

FIG. 3E

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C H 1 ドメイン、C H 2 ドメイン、及び C H 3 ドメインを含む、免疫グロブリン足場；
抗 P D - 1 可変ドメイン、抗 P D - L 1 可変ドメイン、抗 T I G I T 可変ドメイン、及び抗 L A G - 3 可変ドメインからなる群から選択される 1 つ以上の免疫グロブリン可変ドメインを含む、第 1 の標的指向性ドメイン；

V E G F に特異的に結合し、V E G F R 由来の 1 つ以上のペプチドドメインを含む、第 2 の標的指向性ドメイン；並びに

アンジオポエチン／T i e - 2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメイン

を含む、三重特異性アンタゴニスト。

10

【請求項 2】

前記第 2 の標的指向性ドメインは、前記 C H 3 ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合され、前記第 3 の標的指向性ドメインは、前記 C H 3 ドメイン内に挿入される、請求項 1 に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 3】

前記第 1 の標的指向性ドメインは 1 つ以上の抗 P D - 1 可変ドメインを含む、請求項 1 又は 2 に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 4】

前記第 1 の標的指向性ドメインは：

(1) 3 つの相補性決定領域 (H C D R) : H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域であって、

前記 H C D R 1 は、配列番号 4 8、5 1、5 4、5 6、及び 5 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 2 は、配列番号 4 9、5 2、5 7、及び 6 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 3 は、配列番号 5 0、5 3、5 5、5 8、及び 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域と；

(2) 3 つの相補性決定領域 (L C D R) : L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、

前記 L C D R 1 は、配列番号 6 2、6 5、6 8、6 9、7 0、及び 7 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 2 は、配列番号 6 3、6 6、7 1、及び 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 3 は、配列番号 6 4、6 7、7 2、及び 7 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

20

30

【請求項 5】

前記第 1 の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号 1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、及び 1 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 8 0 % ～ 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (H C V R) ；並びに

(2) 配列番号 1 2 8、1 3 0、1 3 2、1 3 4、1 3 6、及び 1 3 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 8 0 % ～ 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (L C V R)

を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

40

【請求項 6】

前記第 1 の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン H C V R ；及び

(2) 配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン L C V R

50

を含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 7】

前記第 1 の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号 135 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン H C V R；及び

(2) 配列番号 136 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 8】

前記第 1 の標的指向性ドメインは：

(1) 3 つの相補性決定領域 (H C D R)：H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3

を含む、H C V R であって、

前記 H C D R 1 は、配列番号 56 のアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 2 は、配列番号 57 のアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 3 は、配列番号 58 のアミノ酸配列を有する、H C V R と；

(2) 3 つの相補性決定領域 (L C D R)：L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3

を含む、L C V R であって、

前記 L C D R 1 は、配列番号 70 のアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 2 は、配列番号 71 のアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 3 は、配列番号 72 のアミノ酸配列を有する、L C V R と

を含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 9】

前記第 2 の標的指向性ドメインは、配列番号 185 のアミノ酸配列を有する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 10】

前記第 3 の標的指向性ドメインは、配列番号 194 のアミノ酸配列の 1 つのコピーのみを有する、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 11】

前記第 3 の標的指向性ドメインは、配列番号 182 のアミノ酸配列を有する、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 12】

配列番号 201 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖、及び／又は配列番号 200 若しくは配列番号 202 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 13】

配列番号 232 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖、及び／又は配列番号 231 若しくは配列番号 233 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 14】

前記第 2 の標的指向性ドメインは、ペプチドリinker を介して、前記免疫グロブリン足場に構造的に結合される、請求項 2 に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 15】

前記ペプチドリinker は、配列番号 284～289 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 14 に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 16】

CH1 ドメイン、CH2 ドメイン、及び CH3 ドメインを含む、免疫グロブリン足場；

1 つ以上の抗 PD - 1 可変ドメイン、又は 1 つ以上の抗 PD - L1 可変ドメインを含む、第 1 の標的指向性ドメイン；

VEGFR の成分を含む、第 2 の標的指向性ドメイン；並びに

TGF - β 経路阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメイン

を含む、三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記第2の標的指向性ドメインは、前記CH3ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合され、前記第3の標的指向性ドメインは、前記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される、請求項16に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項18】

前記第1の標的指向性ドメインは1つ以上の抗PD-1可変ドメインを含む、請求項16又は17に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項19】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む、免疫グロブリンHCVRであって、

前記HCDR1は、配列番号48、51、54、56、及び59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記HCDR2は、配列番号49、52、57、及び60からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記HCDR3は、配列番号50、53、55、58、及び61からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンHCVRと；

(2) 3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む、免疫グロブリンLCVRであって、

前記LCDR1は、配列番号62、65、68、69、70、及び73からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記LCDR2は、配列番号63、66、71、及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記LCDR3は、配列番号64、67、72、及び75からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンLCVRと

を含む、請求項16～18のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項20】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号127、129、131、133、135、及び137からなる群から選択されるアミノ酸配列と80%～100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンHCVR；並びに／又は

(2) 配列番号128、130、132、134、136、及び138からなる群から選択されるアミノ酸配列と80%～100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンLCVR

を含む、請求項16～19のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項21】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号137のアミノ酸配列を有する免疫グロブリンHCVR；及び

(2) 配列番号138のアミノ酸配列を有する免疫グロブリンLCVR

を含む、請求項16～20のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項22】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 配列番号135のアミノ酸配列と80%～100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンHCVR；並びに

(2) 配列番号136のアミノ酸配列と80%～100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンLCVR

を含む、請求項16～21のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項23】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む、免疫グロブリンHCVRであって、

前記HCDR1は、配列番号59のアミノ酸配列を有し、
前記HCDR2は、配列番号60のアミノ酸配列を有し、
前記HCDR3は、配列番号61のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンHCVR
；並びに／又は

(2) 免疫グロブリンLCVRであって、前記軽鎖可変領域は、3つの相補性決定領域
(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

前記LCDR1は、配列番号73のアミノ酸配列を有し、
前記LCDR2は、配列番号74のアミノ酸配列を有し、
前記LCDR3は、配列番号75のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンLCVR
を含む、請求項16～20のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

10

【請求項24】

前記第1の標的指向性ドメインは：

(1) 3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3
を含む、免疫グロブリンHCVRであって、

前記HCDR1は、配列番号56のアミノ酸配列を有し、
前記HCDR2は、配列番号57のアミノ酸配列を有し、
前記HCDR3は、配列番号58のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンHCVR
；並びに／又は

(2) 3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3
を含む、免疫グロブリンLCVRのであって、

20

前記LCDR1は、配列番号70のアミノ酸配列を有し、
前記LCDR2は、配列番号71のアミノ酸配列を有し、
前記LCDR3は、配列番号72のアミノ酸配列を有する、免疫グロブリンLCVR
を含む、請求項16～20のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項25】

前記第2の標的指向性ドメインは、配列番号185のアミノ酸配列を有する、請求項1
6～24のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項26】

前記第2の標的指向性ドメインは、配列番号207のアミノ酸配列を有する、請求項1
6～24のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

30

【請求項27】

前記第3の標的指向性ドメインは、TGFB1RII細胞外ドメイン(ECD)を有
する、請求項16～26のいずれか1項に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項28】

配列番号193のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖、並びに／又は
配列番号192、205、及び206からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する
免疫グロブリン重鎖
を含む、請求項17に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項29】

前記第1の標的指向性ドメインは、ペプチドリinkerを介して、前記免疫グロブリン足
場のアミノ末端に構造的に結合され、

40

前記ペプチドリinkerは、配列番号284～289からなる群から選択されるアミノ酸
配列を有する、請求項17に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項30】

前記第2の標的指向性ドメインは、ペプチドリinkerを介して、前記免疫グロブリン足
場のカルボキシル末端に構造的に結合され、

前記ペプチドリinkerは、配列番号284～289からなる群から選択されるアミノ酸
配列を有する、請求項17に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項31】

前記第3の標的指向性ドメインは、ペプチドリinkerを介して、前記第2の標的指向性

50

ドメインのカルボキシル末端に構造的に結合され、

前記ペプチドリンカーは、配列番号 284～289 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 17 に記載の三重特異性アンタゴニスト。

【請求項 32】

細胞増殖性障害を治療するための方法であって、

有効量の請求項 1～31 の三重特異性アンタゴニストのうちのいずれか 1 つを、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、2018 年 6 月 29 日出願の米国仮特許出願第 62/691,658 号、及び 2019 年 3 月 26 日出願の米国仮特許出願第 62/823,989 号に対する優先権を主張するものであり、これらの仮特許出願の内容は、あらゆる目的のために、参照により本出願に明示的に援用される。

【0002】

本出願は一般に癌治療に関し、特に腫瘍形成、腫瘍免疫、及び血管新生に関連する経路を調節できる、二重特異性及び三重特異性アンタゴニストに関する。

【背景技術】

【0003】

20

宿主が癌細胞を排除できないことは、大きな問題であり続けている。様々な癌の治療のためにますます多くの治療用モノクローナル抗体が認可されているが、癌の成長、及び転移への進行の根底に、多数の異なる分子経路が存在することを考慮すると、これらの抗体に対する耐性の出現が頻繁に観察される。免疫系は癌予防の腫瘍な機序であるが、癌細胞は免疫監視に対抗する。従って、改良された治療用結合アンタゴニスト又は抗体、並びにこのような試薬を用いて癌及び慢性ウイルス感染を治療する方法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本出願のある態様は、三重特異性アンタゴニストに関し、上記三重特異性アンタゴニストは：CH1 ドメイン、CH2 ドメイン、及び CH3 ドメインを含む、免疫グロブリン足場 (scaffold)；抗 PD-1 可変ドメイン、抗 PD-L1 可変ドメイン、抗 TIGIT 可変ドメイン、及び抗 LAG-3 可変ドメインからなる群から選択される 1 つ以上の可変ドメインを含む、第 1 の標的指向性ドメイン；VEGF に特異的に結合し、VEGFR 由来の 1 つ以上のペプチドドメインを含む、第 2 の標的指向性ドメイン；並びにアンジオポエチン/Tie-2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメインを含み、上記第 2 の標的指向性ドメインは、上記 CH3 ドメインのカルボキシル末端に構造的に結合され、上記第 3 の標的指向性ドメインは、上記 CH3 ドメイン内に挿入される。

【0005】

30

本出願の別の態様は、三重特異性アンタゴニストに関し、上記三重特異性アンタゴニストは：CH1 ドメイン、CH2 ドメイン、及び CH3 ドメインを含む、免疫グロブリン足場；抗 PD-1 可変ドメイン、抗 PD-L1 可変ドメイン、抗 TIGIT 可変ドメイン、及び抗 LAG-3 可変ドメインからなる群から選択される 1 つ以上の可変ドメインを含む、第 1 の標的指向性ドメイン；抗 PD-1 可変ドメイン、抗 PD-L1 可変ドメイン、抗 TIGIT 可変ドメイン、及び抗 LAG-3 可変ドメインの第 2 の標的指向性ドメイン；並びにアンジオポエチン/Tie-2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメインを含み、上記第 2 の標的指向性ドメインは、上記 CH3 ドメインのカルボキシル末端に構造的に結合され、上記第 3 の標的指向性ドメインは、上記 CH3 ドメイン内に挿入される。

【0006】

40

50

本出願の別の態様は、三重特異性アンタゴニストに関し、上記三重特異性アンタゴニストは：CH1ドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む、免疫グロブリン足場；抗VEGF可変ドメインからなる群から選択される1つ以上の可変ドメインを含む、第1の標的指向性ドメイン；TGF-β経路阻害剤を含む、第2の標的指向性ドメイン；並びにアンジオポエチン/Tie-2シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインを含み、上記第2の標的指向性ドメインは、上記CH3ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合され、上記第3の標的指向性ドメインは、上記CH3ドメイン内に挿入される。

【0007】

本出願の別の態様は、三重特異性アンタゴニストに関し、上記三重特異性アンタゴニストは：CH1ドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む、免疫グロブリン足場；抗PD-1可変ドメイン、抗PD-L1可変ドメイン、抗TIGIT可変ドメイン、及び抗LAG-3可変ドメインからなる群から選択される1つ以上の可変ドメインを含む、第1の標的指向性ドメイン；VEGFRの成分を含む、第2の標的指向性ドメイン；並びにTGF-β経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインを含み、上記第2の標的指向性ドメインは、上記CH3ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合され、上記第3の標的指向性ドメインは、上記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される。

【0008】

本出願の別の態様は、二重特異性アンタゴニストに関し、上記二重特異性アンタゴニストは：CH1ドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む、免疫グロブリン足場；抗PD-1可変ドメイン、抗PD-L1可変ドメイン、抗TIGIT可変ドメイン、及び抗LAG-3可変ドメインからなる群から選択される1つ以上の可変ドメインを含む、第1の標的指向性ドメイン；並びにVEGFRの成分を含む、第2の標的指向性ドメインを含み、上記第3の標的指向性ドメインは、上記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される。

【0009】

本出願の別の態様は、細胞増殖性障害を治療するための方法に関する。上記方法は、それを必要とする被験者に、本出願の三重特異性アンタゴニストを有効量投与するステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、特定のチェックポイントアンタゴニスト、抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、抗LAG-3、モノクローナル抗体(Mab)の、HCVR及びLCVR配列を示す。

【図2】図2は、トレバナニブ、ペバシズマブ、ラニビズマブ、Tie2、VEGF、及びTGF-βアンタゴニストに関する、HCVR及びLCVR並びに他のドメインの配列を示す。

【図3A-3C】図3A~3Hは、8個の三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、TS-ZPT-1.1、TS-ZPT-1.2、TS-ZPT-1.3、TS-ZPT-2、TS-ZPT-3、TS-ZPT-4、TS-ZPT-5、及びTS-ZPT-6のそれぞれを示し、これらは：(1)抗PD-1可変領域(VH1、VL1)ドメイン、又は他のチェックポイント抗体可変ドメイン；(2)(i)一方若しくは両方のIgGアームのアミノ末端の(図3A~3C、3F)、(ii)各アンタゴニストのカルボキシ末端の(図3D、3E、3H)、又は(iii)CH3ドメインのカルボキシ末端とトレバナニブペプチド(又は他の生物学的ペプチド)との間の(図3G)、アフリベルセプト融合タンパク質ドメイン；(3)(i)各CH3領域のカルボキシ末端に融合した(図3A~3D)、(ii)2つのCH3領域それぞれの中に挿入された(図3E)、(iii)各CH1領域のカルボキシ末端に融合した(図3F)、(iv)各アフリベルセプト融合タンパク質ドメインのカルボキシ末端に融合した(図3G)、又は(v)各CL領域のカルボキシ末端

10

20

30

40

50

に融合した（図 3 H）、トレバナニブペプチド（又は他の生物学的ペプチド）を含む、I g G 1 又は I g G 4 バックボーンを有する。アフリベルセプト融合タンパク質ドメインは、ヒト V E G F 受容体 1 及び 2 の細胞外ドメインからの血管内皮細胞増殖因子（V E G F）結合部分を含み、その一方でトレバナニブペプチドは、A n g 1 及び A n g 2 を標的としてこれらに結合することにより、A n g 1 及び／又は A n g 2 とこれらのコグネイト T i e 2 受容体との相互作用を防止する。

【図 3 D－3 E】同上

【図 3 F－3 H】同上

【図 4 A－4 C】図 4 A～4 C は、3 個の異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、T S - Z P T - 7、T S - Z P T - 8、及び T S - Z P T - 9 をそれぞれ示し、これらは：（1）各カルボキシ末端のアフリベルセプト融合タンパク質ドメイン；（2）抗 P D - 1 又は他のチェックポイントアンタゴニスト抗体可変ドメイン（V H 1、V L 1）；及び（3）（i）2 つの C H 3 領域それぞれの中に挿入された（図 4 A）、（i i）各 C H 2 領域のカルボキシ末端と、アンタゴニスト中の各ポリペプチド鎖のカルボキシ末端のアフリベルセプト融合タンパク質ドメインとの間に挿入された（図 4 B）、又は（i i i）各 I g G 1 アームのアミノ末端に融合した（図 4 C）、トレバナニブペプチド（又は他の生物学的ペプチド）を含む。

【図 5 A－5 B】図 5 A～5 G は、7 個の異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、T S - L P T - 1、T S - L P T - 2、T S - L P T - 3、T S - L P T - 4、T S - L P T - 5、T S - M 3、及び T S - M 4 をそれぞれ示し、これらは：（1）ラニビズマブ（L u c e n t i s）、ベバシズマブ（A v a s t i n）、又は他の抗 V E G F 可変ドメインに対応する、V H 2 及び V L 2 領域；（2）抗 P D - 1、又は他のチェックポイントアンタゴニスト抗体可変ドメインに対応する、V H 1 及び V L 1 領域；並びに（3）（i）2 つの C H 3 領域それぞれの中に挿入された（図 5 A）、（i i）各 C L 1 領域のカルボキシ末端に融合した（図 5 B）、（i i i）2 つのポリペプチド鎖それぞれの C H 1 領域のカルボキシ末端に融合した（図 5 C）、（i v）2 つのポリペプチド鎖それぞれの C L 領域のカルボキシ末端に融合した（図 5 D）、（v）2 つのポリペプチド鎖それぞれの C H 1 領域のカルボキシ末端に融合し、かつ 2 つのポリペプチド鎖それぞれの C L 領域のカルボキシ末端に融合した（図 5 E）、（v i 及び v i i）C H 3 のカルボキシ末端に融合した（図 5 F 及び 5 G）、トレバナニブペプチド（又は他の生物学的ペプチド）を含む。ラニビズマブ可変ドメインはベバシズマブに由来し、これらはいずれも、V E G F R 1 及び 2 に対するヒト V E G F - A の結合を遮断することが知られている。T S - L P T - 1、T S - L P T - 2、T S - L P T - 3、T S - L P T - 4、T S - L P T - 5、T S - M 3、及び T S - M 4 の例示的な配列は、配列番号 2 4 7～2 6 9 に示されている。

【図 5 C－5 E】同上

【図 5 F－5 G】同上

【図 6 A】図 6 A 及び 6 B は、図 3 A～3 E、3 G、3 H、及び 5 A に示されている、一過性トランスフェクション済み H E K 2 9 3 細胞中に発現される三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、非還元 S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）分析を示す。

【図 6 B】同上

【図 7 A－7 B】図 7 A 及び 7 B は、図 3 A～3 H に示されている三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、ヒト P D - 1 とヒト P D - L 1 との間の相互作用を遮断する能力を反映した、細胞ベース結合アッセイから計算された I C 5 0 値（n M）を示す。

【図 8 A－8 B】図 8 A 及び 8 B は、図 3 D、3 E、及び 3 G に示されている三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、V E G F と V E G F R - 2 との間の相互作用を遮断する能力を反映した、結合アッセイから計算された I C 5 0 値（n M）を示す。

【図 9】図 9 は、図 3 B、3 D、3 G、3 H、及び 5 A に示されている三重特異性腫瘍アンタゴニストの、A n g 2 と T i e 2 との間の相互作用を遮断する能力を反映した、結合アッセイから計算された I C 5 0 値（n M）を、ベバシズマブ - トレバナニブ融合対照分

子と比較して示す。

【図10】図10は、HEK293細胞の一過性トランスフェクションによって生成された、精製済み三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-2(2P17)、TS-ZPT-3L(2P17)、及びTS-ZPT-5(2P17)、並びに抗PD-1単一特異性抗体2P17の、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)分析の結果を示す。高分子量(HWM%)種、低分子量(LMW%)種、及び二量体化分子(Dimer%)のパーセンテージを示す。これらの三重特異性抗腫瘍アンタゴニストのHCVR及びLCVRのアミノ酸配列は、配列番号201~204に示されている。

【図11】図11は、CHO安定プールによって発現される精製済み三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-2(2P17)、TS-ZPT-3L(2P17)、及びTS-ZPT-5(2P17)の、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)分析の結果を示す。2つのトランスフェクションプールをTS-ZPT-3L(2P17)に関して評価した。高分子量(HWM%)種、低分子量(LMW%)種、及び二量体化分子(Dimer%)のパーセンテージを示す。

【図12A-12B】図12A及び12Bは、CHO安定プールから精製されて4℃で112日間保管された精製済み三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-3L(2P17)の、クロマトグラフィのトレース、及びサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)分析の結果を示す。高分子量(HWM%)種、低分子量(LMW%)種、及び二量体化分子(Dimer%)のパーセンテージを示す。

【図13A-13B】図13Aは、トレバナニブ長鎖ペプチドを有する例示的な三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、即ちTS-ZPT-3L(2P17)に関する、重鎖アミノ酸配列(配列番号202)及び軽鎖アミノ酸配列(配列番号201)を示し、上記三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)別のチェックポイントアンタゴニスト抗体2P17可変ドメイン(VH1、VL1)の抗PD-1、(2)各アンタゴニストのカルボキシル末端に融合し、かつ3xG4SリンカーでCH3ドメインに接続された、アフリベルセプトVEFG結合ドメイン、及び(3)2つのCH3領域それぞれの中に挿入されたトレバナニブペプチド(又は他の生物学的ペプチド)を含む。図13Bは、これらの配列に由来する例示的な分子を示す。

【図14A-14B】図14Aは、トレバナニブ短鎖ペプチドを有する例示的な三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、即ちTS-ZPT-3S(2P17)に関する、重鎖アミノ酸配列(配列番号200)及び軽鎖アミノ酸配列(配列番号201)を示し、上記三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)別のチェックポイントアンタゴニスト抗体2P17可変ドメイン(VH1、VL1)の抗PD-1、(2)各アンタゴニストのカルボキシル末端に融合し、かつ3xG4SリンカーでCH3ドメインに接続された、アフリベルセプトVEFG結合ドメイン、及び(3)2つのCH3領域それぞれの中に挿入されたトレバナニブペプチド(又は他の生物学的ペプチド)、(i)トレバナニブ阻害ペプチドの単一のコピーを含む。図14Bは、これらの配列に由来する例示的な分子を示す。

【図15】図15は、一過性トランスフェクション済みHEK293細胞によって生成された、図5F及び5G、並びに図13A~14Bに示されている様々な三重特異性抗腫瘍アンタゴニストのSDS-PAGEを示す。

【図16】図16は、HEK293細胞から生成されたTS-ZPT-3L(2P17)、TS-ZPT-3S(2P17)、TS-ZPT-3L(2P16)、及びTS-ZPT-3S(2P16)のサイズ排除クロマトグラフィ分析からの結果を示す。

【図17】図17は、TS-ZPT-3L(2P17)及びTS-ZPT-3S(2P17)の、4℃で保管した状態での経時的なサイズ排除クロマトグラフィ分析を示す。

【図18A-18B】図18Aは、親抗体2P17と比較して、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、PD-1とPD-L1との間の相互作用を遮断する能力を測定する、細胞ベース結合アッセイの結果を示す。図18Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

10

20

30

40

50

【図19A-19B】図19Aは、ベンチマーク抗体ベバシズマブ及び非特異的対照抗体と比較して、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、VEGFとVEGFR-2との間の相互作用を遮断する能力を測定する、細胞ベースバイオアッセイの結果を示す。図19Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

【図20A-20B】図20Aは、ベンチマーク分子トレバナニブ及び非特異的対照抗体と比較して、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、Ang2とTie2との間の相互作用を遮断する能力を測定する、結合アッセイの結果を示す。図20Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

【図21A-21C】図21A~21Eは、ベンチマーク抗PD-1抗体と比較して、バイオレイヤー干渉法によって決定された、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストへのPD-1結合の結果を、得られたこれらの結合親和性定数(図21F)と共に示す。

【図21D-21F】同上

【図22A-22C】図22A~22Eは、ベンチマーク抗体ベバシズマブと比較して、バイオレイヤー干渉法によって決定された、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストへのVEGF165結合の結果を、得られたこれらの結合親和性定数(図22F)と共に示す。

【図22D-22F】同上

【図23A-23C】図23A~23Eは、ベンチマーク分子トレバナニブと比較して、バイオレイヤー干渉法によって決定された、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストへのAng2結合の結果を、得られたこれらの結合親和性定数(図23F)と共に示す。

【図23D-23F】同上

【図24】図24は、Octet RED96システム(ForteBio)を用いて、TS-ZPT-3S(2P16及び2P17)並びにTS-ZPT-3L(2P16及び2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、その3つの結合パートナーそれぞれに対する順次結合を特性決定するための、バイオレイヤー干渉法の使用を示す。

【図25】図25は、4頭の別個のマウスにおけるTS-ZPT-3L(2P17)三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの薬物動態プロファイルを示す。

【図26A-26B】図26A~26Bは：(1) VH1及びVL1領域が、チェックポイント#1、例えば抗PD-1又は抗PD-L1可変ドメインに対応し；(2) VH2及びVL2領域が、チェックポイント#2、例えば抗TIGIT、抗LAG-3可変ドメインに対応し；(3) 円形の領域が、CH3ドメイン内に挿入されたトレバナニブ(又は他のいずれの生物学的ペプチド)に対応する、特定の三重特異性抗腫瘍チェックポイントアンタゴニスト構成を示す。

【図27】図27は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-A1BT-1を示し、これは：多様体IgG1(K447A)足場中のAvastin/ベバシズマブ由来のVH領域(E6Q、L11V)の2つのアミノ酸置換を含有する、アミノ末端抗VEGF可変領域(VH1、VL1)；IgG1 CH3ドメイン内に挿入されたトレバナニブ短鎖ペプチド；及び4xG4SリンカーによってCH3ドメインに接続されたカルボキシ末端TGF-β1 RII ECDを含む。この三重特異性抗腫瘍アンタゴニストのHC及びLCのアミノ酸配列は、配列番号229及び230に列挙されている。

【図28】図28は、対照トランスフェクション抗体2P17と比較して、HEK293一過性トランスフェクション済み細胞によって生成されたTS-A1BT-1の非還元SDS-PAGE分析を示し、これは、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの良好な発現レベルを示している。

【図29】図29は、TS-A1BT-1のサイズ排除クロマトグラフィ分析を示す。

10

20

30

40

50

【図30A-30C】図30A～30Fは、TGF- β RII細胞外ドメイン(ECD)：TS-ZPB-1、TS-ZPB-2、TS-ZPB-3、TS-ZPB-4、TS-ZPB-5、及びTS-ZPB-6をそれぞれ含む6個の三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト構成を示す。

【図30D-30F】同上

【図31A】図31Aは、HEK293細胞によって一過性発現された三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB-1の、精製前及び後の非還元SDS-PAGE分析を示す。

【図32A-32B】図32Aは、TGF- β -RII-Fcと比較した、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB-1の例示的なサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)プロファイルを示す。高分子量種(HWM%)、低分子量種(LMW%)、及び二量体化された分子(Dimer%)のパーセンテージを図32Bに示す。

【図33A-33B】図33Aは、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、及びTS-ZPB-5(2P17)の、PD-1とPD-L1との間の相互作用を遮断する能力を測定する、細胞ベース結合アッセイの結果を示す。図33Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

【図34A-34B】図34Aは、ベンチマークTGF- β 1RII-Fcと比較した、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB-1の、TGF β 1シグナル伝達を遮断する能力を測定するためのバイオアッセイの結果を示す。図34Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

【図35A-35B】図35Aは、ベンチマークベバシズマブと比較した、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB-1の、VEGFとVEGFR-2との間の相互作用を遮断する能力を測定する、ELISAアッセイの結果を示す。図35Bは、この分析から得られるIC50値(nM)を示す。

【図36A-36C】図36A～36Cは、3つの三重特異性アンタゴニスト：TS-ZPB-5；CH3ドメインにK447A変異を有する多様体TS-ZPB-5A；及びアフリベルセプトVEGF結合ドメインのN-結合型グリコシル化を排除するための変異を更に有する多様体TS-ZPB-5Bを示す。

【図37】図37は、一過性トランスフェクション済みHEK293細胞から生成される三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPB-5、TS-ZPB-5A、及びTS-ZPB-5Bの発現レベルを示す。

【図38】図38は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPB-5、TS-ZPB-5A、及びTS-ZPB-5Bの、VEGFとVEGFR-2との間の相互作用を遮断する能力を測定する、細胞ベースアッセイの結果を示す。

【図39】図39は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPB-5、TS-ZPB-5A、及びTS-ZPB-5Bの、TGF β 1シグナル伝達を遮断する能力を測定する、バイオアッセイの結果を示す。

【図40】図40は、TS-ZPT-5A及びTS-ZPT-5Bの、それぞれ2頭のマウスにおける薬物動態プロファイルを示す。

【図41A-41C】図41A～41Cは、3つの異なる二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト構成Bi-ZPL-1(又はBi-ZP-1)、Bi-ZPL-2(又はBi-ZP-2)、及びBi-ZPL-3(又はBi-ZP-3)を示し、これらはそれぞれ：(1)抗PD-1又は抗PD-L1可変領域；及び(2)(i)VH1のアミノ末端に融合した、(ii)N-結合型グリコシル化部位を排除するように変異し、またVH1のアミノ末端に融合した、(iii)N-結合型グリコシル化部位を排除するように変異し、また3xG4SリンカーによってCH3のカルボキシ末端に融合した、アフリベルセプトVEG

10

20

30

40

50

F結合ドメインを含む。

【図42A-42B】図42Aは、ベンチマーク抗PD-1抗体と比較して、Bi-ZPL-1分子の、PD-L1とPD-1との間の相互作用を阻害する能力を測定する、細胞ベースアッセイの結果を示す。図42Bは、この分析から得られる結果としてのIC50値(nM)を示す。

【図43A-43B】図43Aは、ベンチマーク抗PD-1抗体と比較して、Bi-ZPLL-1分子の、VEGFとVEGFR-2との間の相互作用を阻害する能力を測定する、バイオアッセイの結果を示す。図43Bは、結果としてのIC50値(nM)を示す。

【図44】図44は、タンパク質A精製済みBi-ZP-2及びBi-ZPL-3のサイズ排除クロマトグラフィ分析の結果を示す。

【図45】図45は、Bi-ZP-2及びBi-ZPL-3の、マウスにおける薬物動態評価を示す。

【図46A】図46A~46Cは、例示的なフレームワーク領域の配列を示す。図46Aは、抗TIGIT mAbの例示的なフレームワーク領域を示す。図46Bは、抗PD-1及び抗PD-L1 mAbの例示的なフレームワーク領域を示す。図46Cは、抗LAG3 mAbの例示的なフレームワーク領域を示す。

【図46B】同上

【図46C】同上

【発明を実施するための形態】

【0011】

定義

他の定義がされていない限り、本明細書中で使用される全ての技術的用語及び科学用語は、本開示の方法及び組成物が属する分野の当業者によって一般に理解されている意味と同一の意味を有する。本明細書及び添付の請求項中で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、そうでないことが文脈によって明確に規定されない限り、複数の指示物を含むことに留意しなければならない。よって例えば、「あるペプチド(a peptide)」に関する言及は、「1つ以上の(one or more)」ペプチド、又は「複数(plurality)」のこのようなペプチドを含む。本出願の教示に関して、本出願に記載されているいずれの発行済みの特許又は特許出願公開は、参照により本出願に明示的に援用される。

【0012】

本明細書中で使用される場合、用語「PD-1」は、いずれの形態のPD-1、及びPD-1の活性の少なくとも一部を保持したその多様体を指す。ヒトPD-1を指定して言及すること等による別の指示がない限り、PD-1は、天然配列PD-1の全ての哺乳類種、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシを含む。例示的なヒトPD-1アミノ酸配列を以下に挙げる：

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLA
AFPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP
RPAGQFQTLVVGVGGLLSLVLLVWLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVP
CVPEQTEYATIVFSPGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (配列番号180)

【0013】

本明細書中で使用される場合、用語「PD-L1」は、いずれの形態のPD-L1、及びPD-L1の活性の少なくとも一部を保持したその多様体を指す。ヒトPD-L1を指定して言及すること等による別の指示がない限り、PD-L1は、天然配列PD-L1の全ての哺乳類種、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシを含む。例示的なヒトPD-L1アミノ酸配列を以下に挙げる：

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSS
YRQARLLKQQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEQY
PKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELV IPELPLAHPNERTH
LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (配列番号181)

【0014】

本明細書中で使用される場合、用語「T I G I T」は、いずれの形態の T I G I T、及び T I G I T の活性の少なくとも一部を保持したその多様体を指す。ヒト T I G I T を指定して言及すること等による別の指示がない限り、T I G I T は、天然配列 T I G I T の全ての哺乳類種、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシを含む。以下は、例示的なヒト T I G I T アミノ酸配列である：

MTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVND
TGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRRK
SAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQREGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSSFFTETG（配列番号 179）

【0015】

本明細書中で使用される場合、用語「L A G - 3」は、いずれの形態の L A G - 3、及びリンパ球活性化遺伝子 3（L A G - 3）の活性の少なくとも一部を保持したその多様体を指す。ヒト L A G - 3 を指定して言及すること等による別の指示がない限り、L A G - 3 は、天然配列 L A G - 3 の全ての哺乳類種、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシを含む。以下は、例示的なヒト L A G - 3 アミノ酸配列である：

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVWAQEGAPALPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPL
APGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSRGLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSC
RLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWG
CILT YRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSF LTAKWTPPGGPDLLVTGDNGDFTLRL
EDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEA
QEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLPAGHLLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWR
RQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL（配列番号 293）

【0016】

用語「アゴニスト」は、別の分子の生物学的活性又は効果を促進する（即ち誘発する、引き起こす、強化する、又は増大する）物質を指す。用語「アゴニスト」は、受容体に結合する抗体等の物質、及び受容体に結合することなく（例えば関連するタンパク質を活性化することによって）受容体の機能を促進する物質を包含する。

