1二重特異性抗体は、非対称変異体を有するFcドメインを含み、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354Cからなる群から選択される。

10

【0312】

いくつかの実施形態では、BTLA XPD-1抗体は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電scFvリンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合するFvを含む第1の単量体（「scFv単量体」）と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「Fab単量体」）と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、BTLA Fab 9C6__H1.1__L1およびPD-1 scFv 1G6__L1.194__H1.279を利用するが、配列表中のBTLAまたはPD-1 Fvのいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

20

【0313】

いくつかの実施形態では、BTLA XPD-1抗体は、非対称変異体、pI変異体、切断変異体、およびFcRn変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電scFvリンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合するFvを含む第1の単量体（「scFv単量体」）と、b) 非対称変異体L368D/K370S、pI変異体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn変異体M428L/N434S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合するFvを作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「Fab単量体」）と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、BTLA Fab 9C6__H1.1__L1およびPD-1 scFv 1G6__L1.194__H1.279を利用するが、配列表中のBTLAまたはPD-1 Fvのいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

30

40

【0314】

さらなる実施形態は、BTLA Fab 9C6__H1.1__L1およびPD-1 scFv 1G6__L1.194__H1.279を有する、図37からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0315】

さらなる実施形態は、BTLA Fab 9C6__H1.1__L1およびPD-1 scFv 1G6__L1.194__H1.279を有する、図38からの骨格のうちのいずれか

50

を含む。

【0316】

いくつかの実施形態では、BTLAxPD-1二重特異性抗体について、BTLA Fab側のFvは、識別子9C6__H0L0、9C6__H1.1__L1、9C6__H1.11__L1を有する、配列表のそれらの配列から選択される。PD-1 scFv側のFvは、識別子1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1を有する、配列表のそれらの配列から選択される。

【0317】

いくつかの実施形態では、BTLAxPD-1二重特異性抗体は、配列番号22724～23315および配列番号36147～36166としてリストに記載されるものを含む構築物から選択される。

10

【0318】

いくつかの実施形態では、BTLAxPD-1二重特異性抗体は、XENP20895、XENP21220、XENP21221、およびXENP22858から選択される。

【0319】

3. CTLA-4xPD-1

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトCTLA-4に結合する第1のABDと、ヒトPD-1に結合する第2のABDとを含む二重特異性ヘテロ二量体抗体を提供し、図1に示される任意の型であり得る。本開示のほとんどは、FabがCTLA-4側であり、PD-1側がscFv側である栓抜き型を指すが、これは、本明細書の実施形態のすべてについて逆であってもよい。

20

【0320】

一実施形態では、CTLA-4xPD-1二重特異性抗体は、図1Aの栓抜き型であり、PD-1 ABDはscFvである。別の実施形態では、CTLA-4xPD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心scFv型であり、CTLA-4 ABDはFab構成要素である。別の実施形態では、CTLA-4xPD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心scFv型であり、PD-1 ABDはscFvである。

【0321】

CTLA-4xPD-1二重特異性抗体（栓抜き型または中心scFv型のいずれか）は一般に、本明細書に概説される非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。すなわち、いずれかの型において、2つの単量体のFcドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）を含み、Fab側を含む単量体（例えば、重鎖定常ドメイン）は、pI変異体（図4に示されるものを含む）を含む。

30

【0322】

いくつかの実施形態では、CTLA-4xPD-1二重特異性抗体は、非対称変異体を有するFcドメインを含み、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354Cからなる群から選択される。

40

【0323】

いくつかの実施形態では、CTLA-4xPD-1抗体は、非対称変異体、pI変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電scFvリンカー（いくつかの実施形態では、図7の+H配列が好ましい）、非対称変異体S364K/E357Q、切断変異体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合するFvを含む第1の単量体（「scFv単量体」）と、b) 非対称変異

50

体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体（「F a b 単量体」）と、c）軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、C T L A - 4 F a b [C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 2 2 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の C T L A - 4 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

【0324】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 X P D - 1 抗体は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a）帯電 s c F v リンカー（いくつかの実施形態では、図 7 の + H 配列が好ましい）、非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する F v を含む第 1 の単量体（「s c F v 単量体」）と、b）非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体（「F a b 単量体」）と、c）軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、C T L A - 4 F a b [C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 2 2 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の C T L A - 4 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

【0325】

さらなる実施形態は、C T L A - 4 F a b [C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 2 2 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図 3 7 からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0326】

さらなる実施形態は、C T L A - 4 F a b [C T L A - 4] _ H 3 _ L 0 . 2 2 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図 3 8 からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0327】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 X P D - 1 二重特異性抗体について、C T L A - 4 F a b 側の F v は、識別子 [C T L A - 4] _ H 0 . 2 5 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 6 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 7 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 2 9 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 8 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 3 9 _ L 0、0 [C T L A - 4] _ H 0 . 4 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 . 7 0 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 0 _ L 0 . 2 2、[C T L A - 4] _ H 2 _ L 0、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 1 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 3 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 2 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 2 5 _ L 0 . 1 3 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 1 9、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 1、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 2、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 3、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 4、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 5、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 6、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 7、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 8、[C T L A - 4] _ H 3 . 4 _ L 0 . 1 2 9

、[CTLA-4]__H3.4__L0.130、[CTLA-4]__H3.4__L0.131、[CTLA-4]__H3.4__L0.132、[CTLA-4]__H3.5__L2.1、[CTLA-4]__H3.5__L2.2、[CTLA-4]__H3.5__L2.3、[CTLA-4]__H3__L0、[CTLA-4]__H3__L0.22、[CTLA-4]__H3__L0.44、[CTLA-4]__H3__L0.67、および[CTLA-4]__H3__L0.74を有する識別子を有する、配列表のそれらの配列から選択される。PD-1 s c F v側のF vは、識別子1G6__H1.279__L1.194、1G6__H1.280__L1.224、1G6__L1.194__H1.279、1G6__L1.210__H1.288、および2E9__H1L1を有する、配列表のそれらの配列から選択される。

10

【0328】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 X PD-1二重特異性抗体は、配列番号36167~36346および配列番号23316~23735としてリストに記載されるものから選択される。

【0329】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 X PD-1二重特異性抗体は、XENP19738、XENP19739、XENP19741、XENP20053、XENP20066、XENP20130、XENP20146、XENP20717、およびXENP22836から選択される。

20

【0330】

4. LAG-3 X PD-1

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトLAG-3に結合する第1のABDと、ヒトPD-1に結合する第2のABDとを含む二重特異性ヘテロ二量体抗体を提供し、図1に示される任意の型であり得る。本開示のほとんどは、FabがLAG-3側であり、PD-1側がs c F v側である栓抜き型を指すが、これは、本明細書の実施形態のすべてについて逆であってもよい。

【0331】

一実施形態では、LAG-3 X PD-1二重特異性抗体は、図1Aの栓抜き型であり、PD-1 ABDはs c F vである。別の実施形態では、LAG-3 X PD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心s c F v型であり、LAG-3 ABDはFab構成要素である。別の実施形態では、LAG-3 X PD-1二重特異性抗体は、図1Fの中心s c F v型であり、PD-1 ABDはs c F vである。

30

【0332】

LAG-3 X PD-1二重特異性抗体（栓抜き型または中心s c F v型のいずれか）は一般に、本明細書に概説される非対称変異体、p I変異体、および切断変異体を含む。すなわち、いずれかの型において、2つの単量体のFcドメインは、非対称変異体（例えば、図3および図8に示されるアミノ酸置換のセット）、任意選択で切断変異体（図5に示されるものを含む）を含み、Fab側を含む単量体（例えば、重鎖定常ドメイン）は、p I変異体（図4に示されるものを含む）を含む。

【0333】

いくつかの実施形態では、LAG-3 X PD-1二重特異性抗体は、非対称変異体を有するFcドメインを含み、特に有用な非対称変異体は、S364K/E357Q:L368D/K370S、L368D/K370S:S364K、L368E/K370S:S364K、T411T/E360E/Q362E:D401K、L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W、およびT366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354Cからなる群から選択される。

40

【0334】

いくつかの実施形態では、LAG-3 X PD-1抗体は、非対称変異体、p I変異体、および切断変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓

50

抜き型は、a) 帯電 s c F v リンカー（いくつかの実施形態では、図 7 の + H 配列が好ましい）、非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する F v を含む第 1 の単量体（「s c F v 単量体」と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体（「F a b 単量体」と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、L A G - 3 F a b 7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の L A G - 3 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

10

【0335】

いくつかの実施形態では、L A G - 3 X P D - 1 抗体は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a) 帯電 s c F v リンカー（いくつかの実施形態では、図 7 の + H 配列が好ましい）、非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する F v を含む第 1 の単量体（「s c F v 単量体」と、b) 非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第 2 のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第 2 の単量体（「F a b 単量体」と、c) 軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、L A G - 3 F a b 7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の L A G - 3 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

20

【0336】

さらなる実施形態は、L A G - 3 F a b 7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図 3 7 からの骨格のうちのいずれかを含む。

30

【0337】

さらなる実施形態は、L A G - 3 F a b 7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4 および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図 3 8 からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0338】

いくつかの実施形態では、L A G - 3 X P D - 1 二重特異性抗体について、L A G - 3 F a b 側の F v は、識別子 2 A 1 1 _ H 0 L 0、2 A 1 1 _ H 1 . 1 2 5 _ L 2 . 1 1 3、2 A 1 1 _ H 1 . 1 4 4 _ L 2 . 1 4 2、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 1 2 2 ; 2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 1 2 3、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 1 2 4、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 2 5、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 4 7、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 5 0、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 9 1、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 9 3、2 A 1 1 _ H 1 _ L 2 . 9 7、2 A 1 1 _ H 1 L 1、2 A 1 1 _ H 1 L 2、2 A 1 1 _ H 2 L 2、2 A 1 1 _ H 3 L 1、2 A 1 1 _ H 3 L 2、2 A 1 1 _ H 4 L 1、2 A 1 1 _ H 4 L 2、7 G 8 _ H 0 L 0、7 G 8 _ H 1 L 1、7 G 8 _ H 3 . 1 8 _ L 1 . 1 1、7 G 8 _ H 3 . 2 3 _ L 1 . 1 1、7 G 8 _ H 3 . 2 8 _ L 1、7 G 8 _ H 3 . 2 8 _ L 1 . 1 1、7 G 8 _ H 3 . 2 8 _ L 1 . 1 3、7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4、7 G 8 _ H 3 . 3 0 _ L 1 . 3 4、および 7 G 8 _ H 3 L 1 を有する、配列表のそれらの配列から選択される。P D - 1 s c F v 側の F v は、識別子 1 G 6 _ H 1 . 2 7 9 _ L 1 . 1 9 4、1 G 6 _ H 1 . 2 8 0 _ L 1 . 2 2 4、1 G 6 _ L 1

40

50

． 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 、 1 G 6 _ L 1 . 2 1 0 _ H 1 . 2 8 8 、 お よ び 2 E 9 _ H 1 L 1 を 有 す る 、 配 列 表 の そ れ ら の 配 列 か ら 選 択 さ れ る 。

【 0 3 3 9 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 L A G - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 配 列 番 号 3 5 8 6 7 ~ 3 6 1 2 6 お よ び 配 列 番 号 2 3 7 3 6 ~ 2 5 1 3 3 と し て リ ス ト に 記 載 さ れ る も の を 含 む 構 築 物 か ら 選 択 さ れ る 。

【 0 3 4 0 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 L A G - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 X E N P 2 0 2 0 6 、 X E N P 2 1 5 8 2 、 X E N P 2 1 5 8 4 、 X E N P 2 1 5 8 8 、 X E N P 2 2 1 2 3 、 X E N P 2 2 1 2 4 、 X E N P 2 2 1 2 5 、 X E N P 2 2 6 0 4 、 X E N P 2 2 6 7 2 、 X E N P 2 2 8 4 7 、 X E N P 2 2 8 4 7 、 お よ び X E N P 2 2 8 4 9 か ら 選 択 さ れ る 。

10

【 0 3 4 1 】

5 . T I G I T X P D - 1

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 T I G I T X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 配 列 番 号 2 5 1 3 4 ~ 2 5 1 7 3 の リ ス ト に 記 載 さ れ る そ れ ら の 構 築 物 か ら 選 択 さ れ る 。

【 0 3 4 2 】

6 . T I M - 3 X P D - 1

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 本 発 明 は 、 ヒ ト T I M - 3 に 結 合 す る 第 1 の A B D と 、 ヒ ト P D - 1 に 結 合 す る 第 2 の A B D と を 含 む 二 重 特 異 性 ヘ テ ロ 二 量 体 抗 体 を 提 供 し 、 図 1 に 示 さ れ る 任 意 の 型 で あ り 得 る 。 本 開 示 の ほ と ん ど は 、 F a b が T I M - 3 側 で あ り 、 P D - 1 側 が s c F v 側 で あ る 栓 抜 き 型 を 指 す が 、 こ れ は 、 本 明 細 書 の 実 施 形 態 の す べ て に つ い て 逆 で あ っ て も よ い 。

20

【 0 3 4 3 】

一 実 施 形 態 で は 、 T I M - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 図 1 A の 栓 抜 き 型 で あ り 、 P D - 1 A B D は s c F v で あ る 。 別 の 実 施 形 態 で は 、 T I M - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 図 1 F の 中 心 s c F v 型 で あ り 、 T I M - 3 A B D は F a b 構 成 要 素 で あ る 。 別 の 実 施 形 態 で は 、 T I M - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 図 1 F の 中 心 s c F v 型 で あ り 、 P D - 1 A B D は s c F v で あ る 。

【 0 3 4 4 】

T I M - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 (栓 抜 き 型 ま た は 中 心 s c F v 型 の い ず れ か) は 一 般 に 、 本 明 細 書 に 概 説 さ れ る 非 対 称 変 異 体 、 p I 変 異 体 、 お よ び 切 断 変 異 体 を 含 む 。 す な わ ち 、 い ず れ か の 型 に お い て 、 2 つ の 単 量 体 の F c ド メ イ ン は 、 非 対 称 変 異 体 (例 え ば 、 図 3 お よ び 図 8 に 示 さ れ る ア ミ ノ 酸 置 換 の セ ッ ト) 、 任 意 選 択 で 切 断 変 異 体 (図 5 に 示 さ れ る も の を 含 む) を 含 む 、 F a b 側 を 含 む 単 量 体 (例 え ば 、 重 鎖 定 常 ド メ イ ン) は 、 p I 変 異 体 (図 4 に 示 さ れ る も の を 含 む) を 含 む 。

30

【 0 3 4 5 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 T I M - 3 X P D - 1 二 重 特 異 性 抗 体 は 、 非 対 称 変 異 体 を 有 す る F c ド メ イ ン を 含 む 、 特 に 有 用 な 非 対 称 変 異 体 は 、 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q : L 3 6 8 D / K 3 7 0 S 、 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K 、 L 3 6 8 E / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K 、 T 4 1 1 T / E 3 6 0 E / Q 3 6 2 E : D 4 0 1 K 、 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 L 、 K 3 7 0 S : S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q 、 T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V : T 3 6 6 W 、 お よ び T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C : T 3 6 6 W / S 3 5 4 C か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る 。

40

【 0 3 4 6 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 T I M - 3 X P D - 1 抗 体 は 、 非 対 称 変 異 体 、 p I 変 異 体 、 お よ び 切 断 変 異 体 を 含 む 。 し た が っ て 、 い く つ か の 実 施 形 態 は 、 栓 抜 き 型 を 提 供 し 、 こ の 栓 抜 き 型 は 、 a) 帯 電 s c F v リ ン カ ー (い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 図 7 の + H 配 列 が 好 ま し い) 、 非 対 称 変 異 体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q 、 切 断 変 異 体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K 、 な ら び に 本 明 細 書 で 概 説 す る チ ェ ッ ク ポ イ ン ト 阻 害 剤 に 結 合 す る F v を 含 む 第 1 の 単 量 体 (「 s c F v 単 量 体 」) と 、 b) 非 対 称 変 異 体

50

L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「F a b 単量体」）と、c）軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の T I M - 3 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

【0347】

いくつかの実施形態では、T I M - 3 X P D - 1 抗体は、非対称変異体、p I 変異体、切断変異体、および F c R n 変異体を含む。したがって、いくつかの実施形態は、栓抜き型を提供し、この栓抜き型は、a）帯電 s c F v リンカー（いくつかの実施形態では、図7の + H 配列が好ましい）、非対称変異体 S 3 6 4 K / E 3 5 7 Q、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、ならびに本明細書で概説するチェックポイント阻害剤に結合する F v を含む第1の単量体（「s c F v 単量体」）と、b）非対称変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S、p I 変異体 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D、切断変異体 E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 d e l / S 2 6 7 K、F c R n 変異体 M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、および可変軽ドメインと一緒に、本明細書で概説する第2のチェックポイント阻害剤に結合する F v を作りあげる可変重ドメインを含む、第2の単量体（「F a b 単量体」）と、c）軽鎖と、を含む。この実施形態の具体的な例は、P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を利用するが、配列表中の T I M - 3 または P D - 1 F v のいずれかが任意の組み合わせで対となり、使用することができる。

【0348】

さらなる実施形態は、T I M - 3 F a b 側および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図37からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0349】

さらなる実施形態は、T I M - 3 F a b 側および P D - 1 s c F v 1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9 を有する、図38からの骨格のうちのいずれかを含む。

【0350】

いくつかの実施形態では、T I M - 3 F a b 側 X P D - 1 二重特異性抗体について、T I M - 3 F a b 側 F a b 側の F v は、識別子 1 D 1 0 _ H 0 L 0、1 D 1 2 _ H 0 L 0、3 H 3 _ H 1 _ L 2 . 1、6 C 8 _ H 0 L 0、6 D 9 _ H 0 _ 1 D 1 2 _ L 0、7 A 9 _ H 0 L 0、7 B 1 1 _ H 0 L 0、7 B 1 1 v a r _ H 0 L 0、および 7 C 2 _ H 0 L 0 を有する、配列表のそれらの配列から選択される。P D - 1 s c F v 側の F v は、識別子 1 G 6 _ H 1 . 2 7 9 _ L 1 . 1 9 4、1 G 6 _ H 1 . 2 8 0 _ L 1 . 2 2 4、1 G 6 _ L 1 . 1 9 4 _ H 1 . 2 7 9、1 G 6 _ L 1 . 2 1 0 _ H 1 . 2 8 8、および 2 E 9 _ H 1 L 1 を有する、配列表のそれらの配列から選択される。

【0351】

加えて、本発明の抗体は、本明細書に概説される抗原結合ドメインと同じエピトープ、または本明細書に概説される抗原結合ドメインとの結合について競合するエピトープのいずれかに結合するものを含む。いくつかの実施形態では、二重特異性チェックポイント抗体は、本明細書に概説される A B D のうちの1つと、本明細書に概要される A B D のうちの1つと結合について競合する第2の A B D とを含有し得る。いくつかの実施形態では、両 A B D は、本明細書に概説される対応する A B D と結合について競合する。結合競合は一般に、B i a c o r e、表面プラズモン共鳴（S P R）、および／または B L I（バイオレイヤー干渉、例えば、O c t e t アッセイ）アッセイのうちの少なくとも1つを使用して決定され、多くの実施形態において、後者が特に有用である。

【0352】

V I I . 有用な実施形態

一実施形態では、本発明において有用な非対称変異体および p I 変異体の特定の組み合わ

せは、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V : T 3 6 6 W (任意選択で架橋ジスルフィド、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V / Y 3 4 9 C : T 3 6 6 W / S 3 5 4 Cを含む)であり、一方の単量体は、Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 8 1 Dを含み、もう一方の単量体は、正の帯電 s c F v リンカー (型が s c F v ドメインを含む場合)を含む。当該技術分野で理解されるように、「ノブインホール」変異体は、p Iを変化させず、したがって、いずれの単量体で使うことができる。

【0353】

V I I I . 本発明の核酸

本発明は、本発明の二重特異性抗体をコードする核酸 (または「単一特異性」抗体の場合、それらをコードする核酸も) 組成物をさらに提供する。

【0354】

当業者に理解されるように、核酸組成物は、ヘテロ二量体タンパク質の型および足場に依存する。したがって、例えば、型が3つのアミノ酸配列を必要とする場合、例えば、二重 s c F v 型を除いて、図1に示される全ての型に関して、3つの核酸配列が発現のための1つ以上の発現ベクターに組み込まれ得る。同様に、いくつかの型 (例えば、図1に開示されるものなどの二重 s c F v 型) 2つの核酸のみが必要とされ、同様に、それらは、1つまたは2つの発現ベクターに加えられる。

【0355】

当該技術分野で知られるように、本発明の構成要素をコードする核酸は、当該技術分野で知られる、および本発明のヘテロ二量体抗体を産生するために使用される宿主細胞によって、発現ベクターに組み込まれ得る。一般に、核酸は、任意の数の制御要素 (プロモーター、複製の起源、選択可能なマーカー、リボソーム結合部位、誘導物質など) に操作可能に連結される。発現ベクターは、外部染色体または統合ベクターであってもよい。

【0356】

本発明の核酸および/または発現ベクターは、その後、哺乳類、細菌、酵母菌、昆虫、および/または真菌細胞を含む当該技術分野でよく知られる任意の数の異なる型の宿主細胞に変換され、哺乳細胞 (例えば、C H O細胞) は、多くの実施形態において有用である。

【0357】

いくつかの実施形態では、型に応じて適用可能であるように、各単量体をコードする核酸および軽鎖をコードする任意選択の核酸は、一般に、異なるまたは同一のプロモーター制御下で、単一の発現ベクター内でそれぞれ含有される。本発明の特定使用の実施形態では、これらの2つまたは3つの核酸のそれぞれは、異なる発現ベクター上に含有される。本明細書および62/025,931 (参照により本明細書に組み込まれる) で示されるように、異なるベクターの比は、ヘテロ二量体形成を誘起するために使用され得る。すなわち、驚くべきことに、タンパク質が、1:1:2の比で第1の単量体:第2の単量体:軽鎖 (ヘテロ二量体抗体を含む3つのポリペプチドを有する本明細書の実施形態の多くの場合) を含むが、これらは、最良の結果をもたらす比ではない。

【0358】

本発明のヘテロ二量体抗体は、当該技術分野においてよく知られている発現ベクターを含む宿主細胞を培養することによって作製される。一旦産生されると、イオン交換クロマトグラフィー段階を含む伝統的な抗体精製段階がなされる。本明細書で論じられるように、2つの単量体の p I を少なくとも0.5異なるようにすることで、イオン交換クロマトグラフィーもしくは等電点電気泳動、または等電点感受性の他の方法によっての分離が可能になる。すなわち、各モノマーの等電点 (p I) を変える p I 置換を含むことにより、各単量体が異なる p I を有し、ヘテロ二量体も明確な p I を有し、したがって、「三重 F」ヘテロ二量体の等電精製 (例えば、アニオン交換カラム、カチオン交換カラム) を容易にする。これらの置換は、何らかの混入している二重 s c F v - F c ホモ二量体および m A b ホモ二量体の、精製 (例えば、I E F ゲル、c I E F、および分析 I E X カラム) 後の判定および監視においても役に立つ。

【0359】

IX. ヘテロ二量体チェックポイント抗体の生物学的および生化学的機能性

一般に、本発明の二重特異性チェックポイント抗体本はがんを有する患者に投与され、有効性は本明細書に記載されるいくつかの方法で評価される。したがって、がん負荷、腫瘍のサイズ、および転移の存在またはその程度の評価等の、有効性の標準的なアッセイが実行され得る一方で、免疫腫瘍学的治療は免疫状態評価に基づいて評価することもできる。これは、インビトロおよびインビボアッセイの両方を含む、いくつかの方法で行うことができる。例えば、腫瘍量、サイズ、侵襲性、LN関与、転移等の「従来の」測定と共に、免疫状態の変化の評価（例えば、ipi治療後のICOS+CD4+T細胞の存在）が行われてもよい。したがって、CD4+T細胞活性化もしくは増殖、CD8+T（CTL）細胞活性化もしくは増殖、CD8+T細胞媒介細胞傷害活性、ならびに／またはCTL媒介細胞枯渇、NK細胞活性、およびNK媒介細胞枯渇に対するチェックポイントの阻害効果、Treg細胞分化および増殖、ならびにTregもしくは骨髄由来抑制因子細胞（MDSC）媒介免疫抑制もしくは免疫寛容に対するチェックポイントの増大効果、ならびに／または免疫細胞により産生された炎症誘発性サイトカイン、例えば、T細胞もしくは他の免疫細胞によるIL-2、IFN-γ、もしくはTNF-α産生に対するチェックポイントの効果のうちのいずれか、またはすべてが評価され得る。

【0360】

いくつかの実施形態では、治療の評価は、例えば、CFSE希釈法、免疫エフェクター細胞のKi67細胞内染色、および3H-チミジン組み込み法を用いて、免疫細胞増殖を評価することによって行われる。

【0361】

いくつかの実施形態では、治療の評価は、CD25、CD69、CD137、ICOS、PD1、GITR、OX40のうちの1つ以上を含む活性化関連マーカーの遺伝子発現の増加、またはそのタンパク質レベルの増加、およびCD107Aの表面発現によって測定された細胞脱顆粒を評価することによって行われる。

【0362】

一般に、当該技術分野で知られる遺伝子発現アッセイが行われる。

【0363】

一般に、当該技術分野で知られるタンパク質発現測定も同様に行われる。

【0364】

いくつかの実施形態では、治療の評価は、酵素活性（プロテアーゼ活性を含む）、細胞膜透過性、細胞接着、ATP産生、共酵素産生、およびヌクレオチド取り込み活性などの多くの細胞パラメータを推定することにより、標的細胞の生存率を検出することによって測定される細胞傷害活性を評価することによって行われる。これらのアッセイの具体的な例としては、限定されないが、トリパンブルーまたはPI染色、51Crまたは35S放出法、LDH活性、MTTおよび／またはWSTアッセイ、カルセイン-AMアッセイ、発光に基づくアッセイ、およびその他が挙げられる。

【0365】

いくつかの実施形態では、治療の評価は、よく知られた技法を使用して、限定されないが、IFNγ、TNFα、GM-CSF、IL2、IL6、IL4、IL5、IL10、IL13を含むサイトカインを使用して、培養上清においていずれの細胞内で測定する、サイトカイン産生によって測定されたT細胞活性を評価することによって行われる。

【0366】

したがって、治療の評価は、次のうちの1つ以上を評価するアッセイを使用して行うことができる：(i) 免疫応答の増加、(ii) αβおよび／またはγδT細胞の活性化の増加、(iii) 細胞傷害性T細胞活性の増加、(iv) NKおよび／またはNK細胞活性の増加、(v) αβおよび／またはγδT細胞抑制の軽減、(vi) 炎症誘発性サイトカイン分泌の増加、(vii) IL-2分泌の増加、(viii) インターフェロンγ産生の増加、(ix) Th1応答の増加、(x) Th2応答の減少、(xi) 制御性T細胞（Tregのうちの少なくとも1つの細胞数および／または活性の減少もしくは排除。

【0367】

有効性を測定するためのアッセイ

いくつかの実施形態では、T細胞活性化は、当該技術分野で知られる混合リンパ球反応（MLR）アッセイを使用して評価される。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0368】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、異なる因子のリン酸化または脱リン酸化によって測定されるように、または他の翻訳後修飾を測定することによって、免疫応答の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

10

【0369】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞の活性化の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0370】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、がん細胞のような標的細胞の直接殺傷によって、またはサイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって例えば測定される、細胞傷害性T細胞活性化の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

20

【0371】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、がん細胞のような標的細胞の直接殺傷によって、またはサイトカイン分泌によって、または例えばCD107aのような活性化マーカーの発現の変化によって例えば測定される、NKおよび／またはNK細胞活性化の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0372】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞抑制の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

30

【0373】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、ELISAにより、またはLuminexにより、またはMultiplexビーズに基づく方法により、または細胞内染色およびFACS分析により、またはAlisport等により測定される、炎症誘発性サイトカイン分泌の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

40

【0374】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、ELISAにより、またはLuminexにより、またはMultiplexビーズに基づく方法により、または細胞内染色およびFACS分析により、またはAlisport等により測定される、IL-2分泌の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0375】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、ELISAにより、またはLuminexにより、またはMultiplexビーズに基づく方法により、または細胞内染色およびFACS分析により、またはAlisport等により測定される、インターフ

50

ェロン γ 産生の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0376】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 T_h1 応答の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0377】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 T_h2 応答の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

10

【0378】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、フローサイトメトリーによって、またはIHCによって測定される、制御性T細胞 (T_{reg}) のうちの少なくとも1つの細胞数および／または活性の増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じである。

【0379】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、フローサイトメトリーによって、またはIHCによって測定される、M2マクロファージ細胞数の増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じである。

20

【0380】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される、M2マクロファージ腫瘍形成誘発活性の増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じである。

【0381】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、フローサイトメトリーによって、またはIHCによって測定される、N2好中球増加における増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じである。

30

【0382】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される、N2好中球腫瘍形成誘発活性の増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じである。

【0383】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される、T細胞活性化阻害の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

40

【0384】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、がん細胞のような標的細胞の直接殺傷によって、またはサイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって例えば測定される、CTL活性化阻害の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0385】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞消耗の増加または減少を測定する。応答の減少は免疫刺激活性を示す。以下に概説される適切な減少は増加に関するものと同じ

50

である。

【0386】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される、 $\alpha\beta$ および／または $\gamma\delta$ T細胞応答の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0387】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えばCD45RA、CCR7等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される、抗原特異的メモリー応答刺激の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

10

【0388】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、MTT、Cr放出、カルシンAMなどの細胞傷害性アッセイにより、または例えば、CFSE希釈またはヨウ化プロピジウム染色等のようなフローサイトメトリーに基づくアッセイによって例えば測定される、がん細胞のアポトーシスまたは溶解の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0389】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、MTT、Cr放出、カルシンAMなどの細胞傷害性アッセイにより、または例えば、CFSE希釈またはヨウ化プロピジウム染色等のようなフローサイトメトリーに基づくアッセイによって例えば測定される、がん細胞に対する細胞傷害性効果または細胞増殖抑制性効果の刺激における増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

20

【0390】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、MTT、Cr放出、カルシンAMなどの細胞傷害性アッセイにより、または例えば、CFSE希釈またはヨウ化プロピジウム染色等のようなフローサイトメトリーに基づくアッセイによって例えば測定される、がん細胞の直接殺傷の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

30

【0391】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される、Th17活性の増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

【0392】

一実施形態では、シグナル伝達経路アッセイは、例えば、MTT、Cr放出、カルシンAMについてなどの細胞傷害性アッセイにより、または例えば、CFSE希釈またはヨウ化プロピジウム染色等のようなフローサイトメトリーに基づくアッセイによって例えば測定される、補体依存性細胞傷害および／または抗体依存性細胞傷害の誘導における増加または減少を測定する。活性の増加は免疫刺激活性を示す。適切な活性の増加を以下に概説する。

40

【0393】

一実施形態では、T細胞活性化は、例えば、がん細胞のような標的細胞の直接殺傷によって、またはサイトカイン分泌によって、または増殖によって、または例えば、CD137、CD107a、PD1等のような活性化マーカーの発現の変化によって例えば測定される。T細胞について、増殖、活性化の細胞表面マーカー（例えば、CD25、CD69、CD137、PD1）、細胞傷害（標的細胞を殺傷する能力）、およびサイトカイン産生（例えば、IL-2、IL-4、IL-6、IFN γ 、TNF- α 、IL-10、IL-17A）の増加は、がん細胞の強化された殺傷と一致する免疫調節の指標となるだろう。

50

【0394】

一実施形態では、NK細胞活性化は、例えば、例えばがん細胞のような標的細胞の直接殺傷によって、またはサイトカイン分泌によって、または例えばCD107a等のような活性化マーカーの発現の変化によって測定される。NK細胞について、増殖、細胞傷害性（標的細胞を殺傷する能力、CD107a、グランザイム、およびパーフォリン発現の増加）、サイトカイン産生（例えば、IFN γ およびTNF）、および細胞表面受容体発現（例えばCD25）の増加は、がん細胞の強化された殺傷と一致する免疫調節の指標となるだろう。

【0395】

一実施形態では、 $\gamma\delta$ T細胞の活性化は、例えば、サイトカイン分泌によって、または増殖によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される。

10

【0396】

一実施形態では、Th1細胞の活性化は、例えば、サイトカイン分泌によって、または活性化マーカーの発現の変化によって測定される。

【0397】

適切な活性または応答の増加（または上に概説されるように、必要に応じて減少）は、参照試料または対照試料のいずれか、例えば本発明の抗体を含有しない試験試料のシグナルに対する10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または98~99%パーセントの増加である。同様に、参照または対照試料と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍の増加は有効性を示す。

20

【0398】

X. 治療

一旦作製されると、本発明の組成物は、がんを治療することによる、一般に、本発明の二重特異性チェックポイント抗体の結合と共に、T細胞活性の抑制を阻害することによる（例えば、T細胞はもはや抑制されない）いくつかの腫瘍学用途に有用である。

【0399】

したがって、本発明のヘテロ二量体組成物は、これらの癌の治療に有用である。

【0400】

XI. 併用療法

いくつかの実施形態では、二重特異性チェックポイントが抗PD-1抗原結合ドメインを含まない場合、二重特異性抗体は、ペンブロリズマブ（Keytruda（登録商標））またはニボルマブ（Opdivo（登録商標））などの別個の抗PD-1抗体と共投与することができる。共投与は、当業者に理解されるように同時にまたは順次行うことができる。

30

【0401】

すなわち、本明細書に開示されるCTLA-4XLAG-3二重特異性チェックポイント抗体、または配列表の抗LAG-3配列および抗CTLA-4配列を組み込むもののうちのいずれかなど、および特に、XENP22602、XENP22675、XENP22841、またはXENP22843は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0402】

同様に、本明細書に開示されるBTLAxCTLA-4二重特異性チェックポイント、または配列表の抗BTLA配列および抗CTLA-4配列を組み込むもののうちのいずれかなどは、抗PD-1抗体と共投与することができる。

40

【0403】

配列表の抗TIM-3配列および抗CTLA-4配列を組み込むもののうちのいずれかなどのCTLA-4xTIM-3二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0404】

配列表の抗CTLA-4および抗TIGIT配列を組み込むもののうちのいずれかなどのCTLA-4およびTIGIT二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共

50

投与することができる。

【0405】

配列表の抗TIM-3配列および抗LAG-3配列を組み込むもののうちのいずれかなどのTIM-3およびLAG-3二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0406】

配列表の抗TIM-3配列および抗TIGIT配列を組み込むもののうちのいずれかなどのTIM-3およびTIGIT二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0407】

配列表の抗TIM-3および抗BTLA配列を組み込むもののうちのいずれかなどのTIM-3およびBTLA二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0408】

配列表の抗LAG-3配列および抗TIGIT配列を組み込むもののうちのいずれかなどのLAG-3およびTIGIT二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0409】

配列表の抗LAG-3配列および抗BTLA配列を組み込むもののうちのいずれかなどのLAG-3およびBTLA二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0410】

配列表の抗TIGIT配列および抗BTLA配列を組み込むもののうちのいずれかなどのTIGITおよびBTLA二重特異性チェックポイント抗体は、抗PD-1抗体と共投与することができる。

【0411】

XII. インビボ投与用の抗体組成物

本発明に従って使用される抗体の製剤は、所望の純度を有し、任意選択で、医薬的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤（一般にRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]に概説される）と共に抗体を混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態において、貯蔵向けに調製される。許容可能な担体、緩衝剤、賦形剤、または安定剤は、用いられる投与量および濃度で、レシipientに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール、メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなど）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸、単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の糖質、EDTAなどのキレート物質、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）、ならびに／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【0412】

投与様式

本発明の抗体および化学療法剤は、ボラスとしての静脈投与、または一定期間にわたる

10

20

30

40

50

継続注入による静脈投与などの既知の方法に従って、対象に投与される。

【0413】

治療様式

本発明の方法において、療法は、疾患または状態に関する有益な治療応答を提供するために使用される。「有益な治療応答」は、疾患もしくは状態における改善、および／または疾患もしくは状態に関連する症状における改善を意図する。例えば、有益な治療応答は、疾患における下記の改善のうちの1つ以上を指す：（１）新生物細胞数の減少、（２）新生物細胞死の増加、（３）新生物細胞の生存阻害、（５）腫瘍成長の阻害（すなわち、ある程度の緩徐、好ましくは停止）、（６）患者生存率の増加、および（７）疾患または状態に関連する1つ以上の症状のいくらかの緩和。

10

【0414】

何らかの所与の疾患または状態における有益な治療応答は、疾患または状態に特有の標準化された応答基準によって決定され得る。腫瘍応答は、磁気共鳴画像法（MRI）スキャン、x線画像法、コンピュータ断層撮影（CT）スキャン、骨スキャン画像法、内視鏡検査、ならびに骨髓穿刺（BMA）および循環における腫瘍細胞の計数を含む腫瘍生検試料採取などのスクリーニング技法を使用して、腫瘍形態学（すなわち、全体的な腫瘍量、腫瘍サイズなど）における変化で評価することができる。

【0415】

これらの有益な治療応答に加えて、治療を受けている対象は、疾患に関連する症状において、改善の有利な効果を経験し得る。

20

【0416】

本発明による治療は、使用する薬剤の「治療有効量」を含む。「治療有効量」は、必要な投与量および期間で、所望の治療結果を達成するために有効である量を指す。

【0417】

治療有効量は、個々の疾患の状況、年齢、性別、および体重などの要因、ならびに個々における、薬剤の所望応答を引き出す能力に応じて変化してよい。治療有効量は、抗体または抗体部分の治療上有利な効果が、何らかの毒性作用または有害作用を凌ぐ量でもある。

【0418】

腫瘍治療に向けた「治療有効量」は、疾患の進行を安定化させるその能力によって測定されてもよい。がんを阻害する化合物の能力を、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価してよい。

30

【0419】

あるいは、組成物のこの性質は、当業者に知られるインビトロアッセイによって、化合物が、細胞の成長を抑制する能力、またはアポトーシスを誘導する能力を試験することによって評価されてもよい。治療用化合物の治療有効量によって、対象の腫瘍サイズが減少されるか、またはそうでなければ、対象の症状が回復し得る。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および特定の組成物、または選択される投与経路などの要因に基づいてそのような量を決定できるであろう。

【0420】

投与レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与するか、いくつかに分割された用量を長時間にわたって投与するか、または治療状況の要件が示すように、比例的に用量を減少または増加してよい。非経口組成物を、投与の容易化、および投与量の均一性のために、投与量単位形態に製剤化してよい。本明細書で使用される投与量単位形態は、治療される対象の単位投与量として好適な物理的に別個の単位を指す。各単位は、必要な薬学的担体と共に、所望の治療効果をもたらすために計算された既定の量の活性化合物を含有する。

40

【0421】

本発明の投与量単位形態のための規格は、（a）活性化合物特有の特性、および達成される特定の治療効果、ならびに（b）そのような活性化合物を、個々の感受性の治療向けに配合する技術分野での固有の制限、によって決定されると共に、直接的にそれらに応じて

50

、決定される。

【0422】

本発明において使用される二重特異性抗体に向けた、効率的な投与量および投与レジメンは、治療される疾患または状態に依存し、当業者によって決定されてよい。

【0423】

本発明に使用される二重特異性抗体の治療有効量の例示的な非限定的な範囲は、約0.1～100mg/kgである。

【0424】

すべての引用文献は、参照によりそれらの全体が明確に本明細書に組み込まれる。

【0425】

例示目的に向けて、本発明の特定の実施形態を上記に説明したが、当業者は、添付の特許請求の範囲において説明される本発明から逸脱することなく、多くの詳細の変更が行われ得ることを理解するであろう。

【実施例】

【0426】

本発明を示すために、実施例を以下に提供する。これらの実施例は、本発明を何らかの特定の応用、または実施理論に限定しようと意図するものではない。本発明において論じられる定常領域の位置のすべてに関して、番号付けは、Kabata (Kabata et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda。参照によって、全体が組み込まれる)にあるように、EUIンデックスに従う。抗体技術分野の当業者であれば、この慣習が、免疫グロブリン配列の特定領域における、非連続的な番号付けからなっており、免疫グロブリンファミリーにおける保存位置への標準化された参照が可能になっていることを理解するであろう。したがって、EUIンデックスによって定義される、何らかの所与の免疫グロブリンの位置は、その連続配列に必ずしも対応していないことになる。

【0427】

一般的かつ特定の科学技法は、米国公開第2015/0307629号、同第2014/0288275号、およびWO2014/145806に概説され、これらはすべて、参照により全体が明確に組み込まれ、特に、それらに概説される技術に関して組み込まれる。

【0428】

A. 実施例1：複数のがんの種類からのTILは免疫チェックポイント受容体を共発現する。

PD-1、CTLA-4、LAG-3、およびBTLA間の潜在的な関連性を調査するために、The Cancer Genome Atlas project (TCGA)のRNA配列決定データを分析のために使用した。V2 RSEMデータは、FireBrowse (<http://firebrowse.org/>)からダウンロードされた。カスタムルーチンでRを用いて分析を実施した。PD-1とCTLA-4発現との間の相関を、計算されたR²値(図1：ピアソン相関係数の2乗)と共に図66に示す。図66はさらに、PD-1とLAG-3発現、PD-1とBTLA発現、およびLAG-3とCTLA-4発現との間の相関を示す。

【0429】

図44は、PD-1およびCTLA-4が、膀胱癌、乳癌、結腸癌、前立腺癌、黒色腫、卵巣癌、および肺癌を含むがんにおいて共発現されたことを示し、PD-1およびCTLA-4、PD-1およびLAG-3、PD-1およびBTLA、ならびにLAG-3およびCTLA-4のセットが、膀胱癌、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、および黒色腫の癌を含むがんにおいて共発現されたことを示す。