【0017】

用語「アンタゴニスト」又は「阻害剤」は、受容体又はリガンドといった別の分子の生物学的活性又は効果を妨げる、遮断する、阻害する、中和する、又は低減する物質を指す。アンタゴニストは、単一特異性抗体、二重特異性抗体、又は三重特異性抗体であってよい。

【0018】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、抗原を特異的に認識して、1つ以上の免疫グロブリン可変領域を通して該抗原に結合する、ポリペプチド又はポリペプチド複体を指す。抗体は、全抗体、抗原結合断片、又はその一本鎖であってよい。用語「抗体」は、生化学的に区別できる多様なクラスのポリペプチドを包含する。重鎖は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミュー（即ち α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ ）として分類され、これらの間に多少のサブクラス（例えば $\gamma 1 \sim \gamma 4$ ）が存在することは、当業者には理解されるだろう。抗体の「クラス」をそれぞれ I g G、I g M、I g A、I g G、又は I g E として決定するのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 等は、十分に特性決定されており、機能的な専門性を付与するものであることが分かっている。これらのクラス及びアイソタイプそれぞれを修飾したバージョンは、当業者であれば本開示を参照して容易に識別可能であるため、本開示の範囲内である。全ての免疫グロブリンクラスは本開示の範囲内であり、以下の議論は全体として、免疫グロブリン分子の I g G クラスを対象とする。

【0019】

本出願の抗体又は抗体アンタゴニストとしては、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多重特異性、二重特異性、三重特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化、キメラ、及び一本鎖抗体が挙げられる。本明細書で開示される抗体は、鳥

類及び哺乳類を含むいずれの動物に由来するものであってよい。好ましくは上記抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、又はニワトリ抗体である。いくつかの実施形態では、可変領域は軟骨魚類に由来する（例えばサメに由来する）ものであってよい。

【0020】

用語「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、一本鎖 $Fv(scFv)$ 、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 $Fv(sdFv)$ 、 VL 又は VH ドメインを含む断片、 Fab 発現ライブラリによって生成される断片、及び抗イディオタイプ（抗 Id ）抗体といった抗体の一部分を指して使用される。その構造にかかわらず、抗体断片は、完全な状態の抗体が認識する抗原と同一の抗原に結合する。用語「抗体断片」は、 $DART$ 及びダイアボディを含む。用語「抗体断片」はまた、特異的抗原に結合して複合体を形成することによって抗体と同様に作用する免疫グロブリン可変領域を含む、いずれの合成又は遺伝子操作タンパク質を含む。「一本鎖抗体」又は「 $scFv$ 」は、免疫グロブリンの重鎖可変領域（ VH ）及び軽鎖可変領域（ VL ）の融合タンパク質を指す。いくつかの態様では、上記領域は、10～約25個のアミノ酸の短鎖リンカーペプチドと接続される。上記リンカーは、柔軟性のためにグリシンを多く含むことができ、また可溶性のためにセリン又はトレオニンを多く含むことができ、 VH の N 末端を VL の C 末端と接続できるか、又はその逆である。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。 IgG に関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量がおよそ23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量が53,000～70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチド鎖とを含む。これら4つの鎖は典型的には、「Y」字型構成で、ジスルフィド結合によって接合され、このジスルフィド結合では、軽鎖が重鎖から張り出して支えられ、この張り出した構造が、「Y」字型の最も開いた部分から始まって、可変領域を通して続く。

【0021】

軽鎖及び重鎖はいずれも、構造的及び機能的に相同である領域に分割される。用語「定常」及び「可変」は、機能に関して使用される。これに関して軽鎖可変（ VL ）及び重鎖可変（ VH ）ドメインの部分の両方が、抗原認識及び特異性を決定することが理解されるだろう。対照的に、軽鎖定常（ CL ）及び重鎖定常（ $CH1$ 、 $CH2$ 、又は $CH3$ ）ドメインは、分泌、経胎盤移動性、 Fc 受容体結合、補体結合等といった重要な生物学的特性を付与する。慣例として、従来の抗体の定常領域ドメインの番号は、抗体の抗原結合部位又はアミノ末端から離れるほど大きくなる。従来の抗体では、 N 末端部分は可変領域であり、カルボキシ末端部分には定常領域があり、 $CH3$ 及び CL ドメインは実際には、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。本出願に記載されている例示的な $CH1-CH2-CH3$ 配列としては：野生型 $IgG1$ （配列番号274）； $K447A$ 変異を有する $IgG1$ （配列番号275）； $N297A$ 変異を有する $IgG1$ （配列番号276）；野生型 $IgG2$ （配列番号278）；カルボキシ末端リシンが欠失した $IgG2$ （配列番号279）；ヒンジ $S231P$ 変異を有する $IgG4$ （配列番号280）； $S23P$ 及び $K447A$ 変異を有する $IgG4$ （配列番号281）；並びに $S231P$ 変異を有し、かつカルボキシ末端リシンが欠失した $IgG4$ （配列番号282）が挙げられる。例示的な CL 配列は配列番号292である。

【0022】

用語「 Fc 断片」又は「 Fc 」は、抗原結合活性を含まないものの元々は容易に結晶化することが観察されていた（そのため「断片、結晶化可能（*fragment crystallizable*）」から Fc 断片と呼ばれる）抗体の断片を指して使用される。この断片は、対になった $CH2$ ドメイン及び $CH3$ ドメインに対応し、エフェクタ分子及び細胞と相互作用する抗体分子の一部である。本明細書に記載の Fc 断片は、ヒト $IgG1$ 、 $IgG2$ 、及び $IgG4$ 抗体に由来するものであってよく、ヒンジ変異、及びカルボキシ末端リシンの欠失といった修飾を伴う。本出願に記載の例示的な Fc 配列としては：野

生型 I g G 1 F c (配列番号 2 1 0) ; a - グリコシル化 I g G 1 F c (配列番号 2 1 1) ; ヒンジ変異を有する I g G 4 F c (配列番号 2 1 2) ; 野生型 I g G 2 F c (配列番号 2 1 3) ; カルボキシ末端リシンが欠失した I g G 1 F c (配列番号 2 1 4) ; カルボキシ末端リシンが欠失した a - グリコシル化 I g G 1 F c (配列番号 2 1 5) ; ヒンジ変異を有し、かつカルボキシ末端リシンが欠失した I g G 4 F c (配列番号 2 1 6) ; 及びカルボキシ末端リシンが欠失した I g G 2 F c (配列番号 2 1 7) が挙げられる。

【0023】

上述のように、可変領域により、抗体は、抗原上のエпитープを選択的に認識して、これに特異的に結合できる。即ち、抗体の V L ドメイン及び V H ドメイン、又は相補性決定領域 (C D R) のサブセットが組み合わさって、3 次元的な抗原結合部位を画定する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Y 字型の各腕状部分の端部に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、V H 鎖及び V L 鎖それぞれの 3 つの C D R (即ち H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3) によって画定される。いくつかの例では、例えば特定の免疫グロブリン分子、ラクダ種に由来するか、又はラクダ免疫グロブリンをベースとして操作される。あるいは、免疫グロブリン分子は、軽鎖を有さずに重鎖のみから、又は重鎖を有さずに軽鎖のみからな

10

【0024】

自然に発生する抗体では、各抗原結合ドメイン内に存在する 6 個の C D R は、アミノ酸の短く不連続な配列であり、上記配列は、水性環境下でその 3 次元構成を取るときにこの抗原結合ドメインを形成するよう、特異的に配置される。抗原結合ドメイン中のアミノ酸の残基は「フレームワーク」領域と呼ばれるが、これは、分子間変動が比較的小さい。フレームワーク領域は主に β シート構造を採用し、C D R はループを形成し、このループは β シート構造に接続され、場合によっては β シート構造の一部を形成する。よってフレームワーク領域は、鎖間の非共有結合的な相互作用による、正しい配向での C D R の配置を提供する、足場を形成するように作用する。配置された C D R によって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエпитープに対して相補性の表面を画定する。この相補性表面は、抗体とそのコグネイトエпитープとの非共有結合を促進する。C D R 及びフレームワーク領域を含むアミノ酸はそれぞれ、既に正確に定義されているため、いずれの所与の重鎖又は軽鎖可変領域に関して当業者が容易に同定できる。

20

30

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「V H 1」及び「V H 2」は、2 つの異なる結合特異性に対応する免疫グロブリン重鎖可変ドメインを指す。同様に、用語「V L 1」及び「V L 2」は、2 つの異なる結合特異性に対応する軽鎖可変ドメインを指す。これらが共に使用される場合、V H 1 領域及び V L 1 領域は共通の結合特異性を画定すること、並びに V H 2 ドメイン及び V L 2 ドメインは第 2 の結合特異性を画定することを理解されたい。

【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「フレームワーク領域 (F R)」は、C D R 残基以外の可変ドメイン残基を指す。各可変ドメインは典型的には、対応する C D R に隣接する 4 つの F R を有する。例えば V H ドメインは典型的には、3 つの H C D R に H F R 1 - H C D R 1 - H F R 2 - H C D R 2 - H F R 3 - H C D R 3 - H F R 4 という構成で隣接する、4 つの H F R、即ち H F R 1、H F R 2、H F R 3、及び H F R 4 を有する。同様に、L H ドメインは典型的には、3 つの L C D R に L F R 1 - L C D R 1 - L F R 2 - L C D R 2 - L F R 3 - L C D R 3 - L F R 4 という構成で隣接する、4 つの L F R、即ち L F R 1、L F R 2、L F R 3、及び L F R 4 を有する。例示的な F R を図 4 6 A ~ 4 6 C にまとめる。

40

【0027】

軽鎖は、カッパ又はラムダ (κ 、 λ) として分類される。各重鎖クラスは、カッパ又はラムダ軽鎖と結合できる。一般に軽鎖及び重鎖は互いに共有結合し、2 つの重鎖の「後端

50

(tail)」部分は、ハイブリドーマ、B細胞、又は遺伝子操作された宿主細胞によって免疫グロブリンが生成された場合に、共有ジスルフィド結合又は非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y字型構成のフォーク状の端部のN末端から、各鎖の下部のC末端まで連なる。

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「軽鎖定常領域 (CL)」は、抗体軽鎖CL由来のアミノ酸配列 (配列番号292) を含む。好ましくは、軽鎖定常領域は、定常カッパドメイン及び定常ラムダドメインのうちの少なくとも一方を含む。

【0029】

本明細書中で使用される場合、用語「重鎖定常領域 (CH)」は、免疫グロブリン重鎖由来のアミノ酸配列を含む。重鎖定常領域を含むポリペプチドは、CH1ドメイン (配列番号290~291)、ヒンジ (例えば上部、中央、及び/又は下部ヒンジ領域) ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、並びに多様体又はその断片のうちの少なくとも1つを含む。例えば、本開示で使用するための抗原結合ポリペプチドは：CH1ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインと、少なくともヒンジドメインの一部分と、CH2ドメインとを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインとCH3ドメインとを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインと、少なくともヒンジドメインの一部分と、CH3ドメインとを含むポリペプチド鎖；又はCH1ドメインと、少なくともヒンジドメインの一部分と、CH2ドメインと、CH3ドメインとを含むポリペプチド鎖を含んでよい。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。更に、本開示で使用するための抗体は、CH2ドメインの少なくとも一部分 (例えばCH2ドメインの全体又は一部) を含まなくてよい。重鎖定常領域を修飾することにより、そのアミノ酸配列を、自然に発生する免疫グロブリン分子から変化させることができることを理解されたい。

【0030】

例えば、本開示においてこれ以降で考察されるように、本出願人は、CH3ドメインが、CH3ドメインのFcループ (例えば図3Eを参照) への相当な (例えば100aaを超える) 挿入に耐えることができる、又はこのような挿入を収容できることを発見した。従って本出願では、本開示のいずれの阻害性ドメインを、トレバナニブ又はTGFβ1RII ECDドメインをFcループに挿入するのと同様の方法で、同様にFcループに挿入できる。

【0031】

本明細書で開示されている抗体の重鎖定常領域は、異なる免疫グロブリン分子に由来するものであってよい。例えば、ポリペプチドの重鎖定常領域は、IgG1分子に由来するCH1ドメインと、IgG3分子に由来するヒンジ領域とを含んでよい。別の例では、重鎖定常領域は、一部がIgG1分子に由来し、かつ一部がIgG3分子に由来する、ヒンジ領域を含むことができる。別の例では、重鎖部分は、一部がIgG1分子に由来し、かつ一部がIgG4分子に由来する、キメラヒンジを含むことができる。

【0032】

「軽鎖 - 重鎖対」は、軽鎖のCLドメインと重鎖のCH1ドメインとの間のジスルフィド結合によって二量体を形成できる、軽鎖と重鎖との集合を指す。

【0033】

様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び3次元構成が十分に公知である。本明細書中で使用される場合、用語「VHドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の第1の (ほとんどの場合アミノ末端の) 定常領域ドメインを含む。CH1ドメインはVHドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対するアミノ末端である。

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、慣用の番号付与スキームを用いた場合に概ね抗体の残基244から残基360にまでわたる (Kabatt番号付与体

10

20

30

40

50

系では残基 244～360、EU 番号付与体系では残基 231～340）、重鎖分子の一部を含む。CH2ドメインは、別のドメインと密接な対を形成しないという点で独特である。そうではなく、2つのN結合型分岐炭水化物鎖が完全な状態のネイティブIgG分子の2つのCH2ドメインの間に介在する。CH3ドメインは、IgG分子のCH2ドメインからカルボキシ末端にまでわたりし、およそ108個の残基を含む。

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに接合する、重鎖分子の一部を含む。このヒンジ領域はおよそ25個の残基を含み、柔軟であるため、2つのN末端抗原結合領域を独立して動かすことができる。ヒンジ領域は：上部、中央、及び下部ヒンジドメインという3つの別個のドメインに細分化できる。

10

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は、2つの硫黄原子間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成できる、又は第2のチオール基と架橋できる、チオール基を含む。自然に発生するほとんどのIgG分子では、CH1領域とCL領域とはジスルフィド結合によって構造的に結合され、2つの重鎖は、Kabab番号付与体系を用いた239及び242に対応する位置（EU番号付与体系の226位又は229位）において、2つのジスルフィド結合によって構造的に結合される。

【0037】

本明細書中で使用される場合、抗体、抗体断片、又は抗体ドメインの「多様体」は：（1）元の抗体、抗体断片、又は抗体ドメインと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有し；（2）元の抗体、抗体断片、又は抗体ドメインが特異的に結合する標的と同一の標的に特異的に結合する、抗体、抗体断片、又は抗体ドメインを指す。「少なくともx%同一である」又は「少なくともx%の同一性」といった句の形式で配列同一性の測定値が提示されている場合、このような実施形態は、この下限以上のあらゆる整数のパーセンテージを含むことを理解されたい。更に、本出願においてアミノ酸配列が提示されている場合、これは、該アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を追加で開示する、又は包含するものとして解釈されるものとするを理

20

30

【0038】

本明細書中で、例えば「約80%～約100%」といった句で配列相同性の範囲が提示されている場合、このような実施形態は、この範囲内のいずれの整数によって定義されるあらゆる部分範囲を含み、下限の数は80～100のいずれの整数となり得ることを理解されたい。

【0039】

本明細書中で使用される場合、句「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体、典型的にはマウスモノクローナル抗体に由来する抗体を指す。あるいはヒト化抗体は、親抗体である非ヒト抗体の抗原結合特性を保持しているか又は略保持しているものの、ヒトへの投与時に親抗体に比べて低い免疫原性を示す、キメラ抗体に由来するものであってよい。

40

【0040】

本明細書中で使用される場合、句「キメラ抗体」は、免疫反応性領域又は部位が第1の種から得られるか又は第1の種に由来し、（完全なものであっても、部分的なものであっても、本開示に従って修飾されたものであってもよい）定常領域が第2の種から得られる、抗体を指す。特定の実施形態では標的結合領域又は部位は、非ヒトソース（例えばマウス又は霊長類）からのものとなり、定常領域はヒトである。

【0041】

本出願の多重特異性抗体の範囲内に含まれるのは、以下を含む様々な組成物及び方法論である：非対称IgG様抗体（例えばトリオマブ／クアドローマ、Trion Phar

50

ma/Fresenius Biotech) ; ノブ・イントゥ・ホール (knobs - into - holes) 抗体 (Genentech) ; Cross mAb (Roche) ; 静電気適合抗体 (AMGEN) ; LUZ - Y (Genentech) ; ストランド・エクスチェンジ・エンジニアード (strand exchange engineered) ドメイン (SEED) ボディ (EMD Serono ; Biolonic、Merus) ; Fab 交換抗体 (Genmab) ; 対照 IgG 様抗体 (例えば二重標的 (dual targeting : DT) - Ig (GSK/Domantis) ; トゥ・イン・ワン (two - in - one) 抗体 (Genentech) ; 架橋 mAb (Karmanos Cancer Center) ; mAb² (F - star) ; Cov X - body (Cov X/Pfizer) ; 二重可変ドメイン (DVD) - Ig 融合 (Abbott 10) ; IgG 様二重特異性抗体 (Eli Lilly) ; Ts2Ab (Medimmune/AZ) ; BsAb (ZymoGenetics) ; HERCULES (Biogen Idec, TvAb、Roche) ; scFv/Fc 融合 ; SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion、ZymoGenetics/BMS) ; 二重親和性標的転換技術 (Fc - DART、MacroGenics) ; 二重 (scFv)₂ - Fab (National Research Center for Antibody Medicine) ; F(ab)₂ 融合 (Medarex/AMGEN) ; 二重作用又は Bis - Fab (Genentech) ; ドック・アンド・ロック (Dock - and - Lock) (DNL、ImmunoMedics) ; Fab - Fv (UCB - Celltech) ; scFv 及びダイアボディベース抗体 (例えば二重特異性 20 T細胞エンゲージャ (BiTE、Micromet) ; タンデムダイアボディ (Tandab、Affimed) ; DART (MacroGenics) ; 一本鎖ダイアボディ ; TCR 様抗体 (AIT、Receptor Logics) ; ヒト血清アルブミン scFv 融合 (Merrimack) ; COMBODIES (Epigen Biotech) ; 及び IgG/非 IgG 融合 (例えば免疫サイトカイン (EMDSerono、Philogen、ImmunoGene、ImmunoMedics)) 。

【0042】

「特異的に結合する」又は「・・・に対する特異性を有する」は一般に、抗体がその抗原結合ドメインを介してあるエピトープに結合すること、及びこの結合が、抗原結合ドメインと該エピトープとの間のある程度の相補性を伴うことを意味する。この定義に従うと 30、抗体は、その抗原結合ドメインを介したあるエピトープへの結合が、ランダムで無関係なエピトープへの結合に比べて、より容易である場合に、該エピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は本明細書では、特定の抗体が特定のエピトープに結合する相対親和性を定量化するために使用される。例えば、抗体「A」は所与のエピトープに対して、抗体「B」よりも高い特異性を有するとみなされる場合があり、又は抗体「A」は、エピトープ「C」に、関連するエピトープ「D」に関してよりも高い特異性で結合すると言われる場合がある。いくつかの実施形態では、抗体又は抗体断片は、 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、又は 10^{-10} M以下の解離定数 (K_d) を有する抗原との複合体を形成する場合に、ある抗原「に対して特異性を 40有する」。

【0043】

用語「アンタゴニスト抗体」は、標的に結合してこの標的の生物学的効果を阻害又は低減する抗体を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、抗体であって、この抗体が結合する標的、例えば TIGIT が生物学的機能を実施するのを阻害する、抗体を指すことができる。

【0044】

本明細書中で使用される場合、「抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体」は、PD - 1 の生物学的活性、及び/又は PD - 1 によって仲介される 1 つ以上の下流のイベントを阻害できる抗体を指す。抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体は、PD - 1 の生物学的活性を（「ほとんど」を含む何らかの程度まで）遮断する、拮抗する、抑制する、又は低減する抗体を包含 50

し、上記生物学的活性は、PD-1によって仲介される下流のイベント、例えばPD-1結合及び下流シグナル伝達、T細胞増殖の阻害、T細胞活性化の阻害、IFN分泌の阻害、IL-2分泌の阻害、TNF分泌の阻害、IL-10の誘導、及び抗腫瘍免疫応答の阻害を含む。本出願の目的に関して、用語「抗PD-1アンタゴニスト抗体」（相互交換可能な用語として「アンタゴニストPD-1抗体」、「アンタゴニスト抗PD-1抗体」、又は「PD-1アンタゴニスト抗体」が使用される）は、PD-1自体、PD-1の生物学的活性、又は生物学的活性の結果を、略無化する、低減する、又は何らかの意味のある程度に中和する、これまでに同定されているあらゆる用語、名称、並びに機能的状態及び特性を包含することが、明確に理解されるだろう。いくつかの実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体はPD-1に結合して抗腫瘍免疫応答を上方制御する。

10

【0045】

本明細書中で使用される場合、「抗PD-L1アンタゴニスト抗体」は、PD-L1の生物学的活性、及び／又はPD-L1によって仲介される1つ以上の下流のイベントを阻害できる抗体を指す。抗PD-L1アンタゴニスト抗体は、PD-L1の生物学的活性を（「ほとんど」を含む何らかの程度まで）遮断する、拮抗する、抑制する、又は低減する抗体を包含し、上記生物学的活性は、PD-L1によって仲介される下流のイベント、例えばPD-L1結合及び下流シグナル伝達、T細胞増殖の阻害、T細胞活性化の阻害、IFN分泌の阻害、IL-2分泌の阻害、TNF分泌の阻害、IL-10の誘導、及び抗腫瘍免疫応答の阻害を含む。本出願の目的に関して、用語「抗PD-L1アンタゴニスト抗体」（相互交換可能な用語として「アンタゴニストPD-L1抗体」、「アンタゴニスト抗PD-L1抗体」、又は「PD-L1アンタゴニスト抗体」が使用される）は、PD-L1自体、PD-L1の生物学的活性、又は生物学的活性の結果を、略無化する、低減する、又は何らかの意味のある程度に中和する、これまでに同定されているあらゆる用語、名称、並びに機能的状態及び特性を包含することが、明確に理解されるだろう。いくつかの実施形態では、抗PD-L1アンタゴニスト抗体はPD-L1に結合して抗腫瘍免疫応答を上方制御する。

20

【0046】

句「免疫チェックポイント調節因子」は、免疫チェックポイントを通したシグナル伝達を阻害又は刺激する作用剤の機能的クラスを指す。「免疫チェックポイント調節因子」は、一体としてT細胞活性化に関連するシグナル伝達経路を阻害又は刺激する手段を提供する、細胞表面受容体及びその関連するリガンドを含む。例示的な免疫チェックポイント調節因子としては、限定するものではないが：PD-1並びにそのリガンドであるPD-L1及びPD-L2；TIGIT及びそのCD155リガンドであるPVR；CTLA-4並びにそのリガンドであるB7-1及びB7-2；TIM-3及びそのリガンドであるガレクチン-9；LAG-3、並びに肝臓内皮細胞レクチン（LSECtin）及びガレクチン-3を含むそのリガンド；CD122及びそのCD122Rリガンド；CD70、B7H3、B及びTリンパ球減衰因子（BTLA）、並びにVISTAが挙げられる。

30

【0047】

句「チェックポイント調節因子アンタゴニスト」、「免疫チェックポイント結合アンタゴニスト」、及び「免疫チェックポイントアンタゴニスト」は本明細書において、免疫チェックポイント調節因子の活性に干渉する（又はこれを阻害する）ことによって、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を遮断又は阻害する作用剤のクラスに関して、相互交換可能なものとして使用される。このシグナル伝達を阻害することによって、免疫抑制を反転させることができ、これにより、癌細胞に対するT細胞免疫を再確立又は強化できる。免疫チェックポイント調節因子アンタゴニストとしては、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤が挙げられる。

40

【0048】

句「免疫チェックポイント結合アゴニスト」、及び「免疫チェックポイントアゴニスト」

50

」は、免疫チェックポイント調節因子の活性を刺激することによって、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を刺激する作用剤のクラスに関して、相互交換可能なものとして使用される。このシグナル伝達を刺激することによって、癌細胞に対するT細胞免疫を再確立又は強化できる。例示的な免疫チェックポイント調節因子アゴニストとしては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子（TNF）受容体スーパーファミリーのメンバー、例えばCD27、CD40、OX40（CD134）、グルココルチコイド誘導TNFRファミリー関連タンパク質（GITR）、及び4-1BB（CD137）、並びにこれらのリガンドが挙げられる。更なるチェックポイント調節因子アゴニストは、CD28及びICOSを含むB7-CD28スーパーファミリーに属する。

10

【0049】

句「ドミナントネガティブタンパク質」又は「ドミナントネガティブペプチド」は、野生型タンパク質に由来するタンパク質又はペプチドであって、変異及び／又は欠失によって遺伝子的に修飾されていることによって、修飾済みのタンパク質又はペプチドが、それが由来する内因性野生型タンパク質の機能に干渉する、タンパク質又はペプチドを指す。

【0050】

句「VEGF結合アンタゴニスト」は、VEGF-A又はその受容体であるVEGFR-2に結合することによって、この結合の結果として、VEGF-AによるVEGFR-2の活性化を遮断又は阻害する、作用剤の機能的クラスを指す。本明細書中で使用される場合、用語「VEGF結合アンタゴニスト」は、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤を含む。

20

【0051】

句「Tie2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニスト」は、Tie2チロシンキナーゼ受容体、又はそのリガンドのうちの1つに結合することによって、この結合の結果として、Tie2チロシンキナーゼ受容体の、そのリガンド（即ちAng1、Ang2、Ang3、及びAng4）のうちの1つ以上による活性化を遮断又は阻害する、作用剤の機能的クラスを指す。本明細書中で使用される場合、用語「Tie2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニスト」は、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤を含む。

30

【0052】

句「小分子薬剤」は、医薬活性を有し、かつ分子量が約2kDa未満、約1kDa未満、約900Da未満、約800Da未満、又は約700Da未満である、ポリマーでない、多くの場合有機又は有機金属である分子実体を指す。この用語は、タンパク質又は核酸以外の「薬剤」と呼ばれる大半の医薬化合物を包含するが、小さなペプチド又は核酸類似体は小分子薬剤とみなすことができる。例としては、化学療法抗癌剤及び酵素阻害剤が挙げられる。小分子薬剤は、合成によって、半合成によって（即ち自然に発生する前駆体から）、又は生物学的に導出できる。

【0053】

個々のドメインの間にハイフンを用いてポリペプチドドメインの構成を記述する場合（例えばCH2-CH3）、列挙されているドメインの順序は、アミノ末端からカルボキシ末端へのものであることを理解されたい。

40

【0054】

用語「免疫複合体」は、共有結合によって阻害性ペプチド又は小分子薬剤に融合する抗体を指す。上記ペプチド又は小分子薬剤は、定常重鎖のC末端に、又は可変軽鎖及び／若しくは重鎖のN末端に、化学結合できる。

【0055】

「リンカー」は、メイタンシノイド等のペプチド又は小分子薬剤を抗腫瘍アンタゴニストに安定した共有結合で結合するために使用できる。リンカーは、化合物又は抗体が活性

50

のままとなる条件において、酸誘導型切断、光誘導型切断、ペプチダーゼ誘導型切断、エステラーゼ誘導型切断、及びジスルフィド結合切断に対して、感受性を有してよく、又は実質的な耐性を有してもよい。好適なリンカーは当該技術分野で公知であり、例えばジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基、及びエステラーゼ不安定性基が挙げられる。リンカーは、本明細書に記載され、かつ当該技術分野で公知の、荷電リンカー及びその親水性形態も含む。免疫複合体は更に、抗腫瘍アンタゴニストとペプチド及び／又は小分子薬剤との間に、可撓性3 - 15アミノ酸リンカー、例えばGGG（配列番号283）又はGGGGS（G4S）反復ペプチドリリンカー（配列番号284～289）を含んでよい。

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「足場」は、抗体特異性の付加、抗体機能の強化、又は抗体構造及び安定性の支持を含む、アンタゴニストの機能をサポートするために望ましい特性を示すアミノ酸のいずれのポリマーを指す。足場にドナーポリペプチドの結合ドメインを移植することにより、足場にドナーポリペプチドの結合特異性を与えることができる。

【0057】

本明細書中で使用される場合、句「多重特異性阻害剤」は、異なる結合特異性を有する少なくとも2つの標的指向性ドメインを含む分子を指す。いくつかの実施形態では、多重特異性阻害剤は、足場と、異なる抗原又はエピトープを標的とする2つ以上の免疫グロブリン抗原結合ドメインとを含む、ポリペプチドである。特定の実施形態では、多重特異性阻害剤は二重特異性抗体又はアンタゴニストである。他の実施形態では、多重特異性阻害剤は三重特異性抗体又はアンタゴニストである。

【0058】

本明細書中で使用される場合、句「二重特異性」は、異なる結合特異性を有する少なくとも2つの標的指向性ドメインを含む分子を指す。各標的指向性ドメインは1つの標的分子に特異的に結合でき、該標的分子への結合時に該標的分子の生物学的機能を阻害できる。いくつかの実施形態では、二重特異性チェックポイント調節因子アンタゴニストは、2つ以上のポリペプチドを含むポリマー分子である。いくつかの実施形態では、標的指向性ドメインは、抗体の抗原結合ドメイン又はCDRを含む。いくつかの実施形態では、二重特異性阻害剤は二重特異性抗体である。

【0059】

用語「二重特異性抗体」、及び「二重特異性アンタゴニスト」は、2つの異なる抗原（又はエピトープ）に特異的に結合できる抗体に関して、相互交換可能なものとして使用される。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、その2つの結合アームのうちの一方（1対のHC/LC）において1つの抗原（又はエピトープ）に結合し、その第2のアーム（異なる1対のHC/LC）において異なる抗原（又はエピトープ）に結合する、全長抗体である。これらの実施形態では、二重特異性抗体は、（（特異性及びCDR配列いずれについても）別個のものである2つの抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して1価である。

【0060】

他の実施形態では、二重特異性抗体は、その2つの結合アーム（2対のHC/LC）それぞれにおいて2つの異なる抗原（又はエピトープ）に結合できる、全長抗体である。これらの実施形態では、二重特異性抗体は、同一の特異性及び同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して2価である。

【0061】

用語「三重特異性抗体」、及び「三重特異性アンタゴニスト」は、3つの異なる結合特異性を有する3つの標的指向性ドメインを含む分子に関して、相互交換可能なものとして使用される。各標的指向性ドメインは1つの標的分子に特異的に結合でき、該標的分子への結合時に該標的分子の生物学的機能を阻害できる。いくつかの実施形態では、三重特異性アンタゴニストは、2つ以上のペプチドを有するポリマー分子である。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、標的指向性ドメインは、抗体の抗原結合ドメイン又はCDRを含む。いくつかの実施形態では、三重特異性アンタゴニストは三重特異性抗体である。

【0062】

例示的な二重特異性及び三重特異性抗体としては：非対称IgG様抗体（例えばトリオマブ／クアドローマ、Trion Pharma／Fresenius Biotech）；ノブ・イントゥ・ホール（knobs - into - holes）抗体（Genentech）；Cross mAb（Roche）；静電気適合抗体（AMGEN）；LUZ - Y（Genentech）；ストランド・エクスチェンジ・エンジニアード（strand exchange engineered）ドメイン（SEED）ボディ（EMD Serono；Biologic、Merus）；Fab交換抗体（Genmab）；
10 対照IgG様抗体（例えば二重標的（dual targeting：DT） - Ig（GSK／Domantis）；トゥ・イン・ワン（two - in - one）抗体（Genentech）；架橋mAb（Karmanos Cancer Center）；mAb²（F - star）；Cov X - body（Cov X／Pfizer）；二重可変ドメイン（DVD） - Ig融合（Abbott）；IgG様二重特異性抗体（Eli Lilly）；Ts2Ab（Medimmune／AZ）；BsAb（ZymoGenetics）；HERCULES（Biogen Idec、TvAb、Roche）；scFv／Fc融合；SCORPION（Emergent BioSolutions／Trubion、ZymoGenetics／BMS）；二重親和性標的転換技術（Fc - DART、MacroGenics）；二重（scFv）₂ - Fab（National
20 Research Center for Antibody Medicine）；F（ab）₂融合（Medarex／AMGEN）；二重作用又はBis - Fab（Genentech）；ドック・アンド・ロック（Dock - and - Lock）（DNL、ImmunoMedics）；Fab - Fv（UCB - Celltech）；scFv及びダイアボディベース抗体（例えば二重特異性T細胞エンゲージャ（BiTE、Micromet）；タンデムダイアボディ（Tandab、Affimed）；DART（MacroGenics）；一本鎖ダイアボディ；TCR様抗体（AIT、Receptor Logistics）；ヒト血清アルブミンscFv融合（Merrimack）；COMBODIES（Epigen Biotech）；及びIgG／非IgG融合（例えば免疫サイトカイン（EMDSerono、Philogen、ImmunGene、Immu
30 noMedics））が挙げられる。

【0063】

用語「治療する」及び「治療」は、細胞増殖性障害に関連する1つ以上の症状の改善；細胞増殖性障害の1つ以上の症状の発症の予防若しくは遅延；及び／又は細胞増殖性障害の1つ以上の症状の重篤度若しくは頻度の低減を指す。

【0064】

句「それを必要とする患者」、「治療を必要とする患者」、又は「治療を必要とする被験者」は、細胞増殖性障害の治療のための本開示の抗腫瘍アンタゴニストの投与から利益を得る、哺乳類被験者等の被験者を含む。

【0065】

用語「治療有効量」、「薬理学的有効量」、及び「生理学的有効量」は、血流又は標的組織中に閾値レベルの活性アンタゴニスト作用剤を提供するために必要な抗腫瘍アンタゴニストの量を意味するために、相互交換可能なものとして使用される。正確な量は、例えば特定の活性剤、成分、及び成分の物理的特徴、目的とする患者集団、患者の考慮事項等といった多数の因子に左右され、本明細書中で提供される情報、又は関連文献で入手できる情報に基づいて、当業者が容易に決定できる。

【0066】

本文脈で使用される場合、用語「改善する」、「増大させる」、又は「低減する」は、本明細書に記載の治療を開始する前の同一個体における測定値、又は本明細書に記載の治療を受けない対照個体（若しくは複数の対照個体）における測定値といったベースライン

10

20

30

40

50

測定値と比較した、値又はパラメータを示す。

【0067】

「対照個体」は、治療を受ける個体と同一の細胞増殖性障害に苦しむ、（治療を受ける個体と1体以上の対照個体との疾患のステージが同等であることを保証するために）治療を受ける個体と概ね同年齢である、個体である。治療を受ける個体（「患者」又は「被験者」と呼ばれる場合もある）は、細胞増殖性障害を有するヒトの胎児、乳児、小児、青年、又は成人であってよい。

【0068】

用語「細胞増殖性障害」は、細胞の異常増殖を特徴とする障害を指す。増殖性障害は、細胞成長の速度に関するいかなる制限も含意せず、単に成長及び細胞分裂に影響を及ぼす正常な制御の喪失を示す。従っていくつかの実施形態では、増殖性障害の細胞は、正常細胞と同一の細胞分裂速度を有し得るものの、このような成長を制限するシグナルに応答しない。「細胞増殖性障害」の範囲内には、新生物、癌、又は腫瘍が存在する。

【0069】

用語「癌」又は「腫瘍」は、周囲の組織に侵入する、及び／又は新たな定着部位に転移する能力を有する、細胞の増殖を特徴とする多様な悪性新生物のいずれの1つを指し、白血病、リンパ腫、癌腫、黒色腫、肉腫、胚細胞腫瘍、及び芽細胞腫を含む。本開示の方法での治療のための例示的な癌としては、脳癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、中皮腫、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、及び子宮癌、白血病、並びに髄芽腫が挙げられる。

【0070】

用語「白血病」は、造血器官の進行性悪性疾患を指し、一般に、血液及び骨髄中での白血球及びその前駆体の増殖及び発達の異常を特徴とする。例示的な白血病としては例えば、急性非リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球症性白血病、好塩基球性白血病、芽細胞性白血病、ウシ白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリー細胞白血病、血芽球性白血病、血球始原細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ液性白血病（*lymphatic leukemia*）、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病（*lymphogenous leukemia*）、リンパ球白血病（*lymphoid leukemia*）、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄性顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、垂白血病性白血病、及び未分化細胞性白血病が挙げられる。

【0071】

用語「癌腫」は、周辺組織に浸潤して転移を引き起こす傾向を有する、上皮細胞の悪性成長を指す。例示的な癌腫としては例えば、腺房癌（*acinar carcinoma*、*acinous carcinoma*）、腺囊癌腫、腺様嚢胞癌、腺腫性癌、副腎皮質の癌腫、肺胞癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌（*basal cell carcinoma*、*carcinoma basocellulare*）、類基底細胞癌、基底細胞上皮腫（*basosquamous cell carcinoma*）、細気管支肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌、胆管細胞癌、絨毛膜癌、膠様腺癌、面胞癌、子宮体癌、篩状癌、鏝状癌、皮膚癌、円柱腫、円柱細胞癌、乳管癌、非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、浸潤性小葉癌、硬癌、胎児性癌、脳様癌、類表皮癌、腺様上皮癌（*carcinoma epitheliale adenoides*）、外向発育癌、潰瘍癌、線維性癌、膠様癌（*gelatiniform carcinoma*、*gelatinous carcinoma*）、巨細胞癌（*giant cell carcinoma*、*carcinoma gigantocellulare*）、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛

母癌、血液様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子様癌 (hyaline carcinoma)、副腎様腫、乳児胎児性癌、非浸潤性癌、表皮内癌、上皮内癌、クロンペッカー癌 (Krompecher's carcinoma)、クルチツキー細胞癌 (Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、レンズ状癌 (lenticular carcinoma、carcinoma lentificulare)、脂肪腫様癌、リンパ上皮癌、髄様癌、(carcinoma medullare、medullary carcinoma)、黒色腫 (melanotic carcinoma)、軟性腫 (carcinoma molle)、粘液性癌腫 (mucinous carcinoma)、粘液分泌性癌 (carcinoma muciparum)、粘液細胞癌 (carcinoma mucocellulare)、粘表皮癌 (mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌 (carcinoma mucosum)、粘液性癌 (mucous carcinoma)、粘液腫様癌 (carcinoma myxomatodes)、鼻咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、類骨腫、乳頭状癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、粥状癌腫、腎細胞癌、予備細胞癌、肉腫性癌、シュナイダー膜癌腫、スキルス癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、バレイショ状癌 (solanoïd carcinoma)、球状細胞癌、紡錘細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、ひも状癌、血管拡張性癌腫、末梢血管拡張性癌腫、移行上皮癌、結節癌 (carcinoma tuberosum、tuberous carcinoma)、疣贅性癌、及び絨毛癌が挙げられる。

10

【0072】

20

用語「肉腫」は、胚性結合組織様の物質で構成され、一般に線維状の又は均質な物質に埋入された、密に詰まった細胞で構成される、腫瘍を指す。例示的な肉腫としては例えば、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アベメシー肉腫 (Abemethy's sarcoma)、脂肪性肉腫、脂肪肉腫、胞巣状軟部肉腫、エナメル芽細胞性肉腫、ブドウ状肉腫、緑色腫肉腫、絨毛癌、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫 (例えば非ホジキンリンパ腫)、T細胞の免疫芽球性肉腫、ジェンセン肉腫、カポジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉腫肉腫、傍骨肉腫、細網肉腫、ラウス肉腫、漿液嚢胞性肉腫、滑膜肉腫、及び毛細血管拡張性肉腫が挙げられる。

30

【0073】

用語「黒色腫」は、皮膚及び他の器官のメラニン細胞系から発生する腫瘍を指す。黒色腫としては例えば、末端性黒子型黒色腫、無色素性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディング-パッセー黒色腫、若年性黒色腫、黒子性悪性黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫、及び表層進展性黒色腫が挙げられる。

【0074】

更なる癌としては例えば、ホジキン病、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃癌、結腸癌、悪性膵インスラノーマ、悪性カルチノイド、前癌性皮膚病変、精巣癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、泌尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、及び副腎皮質癌が挙げられる。

40

【0075】

I. 三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト

本出願のある態様は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する第1の標的指向性ドメイン；VEGFに特異的に結合し、VEGFR由来の1つ以上のペプチドドメインを含む、第2の標的指向性ドメイン；アンジオポエチン/Tie-2シグナル伝達経路の阻害剤を含む第3の標的指向性ドメインを含み、上記第1の標的指向性ド

50

メインは、上記タンパク質足場のアミノ末端に位置し、上記第2の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のカルボキシ末端に位置する。いくつかの実施形態では、上記第3の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のFcループ中のCH3ドメイン内に挿入される。

【0076】

組換えDNA技術によって生成される融合タンパク質（例えばFc-融合タンパク質）は多くの場合、宿主細胞由来プロテアーゼによる、細胞培養物中での完全な又は部分的な変質（クリッピング）という深刻な問題に直面する。クリッピングは、標的タンパク質の低分子量（LMW）種を生成し、不活性ポリペプチドをもたらす。いずれの特定の理論によって束縛されることを望むものではないが、生物学的ペプチドの位置が、得られる融合タンパク質の変質の程度に影響を及ぼすという仮説が立てられている。本出願の発明者らは、FcループのCH3領域に第2の標的指向性ドメインを挿入することによって、得られる三重特異性アンタゴニストのクリッピングが大幅に低減されることを発見した。

10

【0077】

本出願の別の態様は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する第1の標的指向性ドメイン；VEGFRに特異的に結合し、VEGFR由来の1つ以上のペプチドドメインを含む、第2の標的指向性ドメイン；及びTGF経路阻害剤を含む第3の標的指向性ドメインを含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のCH3ドメインのカルボキシ末端に位置し、上記第3の標的指向性ドメインは、上記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に位置する。いくつかの実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、第1のリンカーを介して、上記タンパク質足場のCH3ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される。いくつかの実施形態では、上記第3の標的指向性ドメインは、第2のリンカーを介して、上記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される。いくつかの実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、第1のリンカーを介して、上記タンパク質足場のCH3ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合され、上記第3の標的指向性ドメインは、第2のリンカーを介して、上記第2の標的指向性ドメインのカルボキシ末端に構造的に結合される。本出願の発明者らは、このような構成が、対応するアンタゴニストに改善された薬物動態を与えることを、予想外に発見した。

20

30

【0079】

いくつかの実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、配列番号185のアミノ酸配列を有するVEGFR成分（アフリベルセプト）を含む。更なる実施形態では、上記VEGFR成分は、アスパラギン酸残基をグルタミン酸残基で置換することによってa-グリコシル化される。a-グリコシル化VEGFR成分の例示的なアミノ酸配列は、配列番号207で例示されている。a-グリコシル化VEGFR成分を有する三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト多様体は、野生型アフリベルセプトに比べて改善された薬物動態を示しながら、VEGFR生物活性を保持している。

40

【0080】

本出願の別の態様は、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する第1の標的指向性ドメイン；TGF- β 経路阻害剤を含む第2の標的指向性ドメイン；及びアンジオポエチン/Tie-2シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む第3の標的指向性ドメインを含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、上記第1の標的指向性ドメインは、ベバシズマブ又はその多様体を含み、上記第3の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のFcループの2つのCH3領域それぞれの中に挿入される。いくつかの実施形態では、上記第1の標的指向

50

性ドメインは、1つ以上の抗PD-1可変ドメインを含み、上記第3の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のFcループの2つのCH3領域それぞれの中に挿入される。いくつかの実施形態では、上記第1の標的指向性ドメインは、1つ以上の抗PD-L1可変ドメインを含み、上記第3の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のFcループの2つのCH3領域それぞれの中に挿入される。

【0082】

いくつかの実施形態では、トレバニブペプチドは、配列：AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE（配列番号182）を含む。特段の記載がない限り、「トレバニブペプチド」及び指定「-長鎖」又は「-L」は、配列番号182の配列に対応し、これは、Ang-1/2遮断ペプチド配列QEECEWDPWTCEHM（配列番号194）の2つのコピーを含む。特定の実施形態では、本出願の三重特異性アンタゴニストは、指定「-短鎖」又は「-S」を伴う配列番号194に対応する配列の単一のコピーを含有する、トレバニブペプチドの修飾されたバージョンを含む。

10

【0083】

II. 二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト

本出願の別の態様は、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する第1の標的指向性ドメイン；及びアンジオポエチン/Tie-2シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む第2の標的指向性ドメインを含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、上記第1の標的指向性ドメインは、1つ以上の抗PD-1又は抗PD-L1可変ドメインを含み、上記第2の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場のFcループの2つのCH3領域それぞれの中に挿入される。

20

【0085】

本出願の別の態様は、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する、第1の標的指向性ドメイン；及びVEGFR成分を含む第2の標的指向性ドメインを含む。

【0086】

図41A～40Cは、例示的な二重特異性抗PD-1/VEGFR成分及び抗PD-L1/VEGFR成分分子である、Bi-ZPL-1及びBi-ZPL-2、並びにBi-ZPL-3を示し、これらはそれぞれ、N末端（図41A）又はカルボキシ末端（図41B～C）にアフリベルセプトを含有する。一実施形態では、Bi-ZPL-1は、配列番号218に記載の配列を含有する免疫グロブリン重鎖、及び/又は配列番号219に記載の配列を含有する免疫グロブリン軽鎖を有する。別の実施形態では、Bi-ZP-1は、配列番号220に記載の配列を含有する免疫グロブリン重鎖、及び/又は配列番号221に記載の配列を含有する免疫グロブリン軽鎖を有する。

30

【0087】

別の実施形態では、Bi-ZP-2は、配列番号222に記載の配列を含有する免疫グロブリン重鎖、及び/又は配列番号223に記載の配列を含有する免疫グロブリン軽鎖を有する。別の実施形態では、Bi-ZPL-2は、配列番号224に記載の配列を含有する免疫グロブリン重鎖、及び/又は配列番号225に記載の配列を含有する免疫グロブリン軽鎖を有する。

40

【0088】

別の実施形態では、Bi-ZPL-3は、配列番号296に記載の配列を含有する免疫グロブリン重鎖、及び/又は配列番号297に記載の配列を含有する免疫グロブリン軽鎖を有する。

【0089】

本出願の別の態様は、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：タンパク質足場；ベバシズマブを含む第1の標的指向性ドメイン；ア

50

ンジオポエチン／T i e - 2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む第 2 の標的指向性ドメインを含む。いくつかの実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場の F c ループ中の C H 3 ドメイン内に挿入される。

【0090】

本出願の別の態様は、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：F c 断片を含むタンパク質足場；V E G F R 成分を含む第 1 の標的指向性ドメイン；アンジオポエチン／T i e - 2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む第 2 の標的指向性ドメインを含む。いくつかの実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場の F c ループ中の C H 3 ドメイン内に挿入される。いくつかの実施形態では、上記タンパク質足場の上記 F c 断片は、第 2 の標的指向性ドメインの挿入前に、配列番号 210～217 からなる群から選択されるアミノ酸を含む。

10

【0091】

本出願の別の態様は、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに関し、上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：F c 断片を含むタンパク質足場；T G F B R 2 E C D を含む第 1 の標的指向性ドメイン；アンジオポエチン／T i e - 2 シグナル伝達経路のペプチド阻害剤を含む第 2 の標的指向性ドメインを含む。いくつかの実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、上記タンパク質足場の F c ループ中の C H 3 ドメイン内に挿入される。いくつかの実施形態では、上記タンパク質足場の上記 F c 断片は、第 2 の標的指向性ドメインの挿入前に、配列番号 210～217 からなる群から選択されるアミノ酸を含む。

【0092】

本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、I g G バックボーンを用いて構築できる。より具体的には、本出願の二重特異性アンタゴニストのいずれは、I g G 1 又は I g G 4 バックボーンを用いて構築できる。I g G 1 バックボーンの使用は癌治療に好ましく、この場合標的は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (A D C C) を仲介できる抗原提示細胞上に存在する。I g G 4 バックボーンを使用すると、抗原結合のみで所望の治療的利益を十分に生成できる場合に、抗原を標的化できる。I g G 4 系アンタゴニストは、例えば I g G 1 抗体に関連する、F c γ R 結合及び補体活性化を含む望ましくないエフェクタ機能を排除する。

20

【0093】

I I I . 標的指向性ドメイン

30

A . 免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する標的指向性ドメイン

免疫チェックポイント調節因子に特異的に結合する標的指向性ドメインとしては、限定するものではないが：(1) 抗 P D - 1 抗体及び抗 P D - 1 抗体断片；(2) 抗 P D - L 1 抗体及び抗 P D - L 1 抗体断片；(3) 抗 T I G I T 抗体及び抗 T I G I T 抗体断片；並びに (4) 抗 L A G - 3 抗体及び抗 L A G - 3 抗体断片が挙げられる。

【0094】

1 . 抗 P D - 1 抗体及び抗 P D - 1 抗体断片

いくつかの実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニストは、抗 P D - 1 抗体又は抗体断片である。ある特定の実施形態では、本出願の P D - 1 阻害剤は、抗体又はその抗原結合部分であって：(1) 重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は 3 つの相補性決定領域 (H C D R) : H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含み、ここで H C D R 1 は、配列番号 48、51、54、56、及び 59 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、H C D R 2 は、配列番号 49、52、57、及び 60 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有し、H C D R 3 は、配列番号 50、53、55、58、及び 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；(2) 軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は 3 つの相補性決定領域 (L C D R) : L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、ここで L C D R 1 は、配列番号 62、65、68、69、70、及び 73 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有する

40

50

アミノ酸配列を有し、L C D R 2 は、配列番号 6 3、6 6、7 1、及び 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し、L C D R 3 は、配列番号 6 4、6 7、7 2、及び 7 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト P D - 1 に特異的に結合する。

【0095】

いくつかの実施形態では、本出願の P D - 1 阻害剤は：(1) 配列番号 1 2 7、1 2 9、1 3 1、1 3 3、1 3 5、及び 1 3 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；(2) 配列番号 1 2 8、1 3 0、1 3 2、1 3 4、1 3 6、及び 1 3 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト P D - 1 に特異的に結合する。

【0096】

いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体又は抗体断片は：(1) 配列番号 5 9 の H C D R 1、配列番号 6 0 の H C D R 2、及び配列番号 6 1 の H C D R 3、並びに(2) 配列番号 3 6 6 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 1、配列番号 3 6 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 2、配列番号 3 7 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 3、配列番号 3 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 4 を含む、重鎖可変領域と；(1) 配列番号 7 3 の L C D R 1、配列番号 7 4 の L C D R 2、及び配列番号 7 5 の L C D R 3、並びに(2) 配列番号 3 7 2 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 1、配列番号 3 7 3 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 2、配列番号 3 7 4 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 3、配列番号 3 7 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 4 を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域とを含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体又は抗体断片は：(1) 配列番号 5 6 の H C D R 1、配列番号 5 7 の H C D R 2、及び配列番号 5 8 の H C D R 3、並びに(2) 配列番号 3 6 6 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 1、配列番号 3 6 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 2、配列番号 3 6 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 3、配列番号 3 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する H F R 4 を含む、重鎖可変領域と；(1) 配列番号 7 0 の L C D R 1、配列番号 7 1 の L C D R 2、及び配列番号 7 2 の L C D R 3、並びに(2) 配列番号 3 6 8 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 1、配列番号 3 6 9 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 2、配列番号 3 7 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 3、配列番号 3 6 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、又は 9 0 % の同一性を有する L F R 4 を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域とを含む。

【0098】

用語「2 P 1 7」又は「P D - 0 6」は：(1) 配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び(2) 配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、本出願の P D - 1 阻害剤を指す。2 P 1 7 (又は P D - 0 6) の C D R 及び F R 領域は、配列番号 5 9 ~ 6 1、7 3 ~ 7 5、3 5 7、3 6 0、3 6 6、及び 3 7 1 ~ 3 7 5 として列挙されている。

【0099】

用語「2P16」又は「PD-05」は：（１）配列番号135のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び（２）配列番号136のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、本出願のPD-1阻害剤を指す。2P16（又はPD-05）のCDR及びFR領域は、配列番号56～58、70～72、357、360、366、及び365～370として列挙されている。

【0100】

２．抗PD-L1抗体及び抗PD-L1抗体断片

一実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニストは、抗PD-L1抗体又は抗体断片である。ある特定の実施形態では、本出願のPD-L1阻害剤は：（１）重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域（HCDR）：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号76、79、85、及び88からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号77、80、82、84、86、及び89からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号78、81、83、87、及び90からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；（２）軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域（LCDR）：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号91、94、98、101、及び104からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号92、95、99、102、及び105からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号93、96、97、100、及び106からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒトPD-L1に特異的に結合する。

【0101】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体又は抗体断片は：（１）配列番号79のHCDR1、配列番号82のHCDR2、及び配列番号83のHCDR3、並びに（２）配列番号366のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR1、配列番号360のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR2、配列番号383のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR3、配列番号357のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR4を含む、重鎖可変領域と；（１）配列番号91のLCDR1、配列番号92のLCDR2、及び配列番号93のLCDR3、並びに（２）配列番号377のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR1、配列番号378のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR2、配列番号379のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR3、配列番号365のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR4を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域とを含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、本出願のPD-L1阻害剤は：（１）配列番号139、141、143、145、147、149、151、及び153からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；（２）配列番号140、142、144、146、148、150、152、及び154からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒトPD-L1に特異的に結合する。好ましい実施形態で

は、抗PD-L1抗体の重鎖及び軽鎖は配列番号153～154からなる。

【0103】

用語「PL-08」は：（１）配列番号153のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び（２）配列番号154のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、本出願のPD-L1阻害剤を指す。PL-08のCDR及びFR領域は、配列番号79、82、83、91～93、357、360、365、366、377～379、及び383として列挙されている。

【0104】

3. 抗TIGIT抗体及び抗TIGIT抗体断片

いくつかの実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニストは、抗TIGIT抗体又は抗体断片である。ある特定の実施形態では、本出願のTIGIT阻害剤は：（１）重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域（HCDR）：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号1、6、11、15、17、20、及び23からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号2、4、7、9、12、13、16、18、21、及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号3、5、8、10、14、19、22、及び25からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；（２）軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域（LCDR）：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号26、29、31、33、35、39、42、及び45からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号27、30、36、37、40、43、及び46からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号28、32、34、38、41、44、及び47からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒトTIGITに特異的に結合する。

【0105】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT抗体又は抗体断片は：（１）配列番号23のHCDR1、配列番号24のHCDR2、及び配列番号25のHCDR3、並びに（２）配列番号343のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR1、配列番号330のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR2、配列番号344のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR3、配列番号319のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR4を含む、重鎖可変領域と；（１）配列番号45のLCDR1、配列番号46のLCDR2、及び配列番号47のLCDR3、並びに（２）配列番号303のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR1、配列番号311のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR2、配列番号317のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR3、配列番号345のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR4を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域とを含む。

【0106】

別の実施形態では、本出願のTIGIT阻害剤は：（１）配列番号107、109、111、113、115、117、119、121、123、及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；（２）配列番号108、110、112、114、116、118、120、122、124、及び126からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～

約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒト T I G I T に特異的に結合する。好ましい実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、配列番号 125 及び 126 からなる重鎖及び軽鎖の配列を有する。

【0107】

用語「B21-35」又は「T-10」は：(1) 配列番号 125 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び(2) 配列番号 126 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、本出願の T I G I T 阻害剤を指す。B21-35 (又は T-10) の C D R 及び F R 領域は、配列番号 23~25、45~47、303、311、317、319、330、及び 343~345 として列挙されている。

10

【0108】

4. 抗LAG-3抗体及び抗LAG-3抗体断片

一実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニストは、抗LAG-3抗体又は抗体断片である。ある特定の実施形態では、本出願のLAG-3阻害剤は：(1) 重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号155~157からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号158~160からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号161~163からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；(2) 軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号164~166からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号167及び168からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号169及び170からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒトLAG-3に特異的に結合する。

20

【0109】

いくつかの実施形態では、抗LAG-3抗体又は抗体断片は：(1) 配列番号156のHCDR1、配列番号158のHCDR2、及び配列番号161のHCDR3、並びに(2) 配列番号399のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR1、配列番号400のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR2、配列番号401のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR3、配列番号402のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR4を含む、重鎖可変領域と；(1) 配列番号164のLCDR1、配列番号167のLCDR2、及び配列番号169のLCDR3、並びに(2) 配列番号403のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR1、配列番号404のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR2、配列番号405のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR3、配列番号406のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するLFR4を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域とを含む。

30

40

【0110】

他の実施形態では、本出願のLAG-3阻害剤は：(1) 配列番号171~174からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と；(2) 配列番号175~178からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、抗体又はその抗原結合部分であり、上記抗体又はその抗原結合部分は、ヒ

50

トLAG-3に特異的に結合する。好ましい実施形態では、抗LAG-3抗体は、配列番号171及び175からなる重鎖及び軽鎖の配列を有する。

【0111】

用語「2L2A.1」は：(1)配列番号171のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び(2)配列番号175のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、本出願のLAG-3阻害剤を指す。2L2A.1のCDR及びFR領域は、配列番号156、158、161、164、167、169、及び399～406として列挙されている。

【0112】

B. 血管新生経路成分に特異的に結合する標的指向性ドメイン

血管新生、即ち既に存在する血管からの新たな血管の発達は、腫瘍の成長及び転移のために重要である。血管新生の阻害は、進行（例えば転移）が血管新生に依存する癌等の疾患の治療のための、潜在的に価値のある戦略を提示する。血管新生の阻害は腫瘍細胞の死をもたらし、これにより、腫瘍抗原を宿主の抗原提示経路に供給できる。

【0113】

2つの重要な血管新生経路として、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)経路及びTie2経路が挙げられる。

【0114】

1. VEGF経路アンタゴニスト及び阻害剤

主要なVEGF経路は、膜透過性チロシンキナーゼVEGF-R2によって仲介される。VEGFの様々なアイソフォーム、特にVEGF-Aは、VEGF-R1及びVEGF-R2に結合して、様々な下流のチロシンキナーゼのリン酸化によって、二量体化及び活性化をもたらす。

【0115】

いくつかの実施形態では、VEGF経路アンタゴニストは、VEGF-A、又はその受容体VEGFR-1及びVEGFR-2に結合し、この結合の結果として、VEGF-AによるVEGFR-1及びVEGFR-2の活性化が遮断又は阻害される。血管新生阻害剤は、例えば抗体、可変ドメイン断片、又はドミナントネガティブ融合タンパク質断片の形態であってよい。

【0116】

例示的なドミナントネガティブ抗VEGFRアンタゴニストは、ヒトVEGF受容体1又は2の細胞外ドメイン(ECD)に対応するタンパク質断片である。ある好ましい実施形態では、ドミナントネガティブ抗VEGFRアンタゴニストは、アフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))であり、これは、ヒトIgG1又はIgG4Fc断片と融合した、ヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメイン由来のVEGF-A結合部分を含有する、組換え融合タンパク質である。アフリベルセプト等のVEGFR-ECDは、VEGF-Aのための可溶性受容体デコイとして作用する。

【0117】

(Zaltrap(登録商標))としても知られる)アフリベルセプトは、ヒトIgG1免疫グロブリンのFc部分と融合したヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメイン由来の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)結合部分からなる、組換えVEGF融合タンパク質である。アフリベルセプトは、循環中の可溶性リガンドを含む、VEGF-A、VEGF-B、抗胎盤成長因子(PIGF)-1及びPIGF-2を含む血管新生に関与する複数のリガンドに結合する。

【0118】

ある好ましい実施形態では、本明細書に記載の三重特異性抗腫瘍アンタゴニストのアフリベルセプトドメインは、アスパラギン酸(Asn、N)残基をグルタミン酸(Glu、E)残基で置換することによって、a-グリコシル化される。N-結合型グリコシル化は、タンパク質のAsn残基の窒素原子(アミド窒素)へのグリカンの付着である。グリコシル化されるAsn残基は、一次構造の特定のコンセンサス配列(Asn-X-Ser又はAsn-X-Thr(ここでXは、プロリン以外のいずれのアミノ酸を指す))に配置さ

10

20

30

40

50

れている必要がある。A s n 残基を G l u 残基（又は他のいずれのアミノ酸残基）で置換することにより、これらの部位でグリコシル化は発生しない。上述の特定のコンセンサス配列に配置された 1 つ以上の A s n 残基は置換可能である。

【0119】

アシアロ糖タンパク質受容体 1 及び 2（A S G R 1 及び A S G R 2）は、露出した末端ガラクトース又は N - アセチルガラクトサミン残基を有する糖タンパク質のエンドサイトーシス及びリソソーム分解を仲介することによって、血清糖タンパク質ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす、膜透過性タンパク質である。場合によっては、タンパク質のグリコシル化は、A S G R 1 及び A S G R 2 によるクリアランスの上昇をもたらす可能性がある。V E G F R 成分ドメインを有する三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの薬物動態を改善する（即ち、より長い半減期を達成する）ために、本出願の発明者らは、A S G R 1 及び A S G R 2 によるタンパク質のクリアランスを制限するための、V E G F R 成分の a - グリコシル化多様体を生成した。a - グリコシル化 V E G F R 成分を有する三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト多様体は、V E G F R 生物活性を保持しながら、薬物動態のアルファ相をグリコシル化 V E G F R 成分に比べて約 5 倍改善する。図 37 を参照されたい。アフリベルセプト V E G F 結合ドメインの例示的なアミノ酸配列は、配列番号 185、即ち SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK に示されており、a - グリコシル化アフリベルセプト V E G F 結合ドメインの例示的なアミノ酸配列は、配列番号 207、即ち SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPEITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISEATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLECTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKESTFVRVHEK に示されている。置換部位には下線が付されている。

【0120】

例示的な V E G F 抗体アンタゴニストは、ベバシズマブ（A v a s t i n（商標））というヒト化抗体である。ベバシズマブは、変異したヒト I g G 1 フレームワーク領域（F R）と、V E G F R - 2 に対するヒト V E G F - A の結合を遮断するマウス抗 h V E G F モノクローナル抗体 A 4. 6. 1 由来の抗原結合相補性決定領域とを含む。ベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ 93%（フレームワーク領域の大半を含む）は、ヒト I g G 1 由来であり、上記配列の約 7% はマウス抗体 A 4. 6. 1 由来である。ベバシズマブは、約 149, 000 ダルトンの分子質量を有し、グリコシル化されている。特定の実施形態では、米国特許第 7, 575, 893 号に記載されているように、ベバシズマブ / A v a s t i n 抗体にアミノ酸置換が含まれていてよい（配列番号 226 ~ 227）。例示的なアミノ酸置換としては、限定するものではないが、E 1 Q、E 6 Q、L 11 V、Q 13 K、L 18 V、R 19 K、A 23 K、又はこれらの組み合わせが挙げられる。

【0121】

更なる抗 V E G F 抗体としては：ベバシズマブと同一の親マウス抗体に由来するモノクローナル抗体断片である、ラニビズマブ（商品名：L u c e n t i s（商標））（配列番号 294 ~ 295）；米国公開特許第 2006 / 0280747 号、米国公開特許第 2007 / 0141065 号、及び / 又は米国公開特許第 2007 / 0020267 号に記載されている G 6 又は B 20 シリーズ抗体（例えば G 6 - 23、G 6 - 31、B 20 - 4. 1）；並びに米国特許第 7, 297, 334 号、米国特許第 7, 060, 269 号、米国特許第 6, 884, 879 号、米国特許第 6, 582, 959 号、米国特許第 6, 703, 020 号、米国特許第 6, 054, 297 号、米国特許出願公開第 2007 / 059312 号、米国特許出願公開第 2006 / 009360 号、米国特許出願公開第 2005 / 0186208 号、米国特許出願公開第 2003 / 0206899 号、米国特許出願公開第 2003 / 0190317 号、及び米国特許出願公開第 2003 / 0203409 号に記載の抗体が挙げられる。

【0122】

例示的な抗 V E G F R - 2 抗体アンタゴニストは、ヒト化 I g G 1 モノクローナル抗体であるラムシルマブであり、これは、V E G F R - 2 の細胞外ドメインに結合することによって、V E G F R - 2 と V E G F - A との相互作用を遮断する。更なる抗 V E G F R - 2 抗体は、米国特許第 7, 4 9 8, 4 1 4 号、米国特許第 6, 4 4 8, 0 7 7 号、及び米国特許第 6, 3 6 5, 1 5 7 号に記載されている。

【0123】

V E G F 経路の例示的な小分子アンタゴニストとしては、スニチニブ、ソラフェニブ、セディナニブ、パゾパニブ、及びニンテダニブを含む、V E G F R - 2 のマルチキナーゼ阻害剤が挙げられる。

【0124】

2. T i e 2 経路アンタゴニスト及び阻害剤

T i e 2 経路は、そのための治療用抗体及び小分子薬剤が開発されている、別の血管新生経路である。T i e 2 チロシンキナーゼ受容体は、そのアンジオポエチン (A n g) リガンド (即ち A n g 1、A n g 2、A n g 3 (マウス)、及び A n g 4) による結合にตอบสนองして、血管新生を活性化する。T i e 2 経路アンタゴニストは、T i e 2 チロシンキナーゼ受容体又はそのアンジオポエチン (A n g) リガンド (即ち A n g - 1、A n g - 2、A n g - 3、及び A n g - 4) のうちの 1 つに結合し、その結合の結果として、そのリガンドのうちの 1 つ以上による T i e 2 受容体の活性化を遮断又は阻害する。

【0125】

一実施形態では、T i e 2 受容体結合アンタゴニストは阻害性ペプチドである。別の実施形態では、上記阻害性ペプチドは、配列番号 1 8 2 のアミノ酸配列、即ち A Q Q E E C E W D P W T C E H M G S G S A T G G S G S T A S S G S G S A T H Q E E C E W D P W T C E H M L E を含む。別の実施形態では、T i e 2 受容体結合アンタゴニストは、F c 断片の C 末端に融合した配列番号 1 8 2 のペプチド、即ち D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K G G G G G A Q Q E E C E W D P W T C E H M G S G S A T G G S G S T A S S G S G S A T H Q E E C E W D P W T C E H M L E (配列番号 1 8 3) を含む。別の実施形態では、上記阻害性ペプチドは、アミノ酸配列 Q E E C E W D P W T C E H M (配列番号 1 9 4) の単一のコピーを含む。

【0126】

別の実施形態では、上記阻害性ペプチドは、F c ループ中の 2 つの C H 3 領域それぞれに組み込まれる。このループ領域は、αヘリックス又はβシートでないタンパク質中の不規則な二次構造であるが、βシートをβシートに、βシートをαヘリックスに、又はαヘリックスをαヘリックスに接続する。上記阻害性ペプチドは、挿入によって (即ち既存の F c ループ中のアミノ酸の間に)、又は既存の F c ループ中のアミノ酸の置換によって (即ち既存の F c ループ中のアミノ酸を除去してペプチドアミノ酸を付加することによって)、付加できる。

【0127】

例示的な F c 断片は、配列番号 2 0 8 のアミノ酸配列、即ち D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K を含む。上述のループ領域は太字になっている。太字で示されている部位は全て、阻害性ペプチド配列による完全な若しくは部分的な置換、又は阻害性ペプチド配列の挿入に好適であり得る。特に好ましい置換及び挿入部位には下線が付されている。