【0430】

B. 実施例 2：二重特異性免疫チェックポイント抗体は、単一特異性免疫チェックポイント抗体より優れている

二重チェックポイント遮断の効果を示すために、プロトタイプ免疫チェックポイント抗体（例えば、ニボルマブおよびイピリムマブ）およびプロトタイプ抗体に基づく二重特異性免疫チェックポイント抗体を産生した。別段の記載がない限り、本明細書において、二重特異性体は、最初に Fab 可変領域、そして次に scFv 可変領域を使用して命名される。プロトタイプ抗体のアミノ酸配列は配列表のリストに記載される。重鎖および軽鎖をコードする DNA を、遺伝子合成によって生成し（Blue Heron Biotechnology, Bothell, Wash）、標準的な分子生物学技法を使用して、二価または二重特異性定常領域を含有する発現ベクター pTT5 にサブクローニングし、HEK293E 細胞において一時的にトランスフェクトした。抗体を、プロテイン A クロマトグラフィー（および二重特異性抗体についてはカチオン交換クロマトグラフィー）により精製した。サイズ排除クロマトグラフィー、分析カチオン交換クロマトグラフィー、およびキャピラリー等電電気泳動により純度を評価した。

【0431】

1. 二重陽性細胞は、二重特異性免疫チェックポイント抗体によって選択的に占有される。単一免疫チェックポイント受容体を発現する非腫瘍反応性 T 細胞に対する、複数の免疫チェックポイント受容体を発現する腫瘍反応性 TIL の選択的標的（実施例 1 に示されるように）は、周辺毒性を回避しながら抗腫瘍活性を増強することができる（図 42 に示されるように）。

【0432】

SEB 刺激 PBMC アッセイを使用して、二重特異性免疫チェックポイント抗体の T 細胞への結合を調査した。SEB 刺激 PBMC アッセイは、T ヘルパー（TH）細胞増殖をアッセイし、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）の集団を生成するためのインビトロ方法である。PBMC が staphylococcal エンテロトキシン B（SEB）で刺激される場合、TH 細胞集団は拡大し、続いて CTL 集団が拡大する。PBMC を、100 ng/mL の SEB で 3 日間刺激し、次いで、4℃で 30 分間、プロトタイプの抗LAG-3 x 抗PD-1 二重特異性抗体および陰性対照（Numax、二価）で処理した。処理後、細胞を、4℃で 30 分間、APC 標識片腕抗LAG-3 抗体、FITC 標識片腕抗PD-1 抗体、および BV605 標識抗CD3 抗体と共にインキュベートした。CD3+T 細胞の散布図を図 67 に示す。データは、PD-1 および LAG-3 の両方を発現する二重陽性細胞が、二重特異性免疫チェックポイント抗体が複数のチェックポイント受容体を発現する T 細胞を選択的に標的とすることを示す抗LAG-3 x 抗PD-1 二重特異性体によって選択的に占有されることを示す。

【0433】

2. 抗CTLA-4 x 抗PD-1 二重特異性体は混合リンパ球反応においてIL-2 応答を増強する

プロトタイプ免疫チェックポイント抗体XENP16432（ニボルマブ）およびXENP16433（イピリムマブ）、ニボルマブおよびイピリムマブに基づく二重特異性免疫チェックポイント抗体XENP16004、ならびに片腕（単一特異性、一価）組み合わせ対照を、混合リンパ球反応（混合白血球反応またはMLRとしても知られる）において試験した。MLRは、T ヘルパー（TH）細胞増殖をアッセイし、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）の集団を生成するための別のインビトロ方法である。同種（異なるMHCハプロタイプ）リンパ球が一緒に培養される場合、TH細胞集団は拡大し、続いてCTL集団が拡大する。インターロイキン-2（IL-2）分泌を使用して、T細胞の活性化を監視した。

【0434】

Ficoll-Plus（商標）Plus 密度勾配を使用して、ヒトPBMCの異なるセットを、異なる匿名の健常なボランティア（HemaCare, Van Nuys, CA）の白血球アフレーションから精製した。2人のドナー由来のPBMCを混合し、次いで

、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の示される試験物品で処理した。上清を収集し、 $\text{IL}-2$ ELISAを使用して $\text{IL}-2$ の濃度を測定し、示されるデータはいくつかの抗 $\text{CTLA}-4$ Fabスクリーニングの結果を示す。これは、FabおよびscFvの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトおよびcyno $\text{CTLA}-4$ に対するKD結合定数、ならびにscFvおよびFabの T_m を示す。加えて、少なくとも1つのヒトVHまたはVL生殖系列と正確に一致した配列9量体の数は、FabおよびscFvの両方の可変領域のヒト性の尺度として示される。

【0435】

図25A。各カラムについて、各データ点は異なるドナードナーの組み合わせの別個の反応である。

【0436】

データは、プロトタイプ抗PD-1 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 二重特異性抗体がニボルマブおよびイピリムマブ単独よりも大幅に $\text{IL}-2$ 応答を増大することを示す。特に、片腕の組み合わせ（二重特異性体のそれぞれの一価のアームに別個に付加される）は、抗PD-1 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 二重特異性体よりも劣り、二重陽性PD-1 + $\text{CTLA}-4$ + 細胞に対して二重特異性体がより強く結合することを示唆し、これは抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性抗体に関して図67に示される所見と一致する。

【0437】

3. 追加の二重特異性免疫チェックポイント抗体は、混合リンパ球反応において $\text{IL}-2$ 応答を増強する

追加の免疫チェックポイント受容体に向けられる追加のプロトタイプ免疫チェックポイント抗体および二重特異性免疫チェックポイント抗体を、上述のMLRアッセイにおいて試験した。20のドナーが1つレシピエントドナーを標的とし、別のセットの20のドナーが別の1つのレシピエントドナーを標的とする、合計40のMLR反応の2セットのMLRを創出した。反応物を、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の示される試験物品と共に6日間インキュベートした。抗PD-1二価（XENP16432）での治療に対する示される試験物品での治療後の $\text{IL}-2$ および $\text{IFN}\gamma$ （ELISAによってアッセイされる）の倍数増加を示すデータを図32に示す。データは、追加の二重特異性免疫チェックポイント抗体も活性化T細胞においてニボルマブ単独よりも優れていたことを示す。

【0438】

4. 三重免疫チェックポイント遮断—抗PD-1二価および抗LAG-3 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 二重特異性抗体は、SEB刺激PBMCアッセイにおける $\text{IL}-2$ 応答の増強において相乗的である

図43に示される抗PD-1二価および抗LAG-3 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 二重特異性体などによる三重免疫チェックポイント遮断がT細胞活性化の増強において追加の利益を提供するであろうと仮定された。仮説を試験するために、プロトタイプ免疫チェックポイント抗体XENP16432（ニボルマブ）、25F7およびイピリムマブに基づくプロトタイプ二重特異性抗LAG-3 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 免疫チェックポイント抗体XENP16430、ならびにXENP16432およびXENP16430の組み合わせを、SEB刺激PBMCアッセイにおいて試験した。

【0439】

複数のドナー由来のヒトPBMCを、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の示される試験物品と共に、72時間、 $10\text{ng}/\text{mL}$ のSEBで刺激した。処理後、細胞上清を、ELISAによって、 $\text{IL}-2$ についてアッセイした。Numax二価に対する $\text{IL}-2$ の倍数増加についてのデータが図33に示される。各点は、技術的一重項において表されるドナーを示す。

【0440】

データは、抗LAG-3 x 抗 $\text{CTLA}-4$ 二重特異性チェックポイント抗体（XENP16430）単独が、対照（Numax二価）に対して $\text{IL}-2$ 応答を増強したが、増強はニボルマブ（XENP16432）単独よりも低いことを示す。しかしながら、ニボルマブと組み合わせた抗 $\text{CTLA}-4$ x 抗LAG-3二重特異性体は、どちらかの単独よりも

10

20

30

40

50

著しく高いIL-2応答をもたらす。

【0441】

5. チェックポイント受容体／リガンド相互作用の遮断はT細胞活性化に必要である
バイオレイヤー干渉（BLI）に基づく方法Octetを使用して、プロトタイプ抗BTLA抗体4A7、E8D9、および8D5を、そのリガンドHVEMとのBTLA相互作用を遮断するそれらの能力についてスクリーニングした。Octetの実験段階には、一般に以下が含まれた：固定化（リガンドまたは試験物品をバイオセンサ上に捕捉する）、会合（リガンドまたは試験物品コーティングしたバイオセンサを、対応する試験物品またはリガンドの連続希釈を含有するウェルに浸漬する）、および試験物品の一価親和性を決定するための解離（バイオセンサを、緩衝剤を含有するウェルに戻す）。緩衝液のみを含有する参照ウェルも、データ処理中のバックグラウンド補正の方法に含まれた。500 nMの各抗BTLA抗体および100 nMのBTLA-Fcを、1時間にわたってインキュベートした。抗Penta-His（HIS1K）バイオセンサを使用して、HVEM-Fc-Hisを捕捉し、次いで、抗体／BTLA混合物に浸漬して、残留BTLA／HVEM結合を測定した。図35Bに示されるように、8D5は、BTLA／HVEM相互作用を遮断しなかったが、4A7およびE8D9は、BTLA／HVEM相互作用を遮断した。

10

【0442】

プロトタイプ抗BTLA抗体、およびプロトタイプ抗体に基づく抗BTLA Fabアームを有する抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体を、SEB刺激PBMCアッセイにおいて試験した。具体的には、ヒトPBMCを、20 µg/mLの示される試験物品と共に20 ng/mLのSEBで72時間刺激した。処理後、細胞上清を、ELISAによって、IL-2についてアッセイした。Numax二価に対するIL-2の倍数増加についてのデータを、図35Aに示す（各点は、一重項で試験した個々のPBMCドナーを表す）。データは、非遮断8D5抗BTLA Fabアームを有する二重特異性抗体がニボルマブよりも著しく少ないIL-2を誘導したことを示し、BTLA／HVEM相互作用の遮断がT細胞活性化の増強に必要であることを示す。

20

【0443】

6. 二重特異性免疫チェックポイント抗体はヒトPBMC移植NSGマウスにおける生着および疾患活性を増強する

30

二重特異性チェックポイント抗体を、NSG（NOD-SCID-ガンマ）免疫不全マウスにおいて実施された移植片対宿主病（GVHD）モデルにおいて評価した。NSGマウスにヒトPBMCを注入したとき、ヒトPBMCはマウス細胞に対して自己免疫応答を発達させた。ヒトPBMCを注入されたNSGマウスの処置後の免疫チェックポイント阻害剤での処置は移植されたT細胞を抑制解除（de-repress）し、生着を増強する。

【0444】

1000万個のヒトPBMCを、0日目にIV-OSPを介してNSGマウスに移植し、その後1日目に示される試験物品（5 mg/kgまたは示されるとおり）を投与した。CD45+事象を14日目に測定した（図34）。GVHDは直接測定されたが、CD45+細胞レベルの増加は体重の減少と相関する（ニボルマブ（抗PD-1モノクローナル抗体、Opdivo（登録商標）として販売されている）単独、イピリムマブ単独（抗CTLA-4モノクローナル抗体、Yervoy（登録商標）として販売されている）、ニボルマブおよびイピリムマブアームに基づくプロトタイプ抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体、および「片腕」組み合わせ対照。によるIL-2放出の増強を見る混合リンパ球反応を示す。

40

【0445】

図26B）、および疾患を予測する。

【0446】

データは、本発明の二重特異性チェックポイント抗体が、対照（PBS+PBMC）と比較して、ヒトPBMC移植NSGマウスにおけるCD45+細胞の増殖を増強することを

50

示す。さらに、ニボルマブ（XENP16432）単独で見られるよりも、本発明の抗体を使用の方が増強が大きい。さらに、ニボルマブと組み合わせた抗CTLA-4 x 抗LAG-3二重特異性体（XENP16430）は、実施例2Dのデータと一致する最高の生着レベルをもたらした。

【0447】

C. 実施例3：ハイブリドーマ

1. ハイブリドーマ生成

本発明の二重特異性免疫チェックポイント抗体のPD-1、LAG-3、およびBTLA標的アームを開発するために、標準的な方法またはRapid Prime方法のいずれかによる、ImmunoPreciseのハイブリドーマ技術により、モノクローナル抗体を最初に生成した。

【0448】

標準的な方法に関して、抗原（複数可）を3匹のBALB/cマウスに注入した。ハイブリドーマ生成のために、殺する7～10日前に、免疫化マウスは抗原ブーストを受けた。抗体価は、ELISAによって抗原で評価され、最良の応答マウスが融合のために選ばれる。最後の抗原ブーストは融合の4日前に与えられる。マウスからのリンパ球をプールし、精製し、次いで、SP2/0骨髓腫細胞と融合した。融合した細胞を、10～12日間、HAT選択的単一段階クローニング媒体上で成長させ、この時点でハイブリドーマはスクリーニングに適した状態であった。

【0449】

Rapid Prime方法に関して、抗原（複数可）を3匹のBALB/cマウスに注入した。19日後、マウスからのリンパ球をプールし、精製し、次いで、SP2/0骨髓腫細胞と融合した。融合した細胞を、10～12日間、HAT選択的単一段階クローニング媒体上で成長させ、この時点でハイブリドーマはスクリーニングに適した状態であった。

【0450】

抗PD-1ハイブリドーマの生成に関して、標準的な方法およびRapid Prime方法が使用され、使用された抗原（複数可）は、ヒトPD-1のマウスFc融合体（huPD-1-mFc）、cyno PD-1のマウスFc融合体（cynoPD-1-mFc）、Hisタグ付きヒトPD-1（hiPD-1-His）、Hisタグ付きcynoPD-1（cynoPD-1-His）、またはこれらの混合物であった。

【0451】

抗BTLAハイブリドーマの生成に関して、標準的な方法およびRapid Prime方法が使用され、使用された抗原は、ヒトBTLAのマウスFc融合体（huBTLA-mFc）、cyno BTLAのマウスFc融合体（cynoBTLA-mFc）、Hisタグ付きヒトBTLA（huBTLA-His）、またはhuBTLA-mFcおよびcynoBTLA-mFcの混合物であった。

【0452】

抗LAG-3ハイブリドーマの生成に関して、Rapid Prime方法が使用され、使用された抗原は、ヒトLAG-3のマウスFc融合体（huLAG-3-mFc）、cyno LAG-3のマウスFc融合体（cynoLAG-3-mFc）、Hisタグ付きヒトLAG-3（hiLAG-3-His）、huLAG-3-mFcおよびcynoLAG-3-mFcの混合物、または混合物huLAG-3-HisおよびcynoLAG-3-Hisであった。

【0453】

抗TIM-3ハイブリドーマの生成に関して、標準的な方法およびRapid Prime方法が使用され、使用された抗原（複数可）は、ヒトTIM-3のマウスFc融合体（huTIM-3-mFc）、cyno TIM-3のマウスFc融合体（cynoTIM-3-mFc）、Hisタグ付きヒトTIM-3（hiTIM-3-His）、Hisタグ付きcynoTIM-3（cynoTIM-3-His）、またはこれらの混合物であった。

【0454】

2. 抗PD-1ハイブリドーマクローンのスクリーニング

上述のように生成された抗PD-1ハイブリドーマクローンは、Octetを使用して2回のスクリーニングを受けた。1回目に関して、抗マウスFc (AMC) バイオセンサを使用してクローンを捕捉し、500 nMの二価ヒトおよびcyno PD-1-Fc-Hisに浸漬した。2回目に関して、ヒトおよびcyno PD-1の両方に対して陽性であった、1回目で同定されたクローンを、AMCバイオセンサ上に捕捉し、500 nM一価ヒトおよびcyno PD-1-Hisに浸漬した。

例示的な抗PD-1抗体の配列は、配列表にある。

【0455】

3. 抗BTLAハイブリドーマクローンのスクリーニング

上述のように生成された抗BTLAハイブリドーマクローンは、Octetを使用して2回のスクリーニングを受けた。1回目に関して、AMCバイオセンサを使用してクローンを捕捉し、複数濃度のヒトおよびcyno BTLA-Hisに浸漬してKDを決定した。2回目に関して、遮断アッセイを使用して、BTLA/HVEM相互作用を遮断したクローンを同定した。抗Penta-His (HIS1K) バイオセンサを使用してHVEM-Fc-Hisを捕捉し、25 nMのBTLA-Fcのみ、またはハイブリドーマ試料の25 nM BTLA-Fc + 1:1希釈に浸漬して、残留BTLA/HVEM結合を測定した。例示的な抗BTLA抗体の配列は、配列表にある。

【0456】

4. 抗LAG-3ハイブリドーマクローンのスクリーニング

抗親和性を有するクローン、MHC-IIを内因的に発現するRamos細胞に結合するLAG-3結合を遮断するクローン、および25 F7 mAbと異なるエピトープに結合するクローンを同定するために、上述のように生成された抗LAG-3ハイブリドーマクローンは、数回のスクリーニングを受けた。

【0457】

Octetを使用して親和性を決定した。AMCバイオセンサを使用してクローンを捕捉し、単一濃度のヒトLAG-3-Fcおよびcyno LAG-3-Fcに浸漬した。LAG-3/MHC-II相互作用を遮断するクローンを同定するために、10 µL中1 µgのヒトLAG-3-hIgを、室温で20分間、50 µLのハイブリドーマ上清（2倍希釈、10% FBSを含むRPMI培地において8回）と混合した。40 µLのDaudiまたはRamos細胞（内因的にMHC-IIを発現する）を添加し、4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、抗ヒトFc-Alexa647二次抗体と共に30分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、FACSによりAlexa647について分析した。データを図62に示す。25 F7 mAbとは異なるエピトープに結合するクローンを同定するために、AMCバイオセンサを使用してクローンを捕捉し、100 nMヒトLAG-3-hFcまたは500 nM 25 F7を含む100 nM LAG-3-hFcに浸漬して、残留結合を測定した。例示的な抗LAG-3抗体の配列は、配列表にある。

【0458】

5. 抗TIM-3ハイブリドーマクローンのスクリーニング

上述のように生成された抗TIM-3ハイブリドーマクローンは、2回のスクリーニングを受けた。1回目は、IgG試料およびIgMクローンのためのスクリーニングに分割された。IgGクローンに関して、AMCバイオセンサを使用してクローンを捕捉し、複数濃度のヒトおよびcyno TIM-3-Hisに浸漬した。IgMクローンに関して、AR2Gを使用して抗IgM mAbをバイオセンサ上に結合し、バイオセンサは、複数濃度のヒトおよびcyno TIM-3-Hisに浸漬された。IgM試料のいずれもベースラインよりも高い結合シグナルをもたらさなかった。1回目のスクリーニングの後、ヒトおよびcyno TIM-3の両方に結合したIgGクローンを、二価のヒトおよびcyno TIM-3-Fcの二価型で再スクリーニングした。例示的な抗TIM-3抗

10

20

30

40

50

体の配列は、配列表にある。

【0459】

クローンのうちのいくつかをキメラ化し、SEB刺激PBMCアッセイにおいてT細胞結合について評価した。ヒトPBMCを、100 ng/mLのSEBで3日間刺激した。刺激後、細胞を、示される試験物品で、4℃で30分間処理した。CD3細胞に対する結合は、抗ヒトFc二次抗体を用いて検出され、図21に示された。

【0460】

6. ハイブリドーマ由来の構成要素抗体ドメインは、チェックポイント受容体／リガンド相互作用を遮断する

実施例2Eに示されるように、チェックポイント受容体／リガンド相互作用の遮断はT細胞活性化に必要である。ハイブリドーマに由来するドメインを含む例示的な抗体の遮断能力を、に示されるように、細胞結合アッセイまたはOctetのいずれかを使用して調査し、本明細書に提供される対象抗体の構成要素抗体ドメインがチェックポイント受容体／リガンド相互作用を遮断することができることを示すグラフである。特に、1G6抗PD-1 scFvアームを含む二重特異性抗体は、PD-1／PD-L1およびPD-1／PD-L2相互作用を遮断することが可能であり、7G8抗LAG-3片腕は、LAG-3／MHC II相互作用を遮断することが可能であり、例示的な抗PD-1 Fabアームを含む二重特異性抗体は、CTLA-4／CD80およびCTLA-4／CD86相互作用を遮断することが可能であり、9C6抗BTLA Fabアームを含む二重特異性抗体は、BTLA／HVEM相互作用を遮断することが可能である。

【0461】

図68。

【0462】

PD-1を外因的に発現するHEK293TをXENP20717と共にインキュベートすることにより、用量依存様式でPD-L1およびPD-L2のPD-1への結合が防止された。LAG-3をXENP22606と共にインキュベートすることにより、MHC-IIを外因的に発現するDaudi細胞へのその結合が防止された。CTLA-4をXENP20066と共にインキュベートすることにより、CD80およびCD86への残留結合が阻害された。BTLAをXENP20895と共にインキュベートすることにより、HVEMへの残留結合が阻害された。

【0463】

D. 実施例4：親和性および安定性の最適化

1. 抗PD-1 mAb 1G6および2E9

実施例3で生成された抗PD-1ハイブリドーマクローン1G6および2E9は、二重特異性免疫チェックポイント阻害剤で使用するためのscFvまたはFabとの関連において最適な親和性および安定性を有するように操作された。クローンは、ストリング含有量最適化(string content optimization)を使用して最初にヒト化された(例えば、米国、特許第7,657,380号、2010年2月2日発行を参照されたい)。重鎖および軽鎖をコードするDNAを、遺伝子合成(Blue Heron Biotechnology, Bothell, Wash.)によって生成し、標準分子生物学的技法を使用して発現ベクターpTT5にサブクローニングした。scFvのC末端は、ポリヒスチンタグを含んだ。Fv変異体のライブラリは、完全長二価Fab-Hisおよび／またはscFv-His型で、標準的な変異誘発(QuickChange, Straagene, Cedar Creek, Tx)によって構築された。標準的なブロテインAクロマトグラフィーにより二価mAbを精製し、Ni-NTAクロマトグラフィーによりFab-HisおよびscFv-Hisを精製した。本発明の例示的な1G6および2E9二価抗体、Fab、ならびにscFvの配列は、配列表のリストに記載されている(しかしながら、ポリヒスチンタグはFabおよびscFvsに関して除去された)。初期スクリーニング後、組み合わせは対象の変異体で構成され、これらは親和性および安定性について発現、精製、および再検査された。

【0464】

二価抗体の親和性スクリーニングをOctetを使用して実施した。

抗ヒトFc (AHC) バイオセンサを使用して試験物品を捕捉し、KD決定のために複数濃度のPD-1-Hisに浸漬した。scFv-Hisの安定性を、示差走査蛍光定量法(DSF)を使用して評価した。DSF実験をBio-Rad CFX ConnectリアルタイムPCR検出システムを使用して実施した。タンパク質をSYPRO Orange蛍光色素と混合し、PBS中0.2mg/mLに希釈した。SYPRO Orangeの最終濃度は10Xであった。25℃での10分間の初期インキュベーション期間後、タンパク質を1℃/分の加熱速度を使用して、25℃から95℃に加熱した。30秒毎に蛍光測定を行った。融解温度(T_m)は、装置のソフトウェアを使用して計算した。親和性および安定性の結果を図23に示す。

10

【0465】

2. 抗CTLA-4 mAb

抗CTLA-4抗体の親可変領域を、様々な二重特異性体の構成要素として使用するために操作した。改善された特性を有する変異体の同定を試みるために、2つのアプローチを取った：(1)単一、二重、および三重アミノ酸置換を、QuickChange (Stratagene, Cedar Creek, Tx) 変異誘発を介して行う、および(2)代替ヒト生殖系列(IGHV3-7、IGHV3-13、IGHV3-21、IGHV3-64、IGKV3D-20、IGKV3-15)と交換されたそれらのフレームワークを有する再移植された配列がDNA合成およびサブクローニングによって構築された。変異体FabおよびscFvを設計し、発現させ、精製した。ヒトおよびcyno CTLA-4に対する親和性を、Octetを使用して、Fabについて測定した。AHCバイオセンサを使用して、ヒトまたはcyno CTLA-4のFc融合体を捕捉し、KD決定のために複数濃度のFab試験物品に浸漬した。DSFを使用して、FabおよびscFvの両方について熱安定性を測定した。加えて、少なくとも1つのヒトVHまたはVL生殖系列と正確に一致した配列9量体の数は、FabおよびscFvの両方の可変領域のヒト性の尺度として計数された(例えば、米国特許第7,657,380号、2010年2月2日発行を参照されたい)。初期スクリーニング後、組み合わせは対象の変異体で構成され、これらは親和性および安定性について発現、精製、および再検査された。結果を図24に要約する。いくつかの変異体は、ヒトおよびcyno CTLA-4の両方に関して類似の親和性を保持しながら、親可変領域に対して増加した熱安定性を有した。加えて、ヒト生殖系列一致配列9量体の数によって測定される配列ヒト性の増加がいくつかの変異体に関して同定された。好ましい変異体としては、H0.25_L0、H0.26_L0、H0.27_L0、H0.29_L0、H0.38_L0、H0.39_L0、H0.40_L0、H0.70_L0、H0_L0.22、H2_L0、H3_L0、H3_L0.22、H3_L0.67、H3_L0.74、H3_L0.44、H3.4_L0.118、H3.4_L0.119、H3.4_L0.120、H3.4_L0.121、H3.4_L0.122、H3.4_L0.123、H3.4_L0.124、H3.4_L0.125、H3.4_L0.126、H3.4_L0.127、H3.4_L0.128、H3.4_L0.129、H3.4_L0.130、H3.4_L0.131、H3.4_L0.132、H3.5_L2.1、H3.5_L2.2、H3.5_L2.3、H3.21_L0.124、H3.21_L0.129、H3.21_L0.132、H3.23_L0.124、H3.23_L0.129、H3.23_L0.132、H3.25_L0.124、H3.25_L0.129、およびH3.25_L0.132が含まれる。

20

30

40

【0466】

3. 抗BTLA mAb 9C6

実施例3で生成された抗BTLAハイブリドーマクローン9C6は、一般に実施例4Aで上述されるように、二価抗体型で最適な親和性および安定性を有するようにヒト化および操作された。本発明の例示的な抗BTLA二価抗体の配列は、配列表のリストに記載され

50

る。

【0467】

変異体二価抗体の親和性スクリーニングをOctetを使用して実施した。AHCバイオセンサを使用して試験物品を捕捉し、KD決定のために、複数濃度のBTLA-Hisを含むウェルに浸漬した（抗BTLAx抗PD-1キメラ二重特異性体がSEB刺激PBMCからのIFN γ 分泌を促進することを示すAおよびBにおいて示される。PBMCを、示される試験物品と共に10ng/mLのSEBで3日間刺激した。細胞上清を収集し、示される分析物についてMSDでアッセイした。A：20 μ g/mLの試験物品；B 5 μ g/mLの試験物品。

【0468】

図52）。

【0469】

4. 抗LAG-3 mAb 7G8および2A11

実施例3で生成された抗LAG-3ハイブリドーマクローン7G8および2A11は、一般に実施例4Aに上述されるように、二重特異性免疫チェックポイント阻害剤で使用するためのFabとの関連において最適な親和性および安定性を有するようにヒト化され、操作された。本発明の例示的な抗LAG-3二価抗体の配列は、配列表のリストに記載される。

【0470】

変異体抗LAG-3 Fabの親和性および安定性は、一般に実施例4Aで上述されるように決定された。AMCバイオセンサを使用して、ヒトLAG-3のマウスFc融合体を捕捉し、KD決定のために複数濃度の試験物品を含有するウェルに浸漬した。結果は、2A11変異体については図53に示され、7G8変異体については図54に示される。

【0471】

例示的な変異体2A11および7G8抗LAG-3二価抗体を、MHC-IIを内因的に発現するDauidi細胞へのLAG-3結合を遮断するそれらの能力についてさらにスクリーニングした。1 μ gのLAG-3-mFcを、室温で30分間、示される濃度のmAbと混合した。次いで、Dauidi細胞を添加し、4℃で30分間インキュベートした。LAG-3-mFc結合を、抗マウスFc二次抗体で検出した。データを図63に示す。

【0472】

5. 抗TIM-3 mAb

実施例3で生成された抗TIM-3ハイブリドーマクローンは、一般に実施例4Aで上述されるように、二価抗体型で最適な親和性および安定性を有するようにヒト化および操作された。本発明の例示的な抗TIM-3二価抗体の配列は、配列表のリストに記載される。

【0473】

変異体二価抗体の親和性スクリーニングをOctetを使用して実施した。AHCバイオセンサを使用して試験物品を捕捉し、KD決定のために複数濃度のTIM-3-Hisを含有するウェルに浸漬した（図22に示される）。

【0474】

最適化した変異体を、SEB刺激PBMCアッセイにおいてT細胞結合についても試験した。ヒトPBMCを、100ng/mLのSEBで72時間刺激した。刺激後、細胞を示される試験物品で処理した。3H3-H1-L2.1(XENP21189)のCD3⁺細胞に対する結合は、抗ヒトFc二次抗体を用いて検出され、図21に示された。7B11-HJ1-L1.1(XENP21196)のCD3⁺細胞に対する結合は、抗ヒトIgG-APC二次抗体を用いて検出され、図21に示された。

【0475】

6. 変異体抗LAG-3x抗CTLA-4 Fab-scFv二重特異性抗体の親和性スクリーニング

実施例4Dに記載される最適化した抗LAG-3二価抗体に由来する抗LAG-3 Fabを含む二重特異性抗体、および実施例4Bに記載される例示的な抗CTLA-4 scF

10

20

30

40

50

vを、一般に上述のように、Octetを使用して親和性についてスクリーニングした。具体的には、AMCまたはHIS1Kバイオセンサを使用して、ヒトLAG-3のマウスFc融合体またはヒトLAG-3のHis-Aviタグ付きTEV-Fc融合体を捕捉し、試験物品を含有するウェルに浸漬してKDを決定した。結果を図55に示す。

【0476】

7. 変異体抗LAG-3 x 抗PD-1 Fab-scFv二重特異性抗体の親和性スクリーニング。

実施例4Dに記載される最適化した抗LAG-3二価抗体に由来する抗LAG-3 Fabを含む二重特異性抗体、および実施例4Aに記載される例示的な抗PD-1 scFvを、一般に上述のように、Octetを使用して親和性についてスクリーニングした。具体的には、AMCまたはHIS1Kバイオセンサを使用して、ヒトLAG-3のマウスFc融合体またはヒトLAG-3のHis-Aviタグ付きTEV-Fc融合体を捕捉し、試験物品を含有するウェルに浸漬してKDを決定した。結果を図61に示す。

【0477】

E. 実施例5：親和性および安定性最適化アームを有する二重特異性免疫チェックポイント抗体のインビトロ評価

1. 抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性抗体

a. 二重特異性抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性抗体はPD-L1およびPD-L2とのPD-1相互作用を遮断する

PD-1を発現するHEK293T細胞を、XENP20717（抗PD-1 x 抗CTLA-4）、および片腕抗PD-1、および抗CTLA-4対照（それぞれ、XENP20111およびXENP20059）と共に、4℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、PD-L1-mFcまたはPD-L2-mFcを添加し、4℃で30分間さらにインキュベートした。PD-L1-mFcおよびPD-L2-mFcを、抗マウスIgG二次抗体で検出した。

【0478】

図45は、XENP20717が用量依存様式でPD-1のリガンドPD-L1およびPD-L2への結合を遮断することができたことを示す。XENP20111もPD-1のリガンドPD-L1およびPD-L2への結合を遮断することができ、一方でXENP20059はそのリガンドへのPD-1結合を遮断しなかった。

【0479】

b. CD3+細胞上の二重特異性抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体のT細胞結合
ヒトPBMCを、500 ng/mLのSEBで3日間刺激し、培養培地で2回洗浄し、次いで500 ng/mLのSEBでさらに24時間再刺激した。次いで、PBMCを、4℃で30分間、XENP20717（抗CTLA-4 x 抗PD-1）で処理した。処理後、PBMCを洗浄し、抗CD3-FITC（UCHT1）mAbを有するCD3+細胞上の抗ヒトFc-（Fab断片特異的）-APC二次抗体（Jackson Labs）と共にインキュベートした。次いで、PBMCを2回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。図45は、7つの固有のPBMCドナーの平均MFIを示し、CD3+T細胞上のXENP20717の結合を示し、結合が用量依存性様式であることを示す。

【0480】

c. T細胞活性化に対する変異体抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体の評価

変異体抗CTLA-4 Fabアームを有する抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体を、MLRアッセイにおいて試験した。混合PBMCを、等モルPD-1結合濃度の、69.5 nMの二価抗体（例えば、ニボルマブ）または139 nMの二重特異性抗体（例えば、XENP16004）で処理した。示されるデータはいくつかの抗CTLA-4 Fabスクリーニングの結果を示す。これは、FabおよびscFvの実施形態のXENPコード、vhおよびvl操作されたドメインの指定、Octetにより測定される、ヒトおよびcynoCTLA-4に対するKD結合定数、ならびにscFvおよびFabのTmを示す。加えて、少なくとも1つのヒトVHまたはVL生殖系列と正確に一致した配

10

20

30

40

50

列9量体の数は、F a bおよびs c F vの両方の可変領域のヒト性の尺度として示される。

【0481】

図25Bは、いくつかの二重特異性抗体がニボルマブ単独よりも優れたIL-2誘導を可能にすることを示す。

【0482】

SEB刺激PBMCアッセイにおいて、PBMCを500 ng/mLのSEBで2日間処理した。次いで、細胞を洗浄し、20 µg/mLのXENP16432（ニボルマブ）またはXENP20717および500 ng/mLのSEBで処理した。上清を、T細胞活性化の指標としてIL-2についてアッセイした。図69に示されるデータは、抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体がニボルマブ単独よりも顕著に多いIL-2放出を誘導

10

【0483】

別の研究において、XENP16432、XENP20717、および片腕組み合わせ対照を、SEB刺激PBMCアッセイにおいて試験した。PBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞をPBSで1回洗浄し、次いで20 µg/mLの試験物品および500 ng/mLのSEBを含む培養培地を添加した。上清を24時間後に収集し、IL-2についてアッセイした。SEB刺激なしの対照実験において、PBMCを示される試験物品で3日間処理した後、上清をIL-2についてアッセイした。IL-2濃度の倍数変化は図45A~Cに示される。図45Bに示されるように、XENP20717は、ニボルマブよりも顕著に多くIL-2分泌を増強した。データは、XENP20717が抗PD-1二価単独、ならびに片腕抗PD-1および片腕抗CTLA-4の組み合わせの両方よりも強くT細胞を活性化し、複数の免疫チェックポイント受容体を発現するT細胞を選択的に活性化する利点を示す。特に、および実施例2Bに記載される所見と一貫して、二重特異性体XENP20717は、XENP20717に由来する片腕抗体の組み合わせよりも大幅にIL-2分泌を増強した。

20

【0484】

抗CTLA-4 s c F vアームおよび変異体2E9抗PD-1 F a bアームを有するCTLA-4およびPD-1を標的とする追加の二重特異性抗体および対照試験物品を、SEB刺激PBMCアッセイにおいて試験した。ヒトPBMCを、100 ng/mLのSEBで2日間刺激した。細胞を洗浄し、20 µg/mLの示される試験物品と組み合わせて100 ng/mLのSEBで再刺激した。処理24時間後に上清をIL-2およびIFNγについてアッセイした（図19AおよびBにそれぞれ示される）。

30

【0485】

2. 抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性チェックポイント抗体のインビトロ評価

a. T細胞活性化に対する変異体抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性体の評価

SEB刺激PBMCアッセイにおいて、PBMCを500 ng/mLのSEBで2日間処理した。次いで、細胞を洗浄し、20 µg/mLのXENP16432（ニボルマブ）またはXENP22604および500 ng/mLのSEBで処理した。上清を、T細胞活性化の指標としてIL-2についてアッセイした（図69に示される）。

【0486】

最適化2A11抗LAG-3 F a bアームを有する追加の抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性抗体（実施例4に記載されるように生成された変異体mAbに由来する）も、SEB刺激PBMCアッセイにおいてT細胞活性化について評価した。複数のドナー由来のヒトPBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞を培養培地で2回洗浄し、10 µg/mLの示される試験物品と組み合わせて500 ng/mLのSEBで刺激した。処理の24時間後、細胞上清を、IL-2およびIFNγについてアッセイした。Numax二価に対するIL-2およびIFNγの倍数増加についてのデータが図64に示される。各点は、技術的一重項において表されるドナーを示す。

40

【0487】

データは、いくつかの抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性抗体がニボルマブ単独または

50

抗LAG-3二価単独よりも強くT細胞を活性化することを示す。

【0488】

3. 抗BTLA x 抗PD-1二重特異性チェックポイント抗体のインビトロ評価

a. CD3⁺細胞上の二重特異性抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体のT細胞結合最適化抗BTLA Fabアームを有する抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体（実施例4に記載されるように生成された変異体mAbに由来する）も、T細胞上の結合について評価した。ヒトPBMCを100 ng/mLのSEBで3日間刺激し、その後、PBMCを、4℃で30分間、示される試験物品で処理した。次いで、PBMCを、抗ヒトFc二次抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。図47は、CD3⁺細胞上の示される試験物品の結合を示す。

10

【0489】

データは、本発明の抗PD-1 x 抗BTLA二重特異性チェックポイント抗体（例えば、XENP20895、XENP21220、およびXENP21221）が片腕対照（例えば、XENP21446およびXENP16011）と比較してより強くT細胞に結合することを示す。これは、ヒトT細胞への結合が一般に、各アームが異なる抗原に一価的に結合する二重特異性抗体で、片腕対照などの一価の単一特異性抗体よりも良好であることを示す。

【0490】

b. T細胞活性化に対する変異体抗BTLA x 抗PD-1二重特異性体の評価

プロトタイプ抗BTLA（例えば、4C7、8D5、およびE8D9）および9C6 Fabアームを有する抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体を、SEB刺激PBMCアッセイにおいてT細胞活性化について評価した。複数のドナー由来のヒトPBMCを、5 μg/mLまたは20 μg/mLの示される試験物品と共に、72時間、10 ng/mLのSEBで刺激した。処置後、細胞上清を、それぞれ、図1Jおよび1Kに示される、ELISAによってIL-2およびIFNγについてアッセイした。データは、9C6ハイブリドーマ由来アームを含む二重特異性抗体が、抗PD-1二価単独が増強するよりも大きいだけでなく、プロトタイプ抗BTLA Fabアームを有する二重特異性体が増強するよりも大きくT細胞活性化を増強したことを示す。

20

【0491】

例示的な抗BTLA x 抗PD-1 XENP-21220およびXENP16432（ニボルマブ）を、SEB刺激PBMCアッセイにおいて評価した。PBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間処理した。次いで、細胞を洗浄し、20 μg/mLのXENP16432またはXENP21220および500 ng/mLのSEBで処理した。上清を、T細胞活性化の指標としてIL-2についてアッセイした（図69に示される）。

30

【0492】

変異体9C6抗BTLA Fabアームおよび片腕変異体9C6抗体（単独で、および片腕抗PD-1抗体との組み合わせで）を有する追加の抗BTLA x 抗PD-1二重特異性体を、上述のように、SEB刺激PBMCアッセイにおいてT細胞活性化について評価した。PBSでの処理に対するIL-2およびIFNγ分泌の倍数増加についてのデータが図1Lに示される。

40

【0493】

4. 抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性チェックポイント抗体のインビトロ評価

a. CD3⁺細胞上の二重特異性抗BTLA x 抗PD-1二重特異性抗体のT細胞結合抗LAG-3 Fabアームおよび片腕変異体抗LAG-3抗体を有する抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体を、T細胞で結合について評価した。ヒトPBMCを100 ng/mLのSEBで3日間刺激し、その後、PBMCを、4℃で30分間、示される試験物品で処理した。処理後、PBMCを、抗CD3-FITCおよび抗ヒトFc-APC抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。次いで、PBMCを2回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。図56は、CD3⁺T細胞上の示される試験物品の結合を示す。

50

【0494】

データは、本発明のいくつかの抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性チェックポイント抗体（例えば、XENP22505およびXENP21896）が片腕対照（例えば、XENP22516）と比較してより強くT細胞に結合することを示す。これは、ヒトT細胞への結合が、各アームが異なる抗原に一価的に結合する二重特異性抗体で、片腕対照などの一価の単一特異性抗体よりも良好であり得ることを示す。

【0495】

b. 抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体によるT細胞活性化

抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体を、MLRおよびSEB刺激PBMCアッセイにおいて、T細胞活性化について評価した。

【0496】

40のMLR反応を、20 μg/mLの示される試験物品の存在下で行い、細胞上清を、IL-2およびIFNγについて、処理の6日後にアッセイした。図59は、抗RSV二価（XENP15074）に対するIL-2およびIFNγにおける倍数誘導を示す。

【0497】

SEB刺激PBMCアッセイにおいて、PBMCを500 ng/mLのSEBで2日間処理した。次いで、細胞を洗浄し、20 μg/mLのXENP16432（ニボルマブ）、XENP22602、またはXENP16432およびXENP22602の組み合わせ、ならびに500 ng/mLのSEBで処理した。上清を、T細胞活性化の指標としてIL-2についてアッセイした（図69に示される）。

【0498】

別のSEB刺激PBMCアッセイにおいて、追加の抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体进行评估した。複数のドナー由来のヒトPBMCを、500 ng/mLのSEBで2日間刺激した。次いで、細胞を培養培地で2回洗浄し、20 μg/mLの示される試験物品と組み合わせて500 ng/mLのSEBで刺激した。処理の24時間後、細胞上清を、IL-2およびIFNγについてアッセイした。Numax二価に対するIL-2およびIFNγの倍数増加についてのデータが図57および図58および図60に示される。各点は、技術的一重項において表されるドナーを示す。