【0128】

別の実施形態では、阻害性ペプチドは、配列番号 2 0 9、即ち S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M G G A Q Q E E C E W D P W T C E H M G S G S A T G G S G S T A S S G S G S A T H Q E E C E W D P W T C E H M L E G G T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V

10

20

30

40

50

FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKに示されているように、Fc残基であるMetとLysとの間の、配列EEMTKとして画定されるFc領域に挿入され、2つのGly残基を、挿入されるペプチドの両側に隣接するリンカーとして含む。Glyリンカーは斜字体になっており、阻害性ペプチドの挿入には下線が付されている。挿入部位は、TS-ZPT-3の図13A～14Bにも示されている。重鎖中で、第1の下線セクションは抗PD-1可変ドメインに対応し、第2の下線セクションはFcループに挿入されたトレバナニブペプチドに対応し、第3の下線セクションはカルボキシ末端に融合したアフリベルセプトドメインに対応する。

【0129】

Tie2活性化の他のペプチド阻害剤（Ang-2阻害剤を含む）としては：アミノ酸配列ETFLSTNKLENQ（配列番号184）を含むA-11（Compugen）；アミノ酸配列NSLSNASEFRAPY（配列番号195）を有するペプチド；アミノ酸配列NLLMAAS（配列番号196）を有するペプチド；CVX-060ペプチド（Pfizer）；CVX-037ペプチド（Pfizer）；及びCGEN-25017（Compugen）が挙げられる。Tie2活性化の更なるペプチド阻害剤は、米国特許第7,138,370号に記載されている。アンジオポエチン-1又はアンジオポエチン-2の例示的なペプチド阻害剤は、米国特許第7,138,370号、米国特許第7,521,053号、米国特許第7,658,924号、及び米国特許第8,030,025号に記載されている。

【0130】

Tie2活性化（及び／又はアンジオポエチン-2）の抗体阻害剤としては：AMG-780（Amgen）；MED-3617（MedImmune／AstraZeneca）；DX-2240（Dyax／Sanofi-Aventis）；REGN-910（Sanofi／Regeneron）；RG7594（Roche）；LC06（Roche）；TAVI6（Roche）；AT-006（Roche／Affitech）が挙げられる。更なるTie2受容体結合抗体アンタゴニスト、及びこれに由来する抗体結合配列は、米国特許第6,376,653号、米国特許第7,521,053号、米国特許第7,658,924号、米国特許第8,030,025号、並びに米国特許出願公開第2013/0078248号、米国特許出願公開第2013/0259859号、及び米国特許出願公開第2015/0197578号に記載されている。

【0131】

Tie2結合アンタゴニストとしては、小分子分子阻害剤であるCGI-1842（CGI Pharmaceuticals）、LP-590（Locus Pharmaceuticals）、ACTB-1003（Act Biotech／Bayer AG）、CEP-11981（Cephalon／Teva）、MGCD265（Methylgene）、レゴラフェニブ（Bayer）、カボザンチニブ／XL-184／BMS-907351（Exelixis）、フォレチニブ（Exelixis）、MGCD-265（MethylGene Inc.）も挙げられる。

【0132】

C. TGF経路阻害剤

TGF-βは、細胞増殖及び分化、遊走及び接着、腫瘍間質及び免疫抑制を含む細胞外マトリックス修飾、血管新生及び線維形成、アポトーシス、並びに他の機能を多数の細胞タイプにおいて制御する、ペプチドの多機能セットを含む。TGF-βは血管新生の強力な誘導因子であり、これは固形腫瘍の重要なサポートシステム、及び腫瘍細胞の播種の機序を提供する。多くの細胞がTGF-βを合成し、これらのうちのほとんど全てが、これらのペプチドに対する特異的受容体を有する。TGF-β1、TGF-β2、及びTGF-β3は全て、同一の受容体シグナル伝達系を介して機能する。TGF-βの活性形態は、セリンスレオニン1型及び2型受容体、それぞれTGF-βRI及びTGFβRIIで構成される膜結合ヘテロ四量体の形成を介してシグナルを送る二量体である。

【0133】

近年、TGF-β経路阻害剤が、TGF-β1又はTGF-β1RIIに対する抗体

又は結合断片、例えば TGF- β 1 RII の細胞外ドメイン (ECD) を含有するドミナントネガティブ融合タンパク質断片の形態で、開発されている。本明細書中で更に説明されるように、TGF β 1 RII ECD は、腫瘍成長及び播種の中心である更なるチェックポイント調節因子経路又は血管新生経路を標的とする、更なる結合剤と組み合わせられている。例示的なヒト TGF- β 1 RII ECD (野生型) は、配列番号 186 に記載のアミノ酸配列を有する。

【0134】

TGF- β 経路阻害剤は例えば：TGF- β 1 若しくは TGF- β 1 RII に対する抗体若しくは可変ドメイン断片；TGF 結合ペプチド；又は TGF- β 1 RII の細胞外ドメイン (ECD) 等のドミナントネガティブ融合タンパク質断片の形態であってよい。特定の実施形態では、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、TGF- β 1 RII ECD を含む。特定の実施形態では、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、TGF- β 1 RII ECD を含む。いくつかの実施形態では、TGF- β 1 RII ECD は、例えば図 30A 及び 30E に示すように、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト中の IgG のカルボキシ末端に融合する。他の実施形態では、TGF- β 1 RII ECD は、例えば図 30B 及び 30D に示すように、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト中の IgG のアミノ末端に融合する。更に他の実施形態では、TGF- β 1 RII ECD は、例えば図 30C 及び 30F に示すように、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト中の IgG の IgG Fc 断片 (即ち CH2 又は CH3 領域) 内に挿入される。

【0135】

例示的な抗 TGF- β 1 抗体は、米国特許第 7,067,637 号、米国特許第 7,494,651 号、米国特許第 7,527,791 号、及び米国特許第 7,619,069 号に記載されている。例示的な抗 TGF- β 1 RII 抗体は、米国特許第 7,579,186 に記載されている。TGF- β 1 の例示的なペプチド阻害剤は、KRIWFIPRSSWYERA (配列番号 197) である。

【0136】

D. 標的指向性ドメインの全体的な構成

抗 PD-1、抗 PD-L1、抗 TIGIT、抗 LAG-3、抗 VEGF、抗 VEGFR、抗アンジオポエチン-1/2、及び/又は抗 Tie2 受容体アンタゴニストのうちのいずれの 1 つは、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、scFv、又は二重特異性及び三重特異性アンタゴニスト等の多重特異性アンタゴニストの形態とすることができる。更に、本明細書に記載のアンタゴニストのいずれは、PD-1、PD-L1、TIGIT、LAG-3、VEGF、VEGFR、アンジオポエチン、及び/又は Tie2 受容体を標的とする多重結合特異性を有することができる。更に、抗体アンタゴニストのいずれは、所与の標的中の複数のエピトープを標的とするように操作されていてよい。更に、いくつかの実施形態では、チェックポイントアンタゴニスト及び/又は血管新生特異性が、対応する受容体に由来する細胞外ドメイン (ECD) 等のドミナントネガティブ融合タンパク質の形態で含まれていてよい。

【0137】

本明細書に記載の HCV R 及び LCVR は、自然に発生する CH1-CH2-CH3 領域、あるいは自然に発生しない若しくは変異した Fc (CH2-CH3) 領域、例えばエフェクタ機能を有しない若しくはほとんど有しない Fc (例えばヒト IgG2 若しくは IgG4)、又は腫瘍環境下での Treg 枯渇を強化するために 1 つ以上の活性化 Fc 受容体 (Fc γ RI、Fc γ RIIa 若しくは Fc γ RIIIa) への結合が強化された Fc に対して、構造的に結合され得る。従って特定の実施形態では、本明細書に記載の抗 PD-1、抗 PD-L1、抗 TIGIT、抗 LAG-3、抗 VEGF、抗 VEGFR HCV R 及び LCVR は、典型的には血清半減期、補体結合、Fc 受容体結合、及び/又は抗原依存性細胞傷害性といった抗体の 1 つ以上の機能的特性を変化させるために、1 つ以上の修飾を含む CH1-CH2-CH3 に構造的に結合され得る。更に、本明細書に記載の抗

体は、抗体の1つ以上の機能的特性を変化させるために、化学的に修飾されていてよく（例えば1つ以上の化学的部分を抗体に付着させることができ）、又はそのグリコシル化を変化させるように修飾されていてよい。より具体的には、特定の実施形態では、本出願の抗体は、Fc領域に修飾を含んでよく、これにより、親Fcと比較して、（a）抗体依存性細胞介在性細胞傷害性（ADCC）が上昇若しくは低下し、（b）補体介在性細胞傷害性（CDC）が上昇若しくは低下し、（c）C1qに対する親和性が上昇若しくは低下し、及び／又は（d）Fc受容体に対する親和性が上昇若しくは低下した、Fc多様体が生成される。このようなFc領域多様体は一般に、Fc領域に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むことになる。複数のアミノ酸修飾を組み合わせることは、特に望ましいものと考えられる。例えば多様体Fc領域はその中に、例えば本明細書中で同定されている特定のFc領域の位置の、2つ、3つ、4つ、5つ等の置換を含んでよい。

10

【0138】

エフェクタ機能が完全に回避されるべき用途、例えば所望の治療的利益の生成には抗原結合だけで十分であり、エフェクタ機能が望ましくない副作用をもたらす（又はそのリスクを上昇させる）だけである場合に関しては、IgG4抗体を使用してよく、又はFc領域若しくはその実質的な部分を欠いた抗体若しくは断片を考えることができ、又はFcを変異させてグリコシル化（例えばN297A）を完全に排除してよい。あるいは、エフェクタ機能を欠き、FcγR（IgG2等）に結合して補体（IgG4等）を活性化する能力を欠いた、ヒトIgG2（CH1ドメイン及びヒンジ領域）とヒトIgG4（CH2及びCH3ドメイン）とのハイブリッド構築物を生成してよい。IgG4定常ドメインを使用する場合、置換S228Pを含むことが好ましい場合が多く、これは、IgG1のヒンジ配列を模倣することによってIgG4分子を安定させ、治療用抗体と、治療を受ける患者の内因性IgG4との間での、Fabアームの交換を減少させる。

20

【0139】

特定の実施形態では、抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、抗LAG-3、抗VEGF、抗VEGFR、抗アンジオポエチン、及び抗Tie2R抗体、又はこれらの断片を修飾することによって、その生物学的半減期を増大させてよい。例えばFcRnに対するFc領域の結合親和性を上昇させるアプローチを含む、様々なアプローチを採用できる。一実施形態では、米国特許第5,869,046号、及び米国特許第6,121,022号に記載されているように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られたサルベージ受容体結合エピトープを含有するように、抗体をCH1又はCL領域内で変化させる。Fc領域内の残基の番号付与は、EUインデックスのものである。本明細書で開示される配列多様体は、残基番号と、これに続く、自然に発生するアミノ酸の代わりとなるアミノ酸とを参照して提供され、必要に応じて、その位置の自然に発生する残基がその前に記載される。所与の位置に複数のアミノ酸が存在し得る場合、例えば配列が自然に発生する複数のアイソタイプ間で異なる場合、又は複数の変異がその位置において置換され得る場合、これらはスラッシュで区切られる（例えば「X/Y/Z」）。

30

【0140】

FcRnへの結合を増大させる、及び／又は薬物動態特性を改善する、例示的なFc多様体は、259、308、及び434位の置換を含み、これらは例えば、259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y、及び434Mを含む。FcRnへのFcの結合を増大させる他の多様体としては：250E、250Q、428L、428F、250Q/428L（Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216、Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356）、256A、272A、305A、307A、311A、312A、378Q、380A、382A、434A（Shields et al. (2001) J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604）、252F、252Y、252W、254T、256Q、256E、256D、433R、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H（Dall'Ac

40

50

qua et al. (2002) J. Immunol., 169:5171-5180, Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem., 281:23514-23524、及び米国特許第8,367,805号)が挙げられる。

【0141】

N434A多様体(Yeung et al. (2009) J. Immunol. 182:7663)等の、IgG Fc中の特定の保存された残基の修飾(1253、H310、Q311、H433、N434)が、FcRn親和性を上昇させることによって循環中の抗体の半減期を増大させる方法として提案されている(国際公開特許第98/023289号)。M428L及びN434Sを含む複合Fc多様体は、FcRn結合を増大させ、半減期を最大5倍まで増大させることが示されている(Zallevsky et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:157)。T307A、E380A、及びN434A修飾を含む複合Fc多様体もまた、IgG1抗体の半減期を延長する(Petkova et al. (2006) Int. Immunol. 18:1759)。更に、M252Y-M428L、M428L-N434H、M428L-N434F、M428L-N434Y、M428L-N434A、M428L-N434M、及びM428L-N434S多様体を含む複合Fc多様体もまた、半減期を延長することが示されている(米国公開特許第2006/173170号)。更に、M252Y、S254T、及びT256Eを含む複合Fc多様体は、半減期を4倍近く増大させることが報告されている(Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514)。

【0142】

IV. 三重特異性アンタゴニストの好ましい実施形態

一実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号127、129、131、133、135、及び137からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号128、130、132、134、136、及び138からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

【0143】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と約80%~約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

【0144】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３５のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３６のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）本明細書中で更に説明されるように、１つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は１つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

10

【０１４５】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は３つの相補性決定領域（HCDR）：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号４８、５１、５４、５６、及び５９からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号４９、５２、５７、及び６０からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号５０、５３、５５、５８、及び６１からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は３つの相補性決定領域（LCDR）：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号６２、６５、６８、６９、７０、及び７３からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号６３、６６、７１、及び７４からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号６４、６７、７２、及び７５からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）本明細書中で更に説明されるように、１つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は１つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。ある好ましい実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

20

30

【０１４６】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は３つの相補性決定領域（HCDR）：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号５９のアミノ酸配列と約８０％又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号６０のアミノ酸配列と約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号６１のアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は３つの相補性決定領域（LCDR）：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号７３のアミノ酸配列と約８０％、約９０％、又は約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号７４のアミノ酸配列と約８０

40

50

%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号75のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

10

【0147】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号56のアミノ酸配列と約80%又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号57のアミノ酸配列と約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号58のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号70のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号71のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号72のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

20

30

【0148】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)1つ以上の抗PD-1可変ドメイン又は1つ以上の抗PD-L1可変ドメインを含む1つ以上の可変領域によって与えられる、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(又はZaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)本明細書中で更に説明されるように、Tie2チロシンキナーゼ受容体、Ang-1、Ang-2、Ang-3、又はAng-4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

40

【0149】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性

50

ドメインと；（３）本明細書中で更に説明されるように、T i e 2チロシンキナーゼ受容体、A n g - 1、A n g - 2、A n g - 3、又はA n g - 4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のC H 3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはC H 3ドメイン内に挿入される。

【０１５０】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３５のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３６のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）配列番号１８５のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト（Z a l t r a p（登録商標））ドメインによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）本明細書中で更に説明されるように、T i e 2チロシンキナーゼ受容体、A n g - 1、A n g - 2、A n g - 3、又はA n g - 4に特異的に結合する生物学的ペプチドを含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のC H 3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはC H 3ドメイン内に挿入される。

【０１５１】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３７のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３８のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）配列番号１８５のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト（Z a l t r a p（登録商標））ドメインによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）配列番号１９４のアミノ酸配列を１つだけ含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のC H 3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはC H 3ドメイン内に挿入される。

【０１５２】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３５のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３６のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）配列番号１８５のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト（Z a l t r a p（登録商標））ドメインによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）配列番号１９４のアミノ酸配列を１つだけ含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のC H 3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはC H 3ドメイン内に挿入される。

【０１５３】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３７のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３８のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）配列番号１８５のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト（Z a l t r a p（登録商標））ドメインによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）配列番号１８２のアミノ酸配列を含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のC H 3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはC H 3ドメイン内に挿入される。

【0154】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメインであって、（a）配列番号１３５のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、（b）配列番号１３６のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第１の標的指向性ドメインと；（２）配列番号１８５のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト（Zaltrap（登録商標））ドメインによって与えられる、第２の標的指向性ドメインと；（３）配列番号１８２のアミノ酸配列を含む、第３の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第２の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第３の標的指向性ドメインはCH3ドメイン内に挿入される。

10

【0155】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号１９８、２００、２０２、２０３、及び２０４からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号１９９及び２０１からなる群から選択されるアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

【0156】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号１９８のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号１９９のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

20

【0157】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号２００のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号２０１のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

【0158】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号２０２のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号２０１のアミノ酸配列と約８０％～約１００％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

30

【0159】

図３Ａ～図４Ｃは、様々な異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを示し、ここで：（１）VH1及びVL1領域は、抗PD-1可変ドメイン又は他のチェックポイント抗体に対応し；（２）二重の卵型はアフリベルセプト融合タンパク質ドメインに対応し；（３）円はトレバナニブペプチドに対応する。図５Ａ～５Ｅは、様々な異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを示し、ここで：（１）VH1及びVL1領域は、抗PD-1可変ドメイン又は別のチェックポイント抗体に対応し；（２）ペバシズマブ又は別の抗VEGF-A抗体のVH及びVL；（３）円はトレバナニブペプチドに対応する。これらの図に示されているように、これらの成分は、複数の構成に再配置できる。例えばトレバナニブペプチドは、以下の位置：（i）各IgG4 CH3領域のカルボキシ末端に融合した位置（図３Ａ～３Ｄ）；（ii）２つのCH3領域それぞれの中に挿入された位置（図３Ｅ、図４Ａ、及び図５Ａ）；（iii）各CH1領域のカルボキシ末端に融合した位置（図３Ｆ、図４Ｃ、図５Ｃ～５Ｅ）；（iv）各アフリベルセプト融合タンパク質ドメインのカルボキシ末端に融合した位置（図３Ｇ）；（v）各CL領域のカルボキシ末端に融合した位置（図３Ｈ、図５Ｂ）；又はCH2ドメインのアミノ末端に融合した位置（図４Ｂ）に配置される。

40

【0160】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：（１）第１の標的指向性ドメ

50

インであって、(a) 配列番号 127、129、131、133、135、及び 137 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b) 配列番号 128、130、132、134、136、及び 138 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第 1 の標的指向性ドメインと；(2) 抗 VEGF アンタゴニスト、又は抗 VEGFR アンタゴニストを含む、第 2 の標的指向性ドメインと；(3) TGF- β 経路阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメインとを含む。一実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端の CH3 ドメインの下流に挿入され、上記第 3 の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第 2 の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

10

【0161】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1) 第 1 の標的指向性ドメインであって、(a) 配列番号 137 のアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b) 配列番号 138 のアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第 1 の標的指向性ドメインと；(2) 抗 VEGF アンタゴニスト、又は抗 VEGFR アンタゴニストを含む、第 2 の標的指向性ドメインと；(3) TGF- β 経路阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端の CH3 ドメインの下流に挿入され、上記第 3 の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第 2 の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

20

【0162】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1) 第 1 の標的指向性ドメインであって、(a) 配列番号 135 のアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b) 配列番号 136 のアミノ酸配列と約 80%～約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第 1 の標的指向性ドメインと；(2) 抗 VEGF アンタゴニスト、又は抗 VEGFR アンタゴニストを含む、第 2 の標的指向性ドメインと；(3) TGF- β 経路阻害剤を含む、第 3 の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第 2 の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端の CH3 ドメインの下流に挿入され、上記第 3 の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第 2 の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

30

【0163】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1) 第 1 の標的指向性ドメインであって、(a) 重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は 3 つの相補性決定領域 (HCDR) : HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 を含み、ここで HCDR1 は、配列番号 48、51、54、56、及び 59 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2 は、配列番号 49、52、57、及び 60 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3 は、配列番号 50、53、55、58、及び 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%、約 90%、又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b) 軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は 3 つの相補性決定領域 (LCDR) : LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、ここで LCDR1 は、配列番号 62、65、68、69、70、及び 73 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%、約 90%、又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2 は、配列番号 63、66、71、及び 74 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%、約 90%、又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3 は、配列番号 64、67、72、及び 75 からなる群から選択されるアミノ酸配列と約 80%、約 90%、又は約 100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第 1 の標的指向性ドメインと；(2) 抗 VEGF アンタゴニスト、又は抗 VEGFR アンタゴニストを含む、第 2 の標的指向性ドメインと；(3) TGF- β 経路阻害剤

40

50

を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH₃ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0164】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号59のアミノ酸配列と約80%又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号60のアミノ酸配列と約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号61のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号73のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号74のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号75のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF-β経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH₃ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0165】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)重鎖可変領域であって、上記重鎖可変領域は3つの相補性決定領域(HCDR)：HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、ここでHCDR1は、配列番号56のアミノ酸配列と約80%又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号57のアミノ酸配列と約80%、約85%、約90%、約95%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号58のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)軽鎖可変領域であって、上記軽鎖可変領域は3つの相補性決定領域(LCDR)：LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、ここでLCDR1は、配列番号70のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR2は、配列番号71のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、LCDR3は、配列番号72のアミノ酸配列と約80%、約90%、又は約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)本明細書中で更に説明されるように、1つ以上の抗VEGFアンタゴニスト及び／又は1つ以上の抗VEGFRアンタゴニストによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF-β経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH₃ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインは、カルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0166】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と

約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF- β 経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0167】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号135のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号136のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF- β 経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0168】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するa-グリコシル化アフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF- β 経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0169】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号135のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号136のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するa-グリコシル化アフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)TGF- β 経路阻害剤を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0170】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)配列番号186のアミノ酸配列を有するTGF β 1 RII細胞外ドメイン(ECD)を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流

に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

【0171】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号135のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号136のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するアフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)配列番号186のアミノ酸配列を有するTGFβ1 RII細胞外ドメイン(ECD)を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

10

【0172】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号137のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号138のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するa-グリコシル化アフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)配列番号186のアミノ酸配列を有するTGFβ1 RII細胞外ドメイン(ECD)を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

20

【0173】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：(1)第1の標的指向性ドメインであって、(a)配列番号135のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域と、(b)配列番号136のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域とを含む、第1の標的指向性ドメインと；(2)配列番号185のアミノ酸配列を有するa-グリコシル化アフリベルセプト(Zaltrap(登録商標))ドメインによって与えられる、第2の標的指向性ドメインと；(3)配列番号186のアミノ酸配列を有するTGFβ1 RII細胞外ドメイン(ECD)を含む、第3の標的指向性ドメインとを含む。別の実施形態では、上記第2の標的指向性ドメインは、アンタゴニストのカルボキシ末端のCH3ドメインの下流に挿入され、上記第3の標的指向性ドメインはカルボキシ末端の第2の標的指向性ドメインの下流に挿入される。

30

【0174】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号187、189、190、192、205、及び206からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号188、191、及び193からなる群から選択されるアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

40

【0175】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号192のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号193のアミノ酸配列と約80%～約100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

【0176】

50

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 205 のアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号 193 のアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

【0177】

他の実施形態では、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 206 のアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、重鎖と；配列番号 193 のアミノ酸配列と約 80%～約 100% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、軽鎖とを含む。

【0178】

本出願の三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、IgG バックボーンを用いて構築できる。より具体的には、本出願のいずれの三重特異性アンタゴニストは、IgG1 又は IgG4 バックボーンを用いて構築できる。IgG1 バックボーンの使用は癌治療に好ましく、この場合標的は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (ADCC) を仲介できる抗原提示細胞上に存在する。IgG4 バックボーンを使用すると、抗原結合のみで所望の治療的利益を十分に生成できる場合に、抗原を標的化できる。IgG4 系アンタゴニストは、例えば IgG1 抗体に関連する、FcγR 結合及び補体活性化を含む望ましくないエフェクタ機能を排除する。

【0179】

V. 抗腫瘍アンタゴニストの使用法

抗 PD-1 アンタゴニスト、抗 PD-1 抗体断片、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L1 抗体断片、抗 TIGIT 抗体、抗 TIGIT 抗体断片、抗 LAG-3 抗体、抗 LAG-3 抗体断片、血管新生経路阻害剤、TGFβ 経路阻害剤、並びに PD-1、PD-L1、TIGIT、LAG-3、VEGF/VEGFR、TGFβ/TGFβ 受容体に特異的に結合する二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストといった、本出願の抗腫瘍アンタゴニストは、例えば免疫応答の強化、及び癌、感染症、又は自己免疫疾患の治療を含む、多数の試験管内及び生体内利用法を有する。

【0180】

A. 抗腫瘍療法

いくつかの実施形態では、本出願の抗腫瘍アンタゴニストを、培養中、試験管内、若しくは生体外の細胞に、又はヒト被験者、例えば生体内に投与して、多様な疾患における免疫を強化する。従って、本明細書で提供されるのは、被験者における免疫応答を改変する方法であって、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を投与することにより、上記被験者の免疫応答を強化する、刺激する、又は上方制御するステップを含む。好ましい被験者としては、免疫応答の強化が望まれるヒト患者が挙げられる。上記方法は特に、免疫応答（例えば T 細胞仲介型免疫応答）の増強によって治療できる障害を有するヒト患者の治療に好適である。上記方法は特に、生体内の癌又は慢性感染の治療に公的である。例えば、抗原特異的免疫を強化するために、抗 PD-1、抗 PD-L1、抗 TIGIT、若しくは抗 LAG-3 組成物を、関心対象の抗原と共に投与してよく、又は上記抗原が、治療対象の被験者（例えば担腫瘍若しくは担ウイルス被験者）の体内に既に存在していてもよい。抗 TIGIT 抗体を別の作用剤と共に投与する場合、これら 2 つを別個に投与しても、同時に投与してもよい。

【0181】

いくつかの実施形態では、上述の方法で使用されるチェックポイント調節因子アンタゴニストは、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 LAG-3 抗体、これらの断片、又はこれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニストは、本出願の二重特異性又は三重特異性抗体である。

【0182】

いくつかの実施形態では、チェックポイント調節因子アンタゴニスト、又は抗腫瘍アンタゴニストは、抗体又は抗体断片の形態である。いくつかの実施形態では、本明細書に記

載の抗体は、ヒト又はヒト化抗体である。

【0183】

また、サンプル中のヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトTIGIT、又はヒトLAG-3の存在を検出及び／又は測定するための方法も包含され、上記方法は、上記サンプル及び対照サンプルを、ヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトTIGIT、又はヒトLAG-3に特異的に結合するそのヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合断片と、上記抗体又はその断片とヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトTIGIT、又はヒトLAG-3との間での複合体の形成が可能な条件下で接触させるステップを含む。続いて複合体の形成が検出され、ここでサンプルと対照サンプルとの間での複合体形成の差は、サンプル中のヒトPD-1、ヒトPD-L1、ヒトTIGIT、又はヒトLAG-3抗原の存在の指標となる。

【0184】

抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、及び抗LAG-3抗体の、T細胞応答の阻害又は同時阻害を遮断する能力を考えると、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗体を用いて抗原特異的T細胞応答、例えば抗腫瘍T細胞応答を刺激する、強化する、又は上方制御する、試験管内及び生体内方法である。特定の実施形態では、(膜CD3を発現する細胞との同時インキュベーションによって)CD3刺激も提供され、この刺激は、抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、又は抗LAG-3抗体による治療と同時に、該治療の前に、又は該治療の後に提供できる。例えば本明細書で提供されるのは、抗原特異的T細胞応答を強化する方法であり、上記方法は、上記T細胞を本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、又は抗LAG-3抗体、及び任意にCD3と接触させて、例えばPD-1、PD-L1、TIGIT、又はLAG-3仲介型阻害効果を除去することによって、抗原特異的T細胞応答を強化するステップを含む。抗原特異的T細胞応答のいずれの好適なインジケータを用いて、抗原特異的T細胞応答を測定できる。このような好適なインジケータの非限定的な例としては、抗体の存在下でのT細胞増殖の増大、及び／又は抗体の存在下でのサイトカイン産生の増大が挙げられる。ある好ましい実施形態では、抗原特異的T細胞によるインターロイキン-2及び／又はインターフェロン-ガンマ産生が強化される。

【0185】

更に包含されるのは、被験者の免疫応答(例えば抗原特異的T細胞応答)を強化する方法であって、上記方法は、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、又は二重特異性若しくは三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを被験者に投与することによって、該被験者の免疫応答(例えば抗原特異的T細胞応答)を強化するステップを含む。ある好ましい実施形態では、被験者は担腫瘍被験者であり、腫瘍に対する免疫応答が強化される。腫瘍は固形腫瘍であっても、液体腫瘍、例えば血液学的悪性腫瘍であってもよい。特定の実施形態では、腫瘍は免疫原性腫瘍である。他の実施形態では、腫瘍は非免疫原性である。特定の実施形態では、腫瘍はPD-L1陽性である。他の実施形態では、腫瘍はPD-L1陰性である。被験者は担ウイルス被験者であってもよくこの被験者の体内では、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの投与の結果として、ウイルスに対する免疫応答が強化される。

【0186】

一実施形態では、被験者の体内での腫瘍の成長を阻害するための方法は、上記被験者に、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者の体内で腫瘍の成長を阻害するステップを含む。また、被験者の慢性ウイルス感染を治療する方法も提供され、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者の体内で慢性ウイルス感染を治療するステップを含む。

【0187】

また本明細書には、腫瘍、例えば癌性腫瘍を有する被験者の腫瘍微小環境から、Treg細胞を枯渇させるための方法も包含され、上記方法は、上記被験者に、腫瘍微小環境中のTreg細胞の枯渇を刺激するFcを含む、治療有効量の、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む。Fcは例えば、エフェクタ機能又は強化されたエフェクタ機能を有する、例えば1つ以上の活性化Fc受容体に結合するか又はこのような結合が強化されている、Fcであってよい。

【0188】

ある好ましい実施形態では、Treg枯渇は、腫瘍微小環境におけるTeffの大幅な枯渇又は阻害を伴わず、また腫瘍微小環境の外でのTeff細胞及びTreg細胞の大幅な枯渇又は阻害を伴わずに、発生する。特定の実施形態では、被験者は、例えば腫瘍微小環境中において、Teff細胞に比べてTreg細胞において高いレベルのTIGITを有する。特定の実施形態では、抗TIGIT抗体又はアンタゴニストは、腫瘍中のTreg、及び／又は腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中のTregを枯渇させることができる。例えばCT26腫瘍モデルでは、(エフェクタ機能を示す)マウスIgG2aとしてフォーマットされた抗マウスTIGIT抗体は、Treg及びCD8+T細胞の両方を部分的に枯渇させたが、CD4+T細胞を枯渇させなかった。これに対応する、マウスIgG1D265Aとしてフォーマットされたエフェクタ機能を有しない抗TIGIT抗体は、T細胞を枯渇させなかった。

【0189】

Fcエフェクタ機能又はエフェクタ機能を有しない抗TIGIT抗体を採用するかどうかを考える際、抗腫瘍免疫応答を強化できるTregの枯渇と、腫瘍細胞を実際に殺滅するために必要な細胞の一部を排除するCD8+T細胞の枯渇との間でのトレードオフを十分に考慮しなければならない。Tregの枯渇は抗腫瘍活性を強化すると予想されるかもしれないが、最近の研究で、TIGIT+TregへのTIGITのライゲーショニングが、Teff細胞増殖のTreg細胞仲介型抑制を促進することが示されており(Jolliffe et al., (2014) Immunity 40:569)、これは、(例えば本発明のアンタゴニスト抗TIGIT抗体を用いて)TIGITシグナル伝達を遮断することによっても、抗腫瘍活性が強化され得ることを示唆している。従って、エフェクタ機能を欠いたアンタゴニスト抗TIGIT抗体の使用が最も有効となり得、これは：i) TregにおけるTIGITシグナル伝達を遮断することによって、Tregの免疫抑制活性を低減し；ii) TIGITの阻害作用を遮断することによって抗腫瘍CD8+T細胞を活性化すると同時に、抗腫瘍CD8+T細胞のエフェクタ機能によって仲介される枯渇を回避し；iii) TIGITが結合するはずだったDNAMをPVR(CD155、TIGITリガンド)に結合させることによって(及びTIGIT-DNAM間の直接の相互作用を低減することによって)DNAM仲介型活性を強化する(Johnston et al., (2014) Cancer Cell 26:923)。これと同じことが、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの使用にも当てはまる。

【0190】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、補助療法として被験者に投与される。本出願による抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いた癌患者の治療は、現在の標準的な治療と比較して長期間持続する反応、少なくとも1年、2年、3年、4年、5年、10年、又はそれ以上の長期生存、少なくとも1年、2年、3年、4年、5年、若しくは10年、又はそれ以上の無再発生存をもたらすことができる。特定の実施形態では、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタ

ゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いた癌患者の治療は、癌の再発を防止するか、又は癌の再発を例えば1年、2年、3年、4年、5年、10年、若しくはそれ以上遅延させる。抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、及び／又は抗LAG-3治療は、一次治療又は二次治療として使用できる。

【0191】

特定の好ましい実施形態では、被験者は、細胞増殖性疾患又は癌を有する。抗TIGIT抗体によって、TIGITを介したPVR／ネクチン-2シグナル伝達を遮断することにより患者の体内の癌性細胞に対する免疫応答を強化できる。同様に、本明細書で提供されるのは、癌を有する被験者を治療するための方法であって、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、抗LAG-3、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者を治療する、例えば癌性腫瘍の成長を阻害若しくは低減する、及び／又は癌を退縮させるステップを含む。本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、抗LAG-3、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、単独で使用して癌性腫瘍の成長を阻害できる。あるいは、これらの抗腫瘍アンタゴニストのうちのいずれを、別の作用剤、例えばこれ以降に記載される他の抗癌標的、免疫原性剤、標準的な癌治療、又は他の抗体と組み合わせて使用できる。