【0499】

データは、抗PD-1二価および抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体の組み合わせがT細胞活性化において相乗的効果をもたらすことを示す実施例2Dと一致する。さらに、データは、7G8に基づく抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体がPBMCで2A11に基づく抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性抗体よりも選択的な機能を呈することを示す。

【0500】

F. 実施例6：二重特異性免疫チェックポイント抗体のインビボ評価

1. 抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体はヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着および疾患活性を増強する

いくつかのGVHD研究において、本発明の例示的な抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体は、ヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着および疾患活性を増強することが示された。

【0501】

第1の研究において、0日目に、IV-OSPを介して1000万個のヒトPBMCをNSGマウスに移植した。1日目に、マウスにXENP16432（2.89 mg/kg）、XENP20053（2 mg/kg）、ならびにXENP16432およびXENP16433（2.89 + 2.92 mg/kg）の組み合わせを投薬した。CD45+細胞計数を14日目に測定した（図70に示される）。

【0502】

変異体抗CTLA-4 Fabおよび抗PD-1 scFvアームを有する追加の抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体进行评估した。1000万個のヒトPBMCを、0日目に

10

20

30

40

50

IV-OSPを介してNSGマウスに移植し、その後1日目に示される試験物品（5mg/kgまたは示されるとおり）を投薬した。CD45+細胞計数を14日目に測定した（図1QA、図1RA、および図1S）。IFN γ レベルもGVHDの追加の指標として測定され、CD45+細胞レベルに対してプロットされた（変異体CTLA-4 Fabアームおよび変異体抗PD-1 scFvアームを有する抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体、ならびにニボルマブ単独、イピリムマブ単独、ならびに対照としてニボルマブおよびイピリムマブアームに基づくプロトタイプ抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性体によるIL-2放出の増強を見る混合リンパ球反応を示す。

【0503】

図27および図30）。

【0504】

データは、本発明の抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性チェックポイント抗体が、対照（PBS+PBMC）と比較して、ヒトPBMC移植NSGマウスにおけるCD45+細胞の増殖を増強することを示す。さらに、ニボルマブ（XENP16432）単独で見られるよりも、本発明の抗体を使用する方が増強が大きい。図31は、研究160314（図26に提示される）と160331（図29に提示される）との間のCD45+細胞増殖に対する試験物品効果の比較を示す。両方の研究は、ニボルマブ単独よりも抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性チェックポイント抗体、が優れていることを一貫して示す。

【0505】

別の研究において、Xtend Fcを有する抗CTLA-4 x 抗PD-1二重特異性抗体を評価した。PBMC移植マウスに示される濃度で示される試験物品を投薬し、CD45+、CD4+、およびCD8+事象を14日目に測定した（図20に示される）。

【0506】

2. 抗BTLA x 抗PD-1二重特異性体はヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着および疾患活性を増強する

第1の研究において、0日目に、IV-OSPを介して1000万個のヒトPBMCをNSGマウスに移植した。1日目に、マウスにXENP16432（2.89mg/kg）およびXENP20895（5mg/kg）を投薬した。CD45+細胞計数を14日目に測定した（図70に示される）。

【0507】

抗BTLA x 抗PD-1二重特異性体XENP20895を第2のGVHD研究で評価した。1000万個のヒトPBMCを、0日目にIV-OSPを介してNSGマウスに移植し、その後1日目に示される試験物品（示される濃度で）を投薬した。CD45+細胞計数およびIFN γ を、10、14、および22日目に測定した（それぞれ、図51に示される）。

【0508】

3. 抗LAG-3 x 抗PD-1二重特異性体はヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着および疾患活性を増強する

GVHDにおいて、0日目に、IV-OSPを介して1000万個のヒトPBMCをNSGマウスに移植した。1日目に、マウスにXENP16432（2.89mg/kg）およびXENP22672（5mg/kg）を投薬した。CD45+細胞計数を14日目に測定した（図70に示される）。

【0509】

実施例6Aに記載される第2の研究において、別の例示的な抗LAG-3 x 抗PD-1（XENP22847）も評価された（図20C）。

【0510】

4. 抗LAG-3 x 抗CTLA-4二重特異性体はヒトPBMC移植NSGマウスにおいて生着および疾患活性を増強する

GVHDにおいて、0日目に、IV-OSPを介して1000万個のヒトPBMCをNSGマウスに移植した。1日目に、マウスにXENP16432（2.89mg/kg）、

10

20

30

40

50

XENP22675 (5mg/kg)、ならびにXENP16432およびXENP22675 (5+5mg/kg) の組み合わせを投薬した。CD45+細胞計数を14日目に測定した(図70に示される)。

【0511】

データは、XENP22675がニボルマブ単独での投薬を上回って生着および疾患活性を強化することを示す。特に、ニボルマブと組み合わせたXENP22675は、相乗的に作用して生着をさらに増強する。

【0512】

G. 実施例7: 抗PD-1 x 抗CTLA-4二重特異性抗体はKG1A-lucがん細胞およびヒトPBMCを移植されたNSGマウスにおいて抗腫瘍活性を呈する

0日目に、NOD SCIDガンマ(NSG)マウスに、KG1A-lucがん細胞を移植した。21日目に、ヒトPBMCをマウスに腹腔内移植した。PBMC生着後、腹腔内注入により示される試験物品を毎週投薬した(対照マウスにはPBSを投薬した)。インビボ撮像システム(IVIS(登録商標)Lumina III)を使用して、各マウスの総フラックスを測定することにより腫瘍成長を監視し、データは図71に示される(最初の投薬後の日数)。

【0513】

XIII. 参照による組み込み

USSN62/420, 500からの「抗CTLA-4」(請求項セットA1~A30)、「抗PD-1」(請求項セットB1~B30)、「抗LAG-3」(請求項セットC1~C28)、「抗TIM-3」(請求項セットD1~D28)、「抗TIGIT」(請求項セットE1~E28)、「抗BTLA」(請求項セットF1~F28)、「骨格+Fv」(請求項セットY1~Y5)、および「特定の分子」(請求項セットX1~X16)の請求項セットは、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【図 2 C】

Macaca fascicularis LAG-3配列、細胞外ドメイン (予測)

>gi1544467815|ref|XP_005870011.1|29-450 配列番号12
TSVVAQGRGAFAGILPCSPPTIPLOJLSIGKRAGVTWQHQPDSGPAXAZGHPEVHGHRPAAPYSKGRPRFRYITVLSVSPGULPSGRLL
PLQIRVQCDEGRGQGFSLWLIPARADAGRYATVH:RQAL:SCRE:RIAVGCAQMTASPPGSTRISDWIILNCSFHFQFASV
3HFR3AGGRVPMQGPHEHLAGSFLHFWHGMQSLMGCIITVYQDRIWPSINEL:TVLQDEAPKILCYAGAGSVELCRKFF
AVGTQSFE:TAAMAFPGSGDILLVAGDSGDTLRLEDVSCAQAGTYICHTPIAQCDQANATVTC:AIITVTKSHGKSGSLKLCDEVT
PASQSQIHVYSPUNTIPQSRSTSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQCHQGERLIGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPAGALRAGEL

ヒトBTLA配列

>sp|Q176A3 配列番号14
MKTLPMLGTGKLFVFFLIPYLDIWNTHGKERCDVLYKSGSEHSITAGQPFSLCPVKYCAHRPHVYKCKLNGCTCVKLEDPQ
TSWREKRNISFFILHEFVPLENDNGSYRCANFQSNLIESHSTLYVTDVKASERFSKDEMASRPWL:LYRLPLGGLPIIJTTCP
CLFCLLRHQRQNELSDTACRE:NLVDAR:KSECTWASTRONSGVLLSETGIYDNDPDLCHRMQSEVSYNDPLEENKPGIIVA
SIAHNSVIGENSLARHVRKAPTEVYASIOVRS

ヒトBTLA配列、細胞外ドメイン

>sp|Q176A9|31-157 配列番号14
KESCDVQVIKRSRHS:TAGDPFLLECPVKYCAHRPIVITWCFKAGTICVLEDRQTSKSEKHNISFFILHEFVLPNDNGSYRCS
ANFQSNLIESHSTLYVTDVKASERFSKDEMASRPWLLYR

Macaca fascicularis BTLA配列 (予測)

>gi1355746406|gb|EHHS1020.1 配列番号15
MKTLPANLGSRLFWVFLIPYLDIWNTHGKSCDVLYIKRSYHSIFAGDRFKLECPVKYCAHRDQVTCCKLNGCTCVKLEGRH
TQWRQKRNISFFILHEFVLPNDNGSYRCANFQSNLIESHSTLYVTDVKASERFSKDEMASRPWL:LYRLPLGGLPIIJTTCP
CLFCLLRHQRQNELSDTIRGEITLVDPVFPFSQGTAGTRNGDVLASDTGIYDNDPDLCHRMQSEVSYNDPLEENKPGIIVA
SINHGCTGLNARQRHVRKAPTEVYASIOVRS

Macaca fascicularis BTLA配列、細胞外ドメイン (予測)

>gi1355746406|gb|EHHS1020.1|31-157 配列番号16
KESCDVQVIKRSYHSIFAGDRFKLECPVKYCAHRDQVTCCKLNGTTCVLEGRHSMKQERNLSFFILHEFVLPNDNGSYRCS
ANFQSNLIESHSTLYVTDVKASERFSKDEMASRPWLLYR

ヒトTIM-3配列

>sp|Q87DQ0 配列番号17
MFSLHFFDVCVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNALDPCYTPAAGNLVPCWCKGACPVFDCSNVVLRTDNRDNDRTSGRYWLK
DPMKQGVSLTIENVTIADSGGYCCRIQIPGIMNDEKHNKLVVVKPAKVPAPTLPQRDLTSAPFRMLTGEHGAETQTLGSLPDINLTQISTLANELDRSLANDLR
DSGATIRIG

【図 2 D】

ヒトTIM-3配列、細胞外ドメイン

>sp|Q87DQ0|22-202 配列番号18
SEVEYRAEVGQNALDPCYTPAAGNLVPCWCKGACPVFDCSNVVLRTDNRDNDRTSGRYWLKNGDFRKGDSVLTENVTIADSGI
YCCRIQIPGIMNDEKFNKLVVKPAKVPAPTLPQRDLTSAPFRMLTTRHGGAETQTLGSLPDINLTQISTLANELDRSLANDLR
DSGATIRIG

Macaca fascicularis TIM-3配列 (予測)

>gi1355750365|gb|EHHS4703.1 配列番号19
MFSLHFFDVCVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNALDPCYTPAAGNLVPCWCKGACPVFDCSNVVLRTDNRDNDRTSGRYWLK
DPMKQGVSLTIENVTIADSGGYCCRIQIPGIMNDEKHNKLVVVKPAKVPAPTLPQRDLTSAPFRMLTGEHGAETQTLGSLPD
VNLTVSNFFCELIQIFTLTNELRDSGATIRTAIYIANGISAGLALALIGALIFKWSYSHSEKQNLISLANIPPSGLANAAEG
IRSEENIYTIEDVYEEVEENYCYVSSGQPPSQPLQCRVAMP

Macaca fascicularis TIM-3配列、細胞外ドメイン (予測)

>gi1355750365|gb|EHHS4703.1|22-203 配列番号20
SEVEYRAEVGQNALDPCYTPAAGNLVPCWCKGACPVFDCSNVVLRTDNRDNDRTSGRYWLKNGDFHKGDSVLTENVTIADSG
VYCCRIQIPGIMNDEKHNKLVVVKPAKVPAPTLPQRDLTSAPFRMLTTRHGGAETQTLGSLPDVNLTVSNFFCELIQIFTLTNE
LDSGATIRTA

10

【図 3 A】

II. 図3A 非対称変異体

単量体 1	単量体 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L351K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411F	Y349T/T394F/D401K

【図 3 B】

単量体 1	単量体 2
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/F357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K

20

30

40

50

【図 3 C】

単量体 1	単量体 2
K392D/K409D	F356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447	
N208D Q295E N384D Q418E N421D	
N208D Q295E Q418E N421D	
Q196K I199T P217R P228R N276K	
Q196K I199T N276K	
E269Q F272Q F283Q E357Q	
E269Q E272Q E283Q	
E269Q F272Q	
E269Q E283Q	
E272Q E283Q	
E269Q	

【図 3 D】

単量体 1	単量体 2
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
I411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411F/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K

10

20

【図 3 E】

単量体 1	単量体 2
L368D/K370S/Q347E	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368F/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E	S364K
L368D/K370T/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368F/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401K/T411K
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
Y407I	T366Y
F405A	T394W
T366Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W

【図 3 F】

単量体 1	単量体 2
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447	
N208D Q295E N384D Q418E N421D	
Q295E N384D Q418E N421D	
N208D Q295E Q418E N421D	
Q295E Q418E N421D	
Q196K I199T P217R P228R N276K	
Q196K I199T N276K	
E269Q E272Q E283Q E357Q	
E269Q E272Q E283Q	
E269Q E272Q	
E269Q E283Q	
E272Q E283Q	
E269Q	

30

40

50

【図 4】

III. 図 4 p I 変異体

変異体	定常領域	置換
pl_ISO(-)		I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V39/M Q419E DEL447
p I _ (-) _ 等配電子 _ A		N208D Q295E N384D Q418E N421D
p I _ (-) _ 等配電子 A - F c の 7		Q295E N384D Q418E N421D
p I _ (-) _ 等配電子 _ B		N208D Q295E Q418E N421D
p I _ (-) _ 等配電子 _ B - F c の 7		Q295E Q418E N421D
pl_ISO(+RR)		Q196K I199T P217R P228R N276K
pl_ISO(+)		Q196K I199T N276K
p I _ (+) _ 等配電子 _ A		E269Q E272Q E283Q E357Q
p I _ (+) _ 等配電子 _ B		E269Q E272Q E283Q
p I _ (-) _ 等配電子 _ E 2 6 9		E269Q E272Q Q / E 2 7 2 Q
p I _ (-) _ 等配電子 _ E 2 6 9		E269Q E283Q Q / E 2 8 3 Q
p I _ (-) _ 等配電子 _ E 2 7 2 Q E272Q E283Q / E 2 8 3 Q		
p I _ (-) _ 等配電子 _ E 2 6 9 Q		E269Q

【図 5】

IV. 図 5 : 切趾変異体

変異体	変異体 (複数可) 、
G236R	P329K
S239G	A330L
S239K	A330S/P331S
S239Q	I332K
S239R	I332R
V266D	V266D/A327Q
S267K	V266D/P329K
S267R	S267R/A327Q
H268K	S267R/P329K
E269R	G236R/L328R
299R	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K
299K	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
K322A	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G
A327G	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G
A327L	E233P/L234V/L235A/G236del
A327N	S239K/S267K
A327Q	S267K/P329K
L328E	
L328R	
P329A	
P329H	

10

20

【図 6 A】

図 6 A 有用な組み合わせ

s c F y 単量体	F a b 単量体 (-)
ヘテロ二量体 p I 変異体 S 3 6 1 / E 3 5 7 Q	ヘテロ二量体 p I 変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0 S
規定されないが (GKPGS) ₄ (配列番号 3 7 7 5 5) を含む任意選択の s c F y 帯電リンカー	等配電子 p I 置換 N 2 0 8 D / Q 2 9 5 E / N 3 8 4 D / Q 4 1 8 E / N 4 2 1 D
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
F c R n に 関 し て ± 4 2 8 L / 4 3 4 S	F c R n に 関 し て ± 4 2 8 L / 4 3 4 S
チェックポイント阻害剤の A B D の s c F y	チェックポイント阻害剤の A B D の他方の F y / F a b

【図 6 B】

s c F y 単量体	F a b 単量体
ヘテロ二量体 p I 変異体 S 3 6 4 / E 3	ヘテロ二量体 p I 変異体 L 3 6 8 D / K 3 7 0
規定されないが (GKPGS) ₄ (配列番号 3 7 7 5 5) を含む任意選択の s c F y 帯電リンカー	p I 置換 I 1 9 9 T N 2 0 3 D K 2 7 4 Q R 3 5 5 Q Q 4 1 9 E K 4 4 7 d e l
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
F c R n に 関 し て ± 4 2 8 L / 4 3 4 S (任意選択)	F c R n に 関 し て ± 4 2 8 L / 4 3 4 S (任意選択)
チェックポイント阻害剤の s c F y	チェックポイント阻害剤の A B D の他方の F y / F a b

30

40

50

【図 7 A】

図 7 A リンカー

正の帯電 s c F v リンカー

名称	配列	長さ	電荷	配列番号
Gly-Ser 15	GGGGSGGGSGGGGS	15	0	37699
Whitlowリンカー	GSTSGSGKPGSGGSTKG	18	+1	37700
6paxA_1 {+A}	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	37701
+B	GKGGSGKGSGGKGGS	15	+3	37702
+C	GKGSGGKGSGGKGGS	15	+3	37703
+D	GGGKSGGGKSGGGGS	15	+3	37704
+E	GKGSGKGKSGGKGKS	15	+6	37705
+F	GGGKSGGKGSGGKGGS	15	+3	37706
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	37707
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	37708
+I	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	20	+8	37709
負の電荷 cFyリンカー				

名称	配列	長さ	電荷	配列番号
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	20	0	37710
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4	37711
-B	GEGGSGEGGSGEGGS	15	-3	37712
-C	GGE GSGGEGSGGEGS	15	-3	37713
-D	GGGESGGGSGGGES	15	-3	37714
-E	GEGSGEGSGEGES	15	-6	37715
-F	GGEGSGEGGSGEGGS	15	-3	37716
-G	GEGSGEGSGEGSGEGES	20	-8	37717

【圖 7 B】

s c F v リンカー

GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号 3 7 7 1 8)

GGGGSGGGSGGGSGGGG (配列番号 3 7 7 1 9)

GSTSGSGKPGSGEGSTKG (配列番号37720)

PRGASKSGSASQTGSAPGS (配列番号37721)

GTAAAGAGAAGGAAAGAAG (配列番号37722)

GTSGSSGSGSGGSGSGGGG (配列番号37723)

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS (配列番号37724)

10

20

【圖 8】

VII. 図 8 非対称の T_m

XENP	ヘテロ二量体＝非対称変異体、類 1	ヘテロ二量体＝非対称変異体、類 2	ヘテロ二量体収率 (%)	CH3 Tm (°C)
12757	なし	なし	52.7	83.1
12758	L368D/K370S	S364K	94.4	76.6
12759	L368D/K370S	S364K/E357L	90.2	77.2
12760	L368D/K370S	S364K/E357Q	95.2	77.5
12761	T411E/K360E/Q362E	D401K	85.6	80.6
12496	L368E/K370S	S364K	91.5	n.d.
12511	K370S	S364K	59.9	n.d.
12840	L368E/K370S	S364K/E357Q	59.5	n.d.
12841	K370S	S364K/E357Q	90.4	n.d.
12894	L368E/K370S	S364K	41.0	n.d.
12895	K370S	S364K	49.3	n.d.
12896	L368E/K370S	S364K/E357Q	73.9	n.d.
12901	K370S	S364K/E357Q	87.9	n.d.

【図 9 A】

[illegible]

30

40

【図 10 A】

【図 10 B】

"CTLA-4" 110.25 L0 抗CTLA-4 Fv²² (XENP19235 Fab, XENP19769 scFv)[illegible] ${}^{\circ}\text{CTLA} + {}^{\circ}\text{H0.26.10} \text{ CTLA} + \text{Fv} \text{ 970} \text{ (XENP19236 Fub, XENP19770 scFv)}$

品名	単位	数量	金額	備考
可成用 (xh) 741イ				
シ				
37813				
37814				
37815				
37816				
37817				
37818				
37819				
37820				
37821				

【図 10 C】

【図 10 D】

CFLA-4-__H0, 27-1, 016CFLA-4 1'v6f7 (XENP19237 1'ab, XENP19771 1'v6v)

[illegible][CTLA-4]_H0.29_L0 Fab XENP19773, scFv XENP19239[illegible]

[CTLA-4]_H0.38_L0 (Fab XENP19248, scFv XENP19782)

種	変異	変異番号
可変域 (Vh) ヌメイ	QVQLVQSGVSPGKSLRLSCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37832
WCDR1	STYQH	37833
WCDR2	FATLGNWYADWYQ	37834
WCDR3	QSSQSSGKGRSSKSGES	37835
セドリンカー	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37836
可変域 (Vl) ヌメイ	ESDSAVYQDQSGEWTFGQTVELK	37837
WCDR1	FAKGVGSSTLA	37838
WCDR2	GAERAE	37839
WCDR3	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37840
scFv	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37841

[CTLA-4]_H0.39_L0 (Fab XENP19249, scFv XENP19783)

種	変異	変異番号
可変域 (Vh) ヌメイ	QVQLVQSGVSPGKSLRLSCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37841
WCDR1	STYQH	37842
WCDR2	FATLGNWYADWYQ	37843
WCDR3	QSSQSSGKGRSSKSGES	37844
セドリンカー	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37845
可変域 (Vl) ヌメイ	ESDSAVYQDQSGEWTFGQTVELK	37846
WCDR1	FAKGVGSSTLA	37847
WCDR2	GAERAE	37848
WCDR3	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37849
scFv	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37850

[CTLA-4]_H0.40_L0 (Fab XENP19250, scFv XENP19784)

種	変異	変異番号
可変域 (Vh) ヌメイ	QVQLVQSGVSPGKSLRLSCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37850
WCDR1	STYQH	37851
WCDR2	FATLGNWYADWYQ	37852
WCDR3	QSSQSSGKGRSSKSGES	37853
セドリンカー	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37854
可変域 (Vl) ヌメイ	ESDSAVYQDQSGEWTFGQTVELK	37855
WCDR1	FAKGVGSSTLA	37856
WCDR2	GAERAE	37857
WCDR3	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37858
scFv	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37859

[CTLA-4]_H0.70_L0 (Fab XENP19280, scFv XENP19818)

種	変異	変異番号
可変域 (Vh) ヌメイ	QVQLVQSGVSPGKSLRLSCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37859
WCDR1	STYQH	37860
WCDR2	FATLGNWYADWYQ	37861
WCDR3	QSSQSSGKGRSSKSGES	37862
セドリンカー	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37863
可変域 (Vl) ヌメイ	ESDSAVYQDQSGEWTFGQTVELK	37864
WCDR1	FAKGVGSSTLA	37865
WCDR2	GAERAE	37866
WCDR3	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37867
scFv	QVLTQPTGISLGGWATISCAASGFTFEITHHWQAQFGQGLGWAFIVGKNGYTAUNTNGNTIRINRNTLL YAGNSLGGITATITGNTGHTLDEFGQGTIVYSS	37868

【図 10 I】

項目	項目名(英)	サイズ	単位	単位番号
1	可変長(ハ)	1	バイト	37868
2	可変長(ハ)	1	バイト	37869
3	可変長(ハ)	1	バイト	37870
4	可変長(ハ)	1	バイト	37871
5	可変長(ハ)	1	バイト	37872
6	可変長(ハ)	1	バイト	37873
7	可変長(ハ)	1	バイト	37874
8	可変長(ハ)	1	バイト	37875
9	可変長(ハ)	1	バイト	37876

【図 10 J】

[illegible]

【図 10 K】

[illegible]

【図 10 L】

№)	Ц/ИД-40 ПЗ.21	№/9	10.129 (40XENP/20473, scvX XENP/20432)	№/9/12
司乘員 (x4) ヲイイ ン			RQVVGKGRKRGISIRLCAWAGTTFSTSTHWWKAGRGLEWVSTSTCONTYVATVSGREFTSRCAWNRH LQVQWGLHUBH AVTYKAWGSLJLFPJWGQSTWVTSB	37895
vICDR1			STVGRH	37896
vICDR2			PTSEWYVYVATVSG	37897
vICDR3			SGLLGFEDI	37898
司乗員 (x4) ヲイイ ン			GRPSRSTWSTGRPSGR658 s e l f v i n c a - FVTCVSTZSLVSGSSTVATSCRAQSGWSXYLWQVQVQAHLVHSGHWHSLVJHSGHSGHGTUULVJ40 GAPWQAVWYVQVQSGSSTWTFSGVATSL6	37708 37899
vICDR1			RASQSGVSSHLA	37900
vICDR2			GASLRAT	37901
vICDR3			QVQSSSLAT	37902
scvX			RQVVGKGRKRGISIRLCAWAGTTFSTSTHWWKAGRGLEWVSTSTCONTYVATVSGREFTSRCAWNRH LQVQWGLHUBH AVTYKAWGSLJLFPJWGQSTWVTSB RATVQWGLHUBH AVTYKAWGSLJLFPJWGQSTWVTSB SPATVQWGLHUBH AVTYKAWGSLJLFPJWGQSTWVTSB SPATVQWGLHUBH AVTYKAWGSLJLFPJWGQSTWVTSB	37903

【図 10 U】

[CLA-4] H3.4_10.119 (Fab XENP20342, scFv XENP20379)			
項目	配列	配列番号	
可変域 (VH) の イン	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS	37976	
VCDR1	SVYVNH	37977	
VCDR2	ESVQDRNRYVALSVWG	37978	
VCDR3	TSRLGDFDL	37979	
セトリンカー	GRGGSGVPSGRVGRGTFPS	37708	
可変域 (VL) の イン	SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF AVYVQGVSSPTFGQGVKILR	37980	
VCDR1	RAVSQVSSSYLA	37981	
VCDR2	GRGSRAT	37982	
VCDR3	QVYGSSEPT	37983	
scFv	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS/GRGGSGVPSGRVGRGTFPS/SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF VSSSYLAWYQGVSSPTFGQGVKILR	37984	

【図 10 V】

[CLA-4] H3.4_10.12 (Fab XENP20071, scFv XENP20078)			
項目	配列	配列番号	
可変域 (VH) の イン	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS	37985	
VCDR1	SVYVNH	37986	
VCDR2	ESVQDRNRYVALSVWG	37987	
VCDR3	TSRLGDFDL	37988	
セトリンカー	GRGGSGVPSGRVGRGTFPS	37989	
可変域 (VL) の イン	SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF AVYVQGVSSPTFGQGVKILR	37990	
VCDR1	RAVSQVSSSYLA	37991	
VCDR2	GRGSRAT	37992	
VCDR3	QVYGSSEPT	37993	
scFv	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS/GRGGSGVPSGRVGRGTFPS/SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF VSSSYLAWYQGVSSPTFGQGVKILR	37993	

【図 10 W】

[CLA-4] H3.4_10.121 (Fab XENP20344, scFv XENP20381)			
項目	配列	配列番号	
可変域 (VH) の イン	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS	37994	
VCDR1	SVYVNH	37995	
VCDR2	ESVQDRNRYVALSVWG	37996	
VCDR3	TSRLGDFDL	37997	
セトリンカー	GRGGSGVPSGRVGRGTFPS	37708	
可変域 (VL) の イン	SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF AVYVQGVSSPTFGQGVKILR	37998	
VCDR1	RAVSQVSSSYLA	37999	
VCDR2	GRGSRAT	38000	
VCDR3	QVYGSSEPT	38001	
scFv	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS/GRGGSGVPSGRVGRGTFPS/SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF VSSSYLAWYQGVSSPTFGQGVKILR	38002	

【図 10 X】

[CLA-4] H3.4_10.122 (Fab XENP20345, scFv XENP20382)			
項目	配列	配列番号	
可変域 (VH) の イン	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS	38003	
VCDR1	SVYVNH	38004	
VCDR2	ESVQDRNRYVALSVWG	38005	
VCDR3	TSRLGDFDL	38006	
セトリンカー	GRGGSGVPSGRVGRGTFPS	37708	
可変域 (VL) の イン	SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF AVYVQGVSSPTFGQGVKILR	38007	
VCDR1	RAVSQVSSSYLA	38008	
VCDR2	GRGSRAT	38009	
VCDR3	QVYGSSEPT	38010	
scFv	EQVVRSGGILVRFPRRIHPTSCAASPTFSSTVMAFVQAFVGLDFEETSTCHRIKYVAUSVSEFTISELWANSGLYQNN SRARATAVYTCARTEHLGRLTLMQGRVTVSS/GRGGSGVPSGRVGRGTFPS/SLVITGSPRTISIGNRBATLFRAGQGVDSSEFLAWYQKFPQARLITVYNSFSLATPTDENRSGSSNTPTTSHRLEPDF VSSSYLAWYQGVSSPTFGQGVKILR	38011	

10

20

30

40

50

【図 10 C C】

[CTLA-4] H3.4 10.127 (Fab XENP20350, scFv XENP20387)

例	配列	配列番号
可変重 (V H) N A イン	EVQLVGGSTVTPPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS	38048
vicDR1	STDRH	38049
vicDR2	STSTGKSHYVAQSSWC	38050
vicDR3	TSHEGFLL	38051
scFv リンカー	GGPSGGRPSGRPSGRPS	37708
可変重 (V L) N A イン	EVLPDSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI NVAIQVQLASSTFGQGVKIK	38052
vicDR1	MAKQVSSSTLA	38053
vicDR2	TSASNAI	38054
vicDR3	SGKGEEL	38055
scFv	EVQLVGGSTVTPPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS VSSSLAWYQKPKQKRAILLVYGRFATIGIDPEFSSSGSTIFFTITSLIEPFPVAVYCSQKGSFMTFQDQVYKIK	38056

【図 10 D D】

[CTLA-4] H3.4 10.128 (Fab XENP20351, scFv XENP20388)

例	配列	配列番号
可変重 (V H) N A イン	EVQVPSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS	38057
vicDR1	STDRH	38058
vicDR2	STSTGKSHYVAQSSWC	38059
vicDR3	TSHEGFLL	38060
scFv リンカー	GGPSGGRPSGRPSGRPS	37708
可変重 (V L) N A イン	EVLPDSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI NVAIQVQLASSTFGQGVKIK	38061
vicDR1	MAKQVSSSTLA	38062
vicDR2	TSASNAI	38063
vicDR3	SGKGEEL	38064
scFv	EVQVPSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS VSSSLAWYQKPKQKRAILLVYGRFATIGIDPEFSSSGSTIFFTITSLIEPFPVAVYCSQKGSFMTFQDQVYKIK	38065

【図 10 E E】

[CTLA-4] H3.4 10.129 (Fab XENP20352, scFv XENP20389)

例	配列	配列番号
可変重 (V H) N A イン	EVQLVGGSTVTPPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS	38066
vicDR1	STDRH	38067
vicDR2	STSTGKSHYVAQSSWC	38068
vicDR3	TSHEGFLL	38069
scFv	EVQLVGGSTVTPPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS VSSSLAWYQKPKQKRAILLVYGRFATIGIDPEFSSSGSTIFFTITSLIEPFPVAVYCSQKGSFMTFQDQVYKIK	38070

【図 10 F F】

[CTLA-4] H3.4 10.130 (Fab XENP20353, scFv XENP20390)

例	配列	配列番号
可変重 (V H) N A イン	EVQVPSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS	38071
vicDR1	STDRH	38072
vicDR2	STSTGKSHYVAQSSWC	38073
vicDR3	TSHEGFLL	38074
scFv リンカー	GGPSGGRPSGRPSGRPS	37708
可変重 (V L) N A イン	EVLPDSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI NVAIQVQLASSTFGQGVKIK	38075
vicDR1	MAKQVSSSTLA	38076
vicDR2	TSASNAI	38077
vicDR3	SGKGEEL	38078
scFv	EVQVPSGGTLPQSLKLTISPAASQFTPSVIMRWTPQAPFQGLEWVEFVYGHKATYAMVKQNTTISRMKASITLQNI SLAKGFTATVTCARCDIEZEFELAGQFAYTNSS VSSSLAWYQKPKQKRAILLVYGRFATIGIDPEFSSSGSTIFFTITSLIEPFPVAVYCSQKGSFMTFQDQVYKIK	38079

10

20

30

40

50

【図10GG】

【CTLA-4】 H3.4_10.131 (Fab XENP20354, scFv XENP20391)

種別	配列	配列番号
可変域 (VH) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM HSLALDPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38080
VCDR1	SYTHL	38081
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38082
VCDR3	LSHLAGEDH	38083
セットリンカー	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM	37708
可変域 (VL) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38084
VCDR1	SYTHL	38085
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38086
VCDR3	LSHLAGEDH	38087
scFv	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38088

【図10HH】

【CTLA-4】 H3.4_10.132 (Fab XENP20355, scFv XENP20392)

種別	配列	配列番号
可変域 (VH) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NSLALDPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38089
VCDR1	SYTHL	38090
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38091
VCDR3	LSHLAGEDH	38092
セットリンカー	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM	37708
可変域 (VL) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38093
VCDR1	SYTHL	38094
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38095
VCDR3	LSHLAGEDH	38096
scFv	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38097

10

20

【図10II】

【CTLA-4】 H3.5_12.1 (Fab XENP20357, scFv XENP20394)

種別	配列	配列番号
可変域 (VH) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NSLALDPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38098
VCDR1	SYTHL	38099
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38100
VCDR3	LSHLAGEDH	38101
セットリンカー	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM	37708
可変域 (VL) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38102
VCDR1	SYTHL	38103
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38104
VCDR3	LSHLAGEDH	38105
scFv	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38106

【図10JJ】

【CTLA-4】 H3.5_12.2 (Fab XENP20358, scFv XENP20395)

種別	配列	配列番号
可変域 (VH) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NSLALDPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38107
VCDR1	SYTHL	38108
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38109
VCDR3	LSHLAGEDH	38110
セットリンカー	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM	37708
可変域 (VL) 変異イン	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38111
VCDR1	SYTHL	38112
VCDR2	EYFVDSNHRVTAIGVGG	38113
VCDR3	LSHLAGEDH	38114
scFv	EVQVVGSGGTVFPGSSLRISGLASGSPFSSSTVTHVAVQKRPKGLKWSFVYGHGKHYQVSKGPTTIRDNKNSLYQM NGLADLPAVYVYCARSHLHPTFVWQVTPVSS	38115

30

40

50

【図 10KK】

[CTLA-4] H3_5_L2.3 (Fab XENP20359, scFv XENP20956)		
項目	内容	配列番号
可変域 (VH) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38134
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38135
WCDR2	IGAGLEFVY	38136
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38137
scFvリンカー	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	37708
可変域 (VL) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38138
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38139
WCDR2	IGAGLEFVY	38140
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38141
scFv	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38142

【図 10MM】

[CTLA-4] H3_10.22 (Fab XENP20911)		
項目	内容	配列番号
可変域 (VH) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38143
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38144
WCDR2	IGAGLEFVY	38145
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38146
scFvリンカー	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	37708
可変域 (VL) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38147
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38148
WCDR2	IGAGLEFVY	38149
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38150
scFv	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38151

【図 10LL】

[CTLA-4] H3_10 (Fab XENP19546, scFv XENP19553)		
項目	内容	配列番号
可変域 (VH) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38125
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38126
WCDR2	IGAGLEFVY	38127
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38128
scFvリンカー	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	37708
可変域 (VL) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38129
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38130
WCDR2	IGAGLEFVY	38131
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38132
scFv	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38133

【図 10NN】

[CTLA-4] H3_0.44 (Fab XENP20052)		
項目	内容	配列番号
可変域 (VH) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38143
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38144
WCDR2	IGAGLEFVY	38145
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38146
scFvリンカー	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	37708
可変域 (VL) シー イン	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38147
WCDR1	ELTQNIIRYTAASVGS	38148
WCDR2	IGAGLEFVY	38149
WCDR3	GRVSGSGEPTGSGTSGS	38150
scFv	EVCLVSGGGVLTGGSTRICCAADRTFFSTLTHWVFQATQSELEWVSEITLUNNYTAIRVLPRTFSIDAKASITCLQNIIL RACTATVYTCATSEZAELEWQGLTAVSS	38151

【図 1000】

【CLA-4】 H3 10.67 (Feb XENP20018)

種	配列	配列番号
可変域 (VH) ヌイ	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLIQAASGFTPEAKSCASVWGPGVCA-SGCGSRFTETQDQVYVAVLQVETLSKANKKNSVTAQDSLS RADITAVTYCAKQGLLEFLVYQQTIVSS	38152
WCDR1	STVA	38153
WCDR2	LTSTQNNRYVANSFS	38154
WCDR3	TKAGSTFF	38155
セクション	QREGSGNSGKSGSGASGS	37708
可変域 (VL) SA	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38156
WCDR1	SAKSGVSSYCA	38157
WCDR2	DAERQI	38158
WCDR3	QVAGSTFF	38159
SCV	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38160

【図 10PP】

【CLA-4】 H3 10.74 (Feb XENP20020)

種	配列	配列番号
可変域 (VH) ヌイ	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLIQAASGFTPEAKSCASVWGPGVCA-SGCGSRFTETQDQVYVAVLQVETLSKANKKNSVTAQDSLS RADITAVTYCAKQGLLEFLVYQQTIVSS	38161
WCDR1	STVA	38162
WCDR2	LTSTQNNRYVANSFS	38163
WCDR3	TKAGSTFF	38164
セクション	QREGSGNSGKSGSGASGS	37708
可変域 (VL) SA	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38165
WCDR1	SAKSGVSSYCA	38166
WCDR2	DAERQI	38167
WCDR3	QVAGSTFF	38168
SCV	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38169

【図 11A】

7C8_H3_30_L1.34 (Feb XENP22594)

種	配列	配列番号
可変域 (VH) ヌイ	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLIQAASGFTPEAKSCASVWGPGVCA-SGCGSRFTETQDQVYVAVLQVETLSKANKKNSVTAQDSLS RADITAVTYCAKQGLLEFLVYQQTIVSS	38170
WCDR1	STVA	38171
WCDR2	LTSTQNNRYVANSFS	38172
WCDR3	TKAGSTFF	38173
セクション	QREGSGNSGKSGSGASGS	38174
可変域 (VL) SA	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38175
WCDR1	SAKSGVSSYCA	38176
WCDR2	DAERQI	38177
WCDR3	QVAGSTFF	38178

【図 11B】

2A11_H1_144_L2.142 (Feb XENP22656)

種	配列	配列番号
可変域 (VH) ヌイ	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLIQAASGFTPEAKSCASVWGPGVCA-SGCGSRFTETQDQVYVAVLQVETLSKANKKNSVTAQDSLS RADITAVTYCAKQGLLEFLVYQQTIVSS	38179
WCDR1	STVA	38180
WCDR2	LTSTQNNRYVANSFS	38181
WCDR3	TKAGSTFF	38182
セクション	QREGSGNSGKSGSGASGS	38183
可変域 (VL) SA	EVLTQSGPTLLSREAEATLSGELSGAGSSVLAIVQMPQKHPALTYDSEATGPGFSGASSTDPVTSRTEPDFAV VYQGGSGEPTQQTIVTFS	38184
WCDR1	SAKSGVSSYCA	38185
WCDR2	DAERQI	38186
WCDR3	QVAGSTFF	38187

10

20

30

40

50

【図 1 1 C】

7C8_H3.18_L1.11 (Fab XENP21670)

配列	変異	変異番号
可変域 (Vh) Vh1	EVYVTSVGHVCPGSAIILSLSSASSTPEIDKQILWQKQKRSGLWQDSEEDQRENTVYAEVYE SAPIISLNLKSNATQNSISDAICAVTGLSLADWDAZLEWQDFTVSS	38186
CDR1	WAGD	38187
CDR2	ELSTGNNHGGVTHESVAG	38188
CDR3	ATQNTLLV	38189
可変域 (Vh) Vh2	ETVLTQSPSSLSASVGRVTITPCASQSVNIVQVYVQKQKPKITVASEPSSGIPARIS SSSEFTDTFTSSAFENETVYQSSNEDEFTTSGKLLK	38190
CDR1	RAKAWQSDVYS	38191
CDR2	PSSTFE	38192
CDR3	QQRDDEFT	38193

【図 1 1 D】

2A11_H0.0 (Fab XENP20930)

配列	変異	変異番号
可変域 (Vh) Vh1	EVYIESSEGLVQGGSKVLSGASSTFSDADPWVQSPENGLWVALLNKRIHATVYAEVYS SRITISDQSKSVYLCMSIRACDQGYCYCTIANNWYFDVWGAITVSS	38194
CDR1	DAMG	38195
CDR2	ELTKANMLVYASVRS	38196
CDR3	LAMDATLV	38197
可変域 (Vh) Vh2	DIYVTSQSLAVSLGCRATITGASGVYDSDSNWVQKQKPKITVASEPSSGIPARIS GGSGDTDLIHPEEEDATVYQSDHDFVQSTKLEK	38198
CDR1	KASQVNDQSHN	38199
CDR2	ASNLSE	38200
CDR3	QASNEDEFT	38201

【図 1 1 E】

2A11_H1.125_L2.113 (Fab XENP21921)

配列	変異	変異番号
可変域 (Vh) Vh1	EVYVSSKAEVKKQNTVTKISCKASGRIKHYEVNQDARSGLFERRQRIEPLQDPSNARKQGR VITADISTNTAMELSSLESQDAVAVCASTLYDA-LDMGGCTIVSS	38202
CDR1	QSEHH	38203
CDR2	WQDVGATRYAFKPS	38204
CDR3	RGVQRLVY	38205
可変域 (Vh) Vh2	DIYVTSQSLAVSLGCRATITGASGVYDSDSNWVQKQKPKITVASEPSSGIPARIS GTXYTFTSSSTADAAVYQDQNTLLVYTGSGTAVIK	38206
CDR1	QASQVNDQSHN	38207
CDR2	ETSTHS	38208
CDR3	QASNTLLVY	38209

【図 1 1 F】

2A11_H1.2 (Fab XENP20847)

配列	変異	変異番号
可変域 (Vh) Vh1	EVYVSSKAEVKKQNTVTKISCKASGRIKHYEVNQDARSGLFERRQRIEPLQDPSNARKQGR VITADISTNTAMELSSLESQDAVAVCASTLYDA-LDMGGCTIVSS	38210
CDR1	QSEHH	38211
CDR2	WQDVGATRYAFKPS	38212
CDR3	RGVQRLVY	38213
可変域 (Vh) Vh2	DIYVTSQSLAVSLGCRATITGASGVYDSDSNWVQKQKPKITVASEPSSGIPARIS GTXYTFTSSLESADAAVYQDQNTLLVYTGSGTAVIK	38214
CDR1	QASQVNDQSHN	38215
CDR2	ETSTHS	38216
CDR3	QASNTLLVY	38217

10

20

30

40

50

【図 11 G】

2A11_H1_L2.25 (Fab XNP21372)

種	変異	変異番号
可変重 (VH) ヌイ	EVGLVDSGEYTRGDSNVLKSLSRKSGKFLKCVLZLNQQRERSGHDEPESLITFAKRGQR VITLADSTNTVIELSGESAEEDVNTVGVNAGSGALDYWAGTLPVNS	38218
WCDR1	LVYFVQ	38219
WCDR2	VTLEFSGTEGDFEG	38220
WCDR3	KQFQALDI	38221
可変重 (VL) ヌイ	LIDPQSDAPSGYFSGKZLTGKADPFGRIINLPFGSPKTKALPVTSIHQVTSRSGSGR GPDLETLISGFAKHLVTEVQQRLEFEGCTKPLK	38222
WCDR1	SSSGGKSLID	38223
WCDR2	YTSGLIF	38224
WCDR3	KQDITLIG	38225

【図 11 H】

2A11_H1_L2.47 (Fab XNP21394)

種	変異	変異番号
可変重 (VH) ヌイ	EVGLVDSGEYTRGDSNVLKSLSRKSGKFLKCVLZLNQQRERSGHDEPESLITFAKRGQR VITLADSTNTVIELSGESAEEDVNTVGVNAGSGALDYWAGTLPVNS	38226
WCDR1	LVYFVQ	38227
WCDR2	VTLEFSGTEGDFEG	38228
WCDR3	KQFQALDI	38229
可変重 (VL) ヌイ	LIDPQSDAPSGYFSGKZLTGKADPFGRIINLPFGSPKTKALPVTSIHQVTSRSGSGR GPDLETLISGFAKHLVTEVQQRLEFEGCTKPLK	38230
WCDR1	SSSGGKSLID	38231
WCDR2	YTSGLIF	38232
WCDR3	KQDITLIG	38233

【図 11 I】

2A11_H1_L2.50 (Fab XNP21401)

種	変異	変異番号
可変重 (VH) ヌイ	EVGLVDSGEYTRGDSNVLKSLSRKSGKFLKCVLZLNQQRERSGHDEPESLITFAKRGQR VITLADSTNTVIELSGESAEEDVNTVGVNAGSGALDYWAGTLPVNS	38234
WCDR1	LVYFVQ	38235
WCDR2	VTLEFSGTEGDFEG	38236
WCDR3	KQFQALDI	38237
可変重 (VL) ヌイ	LIDPQSDAPSGYFSGKZLTGKADPFGRIINLPFGSPKTKALPVTSIHQVTSRSGSGR GPDLETLISGFAKHLVTEVQQRLEFEGCTKPLK	38238
WCDR1	SSSGGKSLID	38239
WCDR2	YTSGLIF	38240
WCDR3	KQDITLIG	38241

【図 11 J】

2A11_H1L2 (Fab XNP20847)

種	変異	変異番号
可変重 (VH) ヌイ	EVGLVDSGEYTRGDSNVLKSLSRKSGKFLKCVLZLNQQRERSGHDEPESLITFAKRGQR VITLADSTNTVIELSGESAEEDVNTVGVNAGSGALDYWAGTLPVNS	38242
WCDR1	LVYFVQ	38243
WCDR2	VTLEFSGTEGDFEG	38244
WCDR3	KQFQALDI	38245
可変重 (VL) ヌイ	LIDPQSDAPSGYFSGKZLTGKADPFGRIINLPFGSPKTKALPVTSIHQVTSRSGSGR GPDLETLISGFAKHLVTEVQQRLEFEGCTKPLK	38246
WCDR1	SSSGGKSLID	38247
WCDR2	YTSGLIF	38248
WCDR3	KQDITLIG	38249

10

20

30

40

50

【図 1 1 K】

7G8_H3.23_L1.11 (Fab XENP21670)

Item	Item	Item
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38250
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38251
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38252
可変域 (VL) ヌイ	STVLIQDSS-SADYVGRPTITCRASQDQYDQGLAQQWYGGKGRGPTMGLVARELLISQIPALIS	38253
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38254
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38255
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38256
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38257
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	

【図 1 1 M】

7G8_H3.28_L1.11 (Fab XENP21893)

Item	Item	Item
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38266
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38267
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38268
可変域 (VL) ヌイ	STVLIQDSS-SADYVGRPTITCRASQDQYDQGLAQQWYGGKGRGPTMGLVARELLISQIPALIS	38269
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38270
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38271
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38272
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38273
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	

【図 1 1 L】

7G8_H3.28_L1 (Fab XENP21892)

Item	Item	Item
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38258
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38259
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38260
可変域 (VL) ヌイ	STVLIQDSS-SADYVGRPTITCRASQDQYDQGLAQQWYGGKGRGPTMGLVARELLISQIPALIS	38261
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38262
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38263
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38264
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38265
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	

【図 1 1 N】

7G8_H3.28_L1.13 (Fab XENP21894)

Item	Item	Item
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38274
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38275
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38276
可変域 (VL) ヌイ	STVLIQDSS-SADYVGRPTITCRASQDQYDQGLAQQWYGGKGRGPTMGLVARELLISQIPALIS	38277
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38278
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38279
可変域 (VH) ヌイ	EVQVYKSHQIWDPSGSLRSCAAAEETDAPKQKVRQDQSGQLEPWADQSSKQDSEHTVARESY	38280
CDR1	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	
CDR2	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	38281
CDR3	EQPTLRDQKSSVILDANELEAFQDVVFTLLINQKYLWQGFIVVHH	

【図 12 A】

(HBT LA4)可変部用L/D可変部 - CDR

何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208
0269 9C6 11010	0269 9C6 11010	0269 9C6 11010
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3

【図 12 B】

何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208
0269 9C6 11010	0269 9C6 11010	0269 9C6 11010
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3

【図 12 C】

(HBT LA4)可変部用L/D可変部 - CDR

何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208
0269 9C6 11010	0269 9C6 11010	0269 9C6 11010
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3

【図 13 A】

(HBT LA4)可変部用L/D可変部 - CDR

何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208	何：HBT LA4 XENP208
0269 9C6 11010	0269 9C6 11010	0269 9C6 11010
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3
可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A	可変部 (V1) N/A
VCOR1	VCOR1	VCOR1
VCOR2	VCOR2	VCOR2
VCOR3	VCOR3	VCOR3

10

20

30

40

50

【図 13 B】

可変長 (V L)	変長	変長番号
402 1012 1016	変長	3814
402 1012 1016	変長	3815
402 1012 1016	変長	3816
402 1012 1016	変長	3817
402 1012 1016	変長	3818
402 1012 1016	変長	3819
402 1012 1016	変長	3820
402 1012 1016	変長	3821

【図 13 C】

[illegible]

【図 13 D】

得意店名	得意店コード
新井田 隆興	38330
新井田 隆興	38331
新井田 隆興	38332
新井田 隆興	38333
新井田 隆興	38334
新井田 隆興	38335
新井田 隆興	38336
新井田 隆興	38337

【図 13 E】

何列番号	何列
何三級IM3 NESP21	38338
494 GD9H0 DD12	
—	
何四級 (h) SA4	
—	
何五級 (v) SA4	
—	
何六級 (v) SA4	
—	
何七級 (v) SA4	
—	
何八級 (v) SA4	
—	
何九級 (v) SA4	
—	
何十級 (v) SA4	
—	
何十一級 (v) SA4	
—	
何十二級 (v) SA4	
—	
何十三級 (v) SA4	
—	
何十四級 (v) SA4	
—	
何十五級 (v) SA4	
—	
何十六級 (v) SA4	
—	
何十七級 (v) SA4	
—	
何十八級 (v) SA4	
—	
何十九級 (v) SA4	
—	
何二十級 (v) SA4	
—	
何二十一級 (v) SA4	
—	
何二十二級 (v) SA4	
—	
何二十三級 (v) SA4	
—	
何二十四級 (v) SA4	
—	
何二十五級 (v) SA4	
—	
何二十六級 (v) SA4	
—	
何二十七級 (v) SA4	
—	
何二十八級 (v) SA4	
—	
何二十九級 (v) SA4	
—	
何三十級 (v) SA4	
—	
何三十一級 (v) SA4	
—	
何三十二級 (v) SA4	
—	
何三十三級 (v) SA4	
—	
何三十四級 (v) SA4	
—	
何三十五級 (v) SA4	
—	
何三十六級 (v) SA4	
—	
何三十七級 (v) SA4	
—	
何三十八級 (v) SA4	
—	
何三十九級 (v) SA4	
—	
何四十級 (v) SA4	
—	
何四十一級 (v) SA4	
—	
何四十二級 (v) SA4	
—	
何四十三級 (v) SA4	
—	
何四十四級 (v) SA4	
—	
何四十五級 (v) SA4	
—	
何四十六級 (v) SA4	
—	
何四十七級 (v) SA4	
—	
何四十八級 (v) SA4	
—	
何四十九級 (v) SA4	
—	
何五十級 (v) SA4	
—	
何五十一級 (v) SA4	
—	
何五十二級 (v) SA4	
—	
何五十三級 (v) SA4	
—	
何五十四級 (v) SA4	
—	
何五十五級 (v) SA4	
—	
何五十六級 (v) SA4	
—	
何五十七級 (v) SA4	
—	
何五十八級 (v) SA4	
—	
何五十九級 (v) SA4	
—	
何六十級 (v) SA4	
—	
何六十一級 (v) SA4	
—	
何六十二級 (v) SA4	
—	
何六十三級 (v) SA4	
—	
何六十四級 (v) SA4	
—	
何六十五級 (v) SA4	
—	
何六十六級 (v) SA4	
—	
何六十七級 (v) SA4	
—	
何六十八級 (v) SA4	
—	
何六十九級 (v) SA4	
—	
何七十級 (v) SA4	
—	
何七十一級 (v) SA4	
—	
何七十二級 (v) SA4	
—	
何七十三級 (v) SA4	
—	
何七十四級 (v) SA4	
—	
何七十五級 (v) SA4	
—	
何七十六級 (v) SA4	
—	
何七十七級 (v) SA4	
—	
何七十八級 (v) SA4	
—	
何七十九級 (v) SA4	
—	
何八十級 (v) SA4	
—	
何八十一級 (v) SA4	
—	
何八十二級 (v) SA4	
—	
何八十三級 (v) SA4	
—	
何八十四級 (v) SA4	
—	
何八十五級 (v) SA4	
—	
何八十六級 (v) SA4	
—	
何八十七級 (v) SA4	
—	
何八十八級 (v) SA4	
—	
何八十九級 (v) SA4	
—	
何九十級 (v) SA4	
—	
何九十一級 (v) SA4	
—	
何九十二級 (v) SA4	
—	
何九十三級 (v) SA4	
—	
何九十四級 (v) SA4	
—	
何九十五級 (v) SA4	
—	
何九十六級 (v) SA4	
—	
何九十七級 (v) SA4	
—	
何九十八級 (v) SA4	
—	
何九十九級 (v) SA4	
—	
何一百級 (v) SA4	
—	
何一百零一級 (v) SA4	
—	
何一百零二級 (v) SA4	
—	
何一百零三級 (v) SA4	
—	
何一百零四級 (v) SA4	

【図 13 F】

図 13 F 13 F 13 F 2	図 13 F 13 F 2	図 13 F 13 F 2
01 011307 11010	01 011307 11010	01 011307 11010
可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ
38346	38346	38346
38347	38347	38347
38348	38348	38348
38349	38349	38349
38350	38350	38350
38351	38351	38351
38352	38352	38352
38353	38353	38353

【図 13 G】

図 13 G 13 G 13 G 2	図 13 G 13 G 2	図 13 G 13 G 2
01 011307 11010	01 011307 11010	01 011307 11010
可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ
38354	38354	38354
38355	38355	38355
38356	38356	38356
38357	38357	38357
38358	38358	38358
38359	38359	38359
38360	38360	38360
38361	38361	38361

【図 13 H】

図 13 H 13 H 13 H 2	図 13 H 13 H 2	図 13 H 13 H 2
01 011307 11010	01 011307 11010	01 011307 11010
可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ
38362	38362	38362
38363	38363	38363
38364	38364	38364
38365	38365	38365
38366	38366	38366
38367	38367	38367
38368	38368	38368
38369	38369	38369

【図 13 I】

図 13 I 13 I 13 I 2	図 13 I 13 I 2	図 13 I 13 I 2
01 011307 11010	01 011307 11010	01 011307 11010
可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ	可変長 (v h) サイズ
38370	38370	38370
38371	38371	38371
38372	38372	38372
38373	38373	38373
38374	38374	38374
38375	38375	38375
38376	38376	38376
38377	38377	38377

10

20

30

40

50

【図 14 A】

[illegible]

【図 14 B】

[illegible]

10

20

【図 14 C】

CTLA4 X PD.1

【図 14 D】

[illegible]

30

40

50

【図 17 A】

【図 17 B】

XENP20153

[illegible]

XENP20833

[illegible]

10

20

【図 17 C】

【図 17 D】

XENP21859

[illegible]

XENP21860

[illegible]

30

40

50

【図 1 7 M】

XENP2602

>XENP2602 758_H3_30_11_34_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_9CF-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVESGGGLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP2602 758_H3_30_11_34_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_9CF-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVESGGGLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP2602 758_H3_30_11_34_-(CTLA-4)_H3_23_10_129_4R (M185:31133-31117)
DIVLTGHSLSAVYDQVTTQASGSLVLSVQKQKQKPKLLVAKSLHGLVPAKSGVSGTDTLISLQDEPFIYVQQLNIDPTTQSGTKLEIK/RTVAASVITTFE2Q
LSGTASTVCLLNTFPLEAVQWRDIALQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS

【図 1 7 N】

XENP2675

>XENP2675 2A11_H1_144_L2_142_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_12B-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP2675 2A11_H1_144_L2_142_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_12B-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP2675 2A11_H1_144_L2_142_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_4R (M185:31133-31117)
DIVLTGHSLSAVYDQVTTQASGSLVLSVQKQKQKPKLLVAKSLHGLVPAKSGVSGTDTLISLQDEPFIYVQQLNIDPTTQSGTKLEIK/RTVAASVITTFE2Q
LSGTASTVCLLNTFPLEAVQWRDIALQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS

【図 1 7 O】

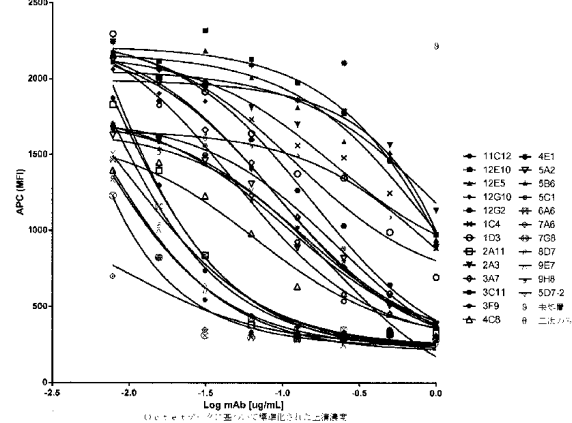
XENP22941

>XENP22941 758_H3_30_11_34_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_9CF-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVESGGGLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP22941 758_H3_30_11_34_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_9CF-PG_4R (M186:31708113-31708113)
EVQLVESGGGLVQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS
VFELASRSSTSGKSGTAAQAAWVAFVAVNIGSGLTSGVHTFPAVLQSGEELTASVAVASISLITCIYINTHKESITVQKWKQSGKSNHTFCTQKREIFRFGAGSYLFFPFRDITLSS
KTFSTQVAVVNHDEIVFNWVVDVFNKATIREREEVYSTVAGVCTVADQNIIRRETPKSHKALAPAKELISAKGAPREFQVTLFEPSEEMISGQSLCTLVGSEVQDAVNES
COFFHNEVCTFVILLSSGSAFVLSLTVQKSRKCPDPSGSLREALLSGRTQK:SLAPK

>XENP22941 758_H3_30_11_34_F40-(CTLA-4)_H3_23_10_129_4R (M185:31133-31117)
DIVLTGHSLSAVYDQVTTQASGSLVLSVQKQKQKPKLLVAKSLHGLVPAKSGVSGTDTLISLQDEPFIYVQQLNIDPTTQSGTKLEIK/RTVAASVITTFE2Q
LSGTASTVCLLNTFPLEAVQWRDIALQSGEELKSGAEFTFDMMISWQKQGLKWLWISFKNNAITLAKSSSTISQDSSESYTLAKSLKADDAVYCTLA4LQVLEWVQGGVTVNISE/ASTGKPS

【図 1 8】



10

20

30

40

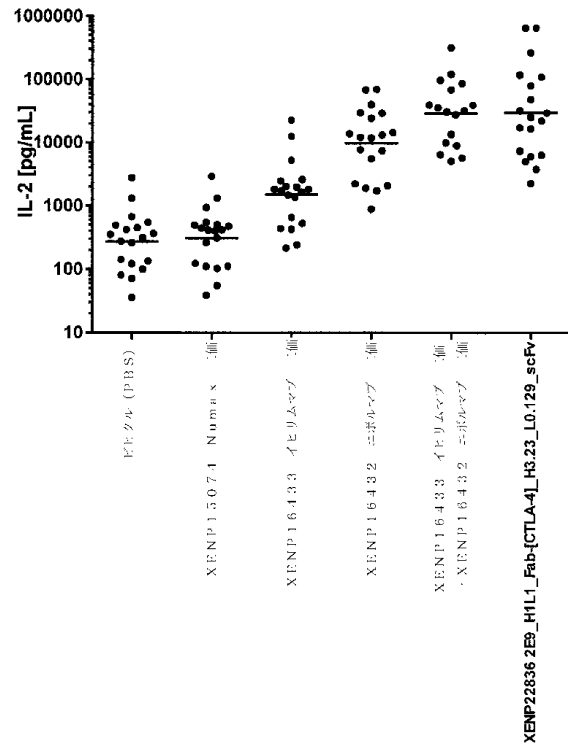
50

【図 19】

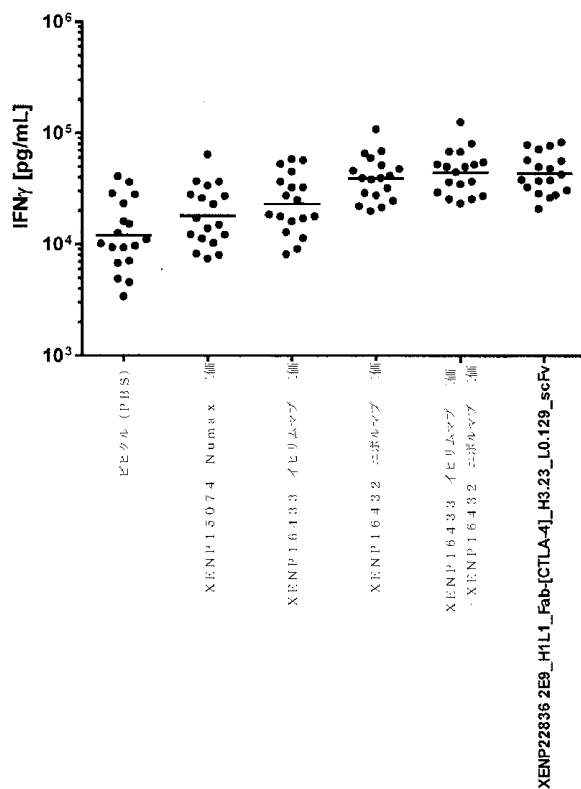
Figure 19

Figure 19A depict cytokine release assay (A: IL-2, G: IFN γ) after SEB stimulation of human PBMCs and treatment with an anti-PD-1 x anti-CTLA-4 bispecific antibody.

【図 19 A】



【図 19 B】



【図 20】

Figure 20

Figure 20A-C depicts CD45+ events, CD4+ events and CD8+ events on Day 14 after human PBMCs were engrafted into NSG mice on Day 0 followed by dosing with the indicated test articles on Day 1.

10

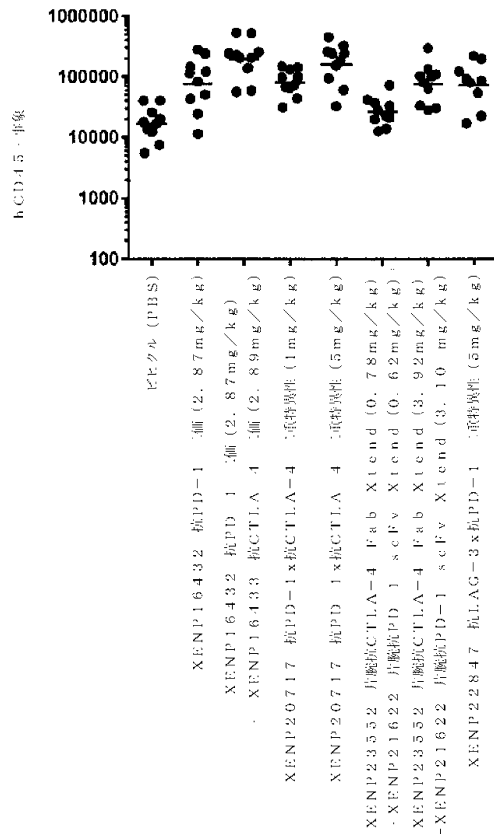
20

30

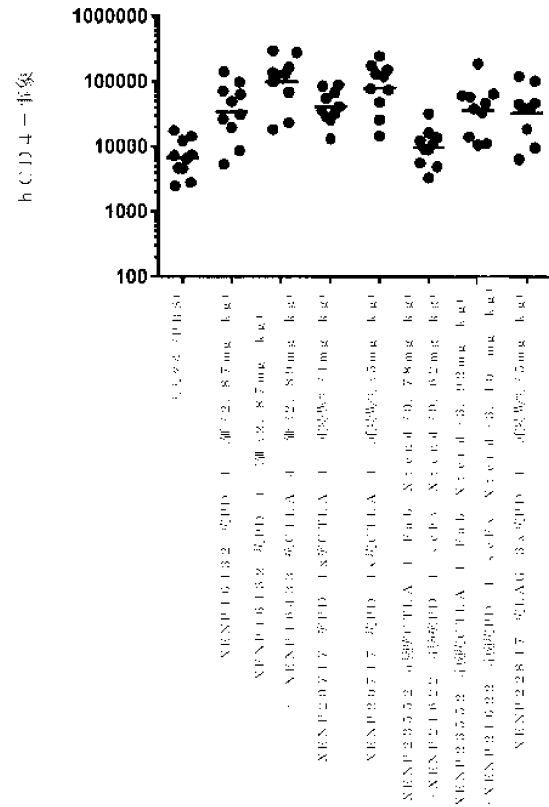
40

50

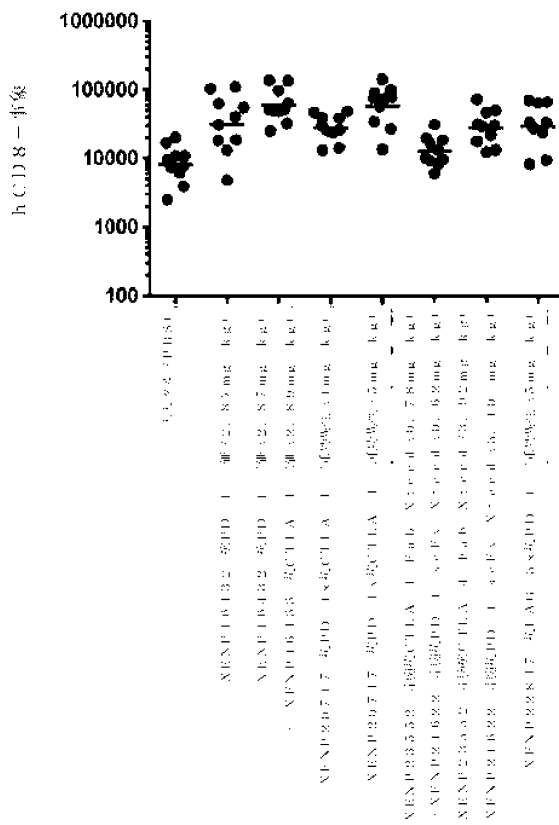
【図 20 A】



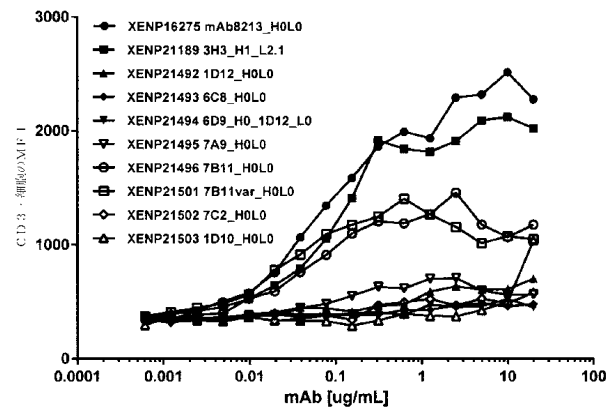
【図 20 B】



【図 20 C】



【図 21 A】



10

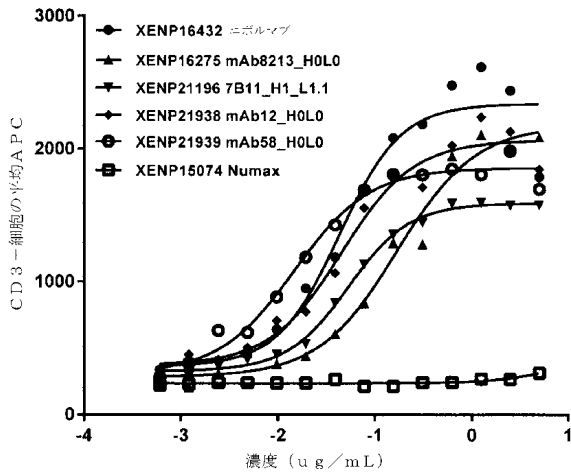
20

30

40

50

【図 2 1 B】



【図 2 2】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
実験番号 1						
16275	mAb8213	H0	L0	4.94E-09; 5.93E-09	7.34E04; 8.63E04	3.63E-04; 5.12E-04
17973	ABTIM3	H0	L0	1.74E-09; 2.75E-09	1.45E05; 1.97E05	2.52E-04; 5.42E-04
20850	1D12	H1	L1	9.07E-09	2.45E05	2.22E-03
20851	1D12	H1	L2	2.84E-08	1.72E05	4.87E-03
20853	3H3	H1	L1	4.49E-09	1.04E05	4.66E-04
20854	3H3	H1	L2	7.64E-09	7.07E04	5.40E-04
20855	3H3	H2	L1	5.16E-09	1.97E05	1.02E-03
20856	3H3	H2	L2	1.30E-08	1.11E05	1.44E-03
20857	3H3	H3	L1	7.11E-09	1.04E05	7.39E-04
20858	3H3	H3	L2	1.57E-08	8.16E04	1.28E-03
20859	3H3	H4	L1	4.50E-09	1.53E05	6.88E-04
20860	3H3	H4	L2	8.20E-09	9.15E04	7.50E-04
20861	7B11	H1	L1	1.07E-08	2.86E05	3.06E-03
20862	7B11	H1	L2	1.24E-08	1.37E05	1.70E-03
20863	7B11	H2	L1	9.24E-09	2.77E05	2.56E-03
20864	7B11	H2	L2	1.85E-08	1.34E05	2.48E-03
20865	7C2	H1	L1	5.90E-09	3.01E05	1.78E-03
実験番号 2						
16275	mAb8213	H0	L0	8.37E-10	1.84E05	1.54E-04
21188	3H3	H1	L1.1	5.34E-09	1.38E05	7.35E-04
21189	3H3	H1	L2.1	2.61E-09	1.54E05	4.00E-04
21190	3H3	H2	L1.1	8.61E-09	2.93E05	2.52E-03
21191	3H3	H2	L2.1	6.90E-09	2.52E05	1.74E-03
21192	3H3	H3	L1.1	1.25E-08	1.14E05	1.42E-03
21193	3H3	H3	L2.1	6.32E-09	1.56E05	9.87E-04
21194	3H3	H4	L1.1	4.60E-09	1.80E05	8.26E-04
21195	3H3	H4	L2.1	2.50E-09	1.78E05	4.45E-04
21196	7B11	H1	L1.1	3.11E-08	4.32E05	1.34E-02
21201	7B11	H1	L2.1	3.76E-08	3.87E05	1.45E-02
21202	7B11	H2.1	L1.1	3.25E-08	5.00E05	1.63E-02
21203	7B11	H2.1	L2.1	2.66E-08	4.80E05	1.28E-02
21204	7C2	H1.1	L1.1	9.41E-10	1.56E06	1.47E-03
実験番号 3						
16275	mAb8213	H0	L0	8.50E-11	1.86E05	1.58E-05
21492	1D12	H0	L0	1.07E-07	1.97E05	2.11E-02
21495	7A9	H0	L0	3.06E-08	2.03E05	6.21E-03
21496	7B11	H0	L0	2.24E-08	2.61E05	5.84E-03
21501	7B11var	H0	L0	2.02E-08	2.90E05	5.84E-03
21502	7C2	H0	L0	6.43E-09	2.68E06	1.72E-02

【図 2 3 A】

完全長 mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
17906	17922	H1	L1	VH-VL	1.49E-07	56.5
18094	18493	H1.1	L1	VH-VL	1.62E-07	56.5
18095	18494	H1.2	L1	VH-VL	1.59E-07	57.0
18096	18495	H1.3	L1	VH-VL	1.86E-07	55.0
18101	18496	H1.4	L1	VH-VL	1.66E-07	56.5
18102	18501	H1.5	L1	VH-VL	1.79E-07	56.0
18103	18502	H1.6	L1	VH-VL	1.43E-07	56.0
18104	18503	H1.7	L1	VH-VL	1.18E-07	56.0
18105	18504	H1.8	L1	VH-VL	1.21E-07	57.0
18106	18505	H1.9	L1	VH-VL	1.91E-07	54.5
18107	18506	H1.10	L1	VH-VL	2.80E-07	
18108	18507	H1.11	L1	VH-VL	1.22E-07	56.5
18109	18508	H1.12	L1	VH-VL	1.48E-07	56.0
18110	18509	H1.13	L1	VH-VL	1.65E-07	55.5
18111	18510	H1.14	L1	VH-VL	1.59E-07	55.5
18112	18511	H1.15	L1	VH-VL	1.30E-07	55.5
18113	18512	H1.16	L1	VH-VL	1.39E-07	55.0
18114	18513	H1.17	L1	VH-VL	5.15E-07	
18115	18514	H1.18	L1	VH-VL	1.20E-07	55.5
18116	18515	H1.19	L1	VH-VL	1.70E-07	56.0
18117	18516	H1.20	L1	VH-VL	1.47E-07	
18118	18517	H1.21	L1	VH-VL	2.04E-07	
18119	18518	H1.22	L1	VH-VL	1.24E-07	55.5
18120	18519	H1.23	L1	VH-VL	1.39E-06	
18121	18520	H1.24	L1	VH-VL	1.84E-07	
18122	18521	H1.25	L1	VH-VL	1.71E-07	
18123	18522	H1.26	L1	VH-VL	1.20E-07	54.5
18124	18523	H1.27	L1	VH-VL	2.02E-07	55.0
18125	18524	H1.28	L1	VH-VL	9.64E-08	56.0
18126	18525	H1.29	L1	VH-VL	1.51E-07	
18127	18526	H1.30	L1	VH-VL	2.01E-07	
18128	18527	H1.31	L1	VH-VL	1.83E-07	
18129	18528	H1.32	L1	VH-VL	2.53E-07	
18130	18529	H1.33	L1	VH-VL	1.87E-07	
18131	18530	H1.34	L1	VH-VL	1.45E-07	
18132	18531	H1.35	L1	VH-VL	2.19E-07	
18133	18532	H1.36	L1	VH-VL	2.18E-07	
18134	18533	H1.37	L1	VH-VL	2.63E-07	
18135	18534	H1.38	L1	VH-VL	2.12E-07	
18136	18535	H1.39	L1	VH-VL	1.90E-07	
18137	18536	H1.40	L1	VH-VL	3.78E-07	
18138	18537	H1.41	L1	VH-VL	1.60E-07	
18139	18538	H1.42	L1	VH-VL	1.74E-07	
18140	18539	H1.43	L1	VH-VL	1.64E-07	

【図 2 3 B】

完全長 mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18141	18540	H1.44	L1	VH-VL	弱い	55.0
18142	18541	H1.45	L1	VH-VL	1.34E-07	51.0
18143	18542	H1.46	L1	VH-VL	1.10E-07	56.5
18144	18543	H1.47	L1	VH-VL	1.11E-07	
18145	18544	H1.48	L1	VH-VL	9.01E-08	
18146	18545	H1.49	L1	VH-VL	1.33E-07	56.0
18147	18546	H1.50	L1	VH-VL	1.44E-07	56.5
18148	18547	H1.51	L1	VH-VL	1.17E-07	51.0
18149	18548	H1.52	L1	VH-VL	9.92E-08	57.0
18150	18549	H1.53	L1	VH-VL	1.36E-07	55.5
18151	18550	H1.54	L1	VH-VL	1.70E-07	
18152	18551	H1.55	L1	VH-VL	1.31E-07	
18153	18552	H1.56	L1	VH-VL	弱い	
18154	18553	H1.57	L1	VH-VL	3.66E-07	
18155	18554	H1.58	L1	VH-VL	弱い	
18156	18555	H1.59	L1	VH-VL	1.65E-06	
18157	18556	H1.60	L1	VH-VL	1.84E-07	
18158	18557	H1.61	L1	VH-VL	弱い	
18159	18558	H1.62	L1	VH-VL	1.37E-07	
18160	18559	H1.63	L1	VH-VL	1.00E-07	56.0
18161	18560	H1.64	L1	VH-VL	1.75E-07	
18162	18561	H1.65	L1	VH-VL	2.76E-07	
18163	18562	H1.66	L1	VH-VL	2.02E-07	
18164	18563	H1.67	L1	VH-VL	8.12E-07	
18165	18564	H1.68	L1	VH-VL	2.23E-07	
18166	18565	H1.69	L1	VH-VL	1.82E-07	
18167	18566	H1.70	L1	VH-VL	1.97E-07	
18168	18567	H1.71	L1	VH-VL	4.53E-07	
18169	18568	H1.72	L1	VH-VL	4.29E-07	
18170	18569	H1.73	L1	VH-VL	1.79E-07	54.5
18171	18570	H1.74	L1	VH-VL	1.45E-07	55.5
18172	18571	H1.75	L1	VH-VL	1.65E-07	53.0
18173	18572	H1.76	L1	VH-VL	1.41E-07	55.5
18174	18573	H1.77	L1	VH-VL	1.25E-07	54.0
18175	18574	H1.78	L1	VH-VL	1.09E-07	53.5
18176	18575	H1.79	L1	VH-VL	2.52E-07	
18177	18576	H1.80	L1	VH-VL	1.91E-07	
18178	18577	H1.81	L1	VH-VL	2.13E-07	
18179	18578	H1.82	L1	VH-VL	2.40E-07	
18180	18579	H1.83	L1	VH-VL	弱い	
18181	18580	H1.84	L1	VH-VL	1.03E-07	55.5
18182	18581	H1.85	L1	VH-VL	8.62E-08	55.0
18183	18582	H1.86	L1	VH-VL	8.39E-08	55.5
18184	18583	H1.87	L1	VH-VL	9.43E-08	54.0

10

20

30

40

50

【図 2 3 C】

完全共in A b	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 A b K _D (nM)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18185	18584	H1.88	L1	VH-VL	8.51E-08	56.0
18186	18585	H1.89	L1	VH-VL	8.09E-08	54.5
18187	18586	H1.90	L1	VH-VL	7.54E-08	55.0
18188	18587	H1.91	L1	VH-VL	1.04E-07	54.5
18189	18588	H1.92	L1	VH-VL	1.07E-07	
18190	18589	H1.93	L1	VH-VL	1.21E-07	
18191	18590	H1.94	L1	VH-VL	8.46E-08	
18192	18591	H1.95	L1	VH-VL	9.15E-08	
18193	18592	H1.96	L1	VH-VL	6.42E-08	
18194	18593	H1.97	L1	VH-VL	8.23E-08	
18195	18594	H1.98	L1	VH-VL	2.41E-07	56.0
18196	18595	H1.99	L1	VH-VL	2.10E-07	56.5
18201	18596	H1.100	L1	VH-VL	2.51E-07	55.0
18202	18601	H1.101	L1	VH-VL	2.32E-07	58.0
18203	18602	H1.102	L1	VH-VL	2.15E-07	56.0
18204	18603	H1.103	L1	VH-VL	2.89E-07	
18205	18604	H1.104	L1	VH-VL	1.98E-07	56.0
18206	18605	H1.105	L1	VH-VL	2.57E-07	53.5
18207	18606	H1.106	L1	VH-VL	1.85E-07	54.5
18208	18607	H1.107	L1	VH-VL	2.33E-07	55.5
18209	18608	H1.108	L1	VH-VL	2.07E-07	55.0
18210	18609	H1.109	L1	VH-VL	2.38E-07	54.5
18211	18610	H1.110	L1	VH-VL	1.78E-07	56.0
18212	18611	H1.111	L1	VH-VL	1.56E-07	55.5
18213	18612	H1.112	L1	VH-VL	1.60E-07	55.0
18214	18613	H1.113	L1	VH-VL	1.65E-07	55.0
18215	18614	H1.114	L1	VH-VL	2.79E-07	55.0
18216	18615	H1.115	L1	VH-VL	1.93E-07	55.0
18217	18616	H1.116	L1	VH-VL	1.80E-07	54.0
18218	18617	H1.117	L1	VH-VL	1.80E-07	56.0
18219	18618	H1.118	L1	VH-VL	2.51E-07	55.0
18220	18619	H1.119	L1	VH-VL	1.57E-07	55.5
18221	18620	H1.120	L1	VH-VL	1.64E-07	54.0
18222	18621	H1.121	L1	VH-VL	1.53E-07	53.5
18223	18622	H1.122	L1	VH-VL	1.67E-07	54.5
18224	18623	H1.123	L1	VH-VL	1.71E-07	52.5
18225	18624	H1.124	L1	VH-VL	1.51E-07	53.0
18226	18625	H1.125	L1	VH-VL	1.88E-07	53.0
18227	18626	H1.126	L1	VH-VL	1.45E-07	53.5
18228	18627	H1.127	L1	VH-VL	1.60E-07	52.5
18229	18628	H1.128	L1	VH-VL	1.51E-07	55.0
18230	18629	H1.129	L1	VH-VL	1.81E-07	
18231	18630	H1.130	L1	VH-VL	1.41E-07	56.0
18232	18631	H1.131	L1	VH-VL	1.34E-07	55.5

【図 2 3 D】

完全共in A b	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 A b K _D (nM)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18233	18632	H1.132	L1	VH-VL	1.92E-07	
18234	18633	H1.133	L1	VH-VL	1.97E-07	55.5
18235	18634	H1.134	L1	VH-VL	2.20E-07	
18236	18635	H1.135	L1	VH-VL	1.53E-07	54.5
18237	18636	H1.136	L1	VH-VL	2.00E-07	
18238	18637	H1.137	L1	VH-VL	1.16E-07	57.0
18239	18638	H1.138	L1	VH-VL	1.42E-07	55.5
18240	18639	H1.139	L1	VH-VL	1.62E-07	56.5
18241	18640	H1.140	L1	VH-VL	1.18E-07	57.0
18242	18641	H1.141	L1	VH-VL	1.53E-07	55.5
18243	18642	H1.142	L1	VH-VL	1.70E-07	56.5
18244	18643	H1.143	L1	VH-VL	1.34E-07	
18245	18644	H1.144	L1	VH-VL	1.50E-07	55.0
18246	18645	H1.145	L1	VH-VL	1.42E-07	57.0
18247	18646	H1.146	L1	VH-VL	1.44E-07	54.0
18248	18647	H1.147	L1	VH-VL	1.28E-07	55.0
18249	18648	H1.148	L1	VH-VL	1.32E-07	56.0
18250	18649	H1.149	L1	VH-VL	1.27E-07	54.5
18251	18650	H1.150	L1	VH-VL	1.23E-07	55.5
18252	18651	H1.151	L1	VH-VL	1.12E-07	57.0
18253	18652	H1.152	L1	VH-VL	8.58E-08	56.5
18254	18653	H1.153	L1	VH-VL	1.66E-07	55.5
18255	18654	H1.154	L1	VH-VL	1.37E-07	56.5
18256	18655	H1.155	L1	VH-VL	9.70E-08	56.5
18257	18656	H1.156	L1	VH-VL	2.80E-07	
18258	18657	H1.157	L1	VH-VL	1.51E-07	57.0
18259	18658	H1.158	L1	VH-VL	1.32E-07	56.5
18260	18659	H1.159	L1	VH-VL	1.39E-07	56.0
18261	18660	H1.160	L1	VH-VL	1.28E-07	57.0
18262	18661	H1.161	L1	VH-VL	1.53E-07	56.5
18263	18662	H1.162	L1	VH-VL	2.78E-07	
18264	18663	H1.163	L1	VH-VL	1.07E-07	55.5
18265	18664	H1.164	L1	VH-VL	2.16E-07	
18266	18665	H1.165	L1	VH-VL	弱い	
18267	18666	H1.166	L1	VH-VL	2.43E-07	
18268	18667	H1.167	L1	VH-VL	弱い	
18269	18668	H1.168	L1	VH-VL	弱い	
18270	18669	H1.169	L1	VH-VL	7.90E-06	
18271	18670	H1.170	L1	VH-VL	弱い	
18272	18671	H1.171	L1	VH-VL	弱い	
18273	18672	H1.172	L1	VH-VL	弱い	
18274	18673	H1.173	L1	VH-VL	弱い	
18275	18674	H1.174	L1	VH-VL	弱い	
18276	18675	H1.175	L1	VH-VL	弱い	