【0192】

従って、本明細書で提供されるのは、例えば腫瘍細胞の成長を阻害することによって、被験者の体内の癌を治療する方法であり、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の治療有効量の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、抗LAG-3、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む。好ましくは、上記抗体は、本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、若しくは抗LAG-3のHCVR及びLCVRを含む、ヒト抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、若しくは抗LAG-3抗体であるか、又は上記抗体は、本明細書に記載の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、若しくは抗LAG-3抗体のうちの少なくとも1つと、結合に関して競合する、若しくは同一のエピトープに結合する、キメラ若しくはヒト化非ヒト抗hu PD-1、抗PD-L1抗体、抗hu TIGIT、若しくは抗LAG-3抗体、例えばキメラ若しくはヒト化抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、若しくは抗LAG-3抗体であってよい。

【0193】

本出願の抗体を用いて成長を阻害できる癌としては、免疫療法に典型的な応答を示す癌が挙げられる。治療対象の癌の非限定的な例としては、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）、非NSCLC、神経膠腫、胃腸癌、腎臓癌（renal cancer）（例えば淡明細胞癌）、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌（kidney cancer）（例えば腎細胞癌（RCC））、前立腺癌（例えばホルモン不応性前立腺癌）、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、膠芽腫（多形膠芽腫）、子宮頸癌、胃癌（stomach cancer）、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、及び頭頸部癌（又は癌腫）、胃癌（gastric cancer）、胚細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫（例えば転移性悪性黒色腫、例えば皮膚又は眼内悪性黒色腫）、骨癌、皮膚癌、子宮癌、肛門領域の癌、精巣癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、軟組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、小児期の固形腫瘍、尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系（CNS）の新生物、中枢神経系原発リンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、脳幹部神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮嚢癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境誘发型癌、ウイルス関連癌（例えばヒトパピローマウイルス（HPV）関連腫瘍）、並びに2つの主要な血球系統のいずれか、即ち（顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージ、及び肥満細胞を産生する）骨髓細胞株又は（B、T、NK、及び形質細胞を産生する）リンパ系細胞株に由来する血液悪性腫瘍、例えばあらゆるタイプの白血病、リンパ腫、及び

骨髄腫、例えば急性、慢性、リンパ性及び／又は骨髄性白血病、例えば急性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、及び慢性骨髄性白血病（CML）、未分化AML（MO）、骨髄芽球性白血病（M1）、骨髄芽球性白血病（M2；細胞成熟を伴う）、前骨髄球性白血病（M3、又はM3多様体〔M3V〕）、骨髄単球性白血病（M4、又は好酸球増加症を伴うM4多様体〔M4E〕）、単球性白血病（M5）、赤白血病（M6）、巨核芽球性白血病（M7）、限局顆粒球性肉腫、及び緑色腫；リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、単球様B細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（MALT）リンパ腫、未分化（例えばKi1+）大細胞リンパ腫、成人T細胞リンパ腫／白血病、マントル細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、腸管T細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、Tリンパ芽球性；及びリンパ腫／白血病（T-Lbly／T-ALL）、末梢T細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、臓器移植後リンパ増殖性疾患、真の組織球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫（LBL）、リンパ系の造血器腫瘍、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性組織球性リンパ腫（DHL）、免疫芽球性大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫（CTLC）（菌状息肉症又はセザリー症候群とも呼ばれる）、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症を伴うリンパ形質細胞性リンパ腫（LP L）；骨髄腫、例えばIgG骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌型骨髄腫、くすぶり型骨髄腫（無症候性骨髄腫とも呼ばれる）、孤立性形質細胞腫、及び多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリー細胞リンパ腫；骨髄系の造血器腫瘍、間葉系起源の腫瘍（線維肉腫及び横紋筋肉腫を含む）；精上皮腫、奇形癌腫、中枢及び末梢神経の腫瘍（星状細胞腫、神経鞘腫を含む）；間葉系起源の腫瘍（線維肉腫、横紋筋肉腫、及び骨肉腫を含む）；並びに他の腫瘍（黒色腫、色素性乾皮症、ケラトアカントーマ、精上皮腫、甲状腺濾胞癌、及び奇形癌腫を含む）、リンパ系の造血器腫瘍、例えばT細胞及びB細胞腫瘍（限定するものではないが、小細胞及び大脳様細胞型のものを含むT前リンパ球性白血病（T-PLL）等のT細胞障害を含む）；好ましくはT細胞型の、大顆粒リンパ球性白血病（LGL）；a/d T-NHL肝脾リンパ腫；末梢性／成熟T細胞リンパ腫（多形性及び免疫芽球性サブタイプ）；血管中心性（鼻）T細胞リンパ腫；頭頸部の癌、腎臓癌（renal cancer）、直腸癌、甲状腺の癌；急性骨髄性リンパ腫、並びに以上の癌のいずれの組み合わせが挙げられる。本明細書に記載の方法は、転移性癌、難治性癌（例えば、例えば遮断CTLA-4又はPD-1抗体を用いた過去の免疫療法に対して、抵抗性を有する癌）、及び再発癌の治療にも使用してよい。

【0194】

抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、単独で、別の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて、又は別の抗腫瘍アンタゴニストと同時に投与できる。抗PD-1抗体、抗TIGIT、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストもまた、免疫原性剤、例えば癌性細胞、腫瘍ワクチン、精製腫瘍抗原（組換えタンパク質、ペプチド、及び炭水化物分子を含む）、癌ワクチン戦略において免疫刺激性サイトカインをエンコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞（He et al. (2004) J. Immunol. 173: 4919-28）、又は腫瘍溶解性ウイルスと、組み合わせて又は同時に投与できる。

【0195】

腫瘍に対するワクチン接種のための多数の実験的戦略が考案されている。これらの戦略のうちの1つでは、ワクチンは、自家腫瘍又は同種異系腫瘍細胞を用いて調製される。これらの細胞ワクチンのいくつかは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入される場合に、最も効果的であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている（Drano et

a l. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 3539-43)。前臨床モデルにおいて、癌ワクチンは、腫瘍内へのエフェクタT細胞浸潤を強化することが示されている。癌ワクチンの主要なタイプとしては、ペプチドワクチン、ベクターベースの抗原特異的ワクチン、全細胞ワクチン、及び樹状細胞ワクチンが挙げられる。全てのワクチンベースの療法は、単一又は複数の抗原性エピトープ又は抗原を、全細胞から患者に送達して、腫瘍特異的エフェクタT細胞を誘導するように設計されている。よって、ワクチンベースの療法は、腫瘍へのT細胞浸潤を誘発するための最も効率的な方法である可能性がある。

【0196】

様々な腫瘍における遺伝子発現及び大規模遺伝子発現パターンの研究により、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義がもたらされた(Rosenberg, S A (1999) Immunity 10: 281-7)。多くの場合、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍中、及び腫瘍が発生する細胞中で発現される分化抗原であり、例えばメラニン細胞抗原 gp100、MAGE抗原、及びTrp-2である。更に重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主の体内に見られる腫瘍特異的T細胞の標的となることを示すことができる。

【0197】

PD-1、PD-L1、TIGIT及び／又はLAG-3阻害を、腫瘍中で発現される一連の組換えタンパク質及び／又はペプチドと組み合わせて使用して、これらのタンパク質に対する免疫応答を生成できる。このようなタンパク質は、免疫系によって自己抗原とみなされる可能性があり、従って免疫系に対して耐性を有する。腫瘍抗原はタンパク質テロメラーゼを含むことができ、これは、染色体のテロメアの合成に必要であり、ヒトの癌の85%超、及びごく限られた数の体細胞組織において発現される(Kim et al. (1994) Science 266: 2011-2013)。腫瘍抗原は、タンパク質配列を変化させるか又は2つの無関係な配列の間で融合タンパク質(即ちフィラデルフィア染色体中のbcr-abl)を生成する体細胞変異によって癌細胞中で発現される「ネオ抗原」、あるいはB細胞腫瘍からのイディオタイプであってもよい。

【0198】

腫瘍ワクチンの非限定的な例としては、転移性前立腺癌のためのFDA認可済み腫瘍ワクチンであるシプリューセル-T(Provenge(登録商標))；顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)を発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞、例えば全細胞GM-CSF分泌性被照射同種異系膵臓癌ワクチン(GVAX；Johns Hopkins)；乳癌抗原、neu、レグマイン、及びβ-カテニンに由来する免疫原性ペプチドからなるマルチペプチドワクチン(これを抗PD-1抗体と組み合わせて投与すると、担乳がんマウスの、ワクチンによって誘発される無進行生存が延長された(Karyampudi L. et al. (2014) Cancer Res 74: 2974-2985))；黒色腫瘍抗原のペプチド、例えばgp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1及び／又はチロシナーゼのペプチドが挙げられる。他の腫瘍ワクチンとしては、ヒトの癌に関与するウイルスからのタンパク質が挙げられ、上記ウイルスは例えば：ヒトパピローマウイルス(HPV)(例えばGardasil(登録商標)、Gardasil 9(登録商標)、及びCervarix(登録商標))；B型肝炎ウイルス(例えばEngerix-B及びRecombivax HB)；C型肝炎ウイルス(HCV)；カポジ肉腫関連ヘルペス肉腫ウイルス(KSHV)である。TIGIT阻害と組み合わせて使用できる別の形態の腫瘍特異的抗原は、腫瘍組織自体から単離された精製済み熱ショックタンパク質(HSP)である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞由来のタンパク質の断片を含有し、これらのHSPは、腫瘍免疫を誘発するための抗原提示細胞への送達において非常に効率的である。タリモジーン・ラハーパレブベック(T-VEC、又はImlygic(登録商標))は、手術で除去できない転移性黒色腫を有する一部の患者の治療のための、FDA認可済みの腫瘍溶解性ウイルスである。

【0199】

樹状細胞(DC)は、抗原特異的応答のプライミングに使用できる、強力な抗原提示細

胞である。DCを生体外で生成して、様々なタンパク質及びペプチド抗原、並びに腫瘍細胞抽出物を担持させることができる(Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332)。また、DCを、これらの腫瘍抗原を発現するように、遺伝的手段で形質導入することもできる。またDCは、免疫化を目的として、腫瘍細胞に直接融合されている(Kugler et al. (2000)

Nature Medicine 6: 332-336)。ワクチン接種の方法として、DC免疫化をTIGIT遮断と効果的に組み合わせることにより、より強力な抗腫瘍応答を活性化すること(引き出す)ことができる。

【0200】

PD-1、PD-L1、TIGIT及び／又はLAG-3阻害は、標準的な癌治療(例えば手術、放射線、及び化学療法)と組み合わせることができる。特にPD-1、PD-L1、TIGIT及び／又はLAG-3阻害は、化学療法レジメンと効果的に組み合わせることができる。これらの例では、投与される化学療法試薬の用量を削減できる可能性がある(Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304)。このような組み合わせの例は、黒色腫の治療のための抗腫瘍アンタゴニストとダカルバジンとの組み合わせである。このような組み合わせの別の例は、黒色腫の治療のためのチェックポイント調節因子アンタゴニスト又は抗腫瘍アンタゴニストとインターロイキン-2(IL-2)との組み合わせである。例えば、PD-1、PD-L1、TIGIT及び／又はLAG-3阻害と化学療法とを組み合わせることで細胞死が促進される科学的根拠は、大半の化学療法用化合物の細胞傷害作用の結果が、抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルを上昇させるはずであるということである。細胞死によるTIGIT、PD-1、PD-L1及び／又はLAG-3阻害との相乗効果をもたらすことができる他の併用療法は、放射線、手術、及びホルモン抑制である。これらのプロトコルはそれぞれ、宿主の腫瘍抗原のソースを生成する。血管新生阻害剤もまた、TIGIT、PD-1、PD-L1及び／又はLAG-3阻害と組み合わせることができる。血管新生の阻害は腫瘍細胞の死につながり、これは腫瘍抗原を宿主の抗原提示経路に供給し得る。

【0201】

本明細書に記載の抗TIGIT抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、Fc α 又はFc γ 受容体発現性エフェクタ細胞を腫瘍細胞に対して標的化する二重特異性抗体と組み合わせて使用してもよい(例えば米国特許第5,922,845号、及び米国特許第5,837,243号を参照)。二重特異性抗体は、2つの別個の抗原を標的とするために使用できる。例えば、抗Fc受容体／抗腫瘍抗原(例えばHer-2/neu)二重特異性抗体は、マクロファージを腫瘍の複数の部位に対して標的化するために使用されている。この標的化により、腫瘍特異的応答をより効果的に活性化できる。これらの応答のT細胞アームは、TIGIT、PD-1、PD-L1及び／又はLAG-3の阻害によって増強されることになる。あるいは、腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体と、樹状細胞特異的細胞表面マーカーとを使用することによって、抗原をDCに直接送達できる。

【0202】

腫瘍は、多様な機序によって宿主の免疫監視を回避する。これらの機序の多くは、腫瘍が発現する免疫抑制タンパク質の不活性化によって克服される可能性がある。これらには特に、TGF- β 、IL-10、及びFasリガンドが含まれる。これらの実体それぞれに対する抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用することにより、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進できる。

【0203】

宿主の免疫応答性を活性化する他の抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用できる。これらには、DC機能及び抗原提示を活性化する、樹状細胞の表面上の分子が含まれる。抗CD40抗体は、T細胞ヘルパー活性を効果的に代替でき(Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478)

、抗TIGIT抗体と組み合わせて使用できる。OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169)、CD137/4-1BB (Melerio et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997)、及びICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266)といったT細胞共刺激分子に対する活性化抗体も、T細胞活性化のレベルの上昇を提供できる。更に、これ以降で更に説明されるように、他の免疫チェックポイント調節因子の阻害剤も、本明細書に記載の他の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用してよい。

【0204】

骨髄移植は現在、造血器起源の多様な腫瘍の治療に使用されている。移植片対宿主病はこの治療の結果であるが、TIGIT阻害を用いて、移植片対腫瘍応答を低減することにより、ドナー移植腫瘍特異的T細胞の効力を増大させることができる。

【0205】

抗TIGIT抗体の存在下で癌及びウイルス感染に対して抗原特異的T細胞を刺激するための、抗原特異的T細胞の生体外活性化及び増殖、並びにこれらの細胞のレシピエントへの養子移入により、養子移入されたT細胞の頻度及び活性を上昇させることができる。

【0206】

腫瘍に対して抗原特異的T細胞を刺激するための、抗原特異的T細胞の生体外活性化及び増殖、並びにこれらの細胞のレシピエントへの養子移入を伴う、複数の実験的治療プロトコルも存在する (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51)。これらの方法を用いて、CMV等の感染性病原体に対するT細胞応答を活性化することもできる。抗TIGIT抗体の存在下での生体外活性化により、養子移入されたT細胞の頻度及び活性を上昇させることができる。

【0207】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストを、感染性疾患、特に慢性感染を有する被験者に投与してよい。この場合、癌への応用と同様に、抗体仲介型PD-1、PD-L1、TIGIT、及び／又はLAG-3阻害を単独で、又はアジュバントとしてワクチンと組み合わせて使用して、病原体、毒素、及び自己抗原に対する免疫応答性を強化できる。この治療アプローチを適用できる例示的な病原体としては、限定するものではないが、HIV、肝炎 (A、B、及びC)、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌、及び緑膿菌が挙げられる。PD-1、PD-L1、TIGIT、及び／又はLAG-3阻害は、感染の経過にわたって新規の又は変化した抗原を提示するHIV等の病原体による、確立された感染に対して、特に有用である。抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの投与により、これらの抗原を外來性として認識させることで、適切なT細胞応答を誘発できる。

【0208】

本明細書に記載の方法によって治療可能な感染症を引き起こす他の病原性ウイルスとしては、HIV、肝炎 (A、B、又はC)、ヘルペスウイルス感染症 (例えばVZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、及びCMV、エプスタイン・バーウイルス)、並びにアデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、おたふく風邪ウイルス、ロタウイルス、はしかウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、伝染性軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス、アルボウイルス性脳炎ウイルス、又はこれらの組み合わせによって引き起こされる感染症が挙げられる。

【0209】

本明細書に記載の方法によって治療可能であり得る、例示的な病原性細菌又はそれらによって引き起こされる疾患としては、クラミジア、リケッチア、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ属、プロテウス属、セ

10

20

30

40

50

ラチア属、シュードモナス属、レジオネラ菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、桿菌菌、コレラ菌、レプトスピラ症、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽、ペスト、及びライム病が挙げられる。

【0210】

本明細書に記載の方法によって治療可能な感染症を引き起こす例示的な病原性真菌としては、カンジダ属（例えばカンジダ・アルビカンズ、カンジダ・クルーセイ、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・トロピカリス等）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、アスペルギルス属（例えばアスペルギルス・フミガーツス、クロコウジカビ等）、ケカビの一種（例えばケカビ、ユミケカビ、クモノスカビ）、スポロシリックス・シェンキイ、ブラストミセス・デルマチチジス、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス、コクシジオイデス・イミチス、及びヒストプラズマ・カプスラーツムが挙げられる。

10

【0211】

本明細書に記載の方法によって治療可能な感染症を引き起こす例示的な病原性寄生虫としては、赤痢アメーバ、大腸バランジウム、フォーラーネグレリア、アカントアメーバの一種、ザンビアジアルジア、クリプトスポリジウムの一種、ニューモシスチス・カリニ、三日熱マラリア原虫、バベシア・ミクロチ、ブルーストリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ドノバンリーシュマニア、トキソプラズマ・ゴンジ、及びニッポストロンギルス・ブラジリエンシスが挙げられる。

【0212】

上述の方法の全てにおいて、PD - 1、PD - L1、TIGIT、及び／又はLAG - 3阻害を、サイトカイン治療（例えばインターフェロン、GM - CSF、G - CSF、IL - 2）、又は2つの異なる結合特異性を用いる二重特異性抗体療法といった、他の形態の免疫療法と組み合わせることにより、腫瘍抗原の提示の強化を提供できる。

20

【0213】

本明細書に記載の抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG - 3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、これらの抗体のうちのいずれか1つ以上と、関心対象の抗原（例えばワクチン）との同時投与によって、抗原特異的免疫応答を強化するために使用できる。従って、本明細書で提供されるのは、被験者の体内での抗原に対する免疫応答を強化する方法であって、上記方法は、上記被験者に：（i）上記抗原；及び（ii）抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG - 3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又はこれらの組み合わせを投与することによって、上記被験者の体内での上記抗原に対する免疫応答を強化するステップを含む。上記抗原は例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、又は病原体由来の抗原とすることができる。このような抗原の非限定的な例としては、上述のセクションに記載したもの、例えば上述の腫瘍抗原（若しくは腫瘍ワクチン）、又は上述のウイルス、細菌、若しくは他の病原体由来の抗原が挙げられる。

30

【0214】

特定の実施形態では、抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗TIGIT抗体、LAG - 3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストが結合するエピトープを含むペプチド又は融合タンパク質を、1つ以上の抗腫瘍アンタゴニストの代わりに、又は1つ以上の抗腫瘍アンタゴニストに加えて、ワクチンとして使用してよい。

40

【0215】

上述の抗体組成物（例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異性抗体又はアンタゴニスト、及び免疫複合体）を生体内及び試験管内で投与する好適な経路は、当該技術分野において公知であり、当業者が選択できる。例えば抗体組成物は、注射（例えば静脈内又は皮下）によって投与できる。使用される分子の好適な投薬量は、被験者の年齢及び体重、並びに抗体組成物の濃度及び／又は処方によって左右される。

【0216】

50

B. 医薬組成物及び治療方法

本出願の別の態様は、癌、慢性感染症、又は易感染性疾患状態といった細胞増殖性障害を治療するための、医薬組成物及び方法に関する。一実施形態では、上記医薬組成物は、本出願の1つ以上の抗腫瘍アンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の上記抗腫瘍アンタゴニストは：1つ以上のチェックポイント調節因子アンタゴニスト、例えばPD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、抗TIGIT阻害剤、LAG-3阻害剤；1つ以上の血管新生阻害剤、例えばVEGF阻害剤、VEGFR2阻害剤、アンジオポエチン-1/2阻害剤、及びTie2R阻害剤；1つ以上の抗腫瘍阻害剤、例えばTGF- β 1阻害剤及びTGF- β 1RII阻害剤；又は二重特異性及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを含む。1つ以上の上記アンタゴニストは、薬学的に許容可能な担体と共に処方される。本出願の医薬組成物は、本明細書に記載されるように、1つ以上の異なる抗体、1つ以上の多重特異性抗体、1つ以上の免疫複合体、又はこれらの組み合わせを含んでよい。

10

【0217】

上述のように、本明細書に記載の医薬組成物を使用するための方法は、それを必要とする被験者に、有効量の本開示による医薬組成物を投与するステップを含む。

【0218】

患者に治療有効量又は予防有効量の抗体又はアンタゴニストを提供するために、いずれの好適な投与経路又はモードを採用できる。例示的な投与経路又はモードとしては、非経口（例えば静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内）、経口、局所（経鼻、経皮、皮内、又は眼内）、粘膜（例えば鼻腔、舌下、頬内、直腸、腔内）、吸入、リンパ管内、脊髄内、頭蓋内、腹腔内、気管内、膀胱内、髄腔内、経腸、肺内、リンパ管内、腔内、眼窩内、被膜内、及び経尿道、並びにカテーテル又はステントによる局所送達が挙げられる。

20

【0219】

本開示による抗体又はアンタゴニストを含む医薬組成物は、いずれの1つ以上の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤中で処方してよい。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な担体」は、生理学的適合性を有するありとあらゆる溶剤、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。医薬組成物は、好適な固体又はゲル相の担体又は賦形剤を含んでよい。例示的な担体又は賦形剤としては、限定するものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、及びポリエチレングリコール等のポリマーが挙げられる。薬学的に許容可能な例示的な担体としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、及びこれらの組み合わせが挙げられる。多くの場合、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムを、組成物中に含めることが好ましい。薬学的に許容可能な担体は更に、微量の補助物質、例えば湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤を含んでよく、これらは治療剤の貯蔵期間又は効力を強化する。

30

【0220】

抗腫瘍アンタゴニストは、非経口投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。好適な緩衝剤としては、限定するものではないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、又はリン酸カリウムが挙げられる。塩化ナトリウムは、溶液の毒性を改変するために、0～300mM（最適には液体剤形に関して150mM）の濃度で使用できる。凍結乾燥剤形には凍結防止剤、主に0～10%のスクロース（最適には0.5～1.0%）を含めることができる。他の好適な凍結防止剤としては、トレハロース及びラクトースが挙げられる。凍結乾燥剤形には増量剤、主に1～10%のマンニトール（最適には2～4%）を含めることができる。安定剤は、液体剤形及び凍結乾燥剤形の両方で使用でき、主に1～50mMのL-メチオニン（任意に5～10mM）である。他の好適な増量剤としては、グリシン、アルギニンが挙げられ、これらは0～0.05%のポリソルベート-80（最適には0.005～0.01%）として含めることができる。更なる界面活性剤としては、限定するものではないが、ポリソルベート20及びBRIJ界面

40

50

活性剤が挙げられる。

【0221】

治療用抗腫瘍アンタゴニスト調製物を凍結乾燥し、滅菌粉体として好ましくは真空下で保存でき、その後、（例えばベンジルアルコール防腐剤を含有する）静菌水又は滅菌水中で再構築してから注射できる。医薬組成物は、注射、例えばボーラス注射又は持続注入による非経口投与のために処方できる。

【0222】

医薬組成物中の治療剤は、「治療有効量」又は「予防有効量」で処方してよい。「治療有効量」は、複数回の投薬量で、必要な期間にわたって、所望の治療効果を達成するために有効な量を指す。組換えベクターの治療有効量は、治療対象の状態；状態の重篤度及び経過；投与のモード；抗体又は作用剤を予防目的で投与するか治療目的で投与するか；1つ以上の特定の作用剤のバイオアベイラビリティ；抗腫瘍アンタゴニストが個体内で所望の応答を誘発する能力；過去の療法；患者の年齢、体重、及び性別；患者の臨床履歴及び抗体に対する応答；使用される抗腫瘍アンタゴニストのタイプ；主治医の裁量等に応じて変化し得る。治療有効量はまた、組換えベクターのいずれの毒性の又は有害な影響を治療上有益な効果が上回る、量でもある。「予防有効量」は、複数回の投薬量で、必要な期間にわたって、所望の予防的結果を達成するために有効な量を指す。

【0223】

好ましくは、抗腫瘍アンタゴニスト中のポリペプチドドメインは、これらが投与される宿主と同一の宿主に由来するものであり、これにより、投与された治療剤に対する炎症反応が低減される。

【0224】

抗腫瘍アンタゴニストは、患者に1回で又は複数回の一連の治療にわたって好適に投与され、診断以降のいずれの時点に患者に投与してよい。抗腫瘍アンタゴニストは、単独の治療として、又は問題となっている状態の治療に有用な他の薬剤もしくは療法と組み合わせて、投与してよい。

【0225】

一般的な案として、治療有効量又は予防有効量の抗腫瘍アンタゴニストは、1回又は複数回の投与で、約1 ng/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日の範囲内で投与されることになる。ある特定の実施形態では、各抗腫瘍アンタゴニストは、約1 ng/kg体重/日～約10 mg/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約1 mg/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約100 µg/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約10 µg/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約1 µg/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約100 ng/kg体重/日、約1 ng/kg体重/日～約10 ng/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日～約10 mg/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日～約100 µg/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日～約1 µg/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日、約10 ng/kg体重/日～約100 ng/kg体重/日、約100 ng/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日、約100 ng/kg体重/日～約10 mg/kg体重/日、約100 ng/kg体重/日～約1 mg/kg体重/日、約100 ng/kg体重/日～約100 µg/kg体重/日、約100 ng/kg体重/日～約1 µg/kg体重/日、約1 µg/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日、約1 µg/kg体重/日～約10 mg/kg体重/日、約1 µg/kg体重/日～約100 µg/kg体重/日、約1 µg/kg体重/日～約10 µg/kg体重/日、約10 µg/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日、約10 µg/kg体重/日～約1 mg/kg体重/日、約10 µg/kg体重/日～約100 µg/kg体重/日、約100 µg/kg体重/日～約100 mg/kg体重/日、約100 µg/kg体重/日～約10 mg/kg体重/日、約1

00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～約1 mg/kg 体重/日、約1 mg/kg 体重/日～約100 mg/kg 体重/日、約1 mg/kg 体重/日～約10 mg/kg 体重/日、約10 mg/kg 体重/日～約100 mg/kg 体重/日の範囲内で投与される。

【0226】

他の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストは、3日毎に500 μg ～20 g 、又は3日毎に25 mg/kg 体重の用量で投与される。

【0227】

他の実施形態では、各抗腫瘍アンタゴニストは、投与1回あたり約10 ng ～約100 ng 、投与1回あたり約10 ng ～約1 μg 、投与1回あたり約10 ng ～約10 μg 、投与1回あたり約10 ng ～約100 μg 、投与1回あたり約10 ng ～約1 mg 、投与1回あたり約10 ng ～約10 mg 、投与1回あたり約10 ng ～約100 mg 、注射1回あたり約10 ng ～約1000 mg 、投与1回あたり約10 ng ～約10,000 mg 、投与1回あたり約100 ng ～約1 μg 、投与1回あたり約100 ng ～約10 μg 、投与1回あたり約100 ng ～約100 μg 、投与1回あたり約100 ng ～約1 mg 、投与1回あたり約100 ng ～約10 mg 、投与1回あたり約100 ng ～約100 mg 、注射1回あたり約100 ng ～約1000 mg 、投与1回あたり約100 ng ～約10,000 mg 、投与1回あたり約1 μg ～約10 μg 、投与1回あたり約1 μg ～約100 μg 、投与1回あたり約1 μg ～約1 mg 、投与1回あたり約1 μg ～約10 mg 、投与1回あたり約1 μg ～約100 mg 、注射1回あたり約1 μg ～約1000 mg 、投与1回あたり約1 μg ～約10,000 mg 、投与1回あたり約10 μg ～約100 μg 、投与1回あたり約10 μg ～約1 mg 、投与1回あたり約10 μg ～約10 mg 、投与1回あたり約10 μg ～約100 mg 、注射1回あたり約10 μg ～約1000 mg 、投与1回あたり約10 μg ～約10,000 mg 、投与1回あたり約100 μg ～約1 mg 、投与1回あたり約100 μg ～約10 mg 、投与1回あたり約100 μg ～約100 mg 、注射1回あたり約100 μg ～約1000 mg 、投与1回あたり約100 μg ～約10,000 mg 、投与1回あたり約1 mg ～約10 mg 、投与1回あたり約1 mg ～約100 mg 、注射1回あたり約1 mg ～約1000 mg 、投与1回あたり約1 mg ～約10,000 mg 、投与1回あたり約10 mg ～約100 mg 、注射1回あたり約10 mg ～約1000 mg 、投与1回あたり約10 mg ～約10,000 mg 、注射1回あたり約100 mg ～約1000 mg 、及び投与1回あたり約1000 mg ～約10,000 mg の範囲内で投与される。抗腫瘍アンタゴニストは毎日、2、3、4、5、6若しくは7日毎、又は1、2、3、若しくは4週間毎に投与される。

【0228】

他の特定の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストは、約0.0006 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.001 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.003 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.006 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.01 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.03 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.06 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.1 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.3 $\text{mg}/\text{日}$ 、0.6 $\text{mg}/\text{日}$ 、1 $\text{mg}/\text{日}$ 、3 $\text{mg}/\text{日}$ 、6 $\text{mg}/\text{日}$ 、10 $\text{mg}/\text{日}$ 、30 $\text{mg}/\text{日}$ 、60 $\text{mg}/\text{日}$ 、100 $\text{mg}/\text{日}$ 、300 $\text{mg}/\text{日}$ 、600 $\text{mg}/\text{日}$ 、1000 $\text{mg}/\text{日}$ 、2000 $\text{mg}/\text{日}$ 、5000 $\text{mg}/\text{日}$ 、又は10,000 $\text{mg}/\text{日}$ の用量で投与してよい。予想されるように、投薬量は、患者の状態、サイズ、年齢に左右されることになる。

【0229】

特定の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストのコード配列を、細胞増殖性障害を有する患者の体内で有効量の抗腫瘍アンタゴニストを発現するために、好適な発現ベクター（例えばウイルス又は非ウイルスベクター）に組み込む。例えば1つ以上の組換えAAV（rAAV）ウイルスの投与を含む特定の実施形態では、医薬組成物は、1 kg あたり少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、少なくとも 10^{13} 、又は少なくとも 10^{14} 個のゲノムコピー（GC）又は組換えウイルス粒子を含む量、又はそのいずれの範囲の量の、rAAVを含んでよい。特定の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、少なくとも 10^{13} 、少な

10

20

30

40

50

くとも 10^{14} 、少なくとも 10^{15} 個のゲノムコピー又は組換えウイルス粒子を含む量、又はそのいずれの範囲の量の、有効量の rAAV 等の組換えウイルスを含む。

【0230】

投薬量は、いずれの特定の細胞増殖性障害に好適な、いくつかの当該技術分野で許容された動物モデルで試験できる。

【0231】

送達方法としては、殺滅されたウイルスに結合した又はしていないポリカチオン性凝縮 DNA の使用、リガンド結合 DNA の使用、リボソームの使用、真核細胞送達ビヒクル細胞の使用、光重合性ヒドロゲル材料の堆積、ハンドヘルド遺伝子導入パーティクルガンの使用、電離放射線の使用、核酸電荷中和、又は細胞膜との融合、粒子仲介型遺伝子導入等を挙げることにもできる。

10

【0232】

C. 併用療法

別の態様では、本出願は、被験者の体内での抗原特異的 T 細胞応答を強化するための併用療法を提供する。一実施形態では、上記方法は、T 細胞を、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 TIM-3 抗体、抗 LAG-3 抗体、これらの抗体断片、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストと、第 2 の抗体、抗体断片、アンタゴニスト、又は薬剤との組み合わせと接触させることによって、抗原特異的 T 細胞応答又はアポトーシス経路を強化するステップを含む。

20

【0233】

関連する態様では、それを必要とする被験者の腫瘍中の調節性 T 細胞を減少させる又は枯渇させる方法は、有効量の抗体又は抗体断片と、第 2 の抗体、抗体断片、アンタゴニスト、又は薬剤との組み合わせを投与することによって、上記被験者の体内の調節性 T 細胞の数を減少させるステップを含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、上記被験者は、本明細書に記載の細胞増殖性疾患又は癌を有する。

【0235】

他の実施形態では、本明細書に記載の上記被験者は、慢性ウイルス感染症、炎症性疾患、又は自己免疫疾患を有する。

30

【0236】

T 細胞に 2 つの別個のシグナルを提供することは、抗原提示細胞 (APC) による休止 T 細胞リンパ球のリンパ球活性化に関する、広く受け入れられているモデルである。このモデルは更に、自己と非自己との識別、及び免疫寛容を提供する。一次シグナル、即ち抗原特異的シグナルは、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) との関連で提示される外来抗原ペプチドの認識に続いて、T 細胞受容体 (TCR) を介して伝達される。第 2 のシグナル、即ち共刺激シグナルは、抗原提示細胞 (APC) 上に発現される共刺激分子によって、T 細胞に送達される。これにより T 細胞が、クローン増殖、サイトカイン分泌、及びエフェクタ機能を促進するように誘導される。共刺激がない場合、T 細胞は抗原刺激に対して不応性となる可能性があり、その結果、外来又は内因性抗原に対する寛容原性応答が生じる。