10

20

【図 2 3 E】

完全共in A b	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 A b K _D (nM)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18277	18676	H1.176	L1	VH-VL	1.32E-07	56.0
18278	18677	H1.177	L1	VH-VL	弱い	
18279	18678	H1.178	L1	VH-VL	弱い	
18280	18679	H1.179	L1	VH-VL	3.40E-07	
18281	18680	H1.180	L1	VH-VL	弱い	
18282	18681	H1.181	L1	VH-VL	弱い	
18283	18682	H1.182	L1	VH-VL	弱い	
18284	18683	H1.183	L1	VH-VL	弱い	
18285	18684	H1.184	L1	VH-VL	弱い	
18286	18685	H1.185	L1	VH-VL	弱い	
18287	18686	H1.186	L1	VH-VL	弱い	
18288	18687	H1.187	L1	VH-VL	弱い	
18289	18688	H1.188	L1	VH-VL	1.61E-07	56.5
18290	18689	H1.189	L1	VH-VL	弱い	
18291	18690	H1.190	L1	VH-VL	弱い	
18292	18691	H1.191	L1	VH-VL	弱い	
18293	18692	H1.192	L1	VH-VL	弱い	
18294	18693	H1.193	L1	VH-VL	弱い	
18295	18694	H1.194	L1	VH-VL	弱い	
18296	18695	H1.195	L1	VH-VL	5.81E-07	
18301	18696	H1.196	L1	VH-VL	弱い	
18302	18701	H1.197	L1	VH-VL	6.15E-07	
18303	18702	H1.198	L1	VH-VL	弱い	
18304	18703	H1.199	L1	VH-VL	弱い	
18305	18704	H1.200	L1	VH-VL	1.77E-07	
18306	18705	H1.201	L1	VH-VL	弱い	
18307	18706	H1.202	L1	VH-VL	弱い	
18308	18707	H1.203	L1	VH-VL	3.95E-07	
18309	18708	H1.204	L1	VH-VL	弱い	
18310	18709	H1.205	L1	VH-VL	弱い	
18311	18710	H1.206	L1	VH-VL	弱い	
18312	18711	H1.207	L1	VH-VL	弱い	
18313	18712	H1.208	L1	VH-VL	弱い	
18314	18713	H1.209	L1	VH-VL	弱い	
18315	18714	H1.210	L1	VH-VL	弱い	
18316	18715	H1.211	L1	VH-VL	1.40E-07	58.5
18317	18716	H1.212	L1	VH-VL	1.24E-07	
18318	18717	H1.213	L1	VH-VL	弱い	
18319	18718	H1.214	L1	VH-VL	弱い	
18320	18719	H1.215	L1	VH-VL	弱い	
18321	18720	H1.216	L1	VH-VL	弱い	
18322	18721	H1.217	L1	VH-VL	弱い	
18323	18722	H1.218	L1	VH-VL	弱い	
18324	18723	H1.219	L1	VH-VL	弱い	

【図 2 3 F】

完全共in A b	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 A b K _D (nM)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18325	18724	H1.220	L1	VH-VL	弱い	
18326	18725	H1.221	L1	VH-VL	弱い	
18327	18726	H1.222	L1	VH-VL	弱い	
18328	18727	H1.223	L1	VH-VL	弱い	
18329	18728	H1.224	L1	VH-VL	弱い	
18330	18729	H1.225	L1	VH-VL	弱い	
18331	18730	H1.226	L1	VH-VL	弱い	
18332	18731	H1.227	L1	VH-VL	弱い	
18333	18732	H1.228	L1	VH-VL	弱い	
18334	18733	H1.229	L1	VH-VL	弱い	
18335	18734	H1.230	L1	VH-VL	弱い	
18336	18735	H1.231	L1	VH-VL	弱い	
18337	18736	H1.232	L1	VH-VL	弱い	
18338	18737	H1.233	L1	VH-VL	弱い	
18339	18738	H1.234	L1	VH-VL	弱い	
18340	18739	H1.235	L1	VH-VL	弱い	
18341	18740	H1.236	L1	VH-VL	弱い	
18342	18741	H1.237	L1	VH-VL	1.95E-07	
18343	18742	H1.238	L1	VH-VL	1.16E-07	57.0
18344	18743	H1	L1.1	VH-VL	1.11E-07	56.5
18345	18744	H1	L1.2	VH-VL	1.20E-07	54.5
18346	18745	H1	L1.3	VH-VL	1.07E-07	55.0
18347	18746	H1	L1.4	VH-VL	8.73E-08	57.0
18348	18747	H1	L1.5	VH-VL	1.02E-07	56.5
18349	18748	H1	L1.6	VH-VL	1.12E-07	57.0
18350	18749	H1	L1.7	VH-VL	1.40E-07	55.5
18351	18750	H1	L1.8	VH-VL	1.40E-07	56.0
18352	18751	H1	L1.9	VH-VL	1.24E-07	57.0
18353	18752	H1	L1.10	VH-VL	1.44E-07	54.5
18354	18753	H1	L1.11	VH-VL	1.46E-07	56.0
18355	18754	H1	L1.12	VH-VL	1.39E-07	58.0
18356	18755	H1	L1.13	VH-VL	1.46E-07	
18357	18756	H1	L1.14	VH-VL	9.95E-08	57.5
18358	18757	H1	L1.15	VH-VL	1.21E-07	56.5
18359	18758	H1	L1.16	VH-VL	2.86E-07	
18360	18759	H1	L1.17	VH-VL	1.13E-07	54.5
18361	18760	H1	L1.18	VH-VL	2.71E-07	
18362	18761	H1	L1.19	VH-VL	2.84E-07	
18363	18762	H1	L1.20	VH-VL	1.75E-07	
18364	18763	H1	L1.21	VH-VL	1.22E-07	58.0
18365	18764	H1	L1.22	VH-VL	3.33E-07	
18366	18765	H1	L1.23	VH-VL	8.20E-08	59.0
18367	18766	H1	L1.24	VH-VL	4.46E-07	
18368	18767	H1	L1.25	VH-VL	4.09E-07	

30

40

【図 2 3 G】

完全系mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18369	18768	H1	L1.26	VH-VL	弱い	
18370	18769	H1	L1.27	VH-VL	3.73E-07	
18371	18770	H1	L1.28	VH-VL	1.22E-07	
18372	18771	H1	L1.29	VH-VL	弱い	
18373	18772	H1	L1.30	VH-VL	弱い	
18374	18773	H1	L1.31	VH-VL	弱い	
18375	18774	H1	L1.32	VH-VL	7.36E-07	
18376	18775	H1	L1.33	VH-VL	弱い	
18377	18776	H1	L1.34	VH-VL	1.45E-06	
18378	18777	H1	L1.35	VH-VL	4.28E-07	
18379	18778	H1	L1.36	VH-VL	弱い	
18380	18779	H1	L1.37	VH-VL	弱い	
18381	18780	H1	L1.38	VH-VL	弱い	
18382	18781	H1	L1.39	VH-VL	5.45E-07	
18383	18782	H1	L1.40	VH-VL	弱い	
18384	18783	H1	L1.41	VH-VL	弱い	
18385	18784	H1	L1.42	VH-VL	弱い	
18386	18785	H1	L1.43	VH-VL	弱い	
18387	18786	H1	L1.44	VH-VL	弱い	
18388	18787	H1	L1.45	VH-VL	弱い	
18389	18788	H1	L1.46	VH-VL	2.19E-07	
18390	18789	H1	L1.47	VH-VL	1.06E-07	55.0
18391	18790	H1	L1.48	VH-VL	1.35E-07	
18392	18791	H1	L1.49	VH-VL	1.49E-07	
18393	18792	H1	L1.50	VH-VL	1.17E-07	57.0
18394	18793	H1	L1.51	VH-VL	1.09E-07	55.5
18395	18794	H1	L1.52	VH-VL	9.28E-08	54.0
18396	18795	H1	L1.53	VH-VL	1.46E-07	
18401	18796	H1	L1.54	VH-VL	4.49E-07	
18402	18801	H1	L1.55	VH-VL	弱い	
18403	18802	H1	L1.56	VH-VL	弱い	
18404	18803	H1	L1.57	VH-VL	弱い	
18405	18804	H1	L1.58	VH-VL	弱い	
18406	18805	H1	L1.59	VH-VL	弱い	
18407	18806	H1	L1.60	VH-VL	弱い	
18408	18807	H1	L1.61	VH-VL	弱い	
18409	18808	H1	L1.62	VH-VL	弱い	
18410	18809	H1	L1.63	VH-VL	弱い	
18411	18810	H1	L1.64	VH-VL	1.79E-07	
18412	18811	H1	L1.65	VH-VL	2.91E-07	
18413	18812	H1	L1.66	VH-VL	3.29E-07	
18414	18813	H1	L1.67	VH-VL	1.46E-07	54.0
18415	18814	H1	L1.68	VH-VL	1.60E-07	
18416	18815	H1	L1.69	VH-VL	弱い	

【図 2 3 H】

完全系mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18417	18816	H1	L1.70	VH-VL	1.34E-07	
18418	18817	H1	L1.71	VH-VL	3.71E-07	
18419	18818	H1	L1.72	VH-VL	6.40E-07	
18420	18819	H1	L1.73	VH-VL	1.52E-07	
18421	18820	H1	L1.74	VH-VL	1.75E-07	
18422	18821	H1	L1.75	VH-VL	1.78E-07	
18423	18822	H1	L1.76	VH-VL	1.33E-07	56.5
18424	18823	H1	L1.77	VH-VL	3.78E-07	
18425	18824	H1	L1.78	VH-VL	弱い	
18426	18825	H1	L1.79	VH-VL	弱い	
18427	18826	H1	L1.80	VH-VL	弱い	
18428	18827	H1	L1.81	VH-VL	2.54E-07	
18429	18828	H1	L1.82	VH-VL	7.67E-08	
18430	18829	H1	L1.83	VH-VL	1.07E-05	
18431	18830	H1	L1.84	VH-VL	5.39E-07	
18432	18831	H1	L1.85	VH-VL	1.56E-07	
18433	18832	H1	L1.86	VH-VL	1.24E-07	55.5
18434	18833	H1	L1.87	VH-VL	2.51E-07	
18435	18834	H1	L1.88	VH-VL	1.40E-07	56.0
18436	18835	H1	L1.89	VH-VL	6.50E-07	
18437	18836	H1	L1.90	VH-VL	1.22E-06	
18438	18837	H1	L1.91	VH-VL	1.79E-07	
18439	18838	H1	L1.92	VH-VL	4.04E-07	
18440	18839	H1	L1.93	VH-VL	7.76E-07	
18441	18840	H1	L1.94	VH-VL	8.48E-08	53.0
18442	18841	H1	L1.95	VH-VL	1.23E-07	54.5
18443	18842	H1	L1.96	VH-VL	1.30E-07	55.5
18444	18843	H1	L1.97	VH-VL	1.06E-07	56.5
18445	18844	H1	L1.98	VH-VL	1.84E-07	
18446	18845	H1	L1.99	VH-VL	1.48E-06	
18447	18846	H1	L1.100	VH-VL	9.17E-08	55.5
18448	18847	H1	L1.101	VH-VL	1.35E-07	
18449	18848	H1	L1.102	VH-VL	1.06E-07	55.0
18450	18849	H1	L1.103	VH-VL	9.46E-08	60.0
18451	18850	H1	L1.104	VH-VL	1.08E-07	57.0
18452	18851	H1	L1.105	VH-VL	1.02E-07	55.0
18453	18852	H1	L1.106	VH-VL	1.01E-07	57.5
18454	18853	H1	L1.107	VH-VL	弱い	
18455	18854	H1	L1.108	VH-VL	弱い	
18456	18855	H1	L1.109	VH-VL	弱い	
18457	18856	H1	L1.110	VH-VL	弱い	
18458	18857	H1	L1.111	VH-VL	弱い	
18459	18858	H1	L1.112	VH-VL	1.92E-07	
18460	18859	H1	L1.113	VH-VL	弱い	

10

20

【図 2 3 I】

完全系mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18461	18860	H1	L1.114	VH-VL	2.87E-07	
18462	18861	H1	L1.115	VH-VL	弱い	
18463	18862	H1	L1.116	VH-VL	5.60E-08	55.5
18464	18863	H1	L1.117	VH-VL	1.58E-07	58.0
18465	18864	H1	L1.118	VH-VL	7.90E-08	51.00, 58.00
18466	18865	H1	L1.119	VH-VL	4.88E-08	54.0
18467	18866	H1	L1.120	VH-VL	7.74E-08	50.50, 57.00
18468	18867	H1	L1.121	VH-VL	1.08E-07	54.5
18469	18868	H1	L1.122	VH-VL	9.36E-08	51.0
18470	18869	H1	L1.123	VH-VL	1.32E-07	49.00, 59.00
18471	18870	H1	L1.124	VH-VL	8.70E-08	53.5
18472	18871	H1	L1.125	VH-VL	1.06E-07	53.0
18473	18872	H1	L1.126	VH-VL	7.34E-08	51.0
18474	18873	H1	L1.127	VH-VL	1.10E-07	55.5
18475	18874	H1	L1.128	VH-VL	1.07E-07	57.0
18476	18875	H1	L1.129	VH-VL	1.00E-07	57.0
18477	18876	H1	L1.130	VH-VL	1.18E-07	54.5
18478	18877	H1	L1.131	VH-VL	1.96E-07	55.5
18479	18878	H1	L1.132	VH-VL	1.51E-07	55.0
18480	18879	H1	L1.133	VH-VL	1.32E-07	54.0
18481	18880	H1	L1.134	VH-VL	1.97E-07	57.0
18482	18881	H1	L1.135	VH-VL	1.56E-07	54.5
18483	18882	H1	L1.136	VH-VL	2.41E-07	56.5
18484	18883	H1	L1.137	VH-VL	1.87E-07	56.0
18485	18884	H1	L1.138	VH-VL	2.05E-07	56.0
18486	18885	H1	L1.139	VH-VL	1.76E-07	54.0
18487	18886	H1	L1.140	VH-VL	2.52E-07	
18488	18887	H1	L1.141	VH-VL	2.05E-07	57.0
18489	18888	H1	L1.142	VH-VL	1.09E-07	54.0
18490	18889	H1	L1.143	VH-VL	2.36E-07	
18491	18890	H1	L1.144	VH-VL	1.83E-07	57.0
18492	18891	H1	L1.145	VH-VL	1.63E-07	54.0
18892	18895	H0	L0	VH-VL	1.24E-07	62.0
該当なし	18896 (s c F v)	H1	L1	VL-VH		58.5
該当なし	18921	H1	L3	VH-VL		55.0
該当なし	18922	H1	L4	VH-VL		57.0
該当なし	18923	H1	L5	VH-VL		60.0
該当なし	18924	H2	L1	VH-VL		
該当なし	18925	H2	L2	VH-VL		
該当なし	18926	H2	L3	VH-VL		
該当なし	18927	H2	L4	VH-VL		
該当なし	18928	H2	L5	VH-VL		
該当なし	18929	H3	L1	VH-VL		
該当なし	18930	H3	L2	VH-VL		

【図 2 3 J】

完全系mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒト P D-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
18931	18931	H3	L3	VH-VL		
18932	18932	H3	L4	VH-VL		
18933	18933	H3	L5	VH-VL		
18934	18934	H4	L1	VH-VL		
18935	18935	H4	L2	VH-VL		
18936	18936	H4	L3	VH-VL		
18937	18937	H4	L4	VH-VL		
18938	18938	H4	L5	VH-VL		
18910	該当なし	H1.90	L1.119	VH-VL	1.254E-08	
18911	該当なし	H1.90	L1.23	VH-VL	2.278E-08	
18912	該当なし	H1.90	L1.67	VH-VL	3.224E-08	
18913	該当なし	H1.90	L1.94	VH-VL	2.27E-08	
18914	該当なし	H1.90	L1.116	VH-VL	1.634E-08	
18915	該当なし	H1.155	L1.119	VH-VL	1.971E-08	
18980	19064	H1.239	L1	VH-VL		56.5
18981	19065	H1.240	L1	VH-VL		56.5
18982	19066	H1.241	L1	VH-VL		57.0
18983	19067	H1.242	L1	VH-VL		56.5
18984	19068	H1.243	L1	VH-VL		55.0
18985	19069	H1.244	L1	VH-VL		55.5
18986	19070	H1.245	L1	VH-VL		56.0
18987	19071	H1.246	L1	VH-VL		54.0
18988	19072	H1.247	L1	VH-VL		56.5
18989	19073	H1.248	L1	VH-VL		55.0
18990	19074	H1.249	L1	VH-VL		54.0
18991	19075	H1.250	L1	VH-VL		56.0
18992	19076	H1.251	L1	VH-VL	6.054E-08	57.0
18993	19077	H1.252	L1	VH-VL		56.5
18994	19078	H1.253	L1	VH-VL		55.0
18995	19079	H1.254	L1	VH-VL		56.5
18996	19080	H1.255	L1	VH-VL		
19001	19081	H1.256	L1	VH-VL		56.0
19002	19082	H1.257	L1	VH-VL	5.607E-08	58.0
19003	19083	H1.258	L1	VH-VL		56.0
19004	19084	H1.259	L1	VH-VL		
19005	19085	H1.260	L1	VH-VL		
19006	19086	H1.261	L1	VH-VL	7.064E-08	57.0
19007	19087	H1.262	L1	VH-VL	6.263E-08	57.0
19008	19088	H1.263	L1	VH-VL		50.0
19009	19089	H1.264	L1	VH-VL		52.0
19010	19090	H1.265	L1	VH-VL		56.0
19011	19091	H1.266	L1	VH-VL		55.0
19012	19092	H1.267	L1	VH-VL		
19013	19093	H1.268	L1	VH-VL		56.5

30

40

50

【図 2 3 K】

完全長mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
19014	19094	H1.269	L1	VH-VL		54.5
19015	19095	H1.270	L1	VH-VL		52.0
19016	19096	H1.271	L1	VH-VL	2.267E-08	55.5
19017	19101	H1.272	L1	VH-VL		55.5
19018	19102	H1.273	L1	VH-VL		52.0
19019	19103	H1.274	L1	VH-VL		56.5
19020	19104	H1.275	L1	VH-VL		50.0
19021	19105	H1.276	L1	VH-VL		
19022	19106	H1.277	L1	VH-VL		58.0
19023	19107	H1	L1.146	VH-VL	6.46E-08	57.0
19024	19108	H1	L1.147	VH-VL		54.5
19025	19109	H1	L1.148	VH-VL	6.665E-08	58.0
19026	19110	H1	L1.149	VH-VL		55.5
19027	19111	H1	L1.150	VH-VL	7.238E-08	57.5
19028	19112	H1	L1.151	VH-VL		
19029	19113	H1	L1.152	VH-VL		56.0
19030	19114	H1	L1.153	VH-VL		55.0
19031	19115	H1	L1.154	VH-VL		54.5
19032	19116	H1	L1.155	VH-VL		55.5
19033	19117	H1	L1.156	VH-VL		56.5
19034	19118	H1	L1.157	VH-VL		56.0
19035	19119	H1	L1.158	VH-VL	9.671E-08	58.0
19036	19120	H1	L1.159	VH-VL		52.0
19037	19121	H1	L1.160	VH-VL		
19038	19122	H1	L1.161	VH-VL		47.5
19039	19123	H1	L1.162	VH-VL		
19040	19124	H1	L1.163	VH-VL		55.5
19041	19125	H1	L1.164	VH-VL		56.0
19042	19126	H1	L1.165	VH-VL		58.5
19043	19127	H1	L1.166	VH-VL		49.0
19044	19128	H1	L1.167	VH-VL		53.0
19045	19129	H1	L1.168	VH-VL		54.0
19046	19130	H1	L1.169	VH-VL		67.0
19047	19131	H1	L1.170	VH-VL		65.5
19048	19132	H1	L1.171	VH-VL		51.5
19049	19133	H1	L1.172	VH-VL		53.0
19050	19134	H1	L1.173	VH-VL		54.5
19051	19135	H1	L1.174	VH-VL		53.5
19052	19136	H1	L1.175	VH-VL		54.0
19053	19137	H1	L1.176	VH-VL		54.0
19054	19138	H1	L1.177	VH-VL		56.0
19055	19139	H1	L1.178	VH-VL		52.5
19056	19140	H1	L1.179	VH-VL		
19057	19141	H1	L1.180	VH-VL		

【図 2 3 L】

完全長mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 mAb	scFv
XENP	XENP				A b K _D (M)	T _m (°C)
19058	19142	H1	L1.181	VH-VL		
19059	19143	H1	L1.182	VH-VL		52.0
19060	19144	H1	L1.183	VH-VL		53.5
19061	19145	H1	L1.184	VH-VL		
19062	19146	H1	L1.185	VH-VL		55.5
19063	19147	H1	L1.186	VH-VL		54.0
該当なし	19148	H1.257	L1.152	VH-VL		57.5
該当なし	19149	H1.257	L1.151	VH-VL		55.5
該当なし	19150	H1.139	L1.134	VH-VL		57.5
該当なし	19151	H1.48	L1.187	VH-VL		53.5
該当なし	19152	H1.48	L1.151	VH-VL		52.5
該当なし	19153	H1.43	L1.159	VH-VL		50.0
該当なし	19154	H1.90	L1.119	VH-VL		53.0
該当なし	19155	H1.90	L1.23	VH-VL		57.5
該当なし	19156	H1.90	L1.67	VH-VL		53.0
該当なし	19157	H1.90	L1.94	VH-VL		52.0
該当なし	19158	H1.90	L1.116	VH-VL		54.5
該当なし	19159	H1.155	L1.119	VH-VL		54.5
19160	該当なし	H1.269	L1.116	VH-VL		
19161	該当なし	H1.271	L1.116	VH-VL	1.233E-08	
19162	該当なし	H1.272	L1.116	VH-VL		
19163	該当なし	H1.90	L1.177	VH-VL		
19164	該当なし	H1.269	L1.177	VH-VL		
19165	該当なし	H1.271	L1.177	VH-VL	4.682E-09	
19166	該当なし	H1.272	L1.177	VH-VL	6.386E-09	
19167	該当なし	H1.90	L1.175	VH-VL		
19168	該当なし	H1.269	L1.175	VH-VL		
19169	該当なし	H1.271	L1.175	VH-VL		
19170	該当なし	H1.272	L1.175	VH-VL		
19172	19182	H1	L1.190	VH-VL	2.577E-08	58.5
19173	19183	H1	L1.191	VH-VL		57.0
19174	該当なし	H1.90	L1.190	VH-VL	1.103E-08	
19175	該当なし	H1.90	L1.191	VH-VL		
19176	該当なし	H1.269	L1.190	VH-VL		
19177	該当なし	H1.271	L1.190	VH-VL	8.287E-09	
19178	該当なし	H1.272	L1.190	VH-VL	7.09E-09	
19179	該当なし	H1.269	L1.191	VH-VL		
19180	該当なし	H1.271	L1.191	VH-VL		
19181	該当なし	H1.272	L1.191	VH-VL		
19193	19203	H1	L1.188	VH-VL	2.596E-08	
19194	19204	H1	L1.189	VH-VL	1.366E-08	64.0
19195	19205	H1.278	L1.188	VH-VL	6.689E-09	66.0
19196	19206	H1.278	L1.189	VH-VL	4.683E-09	67.5
19201	19202	H1.278	L1	VH-VL	1.861E-08	60.0

10

20

【図 2 3 M】

完全長mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
該当なし	19207	H1.278	L1.188	VH-VL		68.0
該当なし	19208	H1.278	L1.189	VH-VL		69.5
19589	19618	H1.279	L1.189	VH-VL	1.254E-08	68.5
19590	19619	H1.280	L1.189	VH-VL	5.393E-09	69.0
19591	19620	H1.281	L1.189	VH-VL		68.0
19592	19621	H1.282	L1.189	VH-VL	1.291E-08	68.5
19593	19622	H1.283	L1.189	VH-VL	7.859E-09	69.0
19594	19623	H1.284	L1.189	VH-VL		70.5
19595	19624	H1.285	L1.189	VH-VL		70.0
19596	19625	H1.286	L1.189	VH-VL	1.41E-08	69.5
19601	19626	H1.278	L1.192	VH-VL	6.268E-09	67.5
19602	19627	H1.278	L1.193	VH-VL	1.37E-08	69.5
19603	19628	H1.278	L1.194	VH-VL	7.5E-09	69.0
19604	19629	H1.278	L1.195	VH-VL		69.5
19605	19630	H1.278	L1.196	VH-VL	4.443E-08	71.0
19606	19631	H1.278	L1.197	VH-VL	2.079E-08	69.5
19607	19632	H1.278	L1.198	VH-VL		67.5
19608	19633	H1.278	L1.199	VH-VL		67.5
19609	19634	H1.278	L1.200	VH-VL		67.5
19610	19635	H1.278	L1.201	VH-VL		67.5
19611	19636	H1.278	L1.202	VH-VL		67.5
19612	19637	H1.278	L1.203	VH-VL		67.5
19613	19638	H1.278	L1.204	VH-VL		67.0
19614	19639	H1.278	L1.205	VH-VL	1.266E-08	68.0
19615	19640	H1.278	L1.206	VH-VL		69.0
19616	19641	H1.278	L1.207	VH-VL		68.5
19617	19642	H1.278	L1.208	VH-VL		68.5
該当なし	19643	H1.279	L1.189	VL-VH		71.5
該当なし	19644	H1.280	L1.189	VL-VH		70.5
該当なし	19645	H1.281	L1.189	VL-VH		69.5
該当なし	19646	H1.282	L1.189	VL-VH		70.0
該当なし	19647	H1.283	L1.189	VL-VH		70.5
該当なし	19648	H1.284	L1.189	VL-VH		70.5
該当なし	19649	H1.285	L1.189	VL-VH		71.5
該当なし	19650	H1.278	L1.192	VL-VH		69.0
該当なし	19651	H1.278	L1.193	VL-VH		71.5
該当なし	19652	H1.278	L1.194	VL-VH		71.5
該当なし	19653	H1.278	L1.195	VL-VH		71.5
該当なし	19654	H1.278	L1.196	VL-VH		64.0
該当なし	19655	H1.278	L1.197	VL-VH		72.0
該当なし	19664	H1.287	L1.209	VH-VL		70.5
該当なし	19665	H1.287	L1.209	VL-VH		72.0
該当なし	19666	H1.284	L1.194	VH-VL		70.5
該当なし	19667	H1.284	L1.194	VL-VH		72.5

【図 2 3 N】

完全長mAb	scFv	VH	VL	s c F v 配向	ヒトPD-1 mAb K _D (M)	scFv T _m (°C)
XENP	XENP					
該当なし	19668	H1.288	L1.210	VH-VL		72.5
該当なし	19669	H1.288	L1.210	VL-VH		72.0
19678	19678	H1.279	L1.192	VH-VL		
19679	19679	H1.280	L1.192	VH-VL		
19680	19680	H1.281	L1.192	VH-VL		
19681	19681	H1.282	L1.192	VH-VL		
19682	19682	H1.279	L1.193	VH-VL		
19683	19683	H1.280	L1.193	VH-VL		
19684	19684	H1.281	L1.193	VH-VL		
19685	19685	H1.282	L1.193	VH-VL		
19686	19690	H1.279	L1.194	VH-VL	7.268E-09	70.0
19687	19687	H1.280	L1.194	VH-VL		
19688	19688	H1.281	L1.194	VH-VL		
19689	19691	H1.282	L1.194	VH-VL	1.212E-08	70.5
19692	19692	H1.279	L1.194	VL-VH		71.5
19693	19693	H1.282	L1.194	VL-VH		71.5
21215	21215	H1.280	L1.224	VH-VL		65.0
21216	21216	H1.280	L1.224	VL-VH		66.5

30

40

50

【図 2 4 A】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9-mers	Δ VH 9-mers	VL 9-mers	Δ VL 9-mers
19950	19533	H0	L0	5.61E-09	3.29E-08	75.8	63.9	65	0	82	0
19211	19745	H0.1	L0	6.33E-09	n.t.	75.5	64	65	0	82	0
19212	19746	H0.2	L0	6.60E-09	n.t.	74.8	63	61	-4	82	0
19213	19747	H0.3	L0	6.39E-09	n.t.	75	63.5	65	0	82	0
19214	19748	H0.4	L0	6.49E-09	n.t.	71.5	58	56	-9	82	0
19215	19749	H0.5	L0	1.09E-08	n.t.	74.5	n.t.	52	-13	82	0
19216	19750	H0.6	L0	6.60E-09	n.t.	76	63.5	56	-9	82	0
19217	19751	H0.7	L0	1.55E-08	n.t.	75.5	n.t.	56	-9	82	0
19218	19752	H0.8	L0	6.94E-09	n.t.	78	66	65	0	82	0
19219	19753	H0.9	L0	6.20E-09	n.t.	75.5	65.5	56	-9	82	0
19220	19754	H0.10	L0	3.25E-08	n.t.	n.t.	n.t.	59	-6	82	0
19221	19755	H0.11	L0	4.12E-08	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	92	0
19222	19756	H0.12	L0	1.06E-08	n.t.	76	64.5	63	-2	82	0
19223	19757	H0.13	L0	7.05E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19224	19758	H0.14	L0	4.24E-08	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19225	19759	H0.15	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19226	19760	H0.16	L0	1.29E-08	n.t.	76.5	66	63	-2	82	0
19227	19761	H0.17	L0	6.59E-09	n.t.	n.t.	n.t.	63	-2	82	0
19228	19762	H0.18	L0	6.30E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19229	19763	H0.19	L0	7.02E-09	n.t.	74	61.5	64	-1	82	0
19230	19764	H0.20	L0	1.19E-08	n.t.	75.5	n.t.	64	-1	82	0
19231	19765	H0.21	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19232	19766	H0.22	L0	4.09E-08	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19233	19767	H0.23	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19234	19768	H0.24	L0	1.13E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19235	19769	H0.25	L0	5.97E-08	n.t.	n.t.	n.t.	74	9	82	0
19236	19770	H0.26	L0	5.70E-08	n.t.	n.t.	n.t.	74	9	82	0
19237	19771	H0.27	L0	6.54E-08	n.t.	n.t.	n.t.	68	3	82	0
19238	19772	H0.28	L0	4.33E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19239	19773	H0.29	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	68	3	82	0
19240	19774	H0.30	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19241	19775	H0.31	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	63	-2	82	0
19242	19776	H0.32	L0	2.87E-08	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19243	19777	H0.33	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19244	19778	H0.34	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	63	-2	82	0
19245	19779	H0.35	L0	2.31E-08	n.t.	n.t.	n.t.	63	-2	82	0
19246	19780	H0.36	L0	4.92E-09	n.t.	74	62.5	61	-4	82	0
19247	19781	H0.37	L0	5.53E-08	n.t.	n.t.	n.t.	60	-5	82	0
19248	19782	H0.38	L0	3.63E-08	n.t.	n.t.	n.t.	66	1	82	0
19249	19783	H0.39	L0	2.64E-06	n.t.	n.t.	n.t.	68	3	82	0
19250	19784	H0.40	L0	2.80E-09	n.t.	61.5	66.5	66	1	82	0
19251	19785	H0.41	L0	1.55E-08	n.t.	63	n.t.	65	0	82	0
19252	19786	H0.42	L0	4.68E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19253	19787	H0.43	L0	4.42E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19254	19788	H0.44	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19255	19789	H0.45	L0	1.40E-08	n.t.	71	n.t.	65	0	82	0
19256	19790	H0.46	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19257	19791	H0.47	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19258	19792	H0.48	L0	5.01E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0

【図 2 4 B】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9-mers	Δ VH 9-mers	VL 9-mers	Δ VL 9-mers
19259	19793	H0.49	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19260	19794	H0.50	L0	1.41E-09	n.t.	n.t.	n.t.	66.5	65	0	82
19261	19795	H0.51	L0	8.43E-09	n.t.	n.t.	n.t.	57.5	65	0	82
19262	19796	H0.52	L0	1.13E-08	3.69E-08	74.5	n.t.	66	0	82	0
19263	19801	H0.53	L0	1.27E-08	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19264	19802	H0.54	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19265	19803	H0.55	L0	3.43E-08	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19266	19804	H0.56	L0	5.95E-08	n.t.	n.t.	n.t.	66	0	82	0
19267	19805	H0.57	L0	9.15E-09	n.t.	62.5	62	65	0	82	0
19268	19806	H0.58	L0	3.93E-09	n.t.	58.5	59	65	0	82	0
19269	19807	H0.59	L0	1.91E-09	n.t.	73	60	65	0	82	0
19270	19808	H0.60	L0	7.46E-09	n.t.	63.5	59.5	65	0	82	0
19271	19809	H0.61	L0	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19272	19810	H0.62	L0	5.48E-08	n.t.	n.t.	n.t.	56	-9	82	0
19273	19811	H0.63	L0	3.66E-09	n.t.	58	59	65	0	82	0
19274	19812	H0.64	L0	2.04E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19275	19813	H0.65	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	56	-9	82	0
19276	19814	H0.66	L0	2.08E-08	n.t.	59.5	n.t.	65	0	82	0
19277	19815	H0.67	L0	1.10E-08	n.t.	58.5	n.t.	65	0	82	0
19278	19816	H0.68	L0	7.32E-09	n.t.	62	63.5	65	0	82	0
19279	19817	H0.69	L0	1.79E-08	n.t.	58	n.t.	65	0	82	0
19280	19818	H0.70	L0	1.42E-08	n.t.	56.5	n.t.	71	6	82	0
19281	19819	H0.71	L0	3.00E-08	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19282	19820	H0.72	L0	5.00E-07	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19283	19821	H0.73	L0	2.07E-09	n.t.	76	64.5	64	-1	82	0
19284	19822	H0.74	L0	1.24E-08	n.t.	59	n.t.	64	-1	82	0
19285	19823	H0.75	L0	3.55E-09	n.t.	76	65	64	-1	82	0
19286	19824	H0.76	L0	1.05E-08	n.t.	78.5	65	64	-1	82	0
19287	19825	H0.77	L0	3.42E-08	n.t.	n.t.	n.t.	64	-1	82	0
19288	19826	H0.78	L0	2.10E-08	n.t.	75.5	n.t.	64	-1	82	0
19289	19827	H0.79	L0	3.79E-08	n.t.	n.t.	n.t.	62	-3	82	0
19290	19828	H0.80	L0	1.24E-08	n.t.	75.5	n.t.	62	-3	82	0
19291	19829	H0.81	L0	5.65E-09	n.t.	74.5	63	59	-6	82	0
19292	19830	H0.82	L0	5.13E-09	n.t.	73.5	62.5	59	-9	82	0
19293	19831	H0.83	L0	5.33E-09	n.t.	72.5	61.5	59	-9	82	0
19294	19832	H0.84	L0	7.94E-09	n.t.	67.5	n.t.	59	-9	82	0
19295	19833	H0.85	L0	2.10E-09	n.t.	70	55.5	59	-9	82	0
19296	19834	H0.86	L0	6.78E-09	n.t.	75.8	65	59	-9	82	0
19301	19835	H0.87	L0	5.15E-08	n.t.	n.t.	n.t.	59	-9	82	0
19302	19836	H0.88	L0	9.63E-09	n.t.	73.5	n.t.	58	-7	82	0
19303	19837	H0.89	L0	2.12E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19304	19838	H0.90	L0	7.82E-09	n.t.	75.5	55.5	65	0	82	0
19305	19839	H0.91	L0	6.11E-09	n.t.	75.5	n.t.	61	-4	82	0
19306	19840	H0.92	L0	5.72E-09	n.t.	73.5	61	65	0	82	0
19307	19841	H0.93	L0	5.13E-09	n.t.	74.5	63.5	56	-9	82	0
19308	19842	H0.94	L0	5.90E-09	n.t.	75.5	64	56	-9	82	0
19309	19843	H0.95	L0	1.02E-08	n.t.	76	64	56	-9	82	0
19310	19844	H0.96	L0	1.53E-08	n.t.	77	65.5	57	-8	82	0
19311	19845	H0.97	L0	6.30E-09	3.17E-08	76	64	65	0	82	0

【図 2 4 C】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9-mers	Δ VH 9-mers	VL 9-mers	Δ VL 9-mers
19312	19846	H0.98	L0	7.36E-09	3.38E-08	74.5	61.5	70	5	82	0
19313	19847	H0.99	L0	7.01E-09	3.53E-08	76	63.5	71	6	82	0
19314	19848	H0.100	L0	1.10E-08	3.14E-08	75.5	n.t.	65	0	82	0
19315	19849	H0.101	L0	1.10E-08	5.00E-07	72	n.t.	65	0	82	0
19316	19850	H0.102	L0	2.46E-08	5.00E-07	79	n.t.	65	0	82	0
19317	19851	H0.103	L0	1.02E-08	3.68E-08	77.5	55.5	69	0	82	0
19318	19852	H0.104	L0	5.00E-07	5.00E-07	72.5	n.t.	65	0	82	0
19319	19853	H0.105	L0	5.00E-07	5.00E-07	78.5	n.t.	65	0	82	0
19320	19854	H0.106	L0	2.37E-08	5.00E-07	74	n.t.	65	0	82	0
19321	19855	H0.107	L0	5.00E-07	5.00E-07	70	n.t.	65	0	82	0
19322	19856	H0.108	L0	1.67E-08	2.17E-08	76.5	64.5	65	0	82	0
19323	19857	H0.109	L0	1.51E-08	4.39E-08	77	65	65	0	82	0
19324	19858	H0.110	L0	5.00E-07	5.00E-07	76.5	n.t.	65	0	82	0
19325	19859	H0.111	L0	6.52E-09	3.30E-08	75	64	65	0	82	0
19326	19860	H0.112	L0	5.00E-07	5.00E-07	77	n.t.	65	0	82	0
19327	19861	H0.113	L0	1.12E-08	3.64E-08	76.5	65	65	0	82	0
19328	19862	H0.114	L0	3.64E-09	2.28E-08	76.5	64.5	65	0	82	0
19329	19863	H0.115	L0	1.19E-08	4.10E-08	76	n.t.	65	0	82	0
19330	19864	H0.116	L0	3.45E-08	5.00E-07	76	n.t.	65	0	82	0

【図 2 4 E】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9- mers	Δ VH 9- mers	VL 9- mers	Δ VL 9- mers
19475	19948	H0	L0.80	6.52E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	76	-6
19476	19949	H0	L0.81	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19477	19950	H0	L0.82	2.39E-08	5.40E-08	n.t.	n.t.	65	0	79	-3
19478	19951	H0	L0.83	8.86E-09	5.13E-08	75	62.5	65	0	79	-3
19479	19952	H0	L0.84	2.95E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	79	-3
19480	19953	H0	L0.85	1.23E-08	4.90E-08	n.t.	n.t.	65	0	79	-3
19481	19954	H0	L0.86	1.55E-08	5.53E-08	n.t.	n.t.	65	0	79	-3
19482	19955	H0	L0.87	5.00E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19483	19956	H0	L0.88	6.96E-09	4.30E-08	75.5	63	65	0	80	-2
19484	19957	H0	L0.89	1.62E-08	4.75E-08	n.t.	n.t.	65	0	81	-1
19485	19958	H0	L0.70	6.58E-09	4.02E-08	76	64.5	65	0	82	0
19486	19959	H0	L0.71	8.41E-09	4.21E-08	76	64.5	65	0	82	0
19487	19960	H0	L0.72	9.76E-09	4.90E-08	75	63	65	0	82	0
19488	19961	H0	L0.73	4.75E-09	n.t.	76.5	65	65	0	91	9
19489	19962	H0	L0.74	9.11E-09	n.t.	76	64.5	65	0	82	0
19490	19963	H0	L0.75	3.53E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	81	-1
19491	19964	H0	L0.76	4.95E-08	n.t.	n.t.	n.t.	65	0	81	-1
19492	19965	H0	L0.77	6.83E-09	n.t.	76.5	65	65	0	81	-1
19493	19966	H0	L0.78	4.18E-09	n.t.	76.5	65	65	0	81	-1
19494	19967	H0	L0.79	5.13E-09	3.81E-08	76	64	65	0	81	-1
19495	19968	H0	L0.80	4.44E-09	2.91E-08	72.5	59.5	65	0	79	-3
19496	19969	H0	L0.81	6.03E-09	3.61E-08	75.5	64	65	0	78	-4
19501	19970	H0	L0.82	5.34E-09	3.25E-08	76	64	65	0	78	-4
19502	19971	H0	L0.83	5.18E-09	3.14E-08	75.5	63.5	65	0	81	-1
19503	19972	H0	L0.84	5.22E-09	3.20E-08	74	61.5	65	0	73	-9
19504	19973	H0	L0.85	4.90E-08	3.00E-08	76	64.5	65	0	80	-2
19505	19974	H0	L0.86	3.51E-09	2.65E-08	74.5	61.5	65	0	77	-5
19506	19975	H0	L0.87	7.35E-09	4.11E-08	75.5	63.5	65	0	82	0
19507	19976	H0	L0.88	6.08E-09	3.73E-08	n.t.	n.t.	65	0	82	0
19508	19977	H0	L0.89	6.40E-09	3.95E-08	75.5	64.5	65	0	73	-9
19509	19978	H0	L0.90	7.23E-09	3.74E-08	75.5	63	65	0	75	-7
19510	19979	H0	L0.91	4.69E-09	3.08E-08	75	62.5	65	0	74	-8
19511	19980	H0	L0.92	7.87E-09	4.24E-08	75	62.5	65	0	73	-9
19512	19981	H0	L0.93	7.70E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19513	19982	H0	L0.94	5.40E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19514	19983	H0	L0.95	1.71E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19515	19984	H0	L0.96	1.80E-09	1.08E-08	72.5	59.5	65	0	73	-9
19516	19985	H0	L0.97	8.41E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19517	19986	H0	L0.98	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19518	19987	H0	L0.99	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19519	19988	H0	L0.100	8.03E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19520	19989	H0	L0.101	1.84E-08	6.21E-08	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19521	19990	H0	L0.102	2.02E-09	2.20E-08	76	62	65	0	73	-9
19522	19991	H0	L0.103	7.90E-09	4.24E-08	75.5	65	65	0	73	-9
19523	19992	H0	L0.104	7.47E-08	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	75	-7
19524	19993	H0	L0.105	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	74	-8
19525	19994	H0	L0.106	2.33E-08	3.30E-08	n.t.	n.t.	65	0	77	-5
19526	19995	H0	L0.107	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	73	-9
19527	19996	H0	L0.108	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	80	-2