40

【0237】

この 2 シグナルモデルでは、T 細胞は、正の共刺激シグナル及び負の共阻害シグナルの両方を受け取る。このような正及び負のシグナルの調節は、免疫寛容を維持し、かつ自己免疫を防止しながら、宿主の防御免疫応答を最大化するために、重要である。負のシグナルは、T 細胞寛容の誘導に必要と思われ、正のシグナルは T 細胞活性化を促進する。共刺激シグナル及び共阻害シグナルの両方が、抗原に曝露された T 細胞に供給され、共刺激シグナルと共阻害シグナルとの間の相互作用は、免疫応答の大きさを制御するために不可欠である。更に、T 細胞に供給されるシグナルは、感染又は免疫誘発が解消される、悪化する、又は持続するに従って変化し、これらの変化は、応答する T 細胞に強力に影響を及ぼ

50

して、免疫応答を再形成する。

【0238】

共刺激の機序は治療上の関心の対象となる。というのは、共刺激シグナルの操作は、細胞ベースの免疫応答を強化する又は終了させるための手段を提供することが示されているためである。近年、T細胞の機能不全又はエネルギーが、免疫チェックポイント調節因子、例えばPD-1並びにそのリガンドPD-L1及びPD-L2の、誘導された持続的な発現と、同時に発生し得る可能性があることが発見された。PD-L1は多くの癌で過剰発現し、多くの場合、予後不良と関連している(Thompson R H et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381)。更に、腫瘍浸潤性Tリンパ球の大半は、主にPD-1を発現するが、これは、腫瘍応答性T細胞上のPD-1の上方制御が抗腫瘍免疫応答の障害に寄与する可能性があることを示す、正常組織中のTリンパ球及び末梢血Tリンパ球とは対照的である(Blood 2009 114(8):1537)。これは、PD-1発現性T細胞と相互作用するPD-L1発現性腫瘍細胞が仲介するPD-L1シグナル伝達を利用して、T細胞活性化の減衰及び免疫監視の回避をもたらすことによるものである可能性がある。PD-L1/PD-1相互作用の阻害は、CD8+T細胞仲介型の癌細胞及び腫瘍の殺滅を含む、T細胞免疫の強化のための手段を提供する。同様のT細胞免疫の強化は、PD-L1の、結合パートナーB7-1への結合を阻害することによって観察されている。従って、PD-1及び他の免疫チェックポイント調節因子の治療的標的化は、極めて高い関心が持たれている分野である。

【0239】

PD-1、PD-L1、TIGIT及び／又はLAG-3シグナル伝達の阻害を、腫瘍細胞において調節解除された他のシグナル伝達経路と組み合わせることにより、治療の効力を強化する手段を提供できる。近年、受容体及びそのリガンドの形態の多数の免疫チェックポイント調節因子が同定されている。共刺激又は共阻害受容体に結合する膜結合型リガンドの1つの重要なファミリーは、B7ファミリーであり、これは：CTLA-4並びにそのリガンドであるB7-1及びB7-2；PD-1並びにそのリガンドであるPD-L1(B7-H1)及びPD-L2(B7-DC)；B7-H2(ICOS-L)；B7-H3；B7-H4；B7-H5(VISTA)；並びにB7-H6を含む。更なる免疫チェックポイントアンタゴニストとしては、限定するものではないが：TIM-3及びそのリガンドであるガレクチン-9；LAG-3、並びに肝類洞内皮細胞レクチン(LSECtin)及びガレクチン-3を含むそのリガンド；CD122及びそのCD122Rリガンド；CD70；B7H3；B7及びTリンパ球減衰因子(BTLA)；並びにVISTAが挙げられる(Le Mercier et al. (2015) Front. Immunol., (6), Article 418)。更に、多数のチェックポイント調節因子アンタゴニストが同定されており、様々な臨床及び前臨床モデルで試験され、並びに／又はFDAによって認可されている(Kyi et al., FEBS Letters, 588:368-376 (2014))。免疫チェックポイント遮断薬としても知られる阻害性受容体遮断薬のコンセプトは、転移性黒色腫に関するPD-1阻害剤ニボルマブ及びペンブロリズマブ並びに抗CTLA-4抗体イピリムマブのFDA認可によって検証されている。

【0240】

免疫チェックポイントアンタゴニストは、免疫チェックポイント調節因子の活性を調節する、又は上記活性に干渉し、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を遮断又は阻害する。このシグナル伝達を阻害することにより、免疫抑制を反転させることができ、従って、癌細胞に対するT細胞免疫を再確立又は強化できる。対照的に、(例えば共刺激分子の)免疫チェックポイントアゴニストは、免疫チェックポイント調節因子の活性を刺激し、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を刺激する。このシグナル伝達を刺激することによって、癌細胞に対するT細胞免疫を再確立又は強化できる。

【0241】

従って一実施形態では、被験者の体内での免疫応答を刺激する方法は、上記被験者に、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、これらの1つ以上の抗体断片（例えば抗TIGIT HCV R及び／若しくはLCVR）、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを、本明細書中で上述されている別の免疫チェックポイント調節因子と組み合わせて投与することによって、上記被験者の体内において免疫応答を刺激して、例えば腫瘍成長を阻害するか、又は抗ウイルス応答を刺激する、ステップを含む。

【0242】

一実施形態では、本出願による抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、これらの1つ以上の抗体断片、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、別の免疫チェックポイント調節因子と、別個の抗体として、又は複数の産物に対する結合特異性を備えた多重特異性抗体中で、組み合わせて投与される。一般に、本明細書に記載の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、免疫応答を刺激するために：（i）T細胞活性化を阻害するIgSFファミリータンパク質、B7ファミリー、若しくはTNFファミリーのアンタゴニスト、若しくはT細胞の活性化を阻害するサイトカイン（例えばIL-6、IL-10、TGF-β、VEGF、若しくは他の免疫抑制性サイトカイン）のアンタゴニスト；及び／又は（ii）免疫応答を刺激するために、T細胞活性化を刺激するための、IgSFファミリー、B7ファミリー、若しくはTNFファミリー、若しくはサイトカインの刺激性受容体のアゴニストと組み合わせることができる。

【0243】

特定の実施形態では、免疫チェックポイント調節因子のリガンドの高発現を示す癌を有する被験者のみが、本出願の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、及び／若しくは抗LAG-3抗体、これらの断片、又は二重特異性若しくは三重特異性アンタゴニストのいずれかとの併用療法のために選択される。例えば一実施形態では、PVR（CD155）及び／若しくはネクチン-2（CD112）の高発現、並びに／又はPD-L1の低発現を示す癌を有する被験者は、本出願の抗TIGIT抗体、その断片、若しくはTIGITアンタゴニストを用いた単剤療法、又はPD-1アンタゴニスト若しくは他の免疫チェックポイント調節因子を用いた併用療法のために選択できる。

【0244】

抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体は、第2の抗体、抗体断片、若しくはアンタゴニストとは別個に投与してよく、又はTIGITに対する少なくとも1つの結合特異性と、他の標的産物に対する第2の結合特異性とを備える、多重特異性抗体若しくはアンタゴニストを投与してよい。更に、本出願による抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT、又は二重特異性若しくは三重特異性アンタゴニストは、免疫応答及び／又はアポトーシスを刺激するのに有効な1つ以上の量の、1つ以上の更なる作用剤、例えば抗体、アンタゴニスト、又は薬剤と、同時投与してよく、これにより、被験者の体内での免疫応答及び／又はアポトーシスが更に強化される、刺激される、又は上方制御される。

【0245】

いくつかの実施形態では、抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、若しくは抗LAG-3抗体、又はこれらの1つ以上の断片は、異なる抗腫瘍アンタゴニストを用いた治療の後に投与される。例えば一実施形態では、抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、又は抗LAG-3抗体は、PD-1／PD-L1アンタゴニストを用いた治療が失敗した後；治療応答が不完全となった後；又は腫瘍の再発若しくは再燃があった（即ち「PD-1失敗」となった）後でのみ、投与され得る。いくつかの実施形態では、このような失敗を示す癌を、例えばPVR及び／又はネクチン-2の発現に関してスクリーニングし、高レベルの発現を有するものだけを、本出願の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、

若しくは抗LAG-3抗体、断片、又はアンタゴニストを用いて治療する。

【0246】

他の抗PD-1抗体としては、限定するものではないが、ニボルマブ(BMS-936558、MDX-1106、OPDIVO(商標))、ヒト化免疫グロブリンG4(IgG4) mAb(Bristol-Myers Squibb)；ペンブロリズマブ(MK-3475、ランブロリズマブ、Keytruda(商標))(Merck)；ピジリズマブ(CT-011)(Medivation)；及びAMP-224(Merck)が挙げられる。抗PD-1抗体は例えば、ABCAM(AB137132)、BIOLEGENE(商標)(EH12、2H7、RMP1-14)、及びAFFYMETRIX EBIOSCIENCE(J105、J116、MIH4)から市販されている。

10

【0247】

他の抗PD-L1抗体としては、アテゾリズマブ(MPDL3280A、RG7446)、完全ヒトIgG4 mAb(Genentech/Roche)；BMS-936559(MDX-1105)、完全ヒト化IgG4 mAb(Bristol-Myers Squibb)；MED14736、ヒト化IgG抗体(Medimmune/AstraZeneca)；及びMSB0010718C、完全ヒトIgG4モノクローナル抗体(Merck、EMD Serono)が挙げられる。

【0248】

本発明の方法に従って使用するための例示的な抗CTLA-4抗体としては、イピリマブ、トレビリズマブ、及びトレメリマブが挙げられる。

20

【0249】

特定の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストは、免疫チェックポイント調節因子のドミナントネガティブタンパク質である。特定の実施形態では、ドミナントネガティブタンパク質は、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-1、B7-2、B7H3、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、BTLA、VISTA、CD70、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーに由来する、細胞外ドメインを含む。特定の実施形態では、これらの細胞外ドメインは、本明細書に記載の抗体の免疫グロブリン定常領域又はFc受容体に融合する。このような変異体は、内因性受容体に結合でき、これにより、シグナル伝達が不足した複合体が形成される。特定の実施形態では、細胞外ドメインは、免疫グロブリン定常領域若しくはFc断片、又はオリゴマータンパク質複合体中のモノマーに融合する。

30

【0250】

特定の実施形態では、ドミナントネガティブPD-L1アンタゴニストは、PD-L1、PD-L2、又はPD-1の細胞外ドメインを含む。別の実施形態では、ドミナントネガティブPD-1アンタゴニストが採用され、これは変異を有するため、PD-L1には結合できない。例示的なドミナントネガティブタンパク質はAMP-224(GlaxoSmith Kline及びAmplimmuneが共同開発)であり、これは、PD-L2の細胞外ドメイン及びヒトIgGのFc領域を含む組換え融合タンパク質である。

【0251】

例示的な免疫チェックポイント調節因子アゴニストとしては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーのメンバー、例えばCD27、CD40、OX40、GITR、及び4-1BB(CD137)、並びにこれらのリガンド、又はCD28及びICOS(CD278)を含むB7-CD28スーパーファミリーのメンバーが挙げられる。更なるチェックポイント調節因子アゴニストとしては、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160、B7-H3、CD83リガンドが挙げられる。免疫チェックポイントアンタゴニストとしては、1つ以上の共刺激ドメインを含む抗体又は可溶性融合タンパク質アゴニストが挙げられる。アゴニスト抗体としては、限定するものではないが：抗CD40 mAb、例えばCP-870、893、ルカツムマブ、及びダセツズマブ；抗CD137 mAb、例え

40

50

ばBMS - 663513ウレルマブ、及びPF - 05082566；抗OX40 mAb；抗GITR mAb、例えばTRX518；抗CD27 mAb、例えばCDX - 1127；並びに抗ICOS mAbが挙げられる。

【0252】

例示的なGITRアゴニストとしては例えば、GITR融合タンパク質及び抗GITR抗体（例えば2価抗GITR抗体）、例えば米国特許第6,111,090号、及び米国特許第8,586,023号；欧州特許第090505B1号、国際公開特許第2010/003118号、及び国際公開特許第2011/090754号に記載されているGITR融合タンパク質が挙げられる。抗GITR抗体は例えば、米国特許第7,025,962号、米国特許第7,618,632号、米国特許第7,812,135号、米国特許第8,388,967号、及び米国特許第8,591,886号；欧州特許第1947183B1号、及び欧州特許第1866339号；国際公開特許第2011/028683号、国際公開特許第2013/039954号、国際公開特許第2005/007190号、国際公開特許第2007/133822号、国際公開特許第2005/055808号、国際公開特許第99/40196号、国際公開特許第2001/03720号、国際公開特許第99/20758号、国際公開特許第2006/083289号、国際公開特許第2005/115451号、国際公開特許第2011/051726号に記載されている。例示的な抗GITR抗体は、TRX518である。

【0253】

共刺激又は共阻害性受容体に結合する別の膜結合型リガンドのファミリーは、コグネイトTNF受容体ファミリーメンバーに結合する分子のTNFファミリーであり、これは、CD40及びCD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137/4-1BB、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT β R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンフォトキシン α /TNF γ 、TNFR2、TNF α 、LT β R、リンフォトキシン α 1(32)、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR（例えばTansey, M. G. et al. (2009) Drug Discovery Today, 14(23-24):1082-1088を参照）を含む。

【0254】

免疫チェックポイントアゴニスト、又は共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体以外の細胞表面分子又はそのリガンドを含み、限定するものではないが、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVE M(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)

、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELP LG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、及びCD83に特異的に結合するリガンドを含む。

【0255】

一態様では、T細胞応答は、本出願の抗PD-1、抗PD-L1、抗TIGIT、又は抗LAG-3 mAbと、(i) T細胞活性化を阻害するタンパク質のアンタゴニスト (例えば免疫チェックポイント阻害剤)、例えばCTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン-1、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD-1H、LAIR1、TIM-1、CD96、及びTIM-4、並びに(ii) T細胞活性化を刺激するタンパク質のアゴニスト、例えばB7-1、B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、CD40、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3、及びCD28Hのうちの1つ以上との組み合わせによって、刺激できる。

【0256】

癌治療のために本出願の抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体及び/又は抗LAG-3抗体と組み合わせることができる、上述のタンパク質のうちの1つを調節する例示的な作用剤としては、(CTLA-4に対する) YERVOY (商標) /イピリムマブ又はトレメリムマブ、(B7.1に対する) ガリキシマブ、(PD-1に対する) OPDIVO (商標) /ニボルマブ/BMS-936558、(PD-1に対する) ピジリズマブ/CT-011、(PD-1に対する) KEYTRUDA (商標) /ペンブロリズマブ/MK-3475、(B7-DC/PD-L2に対する) AMP224、(B7-H1に対する) BMS-936559、(B7-H1に対する) MPDL3280A、(ICOSに対する) MEDI-570、(B7H2に対する) AMG557、(B7H3に対する) MGA271、(LAG-3に対する) IMP321、(CD137/4-1BBに対する) ウレルマブマブ/BMS-663513及びPF-05082566、(CD27に対する) CDX-1127、(OX40に対する) MEDI-6383及びMEDI-6469、(OX40Lに対する) RG-7888、(TACIに対する) アタシセプト、(CD40に対する) CP-870893、(CD40に対する) ルカツマブ、(CD40に対する) ダセツズマブ、(CD3に対する) ムロモナブ-CD3が挙げられる。

【0257】

癌の治療のために本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせることができる他の分子としては、NK細胞の阻害性受容体のアンタゴニスト、又はNK細胞の活性化受容体のアゴニストが挙げられる。例えば、アンタゴニスト抗PD-1、抗PD-L1及び/又は抗TIGIT抗体を、KIRのアンタゴニスト (例えばリリルマブ)、RG7155等のCSF-1Rアンタゴニストと組み合わせることができる。

【0258】

腫瘍は、多様な機序によって宿主の免疫監視を回避する。これらの機序の多くは、腫瘍が発現する免疫抑制タンパク質の不活性化によって克服される可能性がある。これらには特に、TGF- β 、IL-10、及びFasリガンドが含まれる。これらの実体それぞれに対する抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用することにより、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進できる。

【0259】

宿主の免疫応答性を活性化する他の抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用できる。これらには、DC機能及び抗原提示を活性化する、樹状細胞の表面上の分子が含まれる。抗CD40抗体は、T細胞ヘルパー活性を効果的に代替でき、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用できる。OX-40、CD1

10

20

30

40

50

37/4 - 1BB、及びICOSといったT細胞共刺激分子に対する活性化抗体も、T細胞活性化のレベルの上昇を提供できる。

【0260】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、1つ以上の他の治療剤、例えば抗癌剤、放射性毒性剤、又は免疫抑制剤と同時投与できる。このような同時投与により、薬剤に対する耐性の発生、腫瘍細胞の抗体に対する反応性を低下させる抗原性の変化、及び（1つ以上の薬剤を低用量で投与することによる）毒性による問題を解決できる。

【0261】

本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、（免疫複合体として）作用剤に化学的に結合でき、又は作用剤とは別個に投与できる。後者の場合（別個に投与する場合）、抗体は、作用剤の前、後、若しくは作用剤と同時に投与でき、又は他の公知の療法、例えば抗癌療法、例えば放射線と同時投与できる。本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、1つ以上の抗癌剤と同時投与してよく、これにより、異なる機序で相乗的に作用する2つの抗癌剤を提供することで、ヒト癌細胞において細胞傷害効果が得られる。

【0262】

本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、抗癌剤、例えば：アルキル化剤；アントラサイクリン抗生物質；代謝拮抗剤；解毒剤；インターフェロン；ポリクローナル若しくはモノクローナル抗体；EGFR阻害剤；HER2阻害剤；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；ホルモン；有糸分裂阻害剤；ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ（PI3K）阻害剤；Akt阻害剤；哺乳類ラバマイシン標的タンパク質（mTOR）阻害剤；プロテアソーム阻害剤；ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP）阻害剤；Ras/MAPK経路阻害剤；中心体クラスター分離剤；マルチキナーゼ阻害剤；セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤；チロシンキナーゼ阻害剤；VEGF/VEGFR阻害剤；タキサン若しくはタキサン誘導体、アロマターゼ阻害剤、アントラサイクリン、微小管標的化剤、トポイソメラーゼ毒型薬剤、分子標的若しくは酵素（例えばキナーゼ若しくはタンパク質メチルトランスフェラーゼ）の阻害剤、シチジン類似体、又はこれらの組み合わせと組み合わせることができる。

【0263】

例示的なアルキル化剤としては、限定するものではないが：シクロホスファミド（Cytosan；Neosar）；クロラムブシル（Leukeran）；メルファラン（Alkeran）；カルムスチン（BiCNU）；ブスルファン（Busulfex）；ロムスチン（CeeNU）；ダカルバジン（DTIC-Dome）；オキサリプラチン（Eloxatin）；カルムスチン（Gliadel）；イホスファミド（Ifex）；メクロレタミン（Mustargen）；ブスルファン（Myleran）；カルボプラチン（Paraplatin）；シスプラチン（CDDP；Platinol）；テモゾロミド（Temodar）；チオテパ（Thioplex）；ベンダムスチン（Treanda）；又はストレプトゾシン（Zanosar）が挙げられる。

【0264】

例示的なアントラサイクリン抗生物質としては、限定するものではないが：ドキソルビシン（Adriamycin）；ドキソルビシンリボソーム（Doxil）；ミトキサントロン（Novantrone）；ブレオマイシン（Blenoxane）；ダウノルビシン（Cerubidine）；ダウノルビシンリボソーム（DaunoXome）；ダクチノマイシン（Cosmegen）；エピルビシン（Ellence）；イダルビシン（Idamycin）；プリカマイシン（Mithracin）；マイトマイシン（Mutamycin）；ペントスタチン（Nipent）；又はバルルビシン（Valstar）が挙げられる。

【0265】

例示的な代謝拮抗剤としては、限定するものではないが：フルオロウラシル（Aldurcyil）；カペシタビン（Xeloda）；ヒドロキシ尿素（Hydrea）；メルカプ

10

20

30

40

50

トプリン (Purinethol) ; ペメトレキセド (Alimta) ; フルダラビン (Fludara) ; ネララビン (Arranon) ; クラドリビン (Cladribine Novaplus) ; クロファラビン (Clolar) ; シタラビン (Cytosar-U) ; デシタビン (Dacogen) ; シタラビンリポソーム (DepoCyt) ; ヒドロキシ尿素 (Droxia) ; プラトトレキサート (Folotyn) ; フロクスウリジン (FUDR) ; ゲムシタビン (Gemzar) ; クラドリビン (Leustatin) ; フルダラビン (Oforta) ; メトトレキサート (MTX; Rheumatrex) ; メトトレキサート (Trexall) ; チオグアニン (Tabloid) ; TS-1 又はシタラビン (Tarabine PFS) が挙げられる。

【0266】

10

例示的な解毒剤としては、限定するものではないが、アミホスチン (Ethyol) 又はメスナ (Mesnex) が挙げられる。

【0267】

例示的なインターフェロンとしては、限定するものではないが、インターフェロンアルファ-2b (Intron A) 又はインターフェロンアルファ-2a (Roferon-A) が挙げられる。

【0268】

例示的なポリクローナル又はモノクローナル抗体としては、限定するものではないが：トラスツズマブ (Herceptin) ; オファツムマブ (Arzerra) ; ベバシズマブ (Avastin) ; リツキシマブ (Rituxan) ; セツキシマブ (Erbix) ; パニツムマブ (Vectibix) ; トシツモマブ/ヨウ素131トシツモマブ (Bexxar) ; アレムツズマブ (Campath) ; イブリツモマブ (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin) ; ゲムツズマブ (Mylotarg) ; エクリズマブ (Soliris) ; 又はデノスマブが挙げられる。

20

【0269】

例示的なEGFR阻害剤としては、限定するものではないが：ゲフィチニブ (Iressa) ; ラパチニブ (Tykerb) ; セツキシマブ (Erbix) ; エルロチニブ (Tarceva) ; パニツムマブ (Vectibix) ; PKI-166 ; カネルチニブ (CI-1033) ; マツズマブ (Emd7200) ; 又はEKB-569が挙げられる。

30

【0270】

例示的なHER2阻害剤としては、限定するものではないが、トラスツズマブ (Herceptin) ; ラパチニブ (Tykerb) ; 又はAC-480が挙げられる。

【0271】

例示的なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としては、限定するものではないが、ポリノスタット (Zolinza) 、バルプロ酸、ロミデプシン、エンチノスタット、アベキシノスタット、ギビノスタット、及びモセチノスタットが挙げられる。

【0272】

例示的なホルモンとしては、限定するものではないが：タモキシフェン (Sol tamox; Nolvadex) ; ラロキシフェン (Evista) ; メゲストロール (Megace) ; リュープロリド (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur) ; フルベストラント (Faslodex) ; レトロゾール (Femara) ; トリプトレリン (Trelstar LA; Trelstar Depot) ; エキセメスタン (Aromasin) ; ゴセレリン (Zoladex) ; ビカルタミド (Casodex) ; アナストロゾール (Arimidex) ; フルオキシメステロン (Androxy; Halotestine) ; メドロキシプロゲステロン (Provera; Depo-Provera) ; エストラムスチン (Emcyt) ; フルタミド (Eulexin) ; トレミフェン (Fareston) ; デガレリックス (Firmagon) ; ニルタミド (Nilandron) ; アバレリクス (Plenaxis) ; 又はテストラクトン (Teslac) が挙げられる。

40

50

【0273】

例示的な有糸分裂阻害剤としては、限定するものではないが：パクリタキセル (Taxol; Onxol; Abraxane)；ドセタキセル (Taxotere)；ビンクリスチン (Oncovin; Vincasar PFS)；ビンブラスチン (Velban)；エトポシド (Toposar; Etopophos; VePesid)；テニボシド (Vumon)；イクサベピロン (Ixempra)；ノコダゾール；エポチロン；ビノレルビン (Navelbine)；カンプトテシン (CPT)；イリノテカン (Camp to sar)；トポテカン (Hycamtin)；アムサクリン；又はラメラリンD (LAM-D)が挙げられる。

【0274】

例示的なホスファチジルイノシトール-3キナーゼ (PI3K) 阻害剤としては、ウォルトマンニン (PI3Kの非可逆的阻害剤)、デメトキシビリジン (ウォルトマンニンの誘導体)、LY294002 (PI3Kの可逆的阻害剤)；BKM120 (ブパリシブ)；イデラリシブ (PI3Kデルタ阻害剤)；デュベリシブ (IPI-145 (PI3Kデルタ及びガンマの阻害剤))；アルペリシブ (BYL719) (アルファ特異性PI3K阻害剤)；TGR1202 (かつてはRP5264として公知) (経口PI3Kデルタ阻害剤)；並びにコパンリシブ (BAY80-6946) (主にPI3K α 、 δ アイソフォームの阻害剤)が挙げられる。

【0275】

例示的なAkt阻害剤としては、限定するものではないが、ミルテフォシン、AZD5363、GDC-0068、MK2206、ペリフォシン、RX-0201、PBI-05204、GSK2141795、及びSR13668が挙げられる。

【0276】

例示的なMTOR阻害剤としては、限定するものではないが：エベロリムス (Afinitor) 又はテムシロリムス (Torisel)；シロリムス (rapamune)；リダフォロリムス又はデフォロリムス (AP23573)、AZD8055 (AstraZeneca)、OSI-027 (OSI)、INK-128、BEZ235、PI-103、Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WYE-687、WYE-354、及びCC-223が挙げられる。

【0277】

例示的なプロテアソーム阻害剤としては、限定するものではないが、ボルテゾミブ (PS-341)、イキサゾミブ (MLN2238)、MLN9708、デランゾミブ (CEP-18770)、カルフィルゾミブ (PR-171)、YU101、オプロゾミブ (ONX-0912)、マリゾミブ (NPI-0052)、及びジスフィラムが挙げられる。

【0278】

例示的なPARP阻害剤としては、限定するものではないが、オラパリブ、イニパリブ、ベラパリブ、BMN-673、BSI-201、AG014699、ABT-888、GPI21016、MK4827、INO-1001、CEP-9722、PJ-34、Tiq-A、Phen、PF-01367338、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0279】

例示的なRas/MAPK経路阻害剤としては、限定するものではないが、トラメチニブ、セルメチニブ、コビメチニブ、CI-1040、PD0325901、AS703026、RO4987655、RO5068760、AZD6244、GSK1120212、TAK-733、U0126、MEK162、及びGDC-0973が挙げられる。

【0280】

例示的な中心体クラスター分離剤としては、限定するものではないが：グリセオフルビン；ノスカピン、ノスカピン誘導体、例えば臭素化ノスカピン (例えば9-ブロモノスカピン)、還元型ブロモノスカピン (RBN)、N-(3-ブロモベンジル)ノスカピン、アミノノスカピン、及びこれらの水溶性誘導体；CW069；フェナントリジン由来ポリ

10

20

30

40

50

(ADP - リボース) ポリメラーゼ阻害剤、PJ - 34 ; N2 - (3 - ピリジルメチル) - 5 - ニトロ - 2 - フラミド、N2 - (2 - チエニルメチル) - 5 - ニトロ - 2 - フラミド、並びにN2 - ベンジル - 5 - ニトロ - 2 - フラミドが挙げられる。

【0281】

例示的なマルチキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：レゴラフェニブ；ソラフェニブ (Nexavar)；スニチニブ (Sutent)；BI BW2992；E7080；Zd6474；PKC - 412；モテサニブ；又はAP24534が挙げられる。

【0282】

例示的なセリン／スレオニンキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：ルボキシスタウリン；塩酸エリル／イースジル；フラボピリドール；セリシクリブ (CYC202；Roscovitrine)；SNS - 032 (BMS - 387032)；Pkc412；プリオスタチン；KAI - 9803；SF1126；VX - 680；Azd1152；Arry - 142886 (AZD - 6244)；SCIO - 469；GW681323；CC - 401；CEP - 1347；又はPD332991が挙げられる。

【0283】

例示的なチロシンキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：エルロチニブ (Tarceva)；ゲフィチニブ (Iressa)；イマチニブ (Gleevec)；ソラフェニブ (Nexavar)；スニチニブ (Sutent)；トラスツズマブ (Herceptin)；ベバシズマブ (Avastin)；リツキシマブ (Rituxan)；ラパチニブ (Tykerb)；セツキシマブ (Erbibitux)；パニツムマブ (Vectibix)；エベロリムス (Afinitor)；アレムツズマブ (Campath)；ゲムツズマブ (Mylotarg)；テニシロリムス (Torisel)；パゾパニブ (Votrient)；ダサチニブ (Sprycel)；ニロチニブ (Tasigna)；パタラニブ (PtK787；ZK222584)；CEP - 701；SU5614；MLN518；XL999；VX - 322；Azd0530；BMS - 354825；SKI - 606CP - 690；AG - 490；WHI - P154；WHI - P131；AC - 220；又はAMG888が挙げられる。

【0284】

例示的なVEGF／VEGFR阻害剤としては、限定するものではないが：ベバシズマブ (Avastin)；ソラフェニブ (Nexavar)；スニチニブ (Sutent)；ラニビズマブ；ペガブタニブ；又はバンデタニブが挙げられる。

【0285】

例示的な微小管標的化剤としては、限定するものではないが、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン、及びナベルピンが挙げられる。

【0286】

例示的なトポイソメラーゼ毒型薬剤としては、限定するものではないが、テニボシド、エトボシド、アドリアマイシン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ミトキサントロン、アムサクリン、エピルビシン、及びイダルビシンが挙げられる。

【0287】

例示的なタキサン又はタキサン誘導体としては、限定するものではないが、パクリタキセル及びドセタキソールが挙げられる。

【0288】

例示的な一般的化学療法剤、抗新生物剤、抗増殖剤としては、限定するものではないが、アルトレタミン (Hexalen)；イソトレチノイン (Accutane；Amnesteam；Claravis；Sotret)；トレチノイン (Vesanoïd)；アザシチジン (Vidaza)；ボルテゾミブ (Velcade)；アスパラギナーゼ (Elspar)；レバミソール (Ergamisol)；ミトタン (Lysodren)；プロカルバジン (Matulane)；ペガスパルガーゼ (Oncaspar)；デニ

10

20

30

40

50

ロイキンディフチトクス (Ontak) ; ポルフィマー (Photofrin) ; アルデスロイキン (Proleukin) ; レナリドミド (Revlimid) ; ベキサロテン (Targretin) ; サリドマイド (Thalomid) ; テニシロリムス (Torisel) ; 三酸化ヒ素 (Trisenox) ; ベルテポルフィン (Visudyne) ; ミモシン (Leucenol) ; (1M テガフル - 0.4M 5 - クロロ - 2, 4 - ジヒドロキシピリミジン - 1M カリウムオキシソネート) 、又はロバスタチンが挙げられる。

【0289】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、治療用量未満で投与され、別の抗免疫チェックポイント調節因子抗体又はアンタゴニストは、治療用量未満で投与され、血管新生アンタゴニストは、治療用量未満で投与され、あるいは、アンタゴニストの組み合わせの中のいずれのアンタゴニストはそれぞれ、治療用量未満で投与される。

10

【0290】

特定の実施形態では、PD - 1、PD - L1、TIGIT及び／又はLAG - 3阻害は、標準的な癌治療（例えば手術、放射線、及び化学療法）と組み合わせられる。PD - 1、PD - L1、TIGIT及び／又はLAG - 3阻害は、化学療法レジメンと効果的に組み合わせることができる。これらの例では、投与される化学療法試薬の用量を削減できる可能性がある。このような組み合わせの例は、黒色腫の治療のための抗TIGIT、抗PD - 1、抗PD - L1、又は抗LAG - 3抗体と、ダカルバジンとの組み合わせである。このような組み合わせの別の例は、黒色腫の治療のための抗PD - 1、抗PD - L1、抗TIGIT、又は抗LAG - 3抗体と、インターロイキン - 2 (IL - 2) との組み合わせである。PD - 1、PD - L1、TIGIT及び／又はLAG - 3阻害と化学療法とを組み合わせることで、アポトーシスを強化でき、また細胞傷害性免疫のための腫瘍抗原提示を増大させることができると考えられる。他の相乗的併用療法としては、放射線、手術、又はホルモン抑制と組み合わせる使用した場合の、細胞死によるPD - 1、PD - L1、TIGIT、及び／又はLAG - 3阻害が挙げられる。これらのプロトコルはそれぞれ、宿主の腫瘍抗原のソースを生成する。

20

【0291】

特定の実施形態では、本明細書に記載のチェックポイント調節因子アンタゴニストは、多重特異性アンタゴニスト中で、又はFcα若しくはFcγ受容体発現性エフェクタ細胞を腫瘍細胞に対して標的化する二重特異性抗体と組み合わせ、使用できる（例えば米国特許第5,922,845号、及び米国特許第5,837,243号を参照）。二重特異性抗体は、2つの別個の抗原を標的とするために使用できる。例えば、抗Fc受容体／抗腫瘍抗原（例えばHer - 2/neu）二重特異性抗体は、マクロファージを複数の癌細胞又は腫瘍に対して標的化するために使用されている。この標的化により、腫瘍特異的応答をより効果的に活性化できる。これらの応答のT細胞アームは、TIGIT、PD - 1、PD - L1及び／又はLAG - 3の阻害によって増強されることになる。あるいは、腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体と、樹状細胞特異的細胞表面マーカーとを使用することによって、抗原をDCに直接送達できる。

30

40

【0292】

VI. 抗腫瘍アンタゴニストの作製方法

A. アンタゴニストを発現するための核酸及び宿主

一態様では、本出願は、本出願の抗腫瘍アンタゴニストをコードする核酸、及びこのような核酸を含む発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載の実施形態による抗体若しくは断片のHCVR及び／若しくはLCVR断片、又は本明細書に記載の他の抗体及び抗体断片のうちのいずれかをコードする。