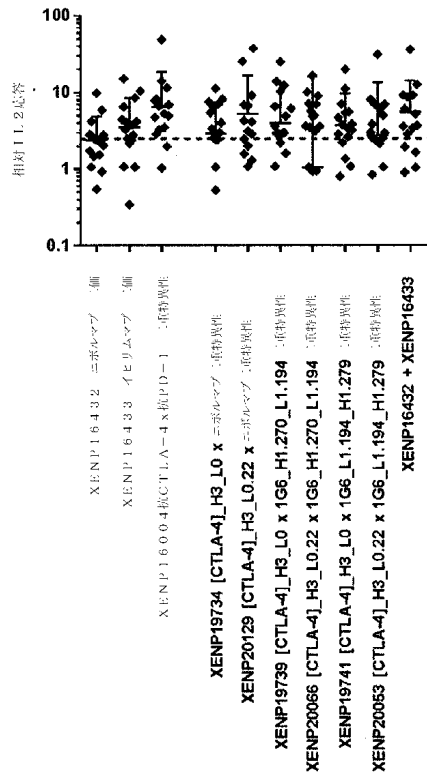
【図 2 4 F】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9- mers	Δ VH 9- mers	VL 9- mers	Δ VL 9- mers	
19528	20001	H0	L0.109	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	77	-6	
19529	20002	H0	L0.110	5.00E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	65	0	81	-1	
19530	20003	H0	L0.111	4.58E-09	1.68E-08	73.5	60.5	65	0	73	-9	
19531	20004	H0	L0.112	5.08E-09	2.93E-08	75.5	63.5	65	0	77	-5	
19532	20005	H0	L0.113	5.62E-09	4.48E-08	n.t.	n.t.	62	65	0	74	-8
	19534	H0.36	L0.50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	62	61	-4	73	-9
	19535	H0.36	L0.51	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	62	61	-4	75	-7
	19536	H0.37	L0.50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	59.5	60	-5	73	-9
	19537	H0.37	L0.113	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	63.5	60	-5	74	-8
	19538	H0.134	L0.51	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	64	62	-3	75	-7
20006	19539	H0.134	L0.53	5.02E-09	2.00E-08	75.5	65	62	-3	74	-8	
	19540	H0.134	L0.57	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	61	62	-3	75	-7
	19541	H0.137	L0.114	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	66	60	-6	74	-8
	19542	H0.138	L0.115	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	64	66	-6	73	-9
	19543	H0.139	L0.116	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	62.5	59	-6	73	-9
19585	19587	H0.140	L0	2.83E-09	1.78E-08	78.5	68	56	-9	82	0	
19586	19588	H0	L0.117	4.09E-09	2.52E-08	76.5	63.5	65	0	69	-13	
19544	19551	H1	L0	1.77E-08	2.51E-08	74.5	61.5	70	5	82	0	
19545	19552	H2	L0	1.10E-07	5.00E-07	n.t.	n.t.	69.5	69	4	82	0
19546	19553	H3	L0	2.87E-09	1.92E-08	78.3	66.9	72	7	82	0	
19547	19554	H4	L0	5.00E-07	5.00E-07	67.5	61.8	71	6	82	0	
19548	19555	H0	L1	7.42E-09	4.37E-08	73.5	59.8	65	0	81	-1	
19549	19556	H0	L2	3.15E-09	2.32E-08	75	61	65	0	81	-1	
19550	19550	H0	L0	5.61E-09	3.29E-08	75.8	63.5	65	0	82	0	
20007	H3	L1	3.35E-09	1.89E-08	75	n.t.	72	7	81	-1		
20008	H3	L2	1.41E-09	1.28E-08	77	n.t.	72	7	81	-1		
20009	H3	L0.12	2.46E-09	1.71E-08	79	n.t.	72	7	77	-5		
20010	H3	L0.18	2.17E-09	1.57E-08	77	n.t.	72	7	77	-5		
20011	H3	L0.22	4.13E-09	2.49E-08	78.5	n.t.	72	7	91	9		
20012	H3	L0.27	1.31E-09	1.04E-08	77.5	n.t.	72	7	81	-1		
20013	H3	L0.32	1.59E-09	1.48E-08	78.5	n.t.	72	7	80	-2		
20014	H3	L0.36	3.75E-09	2.39E-08	77.5	n.t.	72	7	79	-3		
20015	H3	L0.37	1.44E-09	1.06E-08	77	n.t.	72	7	79	-3		
20016	H3	L0.39	1.29E-08	3.75E-08	77.5	n.t.	72	7	79	-3		
20017	H3	L0.41	1.84E-09	1.65E-08	78	n.t.	72	7	78	-4		
20018	H3	L0.67	3.49E-08	5.00E-07	77.5	n.t.	72	7	82	0		
20019	H3	L0.69	2.64E-08	n.t.	77.5	n.t.	72	7	81	-1		
20020	H3	L0.74	2.66E-09	n.t.	78.8	n.t.	72	7	82	0		
20021	H3	L0.75	2.81E-08	n.t.	78	n.t.	72	7	81	-1		
20022	H3	L0.103	3.69E-09	2.84E-08	78	n.t.	72	7	73	-9		
20052	H3	L0.44	6.78E-08	4.20E-08	75.8	n.t.	72	7	82	0		
20068	20075	H3.1	L0.12	5.37E-10	3.04E-09	81	69	68	3	77	-5	
20069	20076	H3.2	L0.12	6.24E-10	4.10E-09	81	69.5	66	3	77	-5	
20070	20077	H3.3	L0.12	2.21E-09	1.08E-08	81	67	68	3	77	-5	
20071	20078	H3.4	L0.12	1.37E-09	6.14E-09	81	69.5	68	3	77	-5	
20072	20079	H3.5	L0.12	3.72E-09	1.59E-08	81.5	70	68	3	77	-5	
20073	20080	H3.6	L0.12	8.14E-09	2.99E-08	81.5	69.5	66	3	77	-5	
20074	20081	H3.7	L0.12	1.58E-09	1.11E-08	80	67	62	-3	77	-5	
20075	20360	H3.9	L0.12	1.16E-09	5.54E-09	n.t.	69.5	66	3	77	-5	

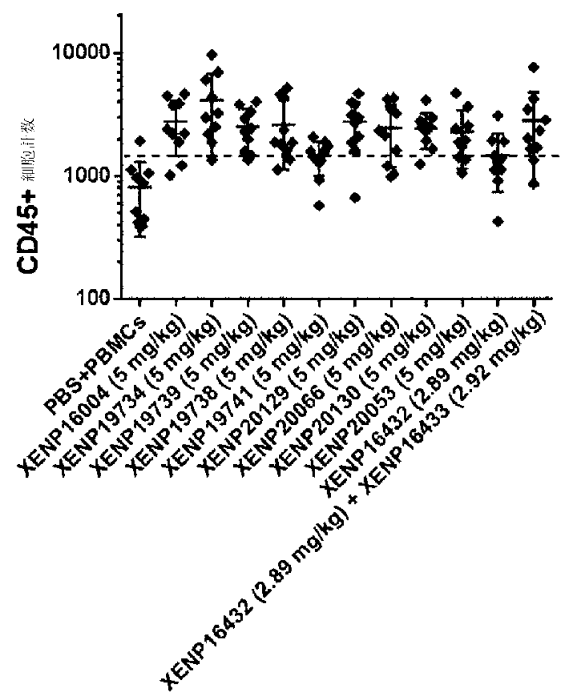
【図 2 4 G】

Fab XENP	scFv XENP	VH	VL	ヒト CTLA-4 Fab K _D (M)	Cyno CTLA-4 Fab K _D (M)	Fab T _m (°C)	scFv T _m (°C)	VH 9- mers	Δ VH 9- mers	VL 9- mers	Δ VL 9- mers
20324	20361	H3.10	L0.12	7.08E-10	3.34E-09	n.t.	68.5	68	3	77	-5
20325	20362	H3.11	L0.12	1.65E-09	6.52E-09	n.t.	71	68	3	77	-5
20326	20363	H3.12	L0.12	1.20E-08	4.13E-08	n.t.	70	68	3	77	-5
20327	20364	H3.13	L0.12	8.15E-10	4.58E-09	n.t.	70	68	3	77	-5
20328	20365	H3.14	L0.12	3.48E-09	1.95E-08	n.t.	69.5	68	3	77	-5
20329	20366	H3.15	L0.12	8.65E-09	3.62E-08	n.t.	71.5	68	3	77	-5
20330	20367	H3.16	L0.12	1.56E-08	6.23E-08	n.t.	70.5	68	3	77	-5
20331	20368	H3.17	L0.12	3.93E-09	2.51E-08	n.t.	70.5	68	3	77	-5
20332	20369	H3.18	L0.12	1.71E-08	8.48E-08	n.t.	69.5	68	3	77	-5
20333	20370	H3.19	L0.12	4.09E-09	1.60E-08	n.t.	71.5	68	3	77	-5
20334	20371	H3.20	L0.12	2.59E-08	2.54E-06	n.t.	70.5	68	3	77	-5
20335	20372	H3.21	L0.12	1.55E-09	9.54E-09	n.t.	71	68	3	77	-5
20336	20373	H3.22	L0.12	7.49E-09	2.98E-08	n.t.	69.5	68	3	77	-5
20337	20374	H3.23	L0.12	1.17E-08	4.78E-09	n.t.	70.5	68	3	77	-5
20338	20375	H3.24	L0.12	6.44E-08	2.39E-08	n.t.	69.5	68	3	77	-5
20339	20377	H3.25	L0.12	4.51E-08	2.74E-05	n.t.	72.5	68	3	77	-5
20340	20377	H3.26	L0.12	1.97E-09	1.23E-06	n.t.	69	68	3	77	-5
20341	20378	H3.4	L0.118	1.55E-09	6.67E-09	n.t.	70.5	68	3	82	0
20342	20379	H3.4	L0.119	1.89E-09	8.23E-09	n.t.	70	68	3	82	0
20343	20380	H3.4	L0.120	2.70E-09	1.05E-08	n.t.	70	68	3	86	4
20344	20381	H3.4	L0.121	1.28E-09	5.54E-09	n.t.	71	68	3	86	4
20345	20382	H3.4	L0.122	1.98E-09	6.47E-09	n.t.	71	68	3	82	0
20346	20383	H3.4	L0.123	2.74E-09	1.14E-08	n.t.	71.5	68	3	91	9
20347	20384	H3.4	L0.124	1.41E-09	5.67E-09	n.t.	72.5	68	3	91	9
20348	20385	H3.4	L0.125	3.20E-09	1.37E-08	n.t.	70.5	68	3	91	9
20349	20386	H3.4	L0.126	1.68E-09	7.52E-09	n.t.	71.5	68	3	91	9
20350	20387	H3.4	L0.127	2.46E-09	9.33E-09	n.t.	72	68	3	96	13
20351	20388	H3.4	L0.128	3.16E-08	3.16E-08	n.t.	72	68	3	91	9
20352	20389	H3.4	L0.129	1.65E-09	7.31E-06	n.t.	73	68	3	91	9
20353	20390	H3.4	L0.130	2.77E-09	1.09E-08	n.t.	73	68	3	100	18
20354	20391	H3.4	L0.131	2.70E-09	1.08E-08	n.t.	72.5	68	3	100	18
20355	20392	H3.4	L0.132	2.78E-09	1.12E-08	n.t.	73.5	68	3	100	18
20356	20393	H3.5	L2	2.17E-09	1.13E-08	n.t.	67	68	3	81	-1
20357	20394	H3.5	L2.1	4.52E-09	2.41E-08	n.t.	67.5	68	3	90	8
20358	20395	H3.5	L2.2	1.90E-09	1.04E-08	n.t.	68.5	68	3	89	7
20359	20396	H3.5	L2.3	3.90E-09	2.05E-08	n.t.	69	68	3	98	16
20422	20431	H3.21	L0.124	5.54E-09	1.23E-08	n.t.	74	68	3	91	9
20423	20432	H3.21	L0.129	5.42E-09	1.36E-08	n.t.	74.5	68	3	91	9
20424	20433	H3.21	L0.132	5.27E-09	1.49E-08	n.t.	75	68	3	90	8
20425	20434	H3.21	L0.134	2.21E-08	1.60E-08	n.t.	73.5	68	3	100	18
20426	20435	H3.21	L0.128	2.97E-03	4.96E-09	n.t.	74	68	3	91	9
20427	20436	H3.23	L0.132	4.84E-09	8.85E-09	n.t.	74.5	68	3	100	18
20428	20437	H3.25	L0.124	4.80E-09	8.65E-09	n.t.	72.5	68	3	91	9
20429	20438	H3.25	L0.126	2.05E-09	3.99E-09	n.t.	73	68	3	91	9
20430	20439	H3.25	L0.132	1.80E-09	3.81E-09	n.t.	73.5	68	3	100	18

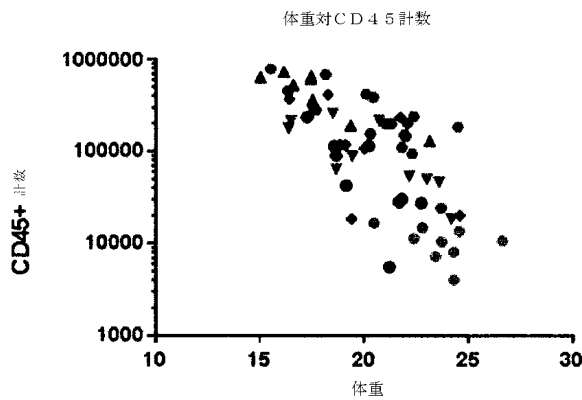
【図 26】



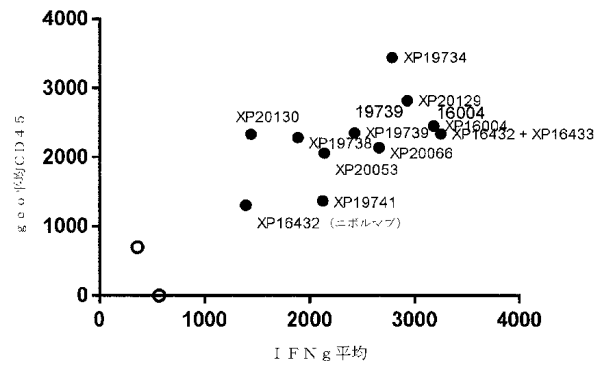
【図 27】



【図 28】



【図 29】



10

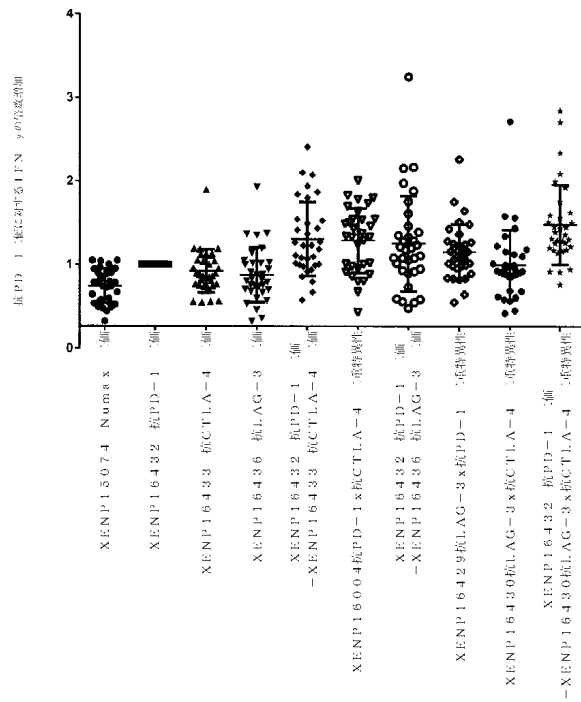
20

30

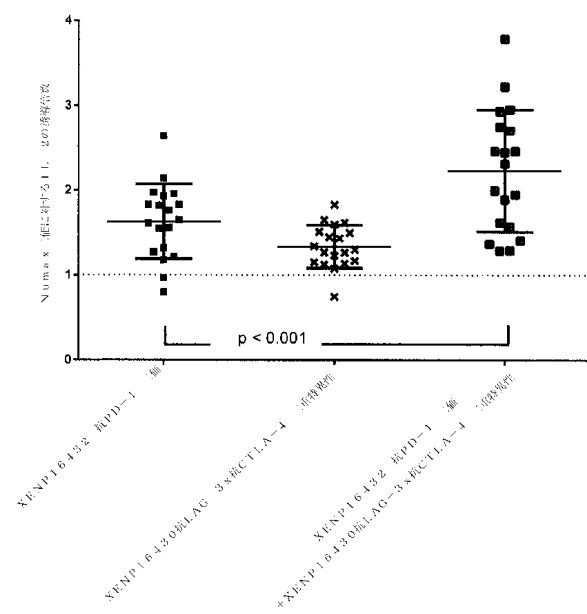
40

50

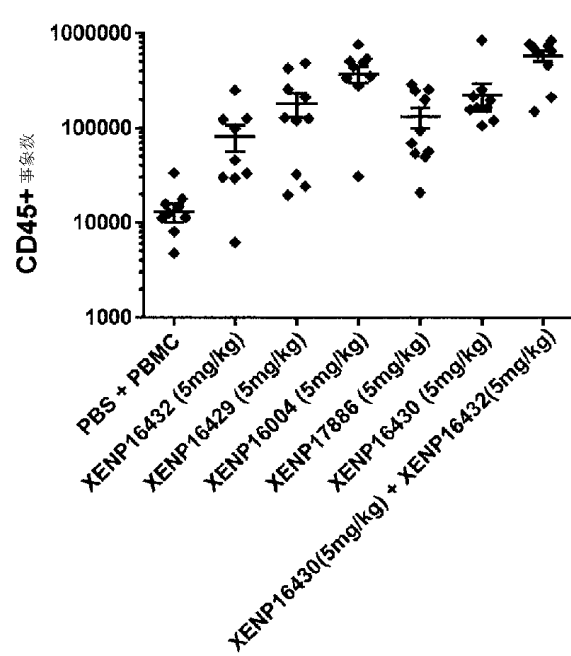
【図 3 3 B】



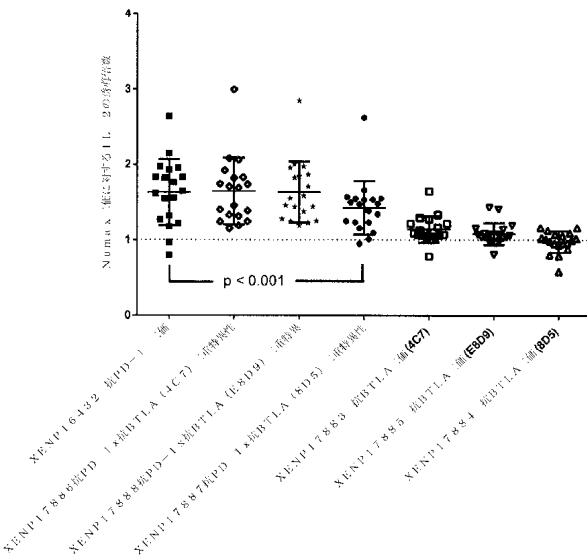
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6 A】



10

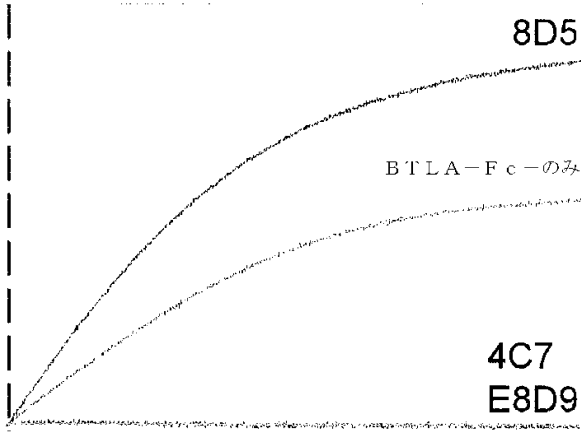
20

30

40

50

【図 3 6 B】



【図 3 7 A】

1
価格表価格 1
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 7 2 5)
ASTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 7 2 4)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK
定額欄 (価額欄分 3 7 2 7)
RTVAASVFLFPFESSEQLNSGTASVYGLLNNFYPRKATYQKRYDNLALQSNQSESVTEQDSKSTYSLASTLISKADYKHYACEVTHGLGSSPHTKSNRGE
2
価格表価格 2
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 7 2 8)
ASTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 7 2 9)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK

10

20

【図 3 7 B】

3
価格表価格 3
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 7 3 1)
ARTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 7 3 2)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK
4
価格表価格 4
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 7 3 4)
ASTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 7 3 5)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK

【図 3 7 C】

5 (3 6 B) / (3 5 L 7 0 4 7)
価格表価格 5
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 9 1 5 8)
ASTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 9 1 5 9)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK
6
価格表価格 6
F a b 欄 価額 (価額欄分 3 9 1 6 0)
ASTKGSVFPLAPSSNSTSGGTALGCLVKDYFPPVTVSNMNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVKPEFSCDKTH
TCFCTAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKVSNKALPAP1
EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHEALHNHYTQK
SLSLSPOK
s c f v 価額 (価額欄分 3 9 1 6 1)
EKSNDKTHPCPCPAPFVAGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVYDKHEDPEVKFNWYDGVVHNHAKTKPRFYNSTYRVWSVTLVHQJMLNGREYKCKV
SNKALPAP1EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGSEFYSDIAVENESGOPENNYKTTPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRMGOQGVFSCSVNHE
ALHNHYTQKSLSLSPK

30

40

50

【図 3 7 D】

附录 7

F. a. b. 樹形虫類 (樹形科) 391 (32)

ASTROGVSFFAPSSKSTGGTAAAGLQVYDFEFTVSNWSGALSTGWHFPAVLOSSGLISLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHSFDTKDKVFPASCKDTH
TCPCAPPAVAGSVYFIFPKPKPITATISRTFVTCVTVYVHEDQVYFKNVYGVHNAKTRPREFVSTKVSIVTIVTIDQINFRVFKVSNVCAIPAI
EPCNAPAGVAGVYFIFPKPKPITATISRTFVTCVTVYVHEDQVYFKNVYGVHNAKTRPREFVSTKVSIVTIVTIDQINFRVFKVSNVCAIPAI
EXTACNAPAGVAGVYFIFPKPKPITATISRTFVTCVTVYVHEDQVYFKNVYGVHNAKTRPREFVSTKVSIVTIVTIDQINFRVFKVSNVCAIPAI

 $\pi \in F_v$ 重数 $\langle \pi, \sigma \rangle_{F_v} = 391$ (3.3)

EPSSDKTHTCPCPCAPDQAGPSVF-TPPRKRDCLMISPTPEVTCCTDUNHEDPFWKBNVVOGVEVHNKATKPRDEQCYSGSRVTSVILVILHQLDNLNGEKKCKEN
SNKALPATKCTLSKAGKQFRFQVITLTPPSREQKTHQVCLCCAGFVSDIAVEMESHQCPENNYETTPV-DSDBGSFELYLSKLIVCFKSRQGGIVFSC54HHE
ALNNHYTKQ-SLSKQK.

论拔尖价格 8

1. 9 (63.4%) 1. 9 (63.4%)

ASTKQSPVETJAPCSPTSESTALGCLVUNOYPEPZVTWNSGSLGSLGHFAVLOSGLGLSLSSVUTPSSSLGNTYTCVNOHKSBDTKRKTETSSVOPCE
PCFAEFJGGGSVFIPEPKKVTLMLSRTPEVTCTVYDQENPEVOTIKYTDGEVHNHAKTPREZFNTSTYVSLVJLHCDKLNGKEHCFYFSGKSPSEK
TISKAGOPNGQVITLPTSCQENTKNQVLTDLVGGEFTGD-AVENSFGGAPENNVTTFVLDGDSGETJYKMLVDKGRGREGGVDSCGWHILCALINHYTKSL
SLSLSG

Z. C. D. Y. 重訂 (配列番号) 39165)

ESKGGPCCPCBPENLGGSEVLEPKEPKTILMISSTPCTCTATATQEDPEQVFNWIDGVEVHNKAKPKPEPQNSITPVYASVLTALHODALNCKEYKCNYSY
KGLPISBETSHAKCQPRQETVYTLPPSQEQTQNHQTLCTLKGFTSDIAYEMSHCQTEHRYCTVTPDSDGSEFFLYSKLTVKSHQCEIVTSSTTHEAL
NNHVTOKRSLSJLG

【図 3 7 E】

檢査と評価 9

F a b 州重鎮 (植秀) 番号 39166)

STUCK

H C F v 重鎮 (配列番号 39167)

ERKQSVCEPICDAPPAVCSLEFPDPHDCACSSCFEUCVWVSHEDEEVNNTVCDEVHNKTPTSEOFNSTPSTSLTWHQUMNGENCKNSYK
SUNLALFKSYSGAGUQEFTTLPSREHUPLMAYCGLRKFISDAVESGEGEENAKLGNLOSUGNEFETSLTVORSNQOQNETSCSMTLLAAH
NYVDCTGTGCR

檢査き價格 10

J. a b 創刊 (元) 1933 3 9 1683

[illegible]

8 c F v 卓頌 (配列番号 39169)

[illegible]

【図 3 8 A】

$$m\Delta b = s c f v \frac{1}{\sqrt{g}} \{ 356 \quad E / 358 N 7^{12} 947 \}$$
 $\langle T, a, b, c, e, f, v, \text{例} \rangle, \langle \text{例}, a, b, c, e, f, v, \text{例} \rangle$

ASTGCPVFPAPBSISVSGTAAAGLWDFPBPVYSHBAGALSGWTFPVLQSSGLVSLATVPSBSSLSCTYICWIKHPSOTQYCNKVEPSCCTHTCEPCPAP
VAGSVEFLPRPDLAMISPEVTVYWHDEPVAJYVQVYVHAFPEEENYSTFVSYLVLMQMLKFEKCYSHVAPLAKETSEARQCPPEPT
PREPHEKTHGLQVQGVSDIAVEMESJQGPENKTPRVIDGSGFPLVSLTSPFGQGVSTVNMHEALRYKQKSLASPK

作品 2 《f-a-b 創》〈作品番号〉: 3 7 7 3 8}

[illegible]

定常略SI (配列番号) 37739)

RTVAAPSVEITPPSDEQLKSGTASVCLINHFYPEAKVQWKVDIALCSG'SOESVTEQDSFDSYLSSTLTLSKADYEKIKVYACEVTHQGLSSP/TKSFNPGE

【図 38 B】

MA3 - 8610-2

Fab-scFv-Hc - 3561) 3581,712タイノ (配列番号:39170)

[illegible]

0904b-scFv 72b-IIc - 3561 / 3581 ヲタイノ (電話番号 39171)

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

Ученый секретариат

mAb-scFv Fab-scFv-Hc - K297A (重链编号39172)

12345678910111213141516171819202122232425262728293031323334353637383940414243444546474849505152535455565758596061626364656667686970717273747576777879808182838485868788899091929394959697989910010110210310410510610710810911011111211311411511611711811912012112212312412512612712812913013113213313413513613713813914014114214314414514614714814915015115215315415515615715815916016116216316416516616716816917017117217317417517617717817918018118218318418518618718818919019119219319419519619719819920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094194294394494594694794894995095195295395495595695795895996096196296396496596696796896997097197297397497597697797897998098198298398498598698798898999099199299399499599699799899910001001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110111021103110411051106110711081109111011111112111311141115111611171118111911201121112211231124112511261127112811291130113111321133113411351136113711381139114011411142114311441145114611471148114911501151115211531154115511561157115811591160116111621163116411651166116711681169117011711172117311741175117611771178117911801181118211831184118511861187118811891190119111921193119411951196119711981199120012011202120312041205120612071208120912101211121212131214121512161217121812191220122112221223122412251226122712281229123012311232123312341235123612371238123912401241124212431244124512461247124812491250125112521253125412551256125712581259126012611262126312641265126612671268126912701271127212731274127512761277127812791280128112821283128412851286128712881289129012911292129312941295129612971298129913

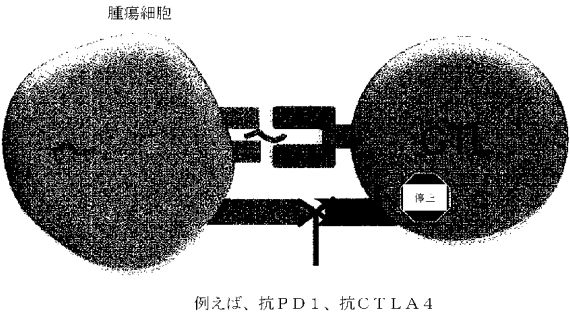
CH-92 AGS-qyma 163636 (1973)

[illegible]

【図 4 0】

	PD-1	CTLA-4	TIM-3	LAG-3	TIGIT	BTLA
第1/第2抗原	PD-1	CTLA-4	TIM-3	LAG-3	TIGIT	BTLA
	Q,R,T	Q,R,S	Q,R,S	Q,R,S	Q,R,S	Q,R,S
	Q,R,U	Q,R,U	Q,R,T	Q,R,T	Q,R,T	Q,R,T
	Q,R,V	Q,R,V	Q,R,U	Q,R,U	Q,R,U	Q,R,U
	Q,R,W	Q,R,W	Q,R,V	Q,R,V	Q,R,V	Q,R,V
	Q,R,X	Q,R,X	Q,R,W	Q,R,W	Q,R,W	Q,R,W
	Q,R,X	Q,R,X	Q,R,X	Q,R,X	Q,R,X	Q,R,X