【0293】

モノクローナル抗体の抗原結合部位をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴ

50

ヌクレオチドプローブを用いて)、ハイブリドーマ細胞から単離して配列決定できる。あるいは、関心対象の免疫グロブリンからのアミノ酸配列を、タンパク質の直接の配列決定によって決定でき、好適なコードヌクレオチド配列は、普遍的なコドン表に従って設計できる。他の場合においては、定常領域、ヒンジ領域等を含む、抗原結合部位のヌクレオチド及びアミノ酸配列、又は他の免疫グロブリン配列は、当業者に公知の、公開されているソースから得ることができる。

【0294】

特定の単一特異性、二重特異性、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストをコードする発現ベクターを用いて、本開示の抗腫瘍アンタゴニストを、試験管内の培養細胞中で合成してよく、あるいは上記発現ベクターを患者に直接投与して、生体内又は生体外で抗腫瘍アンタゴニストを発現させてよい。本明細書中で使用される場合、「発現ベクター」は、本開示の単一特異性、二重特異性、又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストに対応する1つ以上のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを含む、ウイルス又は非ウイルスベクターであって、抗体の調製を目的として、又は治療剤としての直接投与のために、宿主細胞中で1つ以上の上記ポリヌクレオチドから発現させるのに好適な形態の、ウイルス又は非ウイルスベクターを指す。

【0295】

ある核酸配列は、別の核酸配列とある機能的な関係に配置されたときに、上記別の核酸配列に対して「作動可能に結合」される。例えば、プレ配列又はシグナルペプチドのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、上記ポリペプチドのDNAに作動可能に結合され；プロモータ又はエンハンサは、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、このコード配列に作動可能に結合され；あるいはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に作動可能に結合されている。一般に、「作動可能に結合される」は、結合される複数のDNA配列が連続していること、及びシグナルペプチドの場合は連続しておりかつ読み取り段階にあることを意味する。しかしながら、エンハンサは必ずしも連続していなくてよい。結合は、便利な制限部位におけるライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプタ又はリンカーを、従来の慣行に従って使用してよい。

【0296】

抗腫瘍アンタゴニストを発現するための核酸配列は典型的には、アミノ末端シグナルペプチド配列を含み、これは成熟タンパク質から除去される。シグナルペプチド配列は発現のレベルに影響を及ぼし得るため、ポリヌクレオチドは、多様な異なるN末端シグナルペプチド配列のいずれをコードしてよい。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベル等といった因子に左右され得ることは、当業者には理解されるであろう。

【0297】

上述の「調節性配列(regulatory sequence)」は、1つ以上の宿主生物の体内における、作動可能に結合されたコード配列の発現に必要な、DNA配列を指す。用語「調節性配列」は、プロモータ、エンハンサ、及び他の発現制御要素(例えばポリアデニル化シグナル)を含むことを意図したものである。調節性配列は多数のタイプの宿主細胞中でヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、又は特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指示するもの(例えば組織特異性調節性配列)を含む。発現ベクターは一般に、転写終結のための配列を含有し、更に、mRNAの安定性にプラスの影響を及ぼす1つ以上の要素を含有し得る。

【0298】

発現ベクターは、抗腫瘍アンタゴニストの発現を指示するための、プロモータ及び／又はエンハンサを含む1つ以上の転写調節性要素を含有する。プロモータは、転写開始部位に関して比較的固定された位置から転写を開始させるように機能する、DNA配列を含む。プロモータは、RNAポリメラーゼと転写因子との基本的な相互作用に必要なコア要素を含有し、他の上流の要素及び応答要素と連動して作動し得る。

【0299】

本明細書中で使用される場合、用語「プロモータ」は、その最も広い文脈において解釈されるべきであり、ゲノム遺伝子由来の転写調節性要素（TRE）、又はそれ由来のキメラTREを含み、これは、正確な転写開始のためのTATAボックス又はイニシエータ要素を含み、またこれは、発達刺激及び／又は外部刺激に応答してそれに作動可能に結合される遺伝子の活性化又は抑制を調節する更なるTRE（即ち上流活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサ、及びサイレンサ）、並びにトランス作用性調節性タンパク質又は核酸を、伴っても伴わなくてもよい。プロモータは、ゲノム断片を含有してよく、又は組み合わせられる1つ以上のTREのキメラを含有してよい。

【0300】

好ましいプロモータは、関心対象の標的細胞中での高レベルの発現を指示できるプロモータである。プロモータとしては、構成的プロモータ（例えばHCMV、SV40、伸長因子-1 α （EF-1 α ））、又は関心対象の特定の細胞タイプにおいて優先的な発現を示すプロモータが挙げられる。エンハンサは一般に、転写開始部位から離れて機能する、転写ユニットに対して5'又は3'となることができるDNA配列を指す。更にエンハンサは、イントロン内及びコード配列内に存在してよい。これらの長さは通常10～300bpであり、シスで機能する。エンハンサは、近隣のプロモータからの転写を増大させる、及び／又は調節するように機能する。好ましいエンハンサは、抗体産生細胞中での高レベルの発現を指示するものである。細胞又は組織特異的転写調節性要素（TRE）は、発現ベクターに組み込むことによって、発現を所望の細胞タイプに制限できる。Pol IIプロモータ（H1又はU6）は、siRNAが発現されるshRNAの発現に特に有用である。発現ベクターは、1つ以上の細胞タイプでの抗腫瘍アンタゴニストの発現を促進するように設計できる。

【0301】

特定の実施形態では、1つ以上の発現ベクターを操作して、抗腫瘍アンタゴニストと、Tie2経路、VEGF経路、又は免疫チェックポイント調節因子を標的とする1つ以上のsiRNAとの両方を発現させることができる。

【0302】

siRNAは、mRNAの配列特異的転写後遺伝子サイレンシングを誘導するように操作できる、二本鎖RNAである。合成によって産生されたsiRNAは、酵素Dicerによって細胞内で通常処理されるタイプのsiRNAを構造的に模倣する。発現ベクターから発現される場合、この発現ベクターは、処理される短い二本鎖ヘアピン様RNA（shRNA）を、細胞内の標的化siRNAへと転写するように、操作される。合成siRNA及びshRNAは、公知のアルゴリズムを用いて設計でき、また従来のDNA/RNAシンセサイザを用いて合成できる。

【0303】

抗腫瘍アンタゴニストの個々の鎖を共発現させるために、好適なスプライスドナー及びスプライスアクセプタ配列を組み込んで、両方の産物を発現させることができる。あるいは、内部リボソーム結合配列（IRES）又は2Aペプチド配列を採用して、1つのプロモータから複数の産物を発現させることができる。IRESは、リボソームが結合できる構造を提供し、上記リボソームは必ずしもmRNAの5'末端にある必要はない。従って、mRNA内の第2の開始コドンにおいて翻訳を開始するようリボソームに指示でき、これにより、単一のmRNAから2つ以上のポリペプチドを産生できる。2Aペプチドは、2A部位の上流及び下流でペプチドの同時翻訳自己切断を仲介する短い配列を含有し、これにより、2つの異なるタンパク質を、1回の転写から同一のモル量で産生できる。CHYSELが2Aペプチドの非限定的な例であり、これは、翻訳中の真核生物リボソームに、mRNAから解離することなく合成されている成長中のポリペプチド鎖を放出させる。このリボソームは翻訳を続け、第2のポリペプチドを産生する。

【0304】

発現ベクターは、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターを含んでよい。ウイルスベ

10

20

30

40

50

クターは、アデノ関連ウイルス（A A V）、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス（H I V - 1 及び H I V - 2 等のレンチウイルスを含む）、シンドビス及び他の R N A ウイルス、アルファウイルス、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポーバウイルス、パラミクソウイルス、バルボウイルス、ピコルナウイルス、トガウイルス等に由来するものであってよい。非ウイルスベクターは単に、ウイルス由来成分（例えばカプシド及び／又はエンベロープ）でパッケージされていない「裸の」発現ベクターである。

【0305】

特定のケースにおいて、これらのベクターは、これらのウイルスベクターが生来有する、又は操作によってウイルスベクターに与えられた、標的化特性を用いて、特定の疾患又は細胞集団を標的とするように操作できる。特定の細胞を、ポリヌクレオチドの送達及び発現のために「標的化」してよい。従って用語「標的化」はこの場合：カプシド、エンベロープタンパク質、特定の細胞への送達のための抗体の形態での、内因性又は異種結合剤の使用；発現を細胞の1つ以上の特定のサブセットに制限するための組織特異的調節性要素の使用；あるいはこれら両方に基づくものとすることができる。

10

【0306】

いくつかの実施形態では、抗体鎖の発現は、組織特異的又は遍在性プロモータといった調節性要素の制御下にある。いくつかの実施形態では、C M V プロモータ、C M V - ニワトリベータアクチンハイブリッド（C A G）プロモータといった遍在性プロモータ、又は特定の抗体の重鎖若しくは軽鎖若しくは一本鎖誘導体の発現を制御するための組織特異的若しくは腫瘍特異的プロモータを用いてよい。

20

【0307】

非ウイルス発現ベクターは、裸の D N A の直接注入によって、又は抗腫瘍アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドをリボソーム、微粒子、マイクロカプセル、ウイルス様粒子、若しくは赤血球ゴーストでカプセル化することによって、非ウイルス遺伝子の導入に利用できる。このような組成物は、標的指向性ドメインへの化学的コンジュゲーションによって更に結合されて、関心対象の所望の細胞への核酸の標的化された送達及び／又は移入を促進できる。更に、プラスミドベクターを、ポリリジン、プロタミン、及びアルブミンのような高分子 D N A 結合カチオン等の合成遺伝子導入分子と共にインキュベートし、アシアロオロソムコイド、インスリン、ガラクトース、ラクトース、又はトランスフェリンといった細胞標的化リガンドに化学的に結合させることができる。

30

【0308】

あるいは、裸の D N A を採用してもよい。裸の D N A の取り込み効率は、圧縮によって、又は生分解性ラテックスビーズの使用によって、改善できる。このような送達は、ビーズを処理して疎水性を向上させて、エンドソームの破壊及び細胞質への D N A の放出を促進することによって、更に改善できる。

【0309】

B. 単一特異性又は多重特異性抗体の製造方法

一態様では、本出願は宿主細胞であって、本出願の二重特異性及び／又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストをコードする核酸若しくは発現ベクター又は核酸／発現ベクターをコードする、抗 P D - 1、抗 P D - L 1、抗 T I G I T、及び／又は抗 L A G - 3 の H C V R 及び／又は L C V R で形質転換された、宿主細胞を提供する。宿主細胞は、核酸若しくは発現ベクター、又は本明細書に記載の他の同時投与される抗体若しくはアンタゴニストのうちのいずれかをコードする、抗 P D - 1、抗 P D - L 1、抗 T I G I T 及び／又は抗 L A G - 3 の H C V R 及び／又は L C V R を発現できるいずれの細菌又は真核細胞とすることができる。

40

【0310】

別の態様では、抗腫瘍アンタゴニストの製造方法は、抗体又は断片の産生が可能な条件下で、核酸又は発現ベクターをコードする、1つ以上の抗 P D - 1、抗 P D - L 1、抗 T I G I T、及び／又は抗 L A G - 3 の H C V R 及び／又は L C V R で形質転換された、宿

50

主細胞を培養するステップと、上記抗体を上記細胞から精製するステップとを含む。

【0311】

更なる態様では、本出願は、抗体の製造方法を提供し、上記方法は：上記抗体中の1つ以上のポリペプチド鎖をコードする1つ以上の構築物を一時的又は安定的に発現する細胞を培養するステップ；及び培養した上記細胞から上記抗体を精製するステップを含む。機能的な抗体を産生できるいずれの細胞を使用してよい。好ましい実施形態では、抗体発現細胞は、真核生物又は哺乳類由来であり、好ましくはヒト細胞である。様々な組織細胞タイプ由来の細胞を用いて、抗体を発現させることができる。他の実施形態では、細胞は酵母細胞、昆虫細胞、又は細菌細胞である。好ましくは、抗体産生細胞は、上記抗体を発現するベクターで安定的に形質転換される。

10

【0312】

抗体重鎖又は軽鎖を発現する1つ以上の発現ベクターを、Naked DNA技法、カチオン性脂質伸介型トランスフェクション、ポリマー伸介型トランスフェクション、ペプチド伸介型トランスフェクション、ウイルス伸介型感染、物理的又は化学的な作用剤又は処理、電気穿孔法等といったいずれの従来の方法で、細胞内に導入できる。更に、細胞は、抗体を発現する安定的に形質転換されたクローンの選択を促進する選択可能なマーカーと共に、抗体を発現するための、1つ以上の発現ベクターでトランスフェクトしてよい。このような細胞によって産生された抗体は、遠心分離、クロマトグラフィ等といった当該技術分野で公知の技法に従って、回収及び／又は精製できる。

20

【0313】

哺乳類細胞に対して好適な、選択可能なマーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体G418、ハイグロマイシン、及びピューロマイシンが挙げられる。このような選択可能なマーカーを哺乳類宿主細胞内に良好に移入すると、形質転換された哺乳類宿主細胞は、選択された圧力下に置かれた場合に生き残ることができる。選択方式については、2つの広く使用されている別個のカテゴリが存在する。第1のカテゴリは、細胞の代謝と、補充培地から独立して成長する能力を欠いた変異細胞株の使用とに基づくものである。その2つの例は、CHO-DHFR細胞及びマウスLTK細胞である。これらの細胞は、チミジン又はヒポキサンチンといった栄養素を追加せずに成長する能力に欠けている。これらの細胞が、完全なヌクレオチド合成経路に必要な特定の遺伝子を欠いているため、これらの細胞は、不足しているヌクレオチドが補充培地で提供されない限り、生き残ることができない。培地の補充に代わる選択肢は、無傷のDHFR又はTK遺伝子を、これらの各遺伝子を欠いている細胞に導入することによって、成長要件を変更することである。DHFR又はTK遺伝子で形質転換されなかった個々の細胞は、補充されていない培地中では生き残ることができない。

30

【0314】

第2のカテゴリは、いずれの細胞タイプにおいて使用される選択スキームを指す優生選択であり、変異細胞株の使用を必要としない。これらのスキームは典型的には、宿主細胞の成長の阻止のために薬剤を使用する。新規の遺伝子を有する細胞は、薬剤耐性を伝達するタンパク質を発現し、上記選択を生き残ることになる。このような優生選択の例は、ネオマイシン、ミコフェノール酸、又はハイグロマイシンといった薬剤を使用する。これら3つの例は、真核細胞の制御下にある細菌遺伝子を採用して、適切な薬剤G418、即ちネオマイシン(ジェネチシン)、xgpt(ミコフェノール酸)、又はハイグロマイシンそれぞれに対する耐性を伝達する。他には、ネオマイシン類似体G418及びピューロマイシンが挙げられる。

40

【0315】

例示的な抗体発現性細胞としては、ヒトJurkat、ヒト胎児腎臓(HEK)293、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、マウスWEHI線維肉腫細胞、及びリーシュマニア・タレントラエ等の単細胞原生動物種が挙げられる。更に、安定的に形質転換された抗体産生細胞株は、c-myc又は他の不死化剤で不死化された一次細胞を用いて

50

産生できる。

【0316】

一実施形態では、上記細胞株は、安定的に形質転換されたリーシュマニア・タレントラエ等のリーシュマニア細胞株を含む。リーシュマニアは、哺乳類タイプのグリコシル化パターンを示す真核細胞タンパク質の高レベルの発現のための、ロバストで迅速に成長する単細胞宿主を提供することが知られている。市販のリーシュマニア真核細胞発現キットが入手可能である（Jena Bioscience GmbH、イエナ（ドイツ））。

【0317】

いくつかの実施形態では、上記細胞株は、培養物1リットルあたり、少なくとも1mg、少なくとも2mg、少なくとも5mg、少なくとも10mg、少なくとも20mg、少なくとも50mg、少なくとも100mg、少なくとも200mg、少なくとも300mg、少なくとも400mg、又は少なくとも500mgの抗体を発現する。

10

【0318】

本出願の抗体は、いずれの適切な培養培地、例えばRPMI、DMEM、及びAIMV（登録商標）中での培養及び保持の後、抗体発現細胞から単離できる。抗体は、タンパク質A又はタンパク質G免疫アフィニティ精製を含む従来のタンパク質精製方法（例えばアフィニティ精製、クロマトグラフィ等）を用いて精製できる。いくつかの実施形態では、抗体を、培養物上清からの単離のために培養物上清に分泌されるように操作する。

【0319】

限定として解釈されるべきではない以下の実施例によって、本出願を更に説明する。本出願全体を通して引用されている全ての参考文献、特許、及び公開特許出願の内容、並びに図面及び表は、参照により本出願に援用される。

20

【0320】

C. ホモ二量体及びヘテロ二量体

二重特異性及び三重特異性抗体調製物を効率的に製造するための課題の1つは、結合特異性が異なる鎖が同時発現される際の、重鎖及び軽鎖の誤った対合に関する。表1は、結合特異性が異なる重鎖間の誤った対合を克服するための、複数のアミノ酸置換選択肢を示し、これは、所望の重鎖間での正しい会合を「強制する」、又は優先的に促進する。重鎖間の誤った対合を防止又は低減するためのいずれのアプローチを用いて、本開示による二重特異性及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを作製してよい。

30

【0321】

「ノブ・イントゥ・ホール」（K i H）アプローチは、ほとんどの相互作用が発生する2つのCH3ドメイン間の境界の修飾に依存する。典型的には、嵩高い残基を一方の抗体重鎖のCH3ドメインに導入し、これは鍵のように機能する。他方の重鎖には「ホール」が形成され、これは上述の嵩高い残基を収容でき、錠を模倣する。得られるヘテロ二量体Fc部分は、人工的なジスルフィド架橋によって更に安定化できる。

【0322】

別のアプローチは、イオン相互作用又は立体的相補性を有する荷電残基に基づくものである。これは、CH3境界の電荷の極性を変更するステップを含み、これにより、静電的に一致したFcドメインの同時発現が、疎水性コアを保持しながら、好ましい牽引性の相互作用及びヘテロ二量体形成をサポートし、その一方で、好ましくない反発性の電荷の相互作用がホモ二量体化を抑制する。表1を参照。表1のアミノ酸の番号付与は、Kabat番号付与スキームに従っており、本明細書に記載の抗体の重鎖アミノ酸配列に適用できる。

40

【0323】

更なるアプローチでは、ロイシンジッパー（LZ）ドメインをタンパク質足場に組み込んでよい。ロイシンジッパーは、典型的には様々な転写因子中のDNA結合ドメインの一部としての、タンパク質中の一般的な3次元構造モチーフである。単一のLZは、典型的には4～5個のロイシン残基をおよそ7残基の間隔で含有し、これは、片側に沿って疎水性領域が延在する両親媒性アルファヘリックスを形成する。ある特定の実施形態では、ヘ

50

テロ二量体タンパク質足場は、c - f o s 転写因子からの L Z に関連する c - j u n 転写因子からの L Z を含む。c - j u n は、j u n - j u n ホモ二量体を形成することが知られており、c - f o s はヘテロ二量体を形成しないが、j u n - f o s ホモ二量体の形成は j u n - j u n ヘテロ二量体よりもはるかに好ましい。

【0324】

ロイシンジッパードメインは、タンパク質足場中に C H 2 - C H 3 配列の代わりに組み込むことができ、又は二重特異性若しくは三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの2つの重鎖のカルボキシ末端に配置できる。後者の場合、フリン切断部位を C H 3 のカルボキシ末端とロイシンジッパーのアミノ末端との間に導入してよい。これにより、適切な哺乳類細胞発現系において二重特異性又は三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの重鎖及び軽鎖が同時発現されたときに、ヘテロ二量体化ステップの後に、ロイシンジッパーのフリン仲介型切断を促進できる。(W r a n i k e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 8 7 (5) : 4 3 3 3 1 - 4 3 3 3 9 , 2 0 1 2 を参照)。

【表1】

タイプ	HC1	HC2
ノブ・イントゥ・ホール	Y349C、T366S、L368A、Y407V	S354C、T366W
イオン性、静電気	S183E、E356K、E357K、D399K	S183K、K370E、K409D、K439E
イオン性、静電気	K392D、K409D	E356K、D399K
HA-TF 置換	S364H、F405A	Y349T、T394F
HF-TA 置換	S364H、T394F	Y349T、F405A
ロイシンジッパーヘテロ二量体	ヒト c-Jun ロイシンジッパー	ヒト c-fos ロイシンジッパー

【0325】

表1のアミノ酸の番号付与は、K a b a t 番号付与スキームに従っており、本明細書に記載の抗体の重鎖アミノ酸配列に適用できる。表1に記載の変異は、いずれの免疫グロブリン I g G 1 重鎖、並びに本明細書中の他の免疫グロブリンクラス及びサブクラス（又はアイソタイプ）の配列（公開されているもの又はそうではないもの）に適用され得る。

【0326】

二重特異性又は三重特異性抗体の重鎖及び軽鎖の同時発現時、ある結合特異性の軽鎖が、異なる結合特異性の重鎖と誤って対合される場合もある。従って特定の実施形態では、重鎖、軽鎖、又はこれら両方の部分を、これらが由来する「野生型」抗体鎖に比べて修飾することによって、両方の重鎖定常領域の互いに対する誤った対合、及び軽鎖定常領域の、対応する重鎖に対する誤った対合を、防止又は低減できる。

【0327】

軽鎖の誤った対合の問題には、複数の方法で対処できる。いくつかの実施形態では、立体的相補性変異及び／又はジスルフィド架橋を2つの V L / V H 境界に組み込むことができる。他の実施形態では、変異を、イオン性又は静電的相互作用に基づいて組み込むことができる。いくつかの実施形態では、軽鎖の誤った対合は、重鎖の C H 1 ドメインの S 1 8 3 E 変異と、軽鎖の C L ドメインの S 1 7 6 K 変異とを伴う第1のアームを採用することによって、防止又は低減できる。第2のアームは、重鎖の C H 1 ドメインの S 1 8 3 K 変異と、軽鎖の C L ドメインの S 1 7 6 E 変異とを含んでよい。他の実施形態では、「C r o s s M a b」アプローチが採用され、ここでは、二重特異性又は三重特異性抗腫瘍

アンタゴニスト中の一方のアーム（例えばF a b）は触られないままであるが、他の結合特異性を有する他方のアームでは、軽鎖の1つ以上のドメインが、重鎖：軽鎖の境界において、重鎖の1つ以上のドメインと交換される。

【0328】

上で開示されている重鎖及び軽鎖の誤った対合を防止するための方法、特異的変異を含む免疫グロブリンドメイン配列は、米国特許出願公開第2014/0243505号、米国特許出願公開第2013/0022601号に更に記載されている。

【0329】

D. コンジュゲート

特定の実施形態では、本出願の抗腫瘍アンタゴニストは、1つ以上のペプチド及び／又は小分子薬剤に化学的にコンジュゲートされる。上記ペプチド又は小分子薬剤は、同一であっても異なってもよい。上記ペプチド又は小分子薬剤は例えば、還元されたSH基及び／又は炭水化物側鎖に付着させることができる。ペプチド又は小分子薬剤と抗体との共有又は非共有結合を作製する方法は当該技術分野において公知であり、いずれのこのような公知の方法を利用してよい。

【0330】

いくつかの実施形態では、ペプチド又は小分子薬剤は、ジスルフィド結合の形成によって、還元された抗体成分のヒンジ領域に付着させられる。あるいは、このような作用剤は、N - スクシニル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) 等のヘテロ二官能性架橋剤を用いて付着させることができる。このようなコンジュゲーションのための一般的な技法は、当該技術分野において公知である。いくつかの実施形態では、ペプチド又は小分子薬剤は、抗体のFc領域の炭水化物部分を介してコンジュゲートされる。炭水化物基は、チオール基に結合する同一の作用剤の負荷を増大させるために使用でき、又は炭水化物部分は、異なる治療剤若しくは診断剤に結合するために使用できる。抗体の炭水化物部分を介してペプチド阻害剤又は小分子薬剤を抗体にコンジュゲートする方法は、当業者には公知である。例えば一実施形態では、上記方法は、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分を、少なくとも1つの遊離アミン官能基を有する担体ポリマーと反応させるステップを伴う。この反応により、最初のシッフ塩基（イミン）結合が生じ、これを還元して2級アミンとすることによって安定化させて、最終的なコンジュゲートを形成できる。小分子薬剤及びペプチドを抗体にコンジュゲートする例示的な方法は、米国特許出願公開第2014/0356385号に記載されている。

【0331】

好ましくは、本開示の抗腫瘍アンタゴニストは、試験管内及び生体内安定性（例えば長い半減期及び貯蔵寿命安定性）、所望の標的細胞への効率的な送達、結合パートナーに対する親和性の向上、所望の抗体依存性細胞介在性細胞傷害性及び補体依存性細胞傷害性、並びに腎クリアランス又は排泄の低減を含む、抗体の特定の所望の特徴及び薬物動態特性を保持している。従って、抗腫瘍アンタゴニストの設計において、サイズへの十分な配慮、及び特定の定常領域のエフェクタ機能の必要性を、考慮できる。

【0332】

抗PD - 1、抗PD - L1、及び抗TIGIT阻害剤（これらに由来する単一特異性、二重特異性、及び三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを含む）のサイズは、50 kD ~ 300 kD、50 kD ~ 250 kD、60 kD ~ 250 kD、80 kD ~ 250 kD、100 kD ~ 250 kD、125 kD ~ 250 kD、150 kD ~ 250 kD、60 kD ~ 225 kD、75 kD ~ 225 kD、100 kD ~ 225 kD、125 kD ~ 225 kD、150 kD ~ 225 kD、60 kD ~ 200 kD、75 kD ~ 200 kD、100 kD ~ 200 kD、125 kD ~ 200 kD、150 kD ~ 200 kD、60 kD ~ 150 kD、75 kD ~ 150 kD、100 kD ~ 150 kD、60 kD ~ 125 kD、75 kD ~ 125 kD、75 kD ~ 100 kD、又は上述の範囲内で挙げられている整数のいずれの組み合わせによって包含されるいずれの範囲、又は上述の範囲のうちのいずれかの間の整数のいずれの組み合わせによって指定されるいずれの範囲内であってよい。

【実施例】

【0333】

実施例1：モノクローナル抗体の生成

本出願のモノクローナル抗体(mAb)は、当該技術分野で公知の技法を用いて生成及びスクリーニングされる。例えばHarlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照。抗原特異的ハイブリドーマMabは、当該技術分野で公知の技法を用いてクローニング、配列決定、及び操作される。例えばLo. B. K. C Methods in Molecular Biology (Trademark). Volume 248 2004. Antibody Engineeringを参照。

【0334】

実施例2：PD-1標的指向性ドメイン及び複数の血管新生標的化部分を有する、三重特異性アンタゴニスト

図1は、抗PD-1、抗PD-L1、抗LAG-3、及び抗TIGIT mAbのVH及びVL配列を示す。図2は：ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びVHの変異多様体のVH及びVL；アフリベルセプト、トレバナニブ-短鎖ペプチド、及びトレバナニブ-長鎖ペプチドのVEGF結合ドメイン；並びにTGFβ R-IIIの細胞外ドメイン(TGFβ R-III ECD)を含む、他の機能性ドメインを示す。

【0335】

アフリベルセプト融合タンパク質ドメインは、ヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメインに由来する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を含み、VEGF-A、VEGF-B、及びPLGFの、これらの受容体であるVEGFR-1及びVEGFR-2への結合を防止する。トレバナニブペプチドは、Ang1及びAng2を標的としてこれらに結合することにより、Ang1及び/又はAng2と、これらのコグネイトTie2受容体との相互作用を防止する。抗腫瘍アンタゴニストは、IgG1、IgG1 agly、又はIgG4バックボーンで構築できる。

【0336】

それぞれが以下を含む、多様な三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを構築した：

(1) 1つ以上の抗PD-1、又は他のチェックポイント抗体可変領域ドメイン；アフリベルセプトペプチド；及びトレバナニブペプチド又はそのペプチド配列。図3A～3Hは、8個の異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、TS-ZPT-1、1、-1.2、-1.3、及び-2～-6をそれぞれ示す。

(1) 抗PD-1可変領域(VH1、VL1)(図3A～3H)；

(2) (i) 一方若しくは両方のIgGアームのアミノ末端(図3A～3C、3F)；

(ii) 各アンタゴニストのカルボキシ末端(図3D、3E、3H)；又は(iii) CH3ドメインのカルボキシ末端とトレバナニブペプチド(若しくは他の生物学的ペプチド)との間(図3G)の、アフリベルセプト融合タンパク質ドメイン；

(3) (i) 各IgG4 CH3領域のカルボキシ末端に融合した(図3A～3D)；

(ii) 2つのCH3領域それぞれの中に挿入された(図3E)；(iii) 各CH1領域のカルボキシ末端に融合した(図3F)；(iv) 各アフリベルセプト融合タンパク質ドメインのカルボキシ末端に融合した(図3G)；又は(v) 各CL領域のカルボキシ末端に融合した(図3H)、トレバナニブペプチド(又は他の生物学的ペプチド)。

【0337】

図4A～4Cは、3つの異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、TS-ZPT-7、TS-ZPT-8、TS-ZPT-9をそれぞれ示し、これらは：(1) CH3ドメインのカルボキシ末端に融合した、抗PD-1又は他のチェックポイント抗体Fabドメイン(VH1-CH1、VL1-CL1)；(2) CH2ドメインのアミノ末端に融合したCH2ドメインのアミノ末端のアフリベルセプト融合タンパク質ドメイン；(3) (i) 2つのCH3ドメインそれぞれの中に挿入された(図4A)；(ii) CH2ドメインのア

ミノ末端に融合した（図4B）；又は（i i i）CH Iドメインのカルボキシ末端に融合した（図4C）、トレバナニブペプチド（又は他の生物学的ペプチド）を含む。

【0338】

図5A～5Gは、7個の異なる三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、TS-LPT-1、TS-LPT-2、TS-LPT-3、TS-LPT-4、TS-LPT-5、TS-M3、TS-M4をそれぞれ示し、これらは：（1）（i）CH1及びCL1のアミノ末端にそれぞれ融合した（図5F）；又は（i i）VH1及びVL1のアミノ末端にそれぞれ融合した（図5G）、抗PD-1、又は他のチェックポイント抗体可変ドメイン（VH1、VL1）；（2）（i）VH1及びVL1のアミノ末端にそれぞれ融合し、CH1及びCL1のアミノ末端にそれぞれ融合した（図5F）；（i i）CH1及びCL1のアミノ末端にそれぞれ融合した（図5G）；又は（i i i）CH3ドメインのカルボキシ末端、並びにCH1及びCL1ドメインのアミノ末端にそれぞれ融合した、Lucentis、ベバシズマブ、又は他の抗VEGF抗体可変ドメイン（VH1、VL1）；（3）（i）2つのCH3ドメインそれぞれの中に挿入された（図5A）；（i i）CL1ドメインのカルボキシ末端に融合した（図5B）；（i i i）CH Iドメインのカルボキシ末端のうちの1つ若しくは2つに融合した（図5C～5E）；又は（i v）CH3ドメインのカルボキシ末端に融合した（図5F～5G）、トレバナニブペプチド（又は他の生物学的ペプチド）を含む。

10

【0339】

配列番号200及び201（LC）に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPT-3Sの例示的な配列を示す。配列番号201及び202に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPT-3Lの例示的な配列を示す。配列番号187及び188に示されているアミノ酸配列は、TS-LPT-1の例示的な配列を示す。配列番号201及び203に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPT-2の例示的な配列を示す。配列番号201及び204に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPT-5の例示的な配列を示す。配列番号234及び235に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPT-6の例示的な配列を示す。

20

【0340】

実施例3：抗PD-1抗体2P16を用いて作製された三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの特性決定

30

図3A～3Hに示されている三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの複数のバージョンは、2P16抗PD-1抗体、トレバナニブ-長鎖ペプチド、及びアフリベルセプトのVEGF結合ドメインを利用して作製された。TS-ZPT-1.1（配列番号236～237）、TS-ZPT-1.2（配列番号238～239）、TS-ZPT-1.3（配列番号240～241）、TS-ZPT-2（配列番号242～243）、TS-ZPT-3（配列番号201～202）、TS-ZPT-5（配列番号244及び298）、TS-ZPT-6を構築して、TS-LPT-1（配列番号234～235）、即ち2P16抗体、トレバナニブ、及びLucentisのFab部分を利用した三重特異性抗腫瘍アンタゴニストと比較した。

【0341】

40

図6A及び6Bは、一過性トランスフェクション済みHEK293細胞によって発現された三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの、非還元SDS-PAGE分析を示す。分子の精製の前後にサンプルを評価した。結果は、全ての分子が発現され、かつ精製可能であったこと、並びにTS-ZPT-2（2P16）、TS-ZPT-3（2P16）、TS-ZPT-5（2P16）が、TS-ZPT-6（2P16）、及びTS-LPT-1（2P16）よりも良好に発現されたことを示す。

【0342】

遮断アッセイを実施して、選択された三重特異性分子のIC50を計算した。簡潔に述べると、抗ヒトPD-1 mAbの2又は3倍段階希釈物を調製した。ヒトPD-1トランスフェクト済みCHO-K1細胞を、FACS緩衝液（PBS中の0.5%BSA 2

50

mM EDTA)で洗浄し、 10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した。FITC標識ヒトPD-L1-Fcタンパク質を、ヒトPD-1トランスフェクト済みCHO-K1細胞に、最終濃度 $7\mu\text{g/ml}$ で加え、よく混合した。インキュベーションせずに、 $20\mu\text{l}$ のFACS緩衝液中の2,000個のこれらのCHO-K1細胞(PD-L1タンパク質を含む)を、96ウェル丸底プレートに即座に加え、 $20\mu\text{l}$ の、又は2若しくは3倍に段階希釈した、三重特異性分子を、上記細胞に即座に加えて、 4°C で30分間インキュベーションした。続いて細胞を洗浄し、 $30\mu\text{l}$ の7AAD溶液中で再懸濁し；続いて $35\mu\text{l}$ の10%中性緩衝ホルマリン溶液を加えて15分間インキュベーションした後、iQue intelligent systemを用いて分析した。