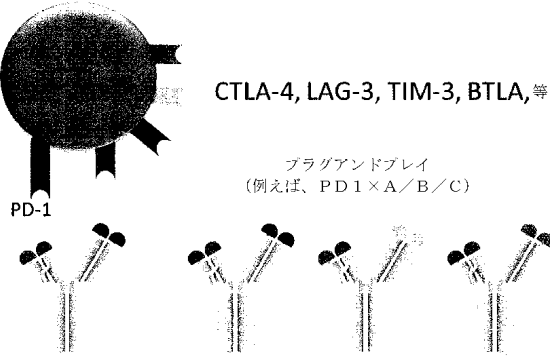
【図 4 1 A】



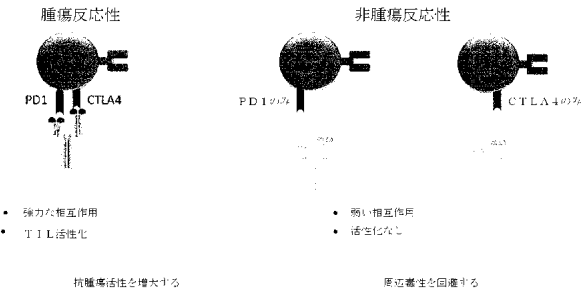
10

20

【図 4 1 B】



【図 4 2】

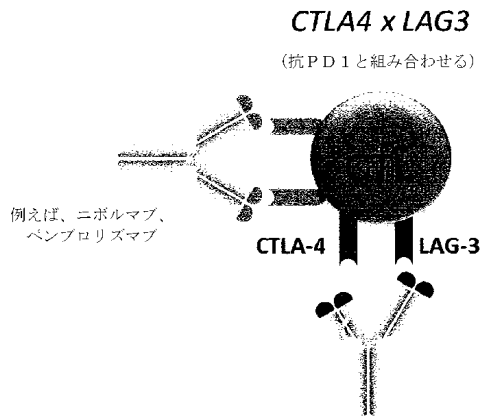


30

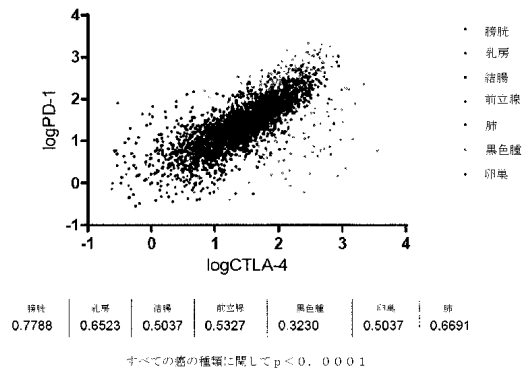
40

50

【図 4 3】

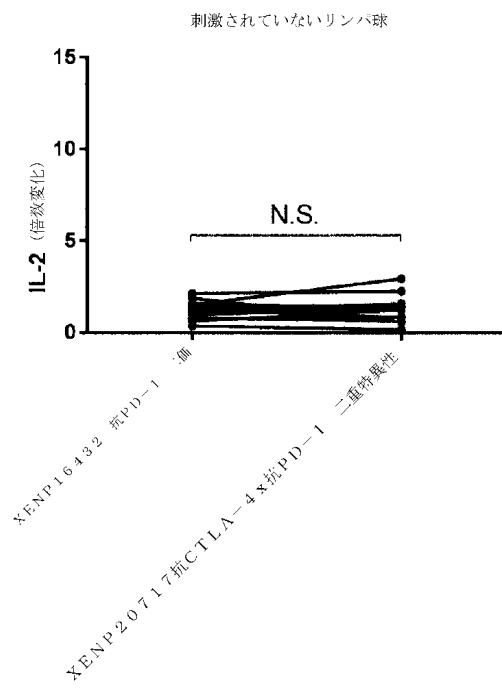


【図 4 4】

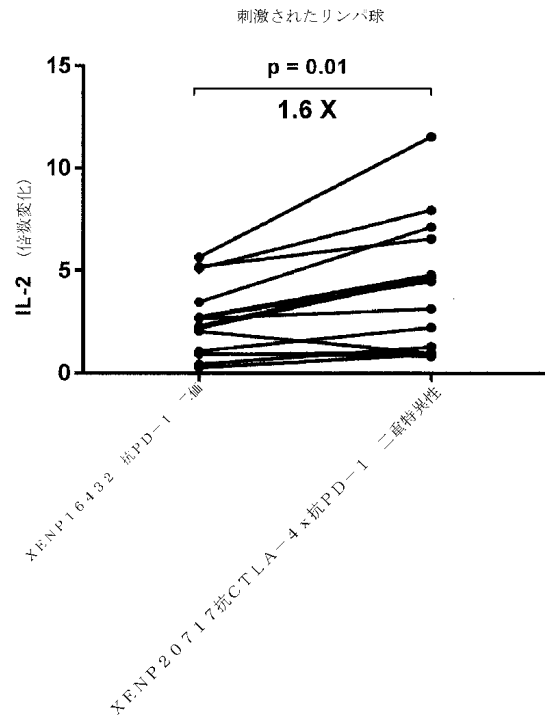


10

【図 4 5 A】



【図 4 5 B】



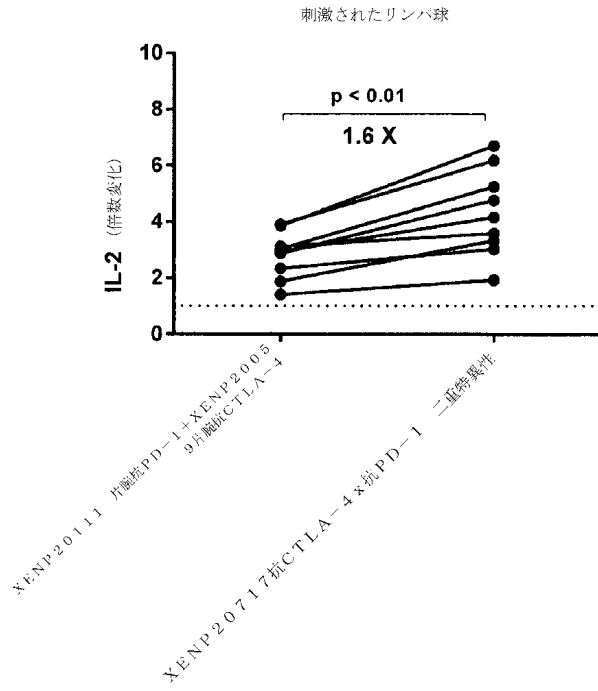
20

30

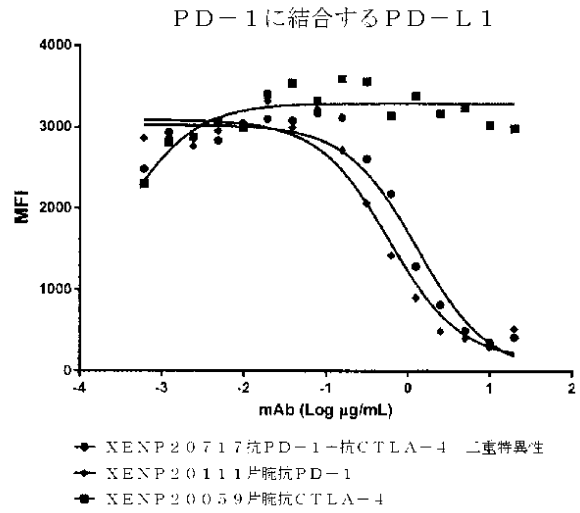
40

50

【図 4 5 C】



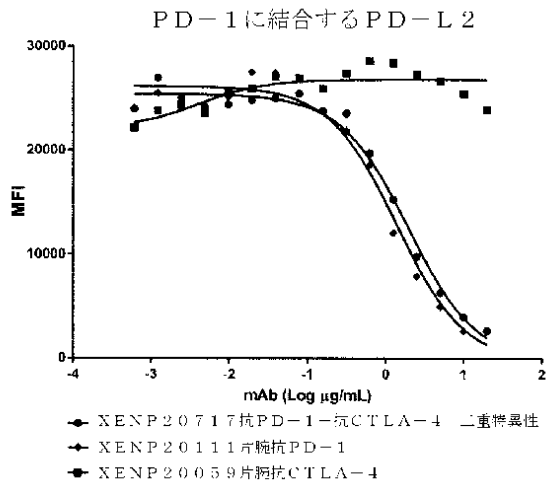
【図 4 6 A】



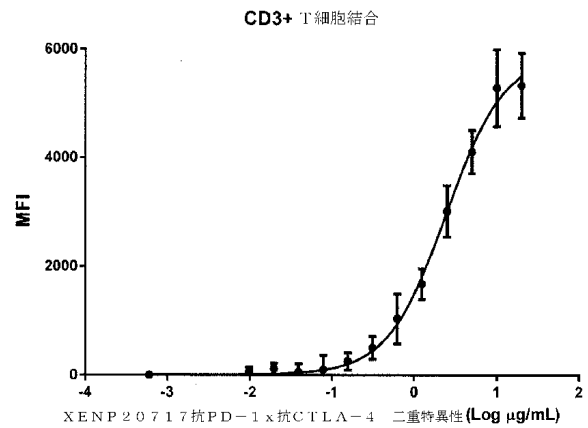
10

20

【図 4 6 B】



【図 4 7】

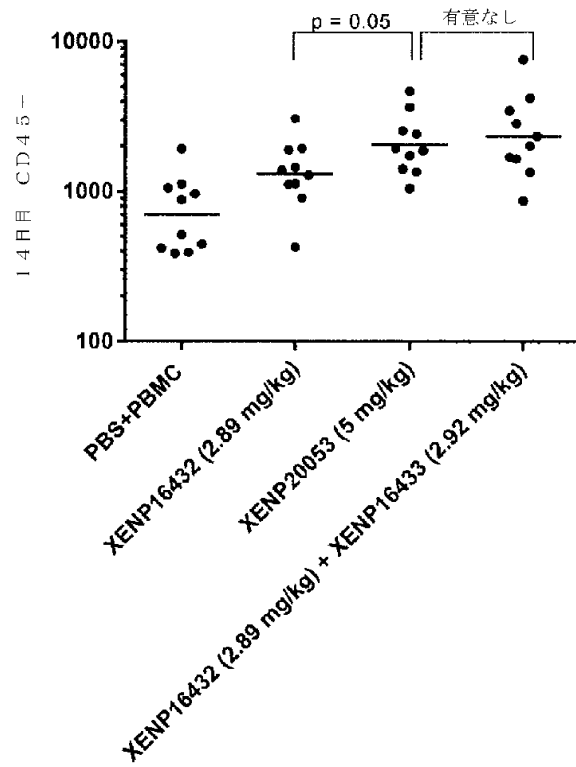


30

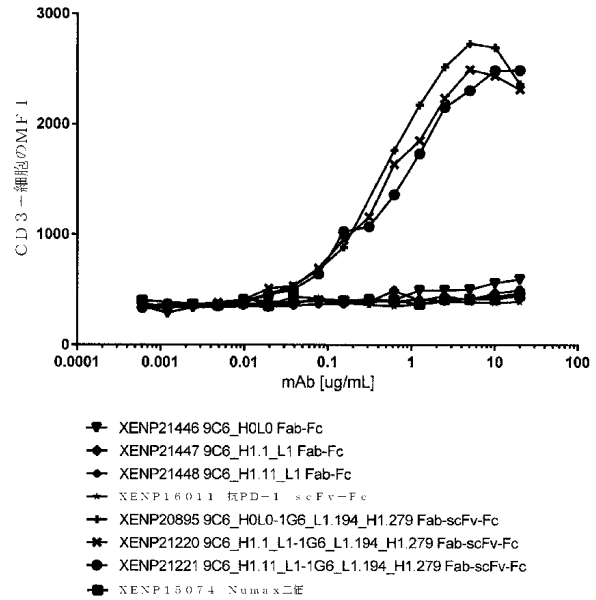
40

50

【図 48】



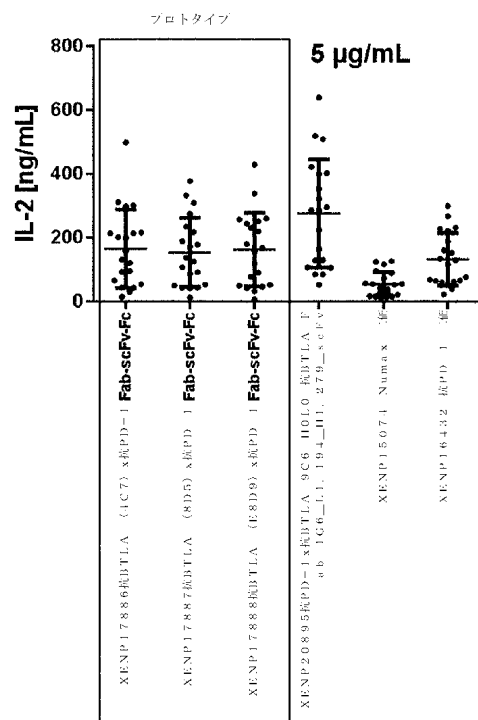
【図 49】



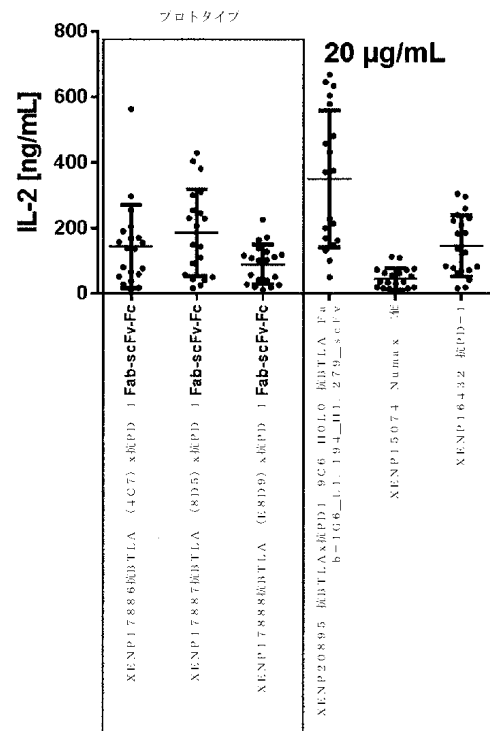
10

20

【図 50 A】



【図 50 B】

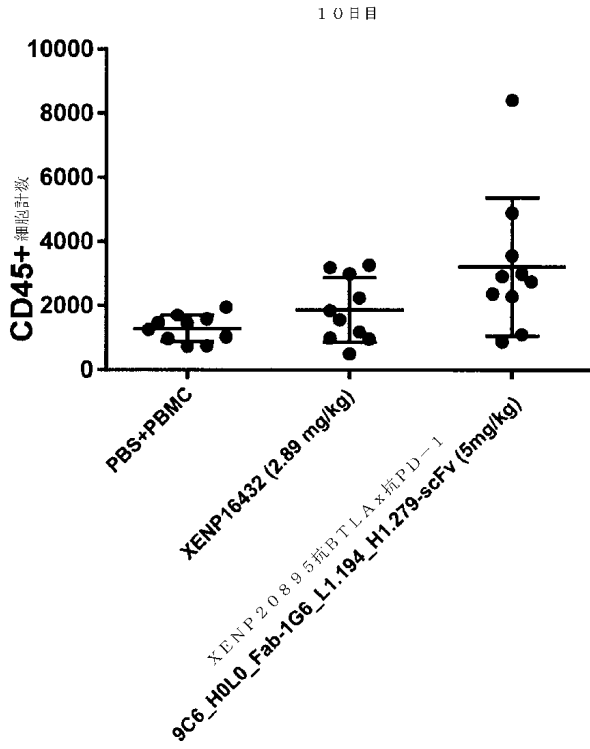


30

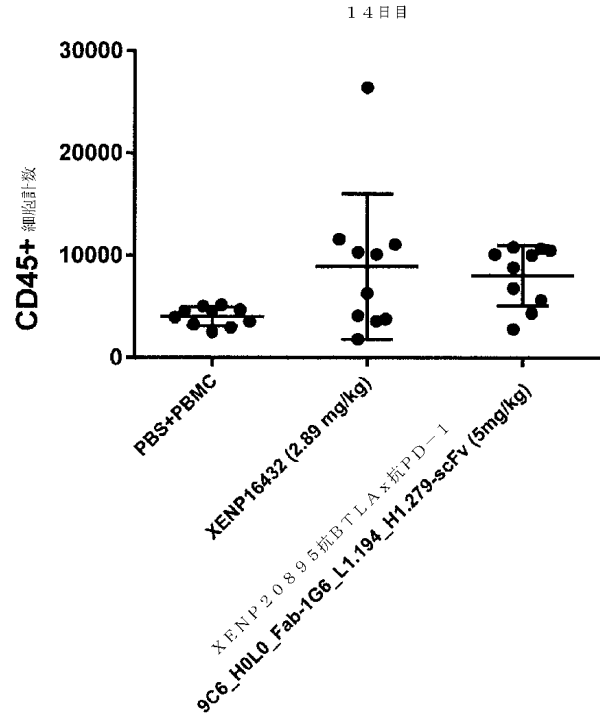
40

50

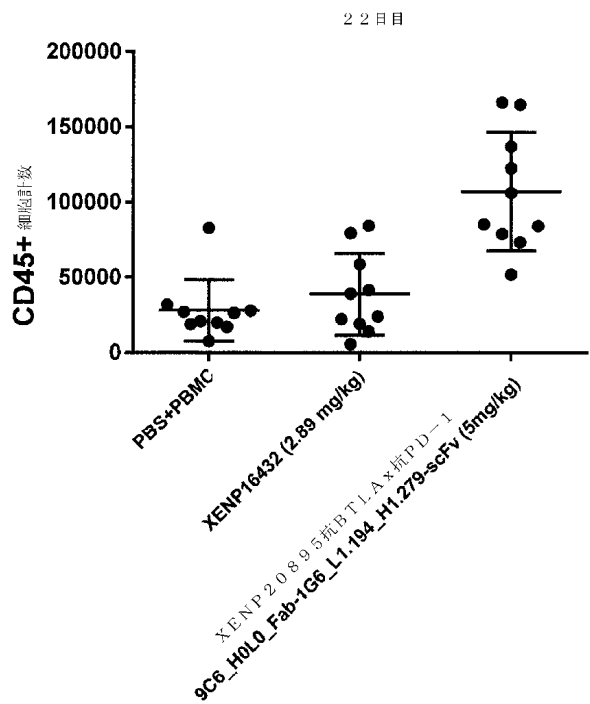
【図 5 3 A】



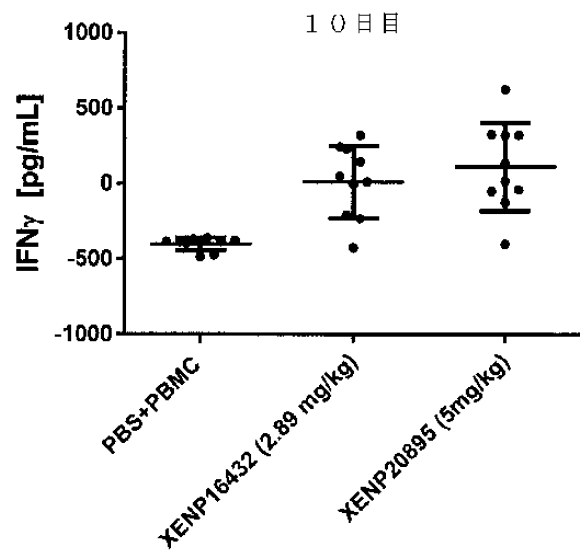
【図 5 3 B】



【図 5 3 C】



【図 5 3 D】



10

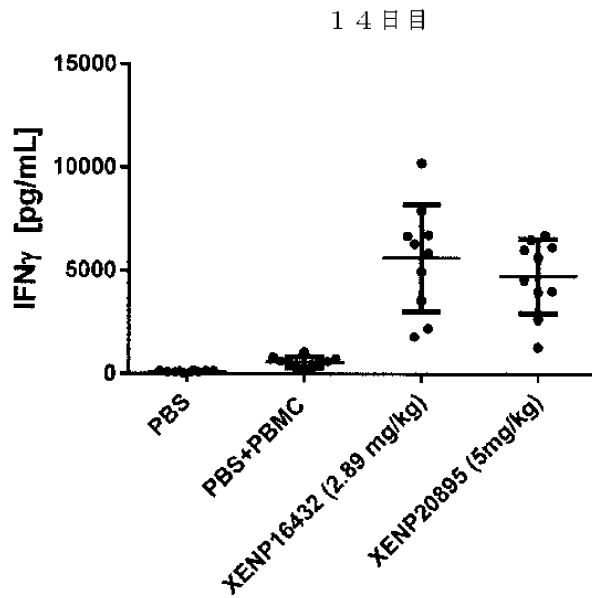
20

30

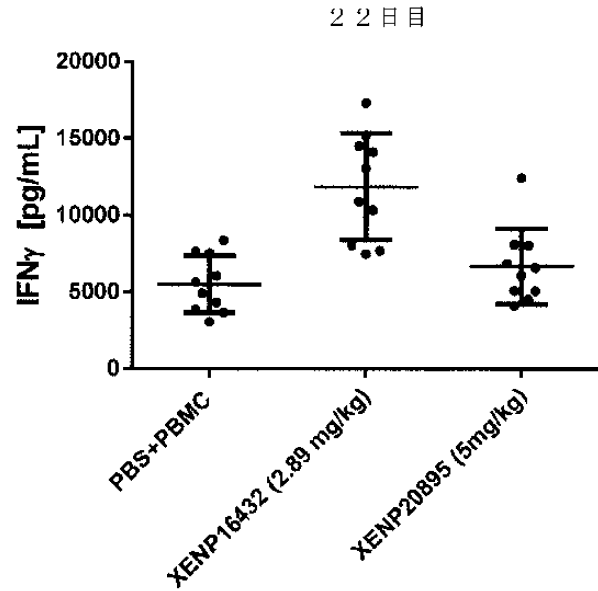
40

50

【図 5 3 E】



【図 5 3 F】



10

【図 5 4】

XENP (二価 mAb)	クローン	VH	VL	KD (M: EITBTLA)
20269	9C6	H0	L0	1.3E-08
20744	9C6	H0	L1	1.4E-08
20745	9C6	H0	L2	1.9E-08
20746	9C6	H1	L0	1.8E-08
20747	9C6	H1	L1	2.7E-08
20748	9C6	H1	L2	4.2E-08
20749	9C6	H2	L0	2.1E-08
20750	9C6	H2	L1	3.7E-08
20751	9C6	H2	L2	5.1E-08
20752	9C6	H3	L0	2.3E-08
20753	9C6	H3	L1	3.2E-08
20754	9C6	H3	L2	3.1E-08
20872	9C6	H1.1	L1	2.4E-08
20873	9C6	H1.2	L1	3.8E-08
20874	9C6	H1.3	L1	5.0E-08
20875	9C6	H1.4	L1	4.5E-08
20876	9C6	H1.5	L1	4.7E-08
20877	9C6	H1.6	L1	4.6E-08
20878	9C6	H1.7	L1	4.5E-08
20879	9C6	H1.8	L1	4.7E-08
20880	9C6	H1.9	L1	3.5E-08
20881	9C6	H1.10	L1	5.1E-08
20882	9C6	H1.11	L1	2.2E-08
20883	9C6	H1.12	L1	3.4E-08
20884	9C6	H1.13	L1	3.0E-08
20885	9C6	H1.14	L1	3.4E-08
20886	9C6	H1.15	L1	3.4E-08
20887	9C6	H1.16	L1	3.7E-08
20888	9C6	H1	L1.1	3.1E-08
20889	9C6	H1	L1.2	3.0E-08
20890	9C6	H1	L1.3	3.2E-08
20891	9C6	H1	L1.4	3.1E-08
20892	9C6	H1	L1.5	3.1E-08
20893	9C6	H1	L1.6	3.4E-08
20894	9C6	H1	L1.7	6.2E-08

【図 5 5 A】

Fab XENP	VH	VL	FLAG-Fab K _d (M)	Fab T _m (°C)
20847	H1	L2	1.37E-08	73.5
21228	H1.1	L2	1.43E-08	72.5
21232	H1.5	L2	1.73E-08	73
21235	H1.8	L2	1.15E-08	72.5
21236	H1.9	L2	1.26E-08	73
21239	H1.12	L2	1.25E-08	73.5
21245	H1.18	L2	1.27E-08	72.5
21249	H1.22	L2	9.50E-09	72.5
21256	H1.29	L2	1.30E-08	73.5
21264	H1.37	L2	3.60E-09	73
21284	H1.57	L2	2.36E-08	73.5
21286	H1.59	L2	3.61E-08	73.5
21291	H1.64	L2	6.71E-09	73
21292	H1.65	L2	7.08E-09	73
21295	H1.68	L2	1.31E-08	72.5
21301	H1.70	L2	5.47E-09	72.5
21302	H1.71	L2	1.25E-08	74.5
21304	H1.73	L2	1.63E-08	73.5
21306	H1.75	L2	1.69E-08	74
21327	H1.96	L2	1.93E-08	73.5
21329	H1.98	L2	1.11E-08	73.5
21332	H1.101	L2	1.43E-08	73.5
21336	H1.105	L2	5.41E-09	73
21339	H1.108	L2	1.29E-08	73.5
21342	H1.111	L2	1.18E-08	73.5
21344	H1.113	L2	1.16E-08	73
21351	H1	L2.4	1.07E-08	71.5
21353	H1	L2.6	1.68E-08	70.5
21360	H1	L2.13	1.17E-08	74
21369	H1	L2.22	1.74E-08	71
21370	H1	L2.23	9.74E-09	73
21371	H1	L2.24	1.80E-08	73
21382	H1	L2.35	5.44E-09	73
21392	H1	L2.45	5.09E-09	72
21394	H1	L2.47	3.40E-09	73.5
21395	H1	L2.48	8.27E-09	72
21401	H1	L2.50	2.30E-09	73.5
21402	H1	L2.51	8.47E-09	73
21409	H1	L2.58	3.11E-09	77

20

30

40

50

【図 5 5 B】

Fab XENP	VH	VL	LAG-3 Fab K _d (M)	Fab T _m (°C)
21411	H1	L2.60	1.46E-08	75
21421	H1	L2.70	6.58E-09	74
21423	H1	L2.72	1.15E-08	73
21424	H1	L2.73	7.68E-09	74
21426	H1	L2.75	1.61E-08	74.5
21609	H1.64	L2.35	1.16E-08	
21610	H1.64	L2.47	3.30E-09	
21611	H1.64	L2.50	2.34E-09	
21612	H1.70	L2.35	1.30E-08	
21613	H1.70	L2.47	6.29E-09	
21614	H1.70	L2.50	6.48E-09	
21615	H1.105	L2.35	5.82E-09	
21616	H1.105	L2.47	3.62E-09	
21617	H1.105	L2.50	2.02E-09	
21705	H.117	L2	2.90E-09	
21706	H.118	L2	4.06E-09	
21707	H.119	L2	7.72E-09	
21708	H.120	L2	8.48E-09	
21709	H.121	L2	3.19E-09	
21710	H.122	L2	4.54E-09	
21711	H.123	L2	7.63E-09	
21712	H.124	L2	1.08E-08	
21713	H.126	L2	1.63E-09	
21714	H.128	L2	5.70E-09	
21715	H.129	L2	1.16E-08	
21716	H.130	L2	9.43E-09	
21717	H.131	L2	1.63E-08	
21718	H.132	L2	2.12E-08	
21719	H.133	L2	1.60E-08	
21720	H.134	L2	2.45E-08	
21721	H.135	L2	5.71E-09	
21722	H.136	L2	3.03E-09	
21723	H.137	L2	7.26E-09	
21724	H.138	L2	8.29E-09	
21725	H.139	L2	7.00E-09	
21726	H.140	L2	1.03E-08	
21727	H.141	L2	4.74E-09	
21728	H.142	L2	1.61E-06	
21729	H.143	L2	4.70E-09	

【図 5 5 C】

Fab XENP	VH	VL	LAG-3 Fab K _d (M)	Fab T _m (°C)
21730	H.144	L2	1.64E-09	
21731	H.145	L2	5.19E-09	
21732	H.146	L2	2.95E-09	
21794	H1.125	L2	8.13E-10	
21795	H1.127	L2	2.36E-09	
21796	H1	L2.102	1.21E-08	
21801	H1	L2.103	3.22E-08	
21802	H1	L2.104	2.09E-07	
21803	H1	L2.105	8.35E-08	
21804	H1	L2.106	1.43E-07	
21805	H1	L2.107		
21806	H1	L2.108		
21807	H1	L2.109	1.68E-08	
21808	H1	L2.110		
21809	H1	L2.111	2.24E-09	
21810	H1	L2.112	3.26E-09	
21811	H1	L2.113	1.29E-09	
21812	H1	L2.114	2.79E-09	
21813	H1	L2.115	6.06E-09	
21814	H1	L2.116	1.58E-09	
21815	H1	L2.117		
21816	H1	L2.118	1.13E-08	
21817	H1	L2.119	3.99E-09	
21818	H1	L2.120	2.90E-09	
21819	H1	L2.121	1.12E-08	
21912	H1.117	L2.50		
21913	H1.125	L2.50	1.75E-10	
21914	H1.126	L2.50	2.75E-10	
21915	H1.144	L2.50	4.63E-10	
21916	H1.127	L2.50	5.28E-10	
21917	H1.136	L2.50	5.12E-10	
21918	H1.154	L2.50	9.22E-10	
21919	H1.141	L2.50	1.71E-09	
21920	H1.117	L2.113	7.96E-10	
21921	H1.125	L2.113	1.38E-10	
21922	H1.126	L2.113	3.96E-10	
21923	H1.144	L2.113	2.84E-10	
21924	H1.127	L2.113	5.20E-10	
21925	H1.136	L2.113	3.08E-10	

10

20

【図 5 5 D】

Fab XENP	VH	VL	LAG-3 Fab K _d (M)	Fab T _m (°C)
21926	H1.154	L2.113	9.08E-10	
21927	H1.141	L2.113	5.63E-10	
21928	H1.117	L2.116	3.23E-10	
21929	H1.125	L2.116	3.64E-10	
21930	H1.126	L2.116	9.37E-10	
21931	H1.144	L2.116	9.74E-10	
21932	H1.127	L2.116	1.66E-09	
21933	H1.136	L2.116	1.31E-09	
21934	H1.154	L2.116	3.58E-09	
21935	H1.141	L2.116	2.16E-09	
21915	H1.144	L2.50	7.66E-10	
21923	H1.144	L2.113	7.31E-10	
22138	H1.158	L2.126	1.58E-07	
22139	H1.159	L2.126	2.12E-07	
22140	H1.160	L2.126	1.70E-07	
22141	H1.161	L2.126	8.77E-08	
22142	H1.162	L2.126	1.20E-07	
22143	H1.163	L2.126	4.62E-07	
22144	H1.164	L2.126	3.46E-07	
22145	H1.165	L2.126	2.01E-07	
22146	H1.166	L2.126	2.59E-07	
22147	H1.167	L2.126	4.12E-08	
22148	H1.168	L2.126	3.43E-07	
22149	H1.169	L2.126	3.24E-07	
22453	H1.144	L2.131	2.00E-09	
22454	H1.167	L2.128	3.00E-07	
22455	H1.167	L2.129	1.68E-06	
22456	H1.167	L2.130	2.64E-07	
22457	H1.167	L2.131	3.76E-07	
22461	H1.125	L2.131	1.67E-09	
22450	H1.144	L2.128	2.55E-09	67
22451	H1.144	L2.129	4.26E-09	67.5
22452	H1.144	L2.130	4.95E-09	68.5
22458	H1.125	L2.128	2.24E-09	65
22459	H1.125	L2.129	5.64E-09	67
22460	H1.125	L2.130	3.21E-09	67
22570	H1.144	L2.132	2.44E-09	66.5
22571	H1.144	L2.133	4.71E-09	67
22572	H1.144	L2.134	5.54E-09	69

【図 5 5 E】

Fab XENP	VH	VL	LAG-3 Fab K _d (M)	Fab T _m (°C)
22574	H1.125	L2.132	1.98E-09	65.5
22575	H1.125	L2.133	3.19E-09	65
22578	H1.141	L2.132	2.93E-12	66.5
22579	H1.141	L2.133	9.21E-09	68
22580	H1.141	L2.134	4.12E-09	69.5
22609	H1.144	L2.136	4.60E-09	67.5
22610	H1.125	L2.136	3.81E-09	66
22611	H1.141	L2.136	4.30E-09	68
22612	H1.144	L2.137	2.03E-08	
22613	H1.125	L2.137	5.09E-09	66
22614	H1.141	L2.137	7.35E-09	68.5
22576	H1.125	L2.134	3.46E-09	66.5
22615	H1.144	L2.126	2.69E-09	
22616	H1.144	L2.91	1.26E-08	74
22617	H1.144	L2.93	8.31E-09	72.5
22618	H1.144	L2.122	9.12E-09	74.5
22619	H1.144	L2.124	1.03E-08	73.5
22620	H1.125	L2.126	1.20E-09	64
22621	H1.125	L2.91	5.96E-09	73.5
22622	H1.125	L2.93	5.81E-09	72
22623	H1.125	L2.122	6.81E-09	73
22624	H1.125	L2.124	7.00E-09	73
22652	H1.144	L2.138	1.32E-09	74
22653	H1.144	L2.139	2.41E-09	
22654	H1.144	L2.140	2.89E-09	
22655	H1.144	L2.141	3.65E-09	
22656	H1.144	L2.142	1.29E-09	74
22657	H1.144	L2.143	3.33E-09	
22658	H1.144	L2.144	3.04E-09	
22659	H1.144	L2.145	3.43E-09	
22660	H1.125	L2.138	9.29E-10	73.5
22661	H1.125	L2.139	2.34E-09	
22662	H1.125	L2.140	2.24E-09	73.5
22663	H1.125	L2.141	2.41E-09	73
22664	H1.125	L2.142	3.62E-10	73.5
22665	H1.125	L2.143	2.74E-09	
22666	H1.125	L2.144	2.58E-09	
22667	H1.125	L2.145	2.70E-09	

30

40

50

【図 5 6 A】

図 V

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
20844	7G8	H3	L1	4.84E-08	3.51E-02	59.0
20911	7G8	H3.1	L1	2.13E-08	5.47E-03	
20912	7G8	H3.2	L1	5.51E-08	1.22E-02	
20913	7G8	H3.3	L1	2.16E-08	7.75E-03	
20914	7G8	H3.4	L1	1.64E-08	7.57E-03	
20915	7G8	H3.5	L1	8.38E-08	3.72E-03	
20916	7G8	H3.6	L1	6.50E-08	1.90E-02	
20917	7G8	H3.8	L1	1.62E-08	8.26E-03	
20918	7G8	H3	L1.1	8.19E-08	2.45E-02	
20919	7G8	H3	L1.2	※	※	
20920	7G8	H3	L1.3	※	※	
20921	7G8	H3	L1.4	8.16E-08	2.17E-02	
20922	7G8	H3	L1.5	※	※	
20923	7G8	H3	L1.6	4.42E-06	3.89E-02	
20924	7G8	H3	L1.8	6.43E-08	1.41E-02	
20925	7G8	H3.1	L1.1	4.31E-08	5.78E-03	
20926	7G8	H3.1	L1.5	5.26E-08	5.85E-03	
20927	7G8	H3.5	L1.1	1.61E-06	7.44E-03	
20928	7G8	H3.5	L1.5	7.31E-08	6.77E-03	
20929	7G8	H3	L0	4.17E-08	3.08E-02	
20930	7G8	H0	L0	6.59E-08	6.10E-02	
20931	7G8	H1	L0	1.09E-07	3.18E-02	
20932	7G8	H2	L0	8.33E-08	6.28E-02	
20933	7G8	H0.1	L0	2.44E-08	2.70E-02	
20934	7G8	H0.2	L0	2.11E-08	2.05E-02	
20935	7G8	H0.3	L0	3.07E-08	1.43E-02	
20936	7G8	H0.4	L0	3.55E-08	3.29E-02	
20937	7G8	H0.5	L0	5.33E-08	3.46E-02	
20938	7G8	H0.6	L0	1.86E-08	2.48E-02	
20939	7G8	H0.7	L0	7.57E-08	9.20E-02	
20940	7G8	H0.8	L0	2.24E-08	3.65E-02	
20941	7G8	H0.9	L0	7.91E-08	1.16E-01	
20942	7G8	H0.10	L0	1.08E-07	1.05E-01	
20943	7G8	H0.11	L0	8.29E-08	1.15E-01	
20944	7G8	H0.12	L0	1.19E-06	3.47E-01	
20945	7G8	H0.13	L0	9.61E-08	1.03E-01	
20946	7G8	H0.14	L0	1.85E-07	2.53E-01	
20947	7G8	H0.15	L0	7.88E-08	1.99E-01	

【図 5 6 B】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
20948	7G8	H0.17	L0	4.14E-08	5.74E-02	
20949	7G8	H0.18	L0	3.74E-08	4.05E-02	
20950	7G8	H0.19	L0	3.85E-08	3.85E-02	
20951	7G8	H0.20	L0	7.09E-08	9.98E-02	
20952	7G8	H0.21	L0	6.30E-08	3.75E-02	
20953	7G8	H0.22	L0	9.92E-08	5.17E-02	
20954	7G8	H0.23	L0	4.49E-08	2.71E-02	
20955	7G8	H0.24	L0	※	※	
20956	7G8	H0.25	L0	9.22E-08	6.99E-02	
20957	7G8	H0.26	L0	1.09E-07	1.18E-01	
20958	7G8	H0.27	L0	3.45E-08	5.35E-02	
20959	7G8	H0.28	L0	5.30E-08	5.63E-02	
20960	7G8	H0.29	L0	6.01E-08	4.73E-02	
20961	7G8	H0.30	L0	2.31E-08	2.00E-02	
20962	7G8	H0.31	L0	1.05E-08	1.29E-02	
20963	7G8	H0.32	L0	6.80E-08	5.77E-02	
20964	7G8	H0.33	L0	6.46E-08	1.61E-02	
20965	7G8	H0.34	L0	3.29E-08	1.77E-02	
20966	7G8	H0.35	L0	8.17E-08	1.70E-02	
20967	7G8	H0.36	L0	3.61E-07	1.49E-01	
20968	7G8	H0.37	L0	8.90E-08	1.33E-01	
20969	7G8	H0.38	L0	1.00E-07	1.66E-01	
20970	7G8	H0.39	L0	1.19E-07	1.62E-01	
20971	7G8	H0.40	L0	2.45E-07	1.49E-01	
20972	7G8	H0.41	L0	6.40E-08	1.48E-01	
20973	7G8	H0.42	L0	5.41E-08	1.17E-01	
20974	7G8	H0.43	L0	1.30E-06	4.23E-01	
20975	7G8	H0.44	L0	5.03E-07	2.47E-01	
20976	7G8	H0.45	L0	3.41E-08	5.79E-02	
20977	7G8	H0.46	L0	2.45E-08	4.35E-02	
20978	7G8	H0.47	L0	3.94E-08	3.73E-02	
20979	7G8	H0.48	L0	3.16E-08	3.07E-02	
20980	7G8	H0.49	L0	2.89E-08	2.66E-02	
20981	7G8	H0.50	L0	2.70E-08	2.71E-02	
20982	7G8	H0.51	L0	3.12E-08	3.57E-02	
20983	7G8	H0.52	L0	3.38E-08	2.95E-02	
20984	7G8	H0.53	L0	3.05E-08	2.31E-02	
20985	7G8	H0.54	L0	6.81E-08	5.02E-02	

10

20

【図 5 6 C】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
20986	7G8	H0.55	L0	4.72E-08	4.53E-02	
20987	7G8	H0.56	L0	1.37E-07	1.06E-01	
20988	7G8	H0.57	L0	5.69E-08	4.86E-02	
20989	7G8	H0.58	L0	6.58E-08	6.12E-02	
20990	7G8	H0.59	L0	3.52E-07	8.60E-02	
20991	7G8	H0.60	L0	7.59E-08	6.07E-02	
20992	7G8	H0.61	L0	1.86E-06	2.22E-01	
20993	7G8	H0.62	L0	3.12E-08	3.17E-02	
20994	7G8	H0.63	L0	2.50E-07	1.67E-01	
20995	7G8	H0.64	L0	9.55E-08	6.47E-02	
20996	7G8	H0.65	L0	1.53E-06	2.43E-01	
21001	7G8	H0.66	L0	3.19E-06	1.47E-01	
21002	7G8	H0.67	L0	1.12E-06	3.70E-01	
21003	7G8	H0.68	L0	7.10E-06	3.57E-01	
21004	7G8	H0.69	L0	1.34E-07	1.39E-01	
21005	7G8	H0.70	L0	1.45E-07	8.55E-02	
21006	7G8	H0.71	L0	2.35E-08	2.46E-02	
21007	7G8	H0.72	L0	4.36E-08	4.93E-02	
21008	7G8	H0.73	L0	1.57E-07	8.04E-02	
21009	7G8	H0.74	L0	6.39E-08	5.12E-02	
21010	7G8	H0.75	L0	9.21E-08	8.34E-02	
21011	7G8	H0.76	L0	5.84E-08	8.50E-02	
21012	7G8	H0.77	L0	1.07E-07	6.84E-02	
21013	7G8	H0.78	L0	1.56E-07	9.33E-02	
21014	7G8	H0.79	L0	5.11E-08	5.02E-02	
21015	7G8	H0.80	L0	1.11E-07	6.42E-02	
21016	7G8	H0.81	L0	6.41E-08	7.22E-02	
21017	7G8	H0.82	L0	1.08E-07	1.12E-01	
21018	7G8	H0.83	L0	3.88E-08	5.32E-02	
21019	7G8	H0.84	L0	1.04E-07	1.06E-01	
21020	7G8	H0.85	L0	5.13E-08	5.55E-02	
21021	7G8	H0.86	L0	8.11E-08	8.50E-02	
21022	7G8	H0.87	L0	1.61E-07	1.14E-01	
21023	7G8	H0.88	L0	8.22E-08	9.43E-02	
21024	7G8	H0.89	L0	6.36E-08	9.23E-02	
21025	7G8	H0.90	L0	6.07E-08	6.79E-02	
21026	7G8	H0.91	L0	8.91E-08	9.16E-02	
21027	7G8	H0.92	L0	7.61E-08	7.27E-02	

【図 5 6 D】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21028	7G8	H0.93	L0	6.69E-08	6.88E-02	
21029	7G8	H0.94	L0	9.67E-08	2.04E-01	
21030	7G8	H0.95	L0	3.11E-08	3.15E-02	
21031	7G8	H0.96	L0	3.74E-08	3.89E-02	
21032	7G8	H0.97	L0	4.45E-08	3.44E-02	
21033	7G8	H0.98	L0	3.64E-08	2.58E-02	
21034	7G8	H0.99	L0	2.23E-08	1.77E-02	
21035	7G8	H0.100	L0	3.37E-08	2.26E-02	
21036	7G8	H0.101	L0	2.27E-08	1.79E-02	
21037	7G8	H0.102	L0	1.64E-08	1.84E-02	
21038	7G8	H0.103	L0	1.09E-08	1.03E-02	
21039	7G8	H0.104	L0	7.96E-08	4.16E-01	
21040	7G8	H0.105	L0	3.54E-08	2.87E-02	
21041	7G8	H0.106	L0	5.76E-08	3.36E-01	
21042	7G8	H0.107	L0	5.06E-08	3.82E-02	
21043	7G8	H0.110	L0	1.16E-07	4.05E-02	
21044	7G8	H0.111	L0	2.33E-07	2.48E-01	
21045	7G8	H0.112	L0	4.31E-07	5.82E-01	
21046	7G8	H0.114	L0	4.20E-08	7.45E-02	
21047	7G8	H0.115	L0	6.98E-08	7.11E-02	
21048	7G8	H0.116	L0	3.52E-08	3.42E-02	
21049	7G8	H0.117	L0	8.34E-07	2.83E-01	
21050	7G8	H0.118	L0	1.50E-07	1.23E-01	
21051	7G8	H0.119	L0	2.71E-08	4.85E-02	
21052	7G8	H0.120	L0	8.60E-08	7.91E-02	
21053	7G8	H0.121	L0	1.92E-07	3.86E-01	
21054	7G8	H0.122	L0	4.63E-08	2.90E-02	
21055	7G8	H0.123	L0	6.45E-07	1.88E-01	
21056	7G8	H0.124	L0	2.15E-07	2.02E-01	
21057	7G8	H0.125	L0	9.51E-07	1.77E-01	
21058	7G8	H0.126	L0	3.12E-07	1.44E-01	
21059	7G8	H0.127	L0	1.35E-07	1.43E-01	
21060	7G8	H0.128	L0	1.34E-07	1.68E-01	
21061	7G8	H0.129	L0	1.17E-08	1.53E-02	
21062	7G8	H0.130	L0	1.24E-07	9.49E-02	
21063	7G8	H0.131	L0	1.44E-07	6.58E-01	
21064	7G8	H0.132	L0	3.56E-05	2.33E-02	
21065	7G8	H0.134	L0	<1.0E-12	<1.0E-07	

30

40

50

【図 5 6 E】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21066	7G8	H0.141	L0	1.11E-07	2.25E-01	
21067	7G8	H0.142	L0	6.72E-08	8.34E-02	
21068	7G8	H0.143	L0	2.35E-07	2.77E-01	
21069	7G8	H0.145	L0	6.09E-08	6.17E-02	
21070	7G8	H0.146	L0	5.40E-08	9.04E-02	
21071	7G8	H0.147	L0	5.53E-07	3.88E-01	
21072	7G8	H0.148	L0	2.10E-07	1.79E-01	
21074	7G8	H0	L0.1	9.61E-08	1.30E-01	
21075	7G8	H0	L0.2	8.81E-08	9.74E-02	
21076	7G8	H0	L0.3	1.86E-07	2.70E-01	
21077	7G8	H0	L0.4	1.09E-07	1.76E-01	
21078	7G8	H0	L0.5	4.48E-08	4.49E-01	
21079	7G8	H0	L0.6	1.28E-07	1.39E-01	
21080	7G8	H0	L0.7	5.79E-06	7.16E-02	
21081	7G8	H0	L0.8	1.16E-07	4.00E-01	
21082	7G8	H0	L0.9	8.20E-06	1.43E-01	
21083	7G8	H0	L0.10	6.42E-08	1.08E-01	
21084	7G8	H0	L0.11	2.70E-08	2.64E-02	
21085	7G8	H0	L0.12	6.51E-08	7.19E-02	
21086	7G8	H0	L0.13	7.75E-08	1.04E-01	
21087	7G8	H0	L0.14	1.19E-07	2.90E-01	
21088	7G8	H0	L0.15	1.57E-07	3.83E-01	
21089	7G8	H0	L0.16	0.00E+00	<1.0E-07	
21090	7G8	H0	L0.17	2.80E-07	3.17E-01	
21091	7G8	H0	L0.18	6.26E-05	2.72E+01	
21092	7G8	H0	L0.19	1.27E-06	2.47E-01	
21093	7G8	H0	L0.20	5.16E-08	7.64E-02	
21094	7G8	H0	L0.21	5.43E-08	8.04E-02	
21095	7G8	H0	L0.22	1.06E-07	1.33E-01	
21096	7G8	H0	L0.23	5.58E-08	1.71E-01	
21101	7G8	H0	L0.24	4.43E-08	1.79E-01	
21102	7G8	H0	L0.25	6.10E-08	1.51E-01	
21103	7G8	H0	L0.26	7.99E-08	1.48E-01	
21104	7G8	H0	L0.27	5.62E-08	1.35E-01	
21105	7G8	H0	L0.28	7.77E-08	9.49E-02	
21106	7G8	H0	L0.29	7.83E-08	5.16E-02	
21107	7G8	H0	L0.30	5.72E-08	4.66E-02	
21108	7G8	H0	L0.31	1.05E-07	4.67E-02	

【図 5 6 F】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21109	7G8	H0	L0.32	4.68E-08	4.50E-02	
21110	7G8	H0	L0.33	6.87E+05	4.23E+08	
21111	7G8	H0	L0.34	2.75E-08	2.68E-02	
21112	7G8	H0	L0.35	9.77E-08	8.71E-02	
21113	7G8	H0	L0.36	1.20E-07	6.11E-02	
21114	7G8	H0	L0.37	3.00E-08	3.15E-02	
21115	7G8	H0	L0.38	1.12E-07	7.85E-02	
21116	7G8	H0	L0.39	3.17E-08	5.71E-02	
21117	7G8	H0	L0.40	2.27E-07	7.01E-01	
21118	7G8	H0	L0.41	8.48E-08	1.31E-01	
21119	7G8	H0	L0.42	2.50E-10	4.30E-03	
21120	7G8	H0	L0.43	2.39E-07	2.12E-01	
21121	7G8	H0	L0.44	2.46E-06	1.14E-01	
21122	7G8	H0	L0.45	1.75E-07	5.49E-01	
21123	7G8	H0	L0.46	2.60E-06	3.50E-01	
21124	7G8	H0	L0.47	6.27E-08	5.49E-02	
21125	7G8	H0	L0.48	3.15E-08	3.71E-02	
21126	7G8	H0	L0.49	5.22E-08	5.09E-02	
21127	7G8	H0	L0.50	4.37E-08	3.69E-02	
21128	7G8	H0	L0.51	2.23E-09	1.89E-02	
21129	7G8	H0	L0.52	5.88E-08	9.73E-02	
21130	7G8	H0	L0.53	3.55E-08	3.99E-02	
21131	7G8	H0	L0.54	8.64E-08	1.08E-01	
21132	7G8	H0	L0.55	※、	※、	
21133	7G8	H0	L0.56	6.02E-07	2.78E-01	
21134	7G8	H0	L0.57	3.63E-08	3.47E-02	
21135	7G8	H0	L0.58	1.65E-07	9.58E-02	
21136	7G8	H0	L0.59	2.27E-08	2.30E-02	
21137	7G8	H0	L0.60	2.65E-08	3.61E-02	
21138	7G8	H0	L0.61	9.30E-08	1.32E-01	
21139	7G8	H0	L0.62	2.91E-08	3.44E-02	
21140	7G8	H0	L0.63	3.40E-08	3.40E-02	
21141	7G8	H0	L0.64	3.69E-08	2.72E-02	
21142	7G8	H0	L0.65	3.09E-08	4.10E-02	
21143	7G8	H0	L0.66	7.34E-08	1.20E-01	
21144	7G8	H0	L0.67	1.26E-07	6.24E-02	
21145	7G8	H0	L0.68	8.99E-08	3.43E-01	
21146	7G8	H0	L0.69	5.94E-08	2.05E-01	

10

20

【図 5 6 G】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21147	7G8	H0	L0.70	4.22E-08	8.54E-02	
21148	7G8	H0	L0.71	1.79E-07	2.51E-01	
21149	7G8	H0	L0.72	1.23E-07	2.35E-01	
21150	7G8	H0	L0.73	7.55E-08	1.58E-01	
21151	7G8	H0	L0.74	1.64E-07	1.84E-01	
21152	7G8	H0	L0.75	9.32E-08	1.42E-01	
21153	7G8	H0	L0.76	※、	※、	
21154	7G8	H0	L0.77	1.87E-07	8.91E-02	
21155	7G8	H0	L0.78	2.94E-07	4.70E-02	
21156	7G8	H0	L0.79	※、	※、	
21157	7G8	H0	L0.80	※、	※、	
21158	7G8	H0	L0.81	※、	※、	
21159	7G8	H0	L0.82	6.04E-07	4.40E-01	
21160	7G8	H0	L0.83	6.50E-08	3.50E-02	
21161	7G8	H0	L0.84	3.52E-06	1.08E-01	
21162	7G8	H0	L0.85	9.89E-08	4.37E-02	
21163	7G8	H0	L0.86	4.90E-08	4.85E-02	
21164	7G8	H0	L0.87	1.25E-07	1.41E-01	
21165	7G8	H0	L0.88	1.90E-07	1.87E-01	
21166	7G8	H0	L0.89	3.52E-06	6.60E-02	
21167	7G8	H0	L0.90	2.54E-08	2.01E-02	
21168	7G8	H0	L0.91	1.12E-06	1.99E-01	
21169	7G8	H0	L0.92	1.20E-07	7.65E-02	
21170	7G8	H0	L0.93	4.81E-08	5.41E-02	
21171	7G8	H0	L0.94	6.64E-07	1.82E-01	
21172	7G8	H0	L0.95	7.61E-08	8.11E-02	
21173	7G8	H0	L0.96	7.95E-07	8.67E-02	
21174	7G8	H0	L0.97	6.75E-08	6.60E-02	
21175	7G8	H0	L0.98	6.19E-08	4.49E-02	
21176	7G8	H0	L0.99	3.97E-08	4.14E-02	
21177	7G8	H0	L0.100	8.53E-08	5.75E-02	
21178	7G8	H0	L0.101	3.33E-07	1.95E+00	
21179	7G8	H0	L0.102	1.04E-07	2.79E-01	
21180	7G8	H0	L0.103	1.50E-07	2.14E+01	
21181	7G8	H0	L0.104	6.11E+16	2.82E+26	
21182	7G8	H0	L0.105	※、	※、	
21183	7G8	H0	L0.106	3.27E+06	7.92E-02	
21184	7G8	H0	L0.107	※、	※、	

【図 5 6 H】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21558	7G8	H3.1	L0.59	7.44E-09	4.35E-03	
21559	7G8	H3.4	L0.59	6.72E-09	4.71E-03	
21560	7G8	H0.129	L0.59	7.05E-09	6.94E-03	
21561	7G8	H0.31	L0.59	6.39E-09	6.75E-03	
21562	7G8	H0.103	L0.59	3.09E-08	5.24E-03	
21563	7G8	H0.71	L0.59	7.04E-09	7.48E-03	
21564	7G8	H3.1	L0	6.73E-09	6.58E-03	
21565	7G8	H3.4	L0	8.47E-09	8.54E-03	
21566	7G8	H3.1	L0.11	4.56E-08	3.76E-02	
21567	7G8	H3.4	L0.11	5.84E-08	4.23E-02	
21568	7G8	H0.129	L0.11	1.26E-07	8.67E-02	
21569	7G8	H3.1	L0.34	1.05E-08	7.33E-03	
21570	7G8	H3.4	L0.34	1.13E-08	9.28E-03	
21571	7G8	H0.129	L0.34	1.33E-08	1.29E-02	
21662	7G8	H3.18	L1	3.04E-09	3.04E-03	
21663	7G8	H3.15	L1	3.50E-09	2.64E-03	
21664	7G8	H3.19	L1	7.41E-09	7.68E-03	
21665	7G8	H3.17	L1	4.07E-09	3.47E-03	
21666	7G8	H3.16	L1	1.63E-08	4.73E-03	
21667	7G8	H3.21	L1	8.57E-09	2.33E-03	
21668	7G8	H3.22	L1			
21669	7G8	H3.23	L1	4.10E-09	3.88E-03	
21670	7G8	H3.18	L1.11	2.88E-09	2.39E-03	54.5
21671	7G8	H3.15	L1.11	2.76E-09	2.48E-03	
21672	7G8	H3.19	L1.11	4.23E-09	4.54E-03	
21673	7G8	H3.17	L1.11	3.75E-09	2.73E-03	
21674	7G8	H3.16	L1.11	1.16E-08	3.38E-03	
21675	7G8	H3.21	L1.11	9.61E-09	2.05E-03	
21676	7G8	H3.22	L1.11			
21677	7G8	H3.23	L1.11	2.83E-09	2.29E-03	
21678	7G8	H3.18	L1.13	6.65E-09	5.02E-03	
21679	7G8	H3.15	L1.13	8.37E-09	4.87E-03	
21680	7G8	H3.19	L1.13	1.70E-08	9.72E-03	
21681	7G8	H3.17	L1.13	1.19E-08	7.68E-03	
21682	7G8	H3.16	L1.13	2.95E-08	1.38E-02	
21683	7G8	H3.21	L1.13	1.10E-08	5.13E-03	
21684	7G8	H3.22	L1.13			
21685	7G8	H3.23	L1.13	1.02E-08	7.76E-03	

30

40

50

【図 5 6 I】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
21686	7G8	H3.18	L1.15	9.47E-09	7.62E-03	
21687	7G8	H3.15	L1.15	2.04E-08	7.79E-03	
21688	7G8	H3.19	L1.15	1.75E-08	1.04E-02	
21689	7G8	H3.17	L1.15	2.19E-08	1.21E-02	
21690	7G8	H3.16	L1.15	9.19E-08	9.61E-03	
21691	7G8	H3.21	L1.15	2.34E-08	8.44E-03	
21692	7G8	H3.22	L1.15	2.12E-08	1.31E-02	
21693	7G8	H3.23	L1.15	8.80E-09	6.46E-03	
21694	7G8	H3	L1.9	3.14E-07	1.16E-01	
21695	7G8	H3	L1.10	8.99E-08	3.06E-02	
21696	7G8	H3	L1.11	4.10E-08	1.48E-02	
21701	7G8	H3	L1.12	4.12E-06	2.07E-01	
21702	7G8	H3	L1.13	2.91E-07	8.61E-02	
21703	7G8	H3	L1.14	1.34E-07	2.39E-02	
21704	7G8	H3	L1.15	1.08E-06	3.49E-01	
21742	7G8	H3.11	L1.13	1.85E-08	1.25E-02	
21743	7G8	H3.4	L1.13	2.90E-08	2.04E-02	
21744	7G8	H3.1	L1.13	4.92E-08	1.89E-02	
21745	7G8	H3.11	L1.15	1.84E-08	1.33E-02	
21746	7G8	H3.4	L1.15	4.31E-08	1.71E-02	
21747	7G8	H3.1	L1.15	2.69E-07	0.0364	
21889	7G8	H3.27	L1	2.48E-09	3.04E-03	
21890	7G8	H3.27	L1.11	2.20E-09	1.81E-03	
21891	7G8	H3.27	L1.13	5.02E-09	5.79E-03	
21892	7G8	H3.28	L1	3.55E-09	4.33E-03	
21893	7G8	H3.28	L1.11	2.10E-09	2.67E-03	
21894	7G8	H3.28	L1.13	6.83E-09	7.95E-03	
22379	7G8	H3.29	L1.11			
22380	7G8	H3.30	L1.11	2.07E-09	2.11E-03	59.5
22381	7G8	H3.31	L1.11	6.94E-09	6.82E-03	
22382	7G8	H3.32	L1.11			
22383	7G8	H3.33	L1.11	6.00E-09	5.14E-03	62.5
22384	7G8	H3.34	L1.11	9.12E-09	2.43E-03	55.0
22385	7G8	H3.35	L1.11	3.18E-09	2.66E-03	56.0
22386	7G8	H3.36	L1.11			
22387	7G8	H3.37	L1.11			
22388	7G8	H3.38	L1.11			
22389	7G8	H3.39	L1.11	3.57E-09	2.54E-03	

【図 5 6 J】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
22390	7G8	H3.40	L1.11			
22391	7G8	H3.41	L1.11			
22392	7G8	H3.42	L1.11			
22393	7G8	H3.43	L1.11			
22394	7G8	H3.44	L1.11			
22395	7G8	H3.45	L1.11			
22396	7G8	H3.46	L1.11			
22401	7G8	H3.47	L1.11	3.50E-09	2.68E-03	
22402	7G8	H3.48	L1.11			
22403	7G8	H3.49	L1.11	2.37E-09	2.85E-03	55.0
22404	7G8	H3.50	L1.11			
22405	7G8	H3.51	L1.11			
22406	7G8	H3.52	L1.11			
22407	7G8	H3.53	L1.11			
22408	7G8	H3.18	L1.16	2.83E-09	3.27E-03	58.0
22409	7G8	H3.18	L1.17	3.04E-09	3.25E-03	56.0
22410	7G8	H3.18	L1.18			
22411	7G8	H3.18	L1.19			
22412	7G8	H3.18	L1.20			
22413	7G8	H3.18	L1.21			
22414	7G8	H3.18	L1.22			
22415	7G8	H3.18	L1.23			
22416	7G8	H3.18	L1.24			
22417	7G8	H3.18	L1.25			
22418	7G8	H3.18	L1.26			
22419	7G8	H3.18	L1.27			
22420	7G8	H3.18	L1.28	2.36E-09	2.55E-03	
22421	7G8	H3.18	L1.29			
22422	7G8	H3.18	L1.30	1.95E-09	3.13E-03	63.0
22423	7G8	H3.18	L1.31	2.65E-09	2.84E-03	
22424	7G8	H3.18	L1.32	2.98E-09	2.95E-03	
22425	7G8	H3.18	L1.33			
22582	7G8	H3.30	L1.30	2.34E-09	2.03E-03	67.5
22583	7G8	H3.33	L1.30	4.51E-09	3.15E-03	68.5
22588	7G8	H3.54	L1.30	8.45E-10	2.18E-03	65.5
22589	7G8	H3.55	L1.30	2.86E-09	4.56E-03	67.5
22590	7G8	H3.56	L1.30	4.85E-08	1.55E-03	66.5
22591	7G8	H3.57	L1.30	3.24E-09	3.45E-03	68.5

10

20

【図 5 6 K】

XENP	クローン	VH	VL	KD (M)	kdis(1/s)	DSF T _M (°C)
22592	7G8	H3.58	L1.30	1.97E-09	2.31E-03	67.0
22593	7G8	H3.59	L1.30	3.54E-09	3.88E-03	69.0
22594	7G8	H3.30	L1.34	6.30E-10	1.48E-03	68.5
22595	7G8	H3.30	L1.36	2.86E-09	2.86E-03	69.5
22596	7G8	H3.33	L1.34	3.45E-09	3.02E-03	68.5
22601	7G8	H3.33	L1.36	1.09E-08	6.95E-03	70.0

【図 5 7 A】

XENP	F a b 関 (抗LAG-3)	s c F y 関 (抗CTLA-4)	ヒトLAG-3 KD (M)
22518	2A11_H1.144_L2.133	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.7E-09
22506	2A11_H1.144_L2.113	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	2.0E-10
22505	2A11_H1.125_L2.113	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	4.0E-10
22509	2A11_H1_L2.113	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	7.8E-10
20444	2A11_H1L2	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	3.5E-09
21859	2A11_H1_L2.47	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	3.5E-10
21860	2A11_H1_L2.50	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.2E-09
22507	2A11_H1.117_L2.116	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	6.2E-10
22508	2A11_H1.144_L2	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.2E-09
22510	2A11_H1_L2.25	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	2.3E-08
22630	2A11_H1.144_L2.137	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	9.4E-10

30

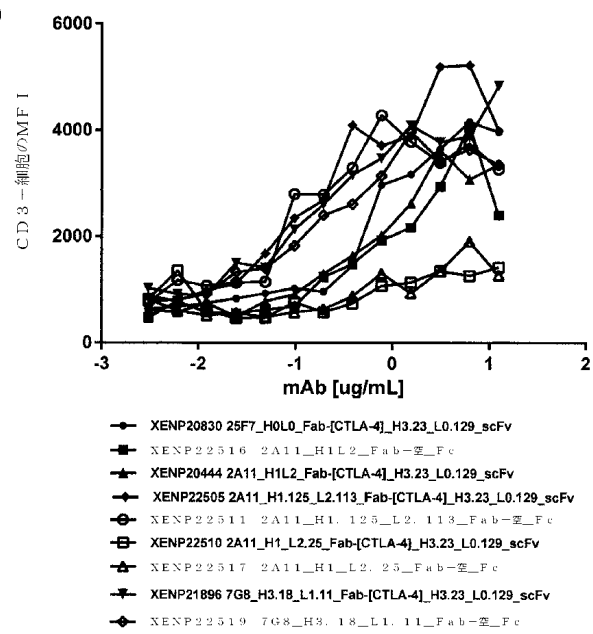
40

50

【図 5 7 B】

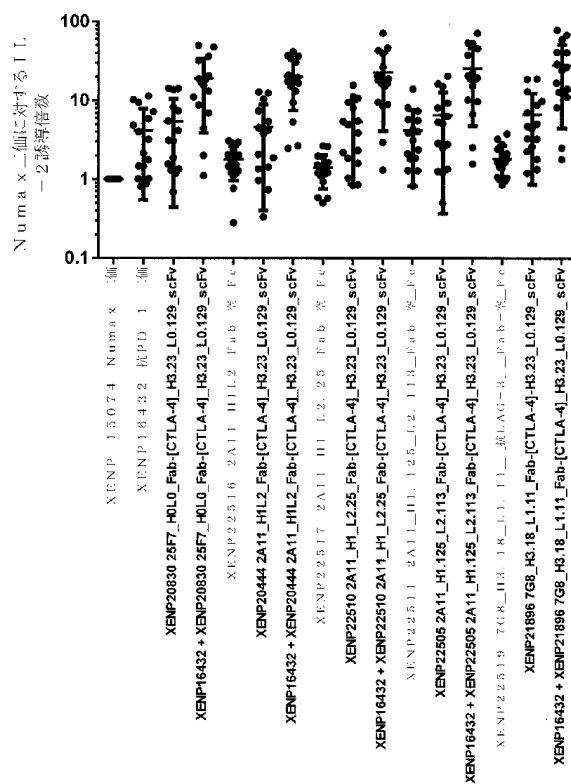
XENP	Fab側 (抗LAG-3)	scFv側 (抗CTLA-4)	ヒトLAG-3 KD (nM)
20833	7G8_H3L1	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	9.1
21895	7G8_H3.18_L1	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.1
21896	7G8_H3.18_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.0
21901	7G8_H3.15_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	
21902	7G8_H3.23_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.1
21903	7G8_H3.18_L1.13	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	2.2
21904	7G8_H3.28_L1	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.7
21905	7G8_H3.28_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.1
21906	7G8_H3.28_L1.13	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	2.1
22555	7G8_H3.30_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.2
22556	7G8_H3.33_L1.11	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	2.6
22557	7G8_H3.18_L1.30	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	0.7
22558	7G8_H3.30_L1.30	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	0.3
22559	7G8_H3.33_L1.30	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	1.6
22602	7G8_H3.30_L1.34	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	0.2
22603	7G8_H3.30_L1.36	[CTLA-4]_H3.23_L0.129	0.4

【図 5 8】

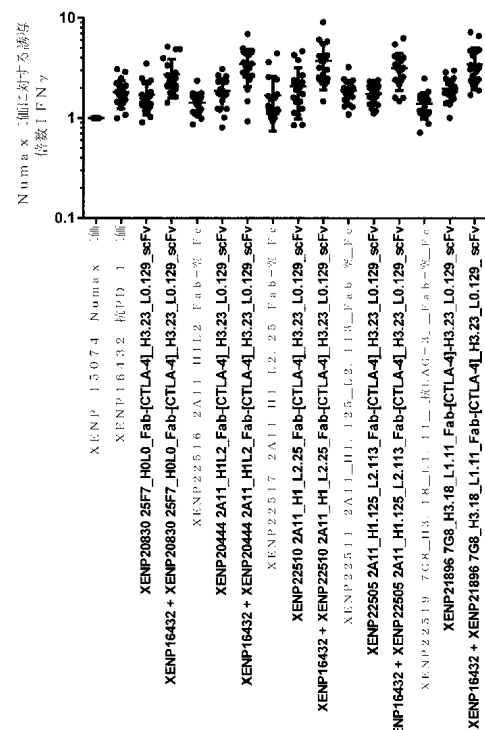


10

【図 5 9 A】



【図 5 9 B】



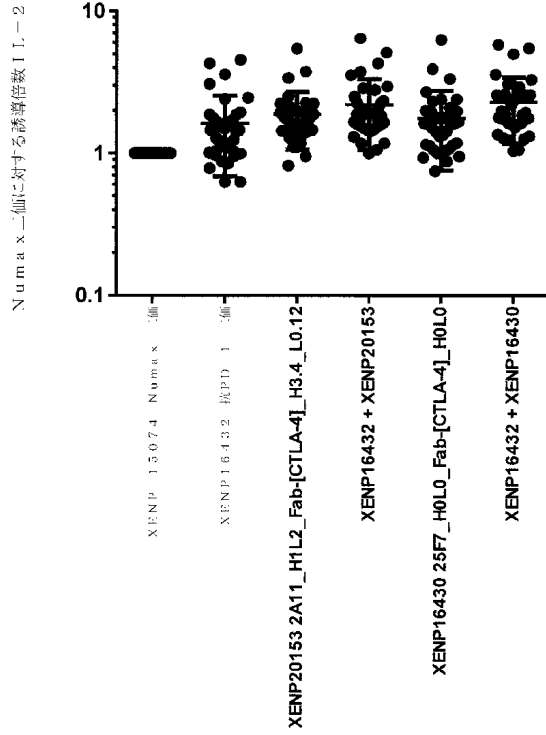
20

30

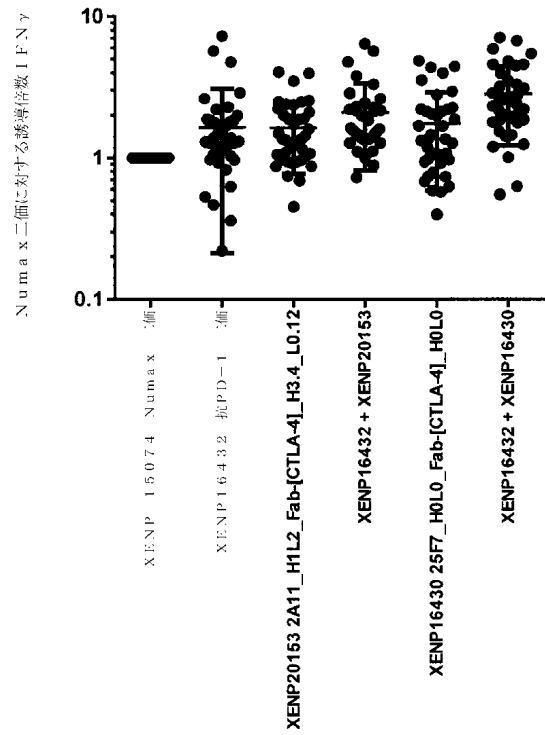
40

50

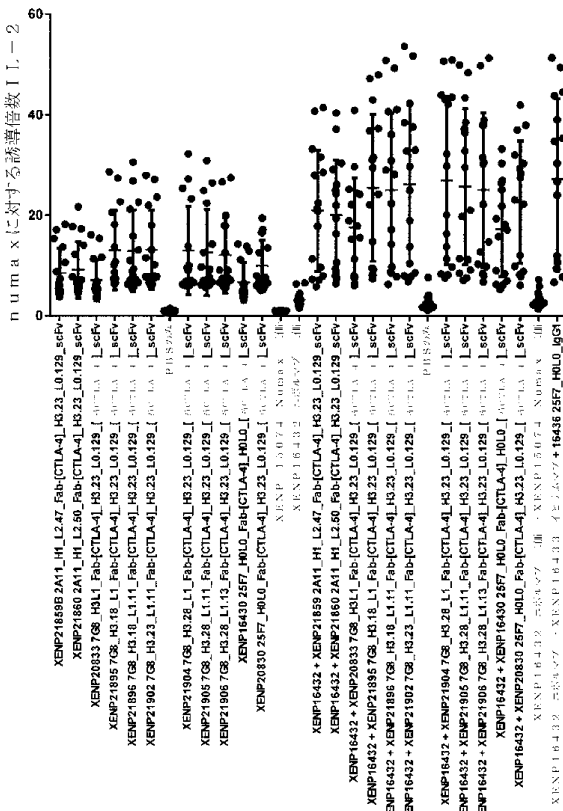
【図 6 0 A】



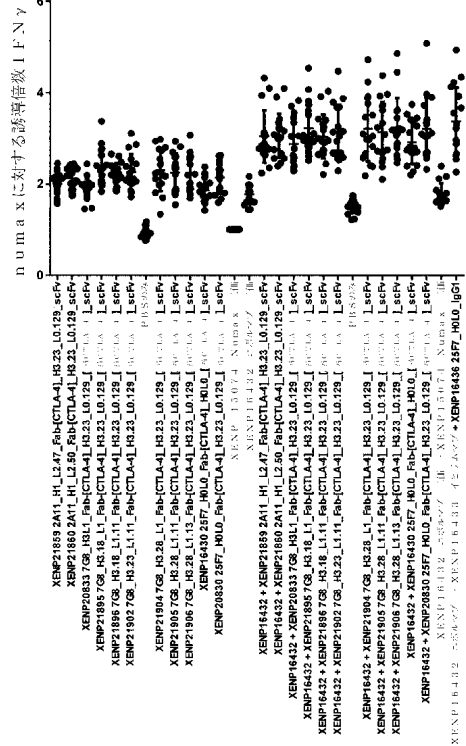
【図 6 0 B】



【図 6 1 A】



【図 6 1 B】



10

20

30

40

50

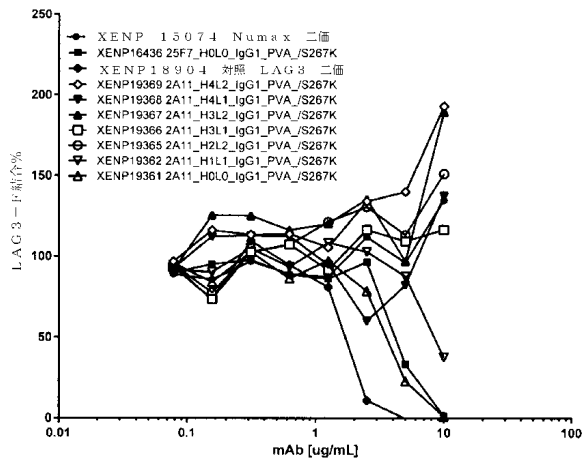
【図 6 2 A】

XENP	F a b 側 (抗 LAG-3)	s c F v 側 (抗 PD-1)	ヒト LAG-3 KD (M)
20206	2A11_H1L2	1G6_L1.194_H1.279	2.2E-09
21584	2A11_H1_L2.93	1G6_L1.194_H1.279	1.4E-08
22123	2A11_H1_L2.122	1G6_L1.194_H1.279	1.9E-08
22125	2A11_H1_L2.124	1G6_L1.194_H1.279	2.0E-08
21582	2A11_H1_L2.91	1G6_L1.194_H1.279	6.2E-09
22627	2A11_H1.144_L2.133	1G6_L1.194_H1.279	3.8E-10
22628	2A11_H1.125_L2.113	1G6_L1.194_H1.279	<1.0E-12
22629	2A11_H1.144_L2.113	1G6_L1.194_H1.279	4.4E-11

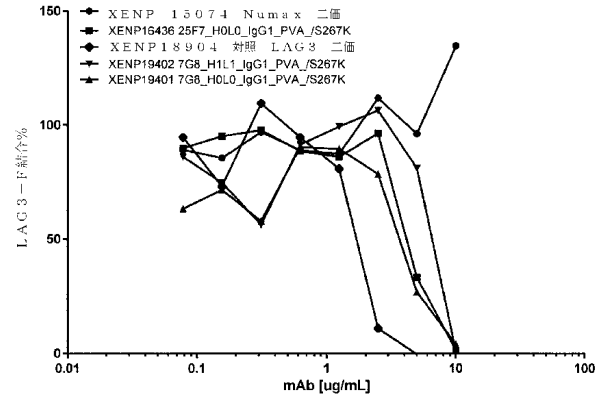
【図 6 2 B】

XENP	F a b 側 (抗 LAG-3)	s c F v 側 (抗 PD-1)	ヒト LAG-3 KD (nM)
22521	7G8_H3.18_L1.11	1G6_L1.194_H1.279	NT
22522	7G8_H3.28_L1.13	1G6_L1.194_H1.279	NT
22565	7G8_H3.30_L1.11	1G6_L1.194_H1.279	NT
22566	7G8_H3.33_L1.11	1G6_L1.194_H1.279	NT
22567	7G8_H3.18_L1.30	1G6_L1.194_H1.279	1.0
22568	7G8_H3.30_L1.30	1G6_L1.194_H1.279	0.3
22569	7G8_H3.33_L1.30	1G6_L1.194_H1.279	1.5
22604	7G8_H3.30_L1.34	1G6_L1.194_H1.279	0.5
22605	7G8_H3.30_L1.36	1G6_L1.194_H1.279	0.5

【図 6 3 A】



【図 6 3 B】



10

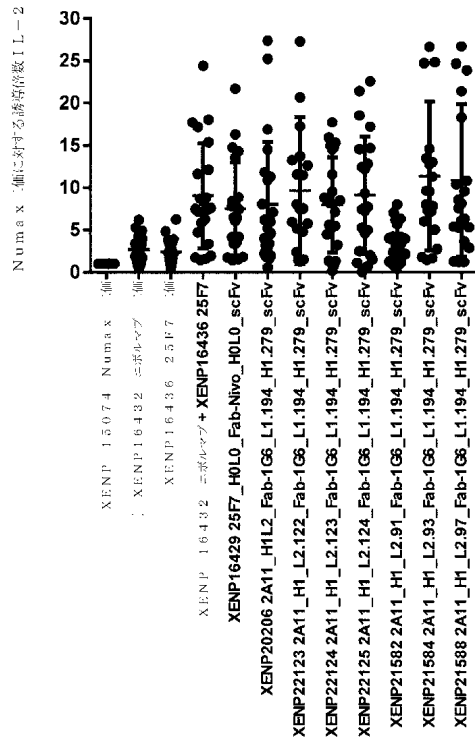
20

30

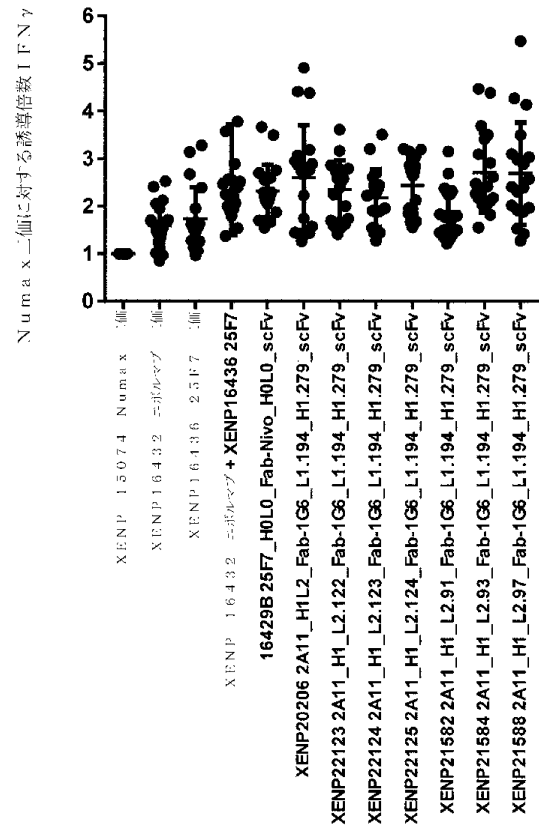
40

50

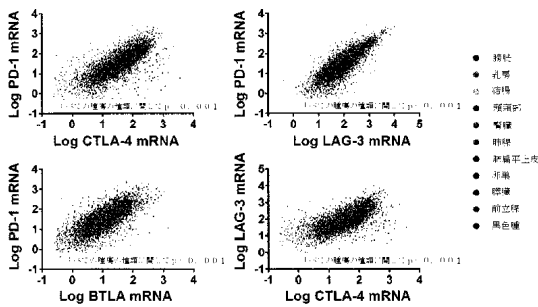
【図 6 4 A】



【図 6 4 B】

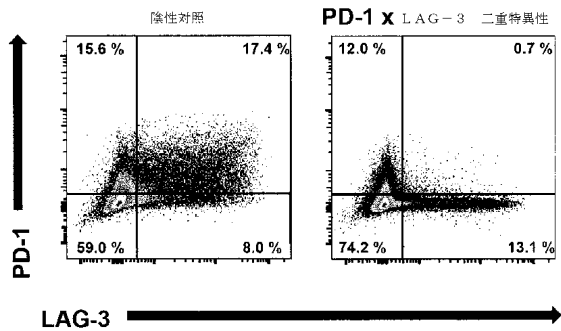


【図 6 5】



本発明の発明はTCGA Research Network: <http://cancerresome.nih.gov/>によって生成されたデータに基づいて

【図 6 6】



10

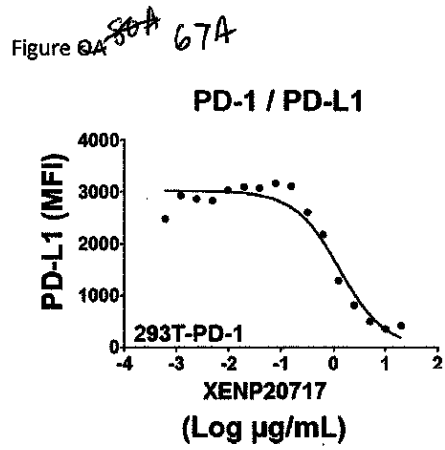
20

30

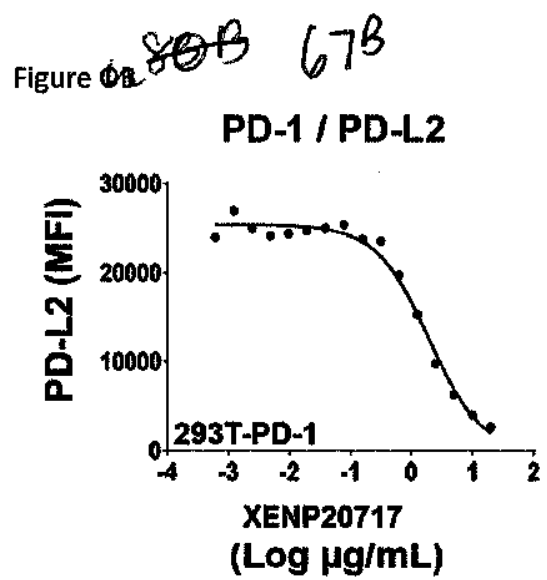
40

50

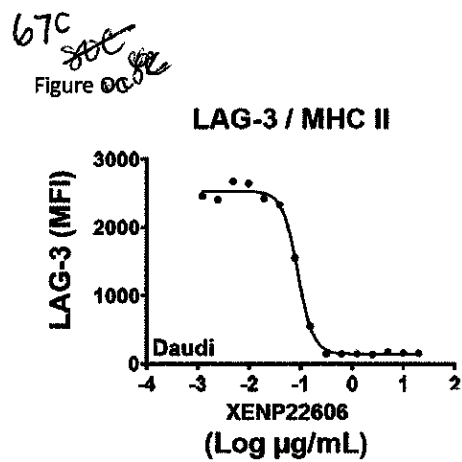
【図 6 7 A】



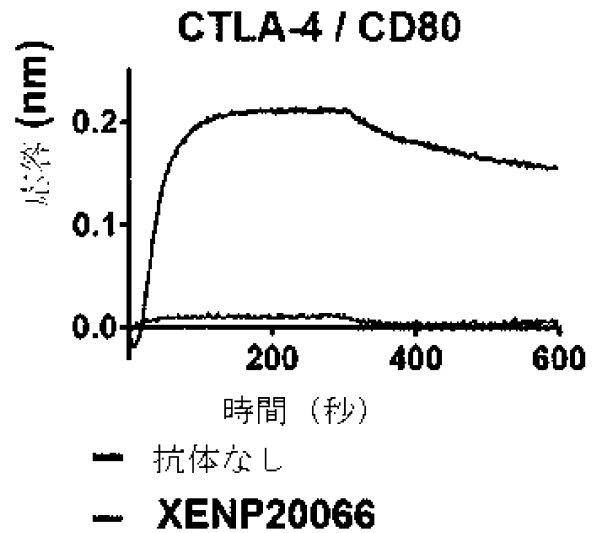
【図 6 7 B】



【図 6 7 C】



【図 6 7 D】



10

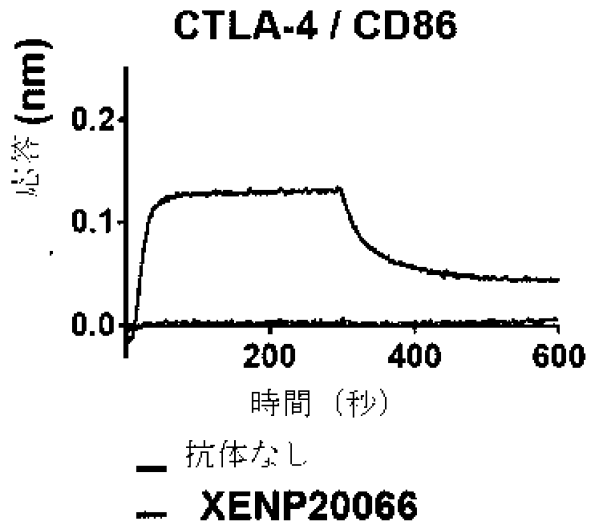
20

30

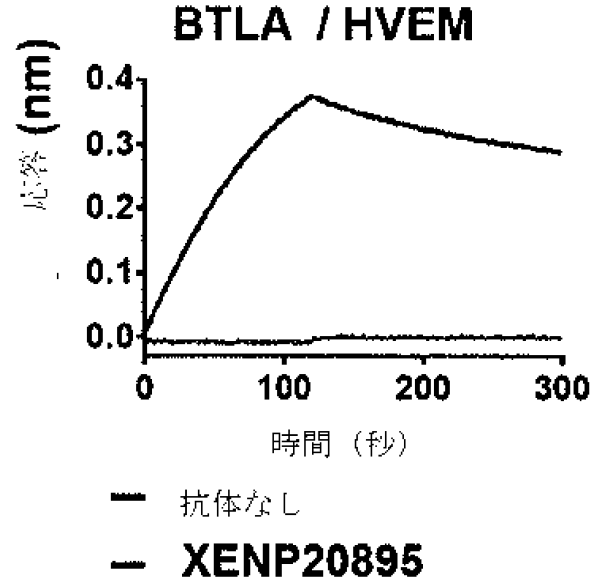
40

50

【図 6 7 E】

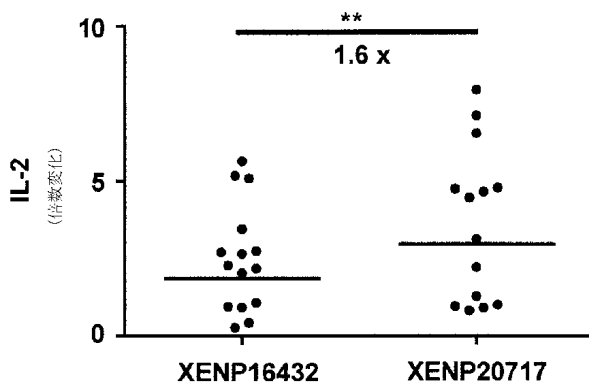


【図 6 7 F】



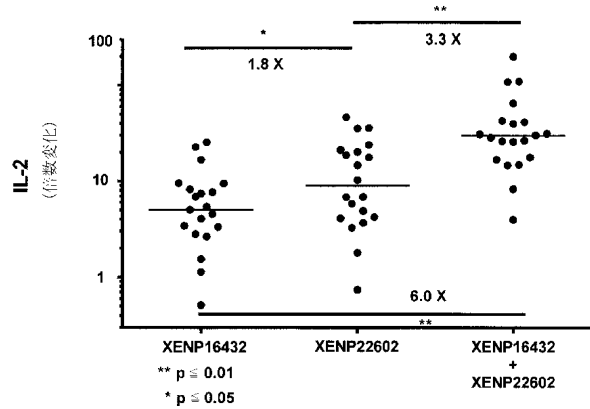
10

【図 6 8】



** $p \leq 0.01$
* $p \leq 0.05$

【図 6 9】



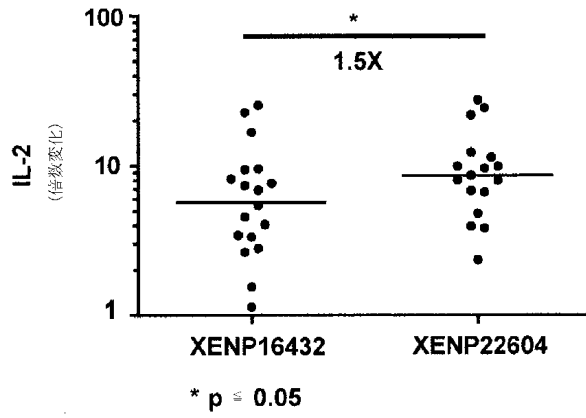
20

30

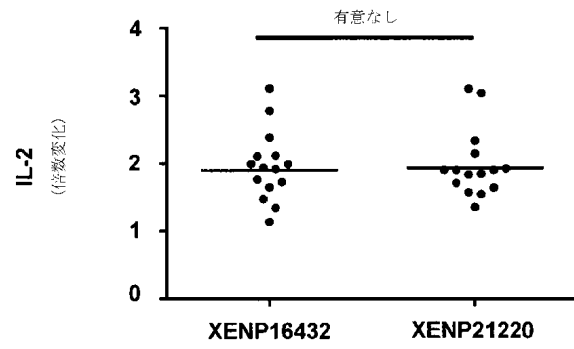
40

50

【図 7 0】

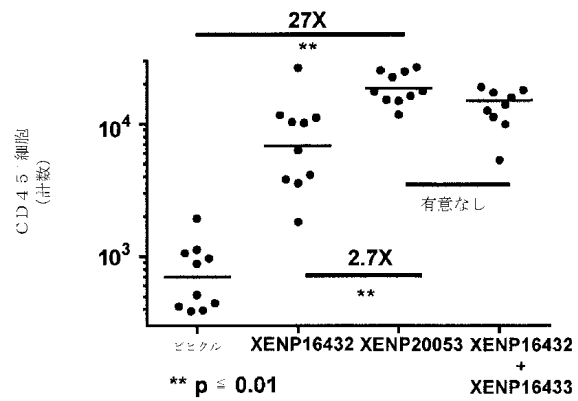


【図 7 1】

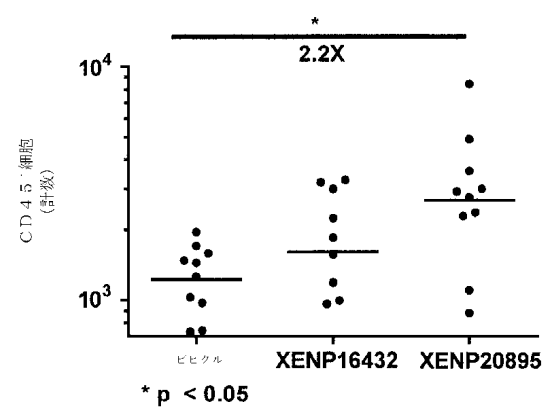


10

【図 7 2】



【図 7 3】



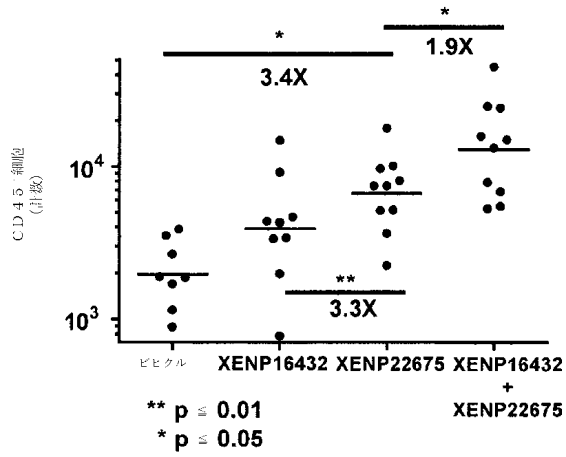
20

30

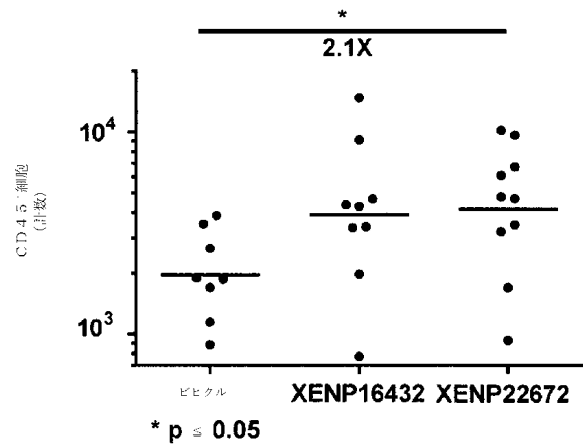
40

50

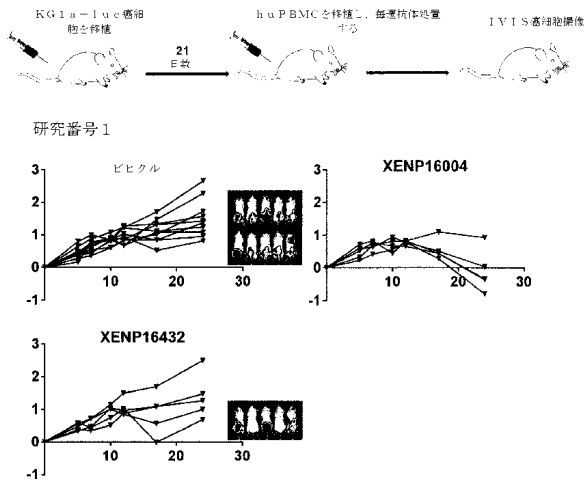
【図 7 4】



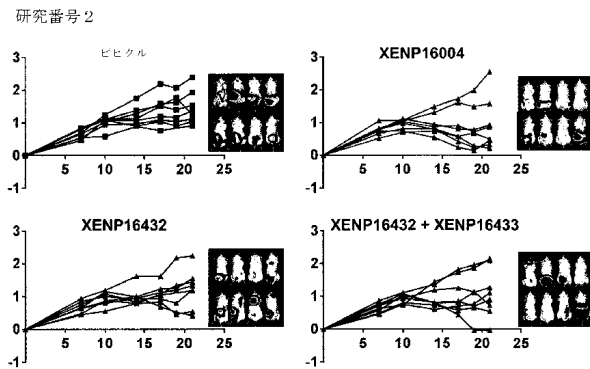
【図 7 5】



【図 7 6 A】



【図 7 6 B】



【配列表】

0007010854000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
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	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/420,500

(32)優先日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ムーア, グレゴリー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内
- (72)発明者 デスジャールレイス, ジョン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ヘドバット, マイケル
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ボンゾン, クリスティーン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ニスタール, アレックス
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロビア, ウエスト レモン アベニュー 1 1 1, ゼンコア インコーポレイテッド内

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第2015/149077 (WO, A1)
国際公開第2014/020984 (WO, A1)
国際公開第2015/103072 (WO, A1)
CLINICAL CANCER RESEARCH, 2013年10月01日, Vol. 19, No. 19, pp. 5300-5309
JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, 2014年02月18日, Vol. 2, No. 1, pp. 1-14

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90
C 0 7 K 16/00-16/46
C 1 2 P 21/08
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q