【0343】

図7A～Bは、例示的な三重特異性抗腫瘍アンタゴニストであるTS-ZPT-1.1(2P16)、TS-ZPT-1.2(2P16)、TS-ZPT-1.3(2P16)、TS-ZPT-2(2P16)、TS-ZPT-3(2P16)、TS-ZPT-5(2P16)、TS-ZPT-6(2P16)と、抗PD-1 mAb及び陽性対照又はベンチマーク(「BM」)抗体(ニボルマブ)との、IC50を示す。IC50は、この相互作用を遮断する点で、ベンチマーク抗体と同等であった。

【0344】

三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-2(2P16)、TS-ZPT-3(2P16)、TS-ZPT-5(2P16)、TS-ZPT-6(2P16)の、VEGFとその受容体であるVEGFR2との間の相互作用を遮断する能力を、判定した。簡潔に述べると、96ウェルアッセイプレートを、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(pH9.6)中の $0.5\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトVEGF 165(R&D)で、 4°C で一晩にわたってコーティングした後、1%BSA/PBSを用いて室温で1時間ブロッキングした。続いて、段階希釈された抗体をプレートに加え、室温で30分間インキュベーションした。組換えヒトVEGFR-2を加え、室温で1時間インキュベーションした。プレートを洗浄緩衝液(PBS中の0.1%Tween-20)で洗浄した後、抗VEGFR-2抗体と共に室温で1時間インキュベーションした。その後、洗浄緩衝液で洗浄し、ヤギ抗マウスIgG-HRPをプレートに加え、室温で1時間にわたってインキュベーションした。TMBをプレートに加えた後で650nmでの吸光度を測定することにより、VEGFR-2結合の量を検出した。IC50値を、活性曲線の中点として決定した。

【0345】

図8A及び8Bは、三重特異性アンタゴニストTS-ZPT-1.2(2P16)、TS-ZPT-2(2P16)、TS-ZPT-5(2P16)、TS-ZPT-6(2P16)、及びTS-LPT-1(2P16)用いたVEGF-VEGFR2遮断アッセイから計算した、IC50値を示し、これらをアフリベルセプトペプチド及びベバシズマブ抗体に対応する陽性対照と比較した。これらの分析の結果は、三重特異性アンタゴニストが、対応する対照と同等又はそれ以下の(即ちより良好な)IC50値を示したことを示した。

【0346】

三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-1.2(2P16)、TS-ZPT-2(2P16)、TS-ZPT-5(2P16)、TS-ZPT-6(2P16)、及びTS-LPT-1の、Ang-2とその受容体であるTie2との間の相互作用を遮断する能力を、判定した。簡潔に述べると、96ウェルアッセイプレートを、PBS中の $1\mu\text{g/ml}$ の組換えヒトAng2(R&D)で、 37°C で1時間にわたってコーティングした後、1%BSA/PBSを用いて室温で1時間遮断した。続いて、段階希釈された抗体及び組換えヒトTie2混合物をプレートに加え、室温で2時間インキュベーションした。プレートを洗浄緩衝液(PBS中の0.1%Tween-20)で洗浄した後、抗Tie2抗体と共に室温で1時間インキュベーションした。洗浄緩衝液で洗浄した後、ヤギ抗マウスIgG-HRPをプレートに加え、室温で1時間にわたってインキュベーションした。TMBをプレートに加えた後で650nmでの吸光度を測定することにより、Tie

2 結合を検出した。I C 5 0 値を、活性曲線の中点として決定した。

【0347】

図9は、三重特異性アンタゴニストTS-ZPT-1、2(2P16)、TS-ZPT-2(2P16)、TS-ZPT-5(2P16)、TS-ZPT-6(2P16)、及びTS-LPT-1(2P16)を用いたTie2-Ang2遮断アッセイ試験から計算した、I C 5 0 値を示し、これらをアンタゴニストであるベバシズマブトレバナニブに対応する陽性対照と比較した。この分析の結果は、三重特異性アンタゴニストが、対応する対照と同等又はそれ以下の(即ちより良好な)I C 5 0 値を示したことを示した。

【0348】

実施例4：抗PD-1抗体2P17を用いて構築した、TS-ZPT-2、TS-ZPT-3L、及びTS-ZPT-5分子の特性決定

TS-ZPT-2、TS-ZPT-3L、及びTS-ZPT-5三重特異性抗腫瘍アンタゴニストを、抗PD-1抗体2P17を用いて作製し(それぞれ配列番号203及び201、233及び201、204及び201)、タンパク質Aクロマトグラフィーで精製した後で、サイズ排除クロマトグラフィーによって、均質性及び安定性に関して特性決定した。SECクロマトグラフィーは、Tosoh TSKgel UP-G3000SWXLカラムを用いて実施した。移動相系は100mMのリン酸ナトリウム、400mMの塩酸ナトリウム、6%のイソプロピルアルコール、pH6.8、0.2mL/分であった。検出は、相対面積積分のために214nmで実施した。

【0349】

図10は、TS-ZPT-2(2P17)、TS-ZPT-3L(2P17)、及びTS-ZPT-5(2P17)、並びにHEK293一過性トランスフェクション済み細胞によって産生された親2P17抗体の、サイズ排除クロマトグラフィー分析の結果を示す。二量体化分子(Dimer)と比較した高分子量(HWM)種及び低分子量(LMW)種のパーセンテージは、これら3つの三重特異性アンタゴニストのうちTS-ZPT-3L(2P17)が、最低パーセンテージのLMW種及び最高パーセンテージの二量体を有していたことを示す。

【0350】

図11は、3つの三重特異性アンタゴニスト：TS-ZPT-2(2P17)、TS-ZPT-3L(2P17)(2つのプールから精製)、及び安定したCHO細胞プールから産生されたTS-ZPT-5(2P17)の、二量体と比較したHWM及びLMW種の相対量を示す。結果は、これら3つの三重特異性アンタゴニストのうちTS-ZPT-3L(2P17)が、最低パーセンテージのLMW種及び最高パーセンテージの二量体を有していたことを示す。

【0351】

従って、一過性細胞株及び安定した細胞株の両方において、TS-ZPT-3L(2P17)は最低量のクリッピングを示し、これは、CH3領域へのトレバナニブペプチドの挿入が、アフリベルセプト融合タンパク質を保護し、クリッピングを低減することを示している。

【0352】

図12A及び12Bは、TS-ZPT-3L(2P17)のDimer、HWM、及びLMW種が、4℃で少なくとも112日間の良好な安定性を示すことを示している。

【0353】

実施例5：TS-ZPT-3S及びTS-ZPT-3L三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの発現及び精製

TS-ZPT-3の複数のバージョンを、全長トレバナニブペプチドTS-ZPT-3Lと、TS-ZPT-3Sの単一コピー(即ちトレバナニブ-短鎖)ペプチドとの両方を伴う、抗PD-1抗体2P16及び2P17を用いて作製した。これら4つの分子を、ベバシズマブのVH及びVLを利用した三重特異性分子であるTS-M3及びTS-M4(図5F及び5Gに図示)、並びに可変ドメイン配列が図1に配列番号247~254の配

10

20

30

40

50

列で示されている抗PD-1抗体ニボルマブを利用した三重特異性分子である2P16及び2P17（その可変ドメイン配列は図1に配列番号247～254の配列で示されている）と比較した。

【0354】

図13Aは、トレバナニブペプチドを含む例示的な三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、即ちTS-ZPT-3L（2P17）の、重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を示す。図13Bは、これらの配列に由来する例示的な分子を示す。

【0355】

図14Aは、トレバナニブ短鎖ペプチドを含む例示的な三重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、即ちTS-ZPT-3S（2P17）の、重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を示す。図14Bは、これらの配列に由来する例示的な分子を示す。

【0356】

図15は、一過性トランスフェクション済みHEK293細胞による産生後の三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-3S（2P17）、TS-ZPT-3L（2P17）、TS-M3（2P17）、TS-M4（2P17）、TS-M3（2P16）、及びTS-M3（ニボルマブ）の、クマシー染色非還元SDS-PAGE分析を示す。結果は、アフリベルセプト融合タンパク質ドメインを含有する三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-ZPT-3S（2P17）、TS-ZPT-3L（2P17）が、抗VEGF可変ドメインを含有する三重特異性抗腫瘍アンタゴニストTS-M3（ニボルマブ）、TS-M4（ニボルマブ）、TS-M3（2P17）及びTS-M3（2P16）よりも高い発現レベルを示したことを示す。

【0357】

図16は、タンパク質Aクロマトグラフィーによる精製後の、TS-ZPT-3L（2P17）、TS-ZPL-3S（2P17）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P16）のサイズ排除クロマトグラフィー分析からの結果を示す。二量体分子（Dimer）と比較した、高分子量（HWM）種及び低分子量（LMW）種のパーセンテージは、2P17抗体を含む分子が、好ましい二量体種を比較的高いレベルで有することを示している。

【0358】

図17は、4℃で48日間保管されたTS-ZPT-3S（2P17）及びTS-ZPT-3L（2P17）のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示し、これは、これら両方の分子が保管時に安定していることを示す。

【0359】

実施例6：三重特異性アンタゴニストTS-ZPT-3の機能的特性決定

実施例5のPD-1-PDL1細胞ベースの遮断アッセイを用いて、三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの4つのバリエーションであるTS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、PD-1とそのリガンドであるPD-L1との間の相互作用を遮断する能力を評価した。その結果を用いて、対応するIC50を、2P17及びベンチマーク抗体（ニボルマブ）と共に計算した。図18A～18Bは、IC50が、この相互作用の遮断において、ベンチマーク抗体と同等であったことを示す。

【0360】

VEGF-VEGFR-2 バイオアッセイを用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、VEGFとその受容体であるVEGFR-2との間の相互作用を遮断する能力を評価し、対応するIC50を、ベンチマーク抗体（ベバシズマブ）と共に計算した。簡潔に述べると、VEGFR2/NFATレポータ-HEK293組換え細胞株（BPS Bioscience Catalog #：79387）を、30k細胞/ウェルの密度で、白色で底が透明の96ウェルマイクロプレートに播種した。24時間後、指示されている分子の段階希釈物及びヒトVEGF165をウェルに加えた。4時

間のインキュベーションの後、100 μ lのONE-Step（商標）ルシフェラーゼ試薬を加え、室温で15分間振盪し、プレートの発光シグナルを読み取った。図19A～19Bは、IC50が、この相互作用の遮断において、ベンチマーク抗体と同等であったことを示す。

【0361】

実施例5のAng2-Tie2遮断アッセイを用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、Tie2とそのリガンドであるAng-2との間の相互作用を遮断する能力を評価し、対応するIC50を、ベンチマーク抗体（トレバナニブ）と共に計算した。図20A～20Bは、2つのAng-2遮断ペプチドを含むTS-ZPT-3L（2P16）及びTS-ZPT-3L（2P17）のIC50がベンチマークと同等であったものの、1つのAng-2遮断ペプチドしか含まないTS-ZPT-3S（2P16）及びTS-ZPT-3S（2P17）のIC50がベンチマークより高いことを示す。

10

【0362】

実施例9のバイオレイヤー干渉法アッセイを用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、PD-1タンパク質に対する結合親和性を評価した。図21A～21Fは、結合及び結果として生じる結合親和性定数を示す。結果は、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）が、ベンチマーク（ニボルマブ）より高い親和性を示したことを示す。

20

【0363】

同様のバイオレイヤー干渉法アッセイを用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、VEGF165に対する結合親和性を評価した。図22A～22Fは、結合及び結果として生じる結合親和性定数を示す。結果は、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）が、ベンチマーク（ベバシズマブ）より高い親和性を示したことを示す。

30

【0364】

同様のバイオレイヤー干渉法アッセイを用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、Ang-2に対する結合親和性を評価した。図23A～23Fは、結合及び結果として生じる結合親和性定数を示す。結果は、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）が、ベンチマーク（トレバナニブ）と同等の親和性を示したことを示す。

【0365】

図24は、概ね上述の実施例11で説明したように、Octet RED96 System（ForteBio）を用いて、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-ZPT-3S（2P17）、及びTS-ZPT-3L（2P17）の、その3つの結合パートナーそれぞれに対する順次結合を特性決定するための、バイオレイヤー干渉法の使用を示す。簡潔に述べると、20nMのTS-ZPT-3三重特異性抗体を、抗ヒトIgG捕捉バイオセンサに装入した。上記3つの抗原の、上記4つのTS-ZPT-3分子に対する順次結合を監視するために、バイオセンサを、飽和濃度の各抗原（240nMのHisタグ付きヒトPD-I、120nMのヒトVEGF165、40nMのHisタグ付きヒトアンジオポエチン-2）を内包したウェル内に5分間配置した後、1分間解離させた。3つの異なる順次結合の組み合わせを観察した。これらの結果は、TS-ZPT-3S（2P16）、TS-ZPT-3L（2P16）、TS-Z

40

50

P T - 3 S (2 P 1 7)、及び T S - Z P T - 3 L (2 P 1 7) が、V E G F、A n g - 2、及び P D - 1 に同時に結合できることを示す。

【0366】

T S - Z P T - 3 L (2 P 1 7) の生体内薬物動態特性を評価するために、薬物動態プロファイルを生成した。簡潔に述べると、10mg/kg のアンタゴニストを、4頭の6～10週齢のメスのC D 1マウスの尾部静脈に静脈内注射した (n = マウス2頭/分子)。注射の3分後、3時間後、1日後、3日後、7日後、及び10日後に血清を回収した。血清中の抗体を検出するために、96ウェルE L I S Aプレートを、5µg/ml のヤギ抗ヒトI g G F (a b ') 2断片でコーティングした後、P B S中で5%のミルクでブロッキングした。5%のミルク中の、段階希釈されたマウス血清、並びに標準として段階希釈及び精製されたタンパク質分子を、プレートに加えた。ペルオキシダーゼコンジュゲートマウス抗ヒトI g Gとのインキュベーション、及び更なる洗浄に続いて、T M B - E L I S A基質とのインキュベーションの後にT S - Z P 1 7 T - 3を検出した。この分析の結果は、T S - Z P 1 7 T - 3の半減期 (T 1 / 2) が約2日であることを示した (図25)。

10

【0367】

従って、トレバナニブ又はその多様体の挿入により、安定した強力な三重特異性治療用分子を生成できる。

【0368】

図26A～26Bは、2つのチェックポイント抗体と、C H 3ドメインに挿入されたトレバナニブペプチドとを利用した、2つの更なる三重特異性分子を示す。これらの分子は：(1) 第1のチェックポイント抗体、例えば抗P D - 1又は抗P D - L 1からのV H及びV Lと；(2) C H 3に挿入されたトレバナニブと；(3) 第2のチェックポイント阻害剤、例えば抗T I G I T又は抗L A G 3からの3 - 6 x G 4 Sリンカーを含むV H及びV Lとを含む、図1に示されている配列を含む。

20

【0369】

図27は：(1) ベバシズマブ、又は別の抗V E G F抗体をコードする、V H及びV Lドメインと；(2) C H 3ドメインに挿入されたトレバナニブペプチドと；(3) C H 3ドメインのカルボキシ末端に融合したT G F B R - I I E C Dとを含む、更なる三重特異性分子T S - A 1 B T - 1 (配列番号229～230)を示す。この分子は、一過性トランスフェクション済みH E K 2 9 3細胞によって産生される。図28では、H E K 2 9 3細胞からの未精製の上清の非還元S D S - P A G E分析は、上記分子が良好に発現することを示している。図29は、タンパク質Aクロマトグラフィで精製されたT S - A 1 B T - 1の、サイズ排除クロマトグラフィ分析を示す。

30

【0370】

実施例7：T G F - β R I I細胞外ドメイン (T G F - β - R I I E C D) を含む三重特異性抗腫瘍アンタゴニストの設計

図30A～30Fは、6つの三重特異性抗腫瘍アンタゴニストT S - Z P B - 1、T S - Z P B - 2、T S - Z P B - 3、T S - Z P B - 4、T S - Z P B - 5、及びT S - Z P B - 6それぞれを示す。これらのアンタゴニストは：(1) 抗P D - 1、又は別のチェックポイント抗体可変ドメイン (V H 1、V L 1) (図30A～30F)；(2) (i) 各重鎖V H 1領域のアミノ末端に融合した (図30A、30D、30F)、又は(ii) 各重鎖C H 3領域のカルボキシ末端に融合した (図30B、30C、30E)、アフリベルセプト融合タンパク質ドメイン；及び(3) (i) 各重鎖C H 3領域のカルボキシ末端に融合した (図30A)、(ii) 各重鎖V H 1領域のアミノ末端に融合した (図30B)、(iii) 各重鎖C H 3領域のF cループに挿入された (図30C、30F)、(iv) アフリベルセプト融合タンパク質ドメインの上流で、各重鎖のアミノ末端に融合した (図30D)、又は(v) アフリベルセプト融合タンパク質ドメインの下流で、各重鎖のカルボキシ末端に融合した (図30E)、T G F - β R I I細胞外ドメイン (E C D) を含む。

40

50

【0371】

配列番号187及び188に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPLB-1の例示的な配列を示す。配列番号270及び271に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPB-1に関する例示的な配列を示す。配列番号272及び273に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPB-2に関する例示的な配列を示す。配列番号188及び189に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPLB-3に関する例示的な配列を示す。配列番号190及び191に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPB-3に関する例示的な配列を示す。配列番号192及び193に示されているアミノ酸配列は、TS-ZPB-5に関する例示的な配列を示す。

【0372】

実施例8：TS-ZPB及びTS-ZPLB分子の一過性発現

TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB分子を、ヒト胎児腎臓HEK293細胞中で一過性発現させ、これらを7日間培養した。Applied BiosystemsのPOROS A 20 μ mカラム、2.1 $\times$ 30mm、0.1mLを用いて、力価を定量した。波長280nmにおいて、精製済みの組換えTIGIT mAbを用いて、標準曲線を生成した。サンプルを、30 μ Lの上清でHPLCに丁寧に注入した。移動相AはpH7.3のPBSであり、移動相BはpH2.2のPBSであった。開始から0.2分を100%Aとし、続いて0.22~1.22分を100%Bとし、1.23~2.30分を100%Aに戻し、2.32~3.32分を100%Bとし、3.4~4.00分を100%Aとして終了する、多段階の勾配を構成した。使用した流量は1mL/分であり、1回の実行につき合計4分とした。

【0373】

図31Aに示すように、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLBのSDS-PAGE分析を、一過性トランスフェクション済みHEK293細胞によって実施した。この分析の結果、全ての分子が良好に発現していた(図31B)。

【0374】

図32Aは、214nmで検出を行うTosoh TSKgel UP-G3000S WXLカラムを用いたTS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLBの例示的なサイズ排除クロマトグラフ(SEC)プロファイルを示す。結果は、TS-ZPLB-1及びTS-ZPB-5(2P17)が他のTS-ZPB分子に比べて最も多くの二量体を保持していることを示している。

【0375】

実施例9：対照と比較したTS-ZPB三重特異性アンタゴニストの機能的特性決定

図33Aは、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、及びTS-ZPB-5(2P17)の、PD-1とPD-L1との間の相互作用を遮断する能力を測定する、細胞ベースアッセイの結果を示す。この実験では、TS-ZPB分子の3倍段階希釈物(図示されている通り；最高Ab濃度：300nM；各mAbについて3回)を調製し；ヒトPD-1トランスフェクト済みCHO K1細胞をFACS緩衝液(PBS中の0.5%BSA 2mM EDTA)で洗浄し、10⁶細胞/mLの濃度に再懸濁し；FITC標識ヒトPD-L1-Fcタンパク質を、7 μ g/mLの最終濃度でヒトPD-1トランスフェクト済みCHO K1細胞に加え；十分に混合し；インキュベーションを行うことなく、20 $\times$ 10³個の(PD-L1タンパク質を含む)トランスフェクト済みCHO K1細胞を、96ウェル丸底プレート中の20 μ LのFACS緩衝液に即座に加え；続いて20 μ LのTS-ZPB分子の3倍段階希釈物を上記細胞に即座に加えて、4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションし；次に細胞を洗浄し、30 μ Lの7AAD溶液中で再懸濁し、35 μ Lの10%中性緩衝ホルマリン溶液を加えた。15分間インキュベーションした後、iQue integrity システムを用

いて分析した。図33Bは、この分析から得られたIC50値(nM)が、全ての分子がPD-1とPD-L1との相互作用を阻害できることを示していることを示している。

【0376】

図34Aは、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLB、並びにベンチマークであるTGFβ1RII-Fcの、TGFβ1シグナル伝達を遮断する能力を測定するための、TGFβ/SMA Dシグナル伝達経路SBEレポータ-HEK293細胞株(BPS Bioscience, Inc. (カリフォルニア州サンディエゴ)、Catalog#: 60653)を用いた細胞ベースアッセイの結果を示す。簡潔に述べると、SBEレポータ-HEK293細胞を、~35,000細胞/ウェルの密度で、白色で底が透明の96ウェルマイクロプレート内の、100μlの成長培地中に播種した。播種の24時間後、細胞を、90μlのアッセイ培地中のTS-ZPB分子の5倍段階希釈物で処理した。次に、10μlの希釈ヒトTGFβ1を、刺激したウェルに加え(最終TGFβ1濃度=10ng/ml);10μlのアッセイ培地を未刺激の対照ウェルに加え(基礎活性を決定するため)、その一方で、100μlのアッセイ培地を、細胞を含まない対照ウェルに加えた(バックグラウンドの発光を決定するため)。続いてこれらのプレートを、CO₂インキュベータ内で37℃で一晩(~18時間)インキュベーションした。一晩のインキュベーションの後、ONE-Step(商標)ルシフェラーゼアッセイシステム(BPS Bioscience, Inc.)を用いて、提供されているプロトコルに従ってルシフェラーゼアッセイを実施した(即ち100μlのONE-Step(商標)ルシフェラーゼ試薬を加え、室温で~15~30分間振盪した後で発光シグナルを読み取った)。図34Bは、この分析から得られたIC50値(nM)を示し、これは、上記分子がTGFβ-1の生体活性を遮断できることを示している。

【0377】

図35Aは、TS-ZPB-1(2P17)、TS-ZPB-2(2P17)、TS-ZPB-3(2P17)、TS-ZPB-5(2P17)、及びTS-ZPLBの、VEGFとVEGFR-2との間の相互作用を遮断する能力を、ベンチマーク抗体ベバシズマブと比較して測定する、ELISAアッセイの結果を示す。簡潔に述べると、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中の0.5μg/mlの組換えヒトVEGF-165(R&D #293-VE-050/CF)で、96ウェルアッセイ中のウェルをコーティングし、4℃で一晩にわたってインキュベーションした。その後これらのウェルを、PBS中の0.05%Tween20(洗浄緩衝液)で3回洗浄し、PBS中の1%BSAを用いて室温で1時間ブロッキングし、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、50μlの5倍段階希釈抗体をプレートのウェルに加え、室温で30分間インキュベーションした。続いて50μlの0.6μg/ml組換えヒトVEGFR-2-hu IgG1-Hisタグ(R&D #357-KD-050)をウェル内の抗体に加え、室温で1時間インキュベーションした後、洗浄緩衝液で3回洗浄した。その後、100μlの抗HisタグHRP(1:10,000)を加え、これらのプレートを室温で40分間インキュベーションし、洗浄緩衝液で3回洗浄した。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(3,3',5,5'-TMED)をプレートの各ウェルに加えた後、650nmでの吸光度を測定することによって、VEGFR-2結合(His-タグ)を検出した。図35Bは、この分析から得られたIC50値(nM)を示し、これは、全ての分子がVEGFとVEGFR-2との結合を阻害できることを示している。

【0378】

実施例10: a-グリコシル化VEGFR(アフリベルセプト)を含むTS-ZPT-5多様体の機能的特性決定

TS-ZPB-5の薬物動態を改善するために、TS-ZPB-5の2つの多様体を製造した。TS-ZPB-5Aの重鎖(配列番号205)を、CH3ドメインのカルボキシ末端のリシンのコドンにおいて変異させて、血中に存在するプロテアーゼによる潜在的なタンパク質分解活性を低減した。TS-ZPB-5Bの重鎖(配列番号206)は更に、ASGRI及びASGRIIによるクリアランスを低減するために、アフリベルセプトの

【 0 3 7 9 】

【 0 3 8 0 】

【 0 3 8 1 】

10

【 0 3 8 2 】

20

【 0 3 8 3 】

【 0 3 8 4 】

図 4 1 A ~ 4 1 C は、二重特異性分子 T S - Z P L - 1（又は T S - Z P - 1）、T S - Z P L - 2（又は T S - Z P - 2）、及び T S - Z P L - 3（又は T S - Z P - 3）を示し、これらは：（1）P D - 1、P D - L 1、又は他のチェックポイント抗体可変ドメイン（V H 及び V L）；（2）アフリベルセプトであって、（i）V H ドメインのアミノ末端（図 4 0 A 及び 4 0 B）；（i i）C H 3 ドメインのカルボキシ末端（図 4 0 C）に融合した、アフリベルセプトを含む。これらの分子の例示的な配列は、配列番号 2 1 8 ~ 2 2 5 である。

【 0 3 8 5 】

30

40

【 0 3 8 6 】

50

【 0 3 8 7 】

【 0 3 8 8 】

10

【 0 3 8 9 】

以上の説明は、当業者に本発明の実施方法を教示することを目的としており、この説明を読めば当業者には明らかになるであろう本発明の明白な修正形態及び変形形態の全てを詳述することを意図したものではない。しかしながら、全てのこのような明白な修正形態及び変形形態は、以下の請求項によって定義される本発明の範囲内に含まれることが意図されている。請求項は、文脈によってそうでないことが明確に示されていない限り、請求対象である構成要素及びステップを、意図されている目的を達成するために有効ないずれの順序で、包含することを意図している。

【図 1】

Exemplary Functional Checkpoint Sequences

VH/VL or Fusion Protein Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains
Anti-PD-L1 HCVR [P1-08]	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKSCASGYFTTYYWMMHWVRQAPGGQLEWMGMHPNSGNGNNYNEKFKSRVTIMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYCCARVWGSSPYFDWGQGLTLVTSS (SEQ ID NO: 153)
Anti-PD-L1 LCVR [P1-08]	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIDNLYWYQQKPGKAPKLIIKYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLIQPEDFAITFCQQQGYLPWTFGGGTKEVIK (SEQ ID NO: 154)
Anti-PD-1 HCVR (nivolumab)	QVQLVQSGAEVQVQPSRLRLDCKASGDTFSNMGHWQAPGKLEWVAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNSKNTLTQLMSLRAEDTAVYCATNDYWGQGLTLVTSS (SEQ ID: 245)
Anti-PD-2 LCVR (nivolumab)	EIVLTQSPDLTSLPERATISCRASQSSVYSLAWQPGQKGPAPRLIIVDASNRTATGIPARFSGSGSGTDFITLTLSLEPEDFAIVCYQCSNWRPTFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 246)
Anti-PD-1 HCVR (Z1P17 or PD-06)	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKSCASGYFTTYYWMMHWVRQAPGGQLEWMGVIPFGSGNSKYNEFKGRVLTADTISTSTVYMELSLRSEDATVYCASTCYDGYDWWGGTIVTSS (SEQ ID NO: 137)
Anti-PD-1 LCVR (Z1P17 or PD-06)	DIQMTQSPSLFASVGDRVTTTCASQNVGTMNAVAYQQKPGKAPKALIVASVRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLIQPEDFAITFCQQQSYPTFGQGTLEIK (SEQ ID NO: 138)
Anti-PD-1 HCVR (Z1P16 or PD-05)	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKSCASGYFTTYYIYWMRQAPGGQLEWMGMGINPGDITNFNEFKIRVITMTRDTSISTAYMELSLRSEDATVYCCARYHWGGLVDWGQGLTLVTSS (SEQ ID NO: 135)
Anti-PD1 LCVR (Z1P16 or PD-05)	DIVLTQSPASLVSPGQRATITCRASKSVTSYGTSYHWYQKPGQPKLLIYASNLSEGVPARFSGSGSDGDTFLTINPYAEADATANYVCQHTWELNPTFGGTVKEIK (SEQ ID NO: 136)
Anti-TIGIT HCVR (B21-35 or T-10)	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKSCASGYFTTYYWMMHWVRQAPGGQLEWMGINPSGRTSYAQMFKGRVITMTRDTSISTVYMELSLRSEDATVYCCAREEQPVPGGDFYWGQGLTLVTSS (SEQ ID NO: 125)
Anti-TIGIT LCVR (B21-35 or T-10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTISCRASQISIRRYLNWYQQKPGKAPKLIIYSASMLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLIQPEDFAITFCQQSYIPTFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 126)
Anti-Lag-3 HCVR (Z12A.1)	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKSCASGYTLTDYYNWNWVRQAPGGQLEWMGVINPYMGDTSYNEKFKGRVITMTRDTSISTVYMELSLRSEDATVYCYVRDGYVHYFDWGQGLTLVTSS (SEQ ID NO: 171)
Anti-Lag-3 LCVR (Z12A.1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTISCRASQDISRLTYLQPEPEKAPKRLVATSSLDGVPKRFSGSGSGTDFITLTIISIQPEDFAITFCQQSYPTFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 175)

【图 2】

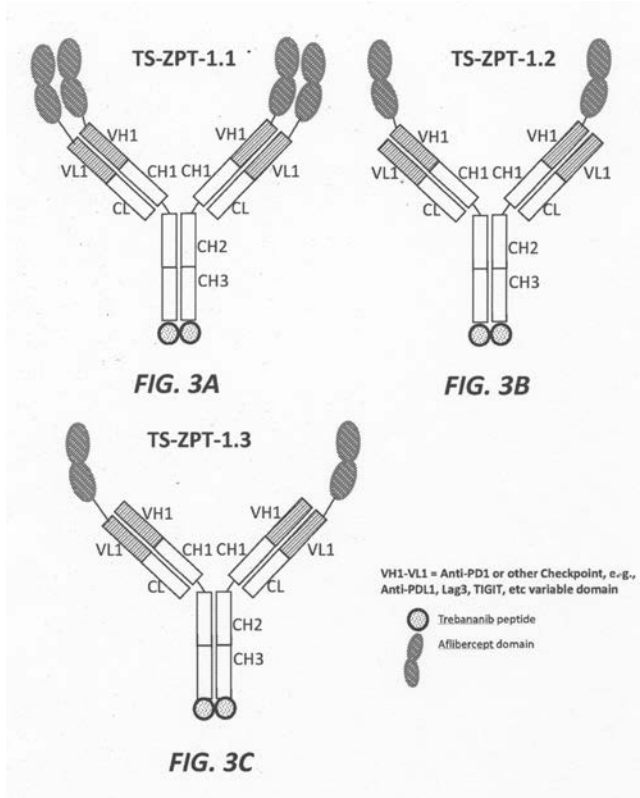
Functional Domain Sequences

VH/VL or Fusion Protein Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains
Trebananib long peptide	AQCEEECEWDPWTCEHHMGSQGSATGGSGTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHH (SEQ ID NO: 182)
Trebananib-short peptide	QEECEWDPWTCEHH (SEQ ID NO: 194)
Bevacizumab (Avastin) HCVR (wt)	EVQLVESGGGLVQPQGGSLSCAASGYFTFYNGMNMVVRQAPGKGLGEVWGWINTYWGPTYYAADRKRRTFLDSKSTAYLQMNSLRADETAVYCAKPYHHSGSHWYFDWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 233)
Bevacizumab (Avastin) HCVR (mt)	EVQLVQSGGGGVQPQGGSLSCAASGYFTFYNGMNMVVRQAPGKGLGEVWGWINTYWGPTYYAADRKRRTFLDSKSTAYLQMNSLRADETAVYCAKPYHHSGSHWYFDWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 235)
Bevacizumab (Avastin) LCVR	DIQMTPSPSSLASVGRDRTVITCSAQSDISNLYNWYQQKPGKAPKVLVYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDTFTLTLSLPDEDFATYCYQQYSTVPTWFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 234)
Ranibizumab (Lucentis) HCVR	EVQLVESGGGLVQPQGGSLSCAASGYFTFYNGMNMVVRQAPGKGLGEVWGWINTYWGPTYYAADRKRRTFLDSKSTAYLQMNSLRADETAVYCAKPYHHSGSHWYFDWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 305)
Ranibizumab (Lucentis) LCVR	DIQLTQSPSSLASVGRDRTVITCSAQSDISNLYNWYQQKPGKAPKVLVYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDTFTLTLSLPDEDFATYCYQQYSTVPTWFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 306)
Aflibercept VEGF binding domain	GRLEIVCPRTSVSTLQKFLPTLDIPDKRGLWDSRKGFISSNATYKEIGLLTCEATVNGHLYNTKINLRHQTGNTIDVLPSSHGIELVSGKVLNLNCTARTLELVGIDFNWEYSPSGHKKHLVNDKLTQSGSEMKKFLSTIDTGVRDSQGLYCAASSGLMKNKSTFVRVHEK (SEQ ID NO: 185)
TGF- β R1-ECD	PPHVKQSVNMDNDVNDNGAKVFKPQCFCKCDVRFTSCDNQKSCMNCSTSCPKPQEVCAVWVKNDENITLETCHVDKPHLFHDLDAASPCKIMEKKKPGTEFFMCSGSDCEDNDNIIFSEYNTSNF (SEQ ID NO: 186)

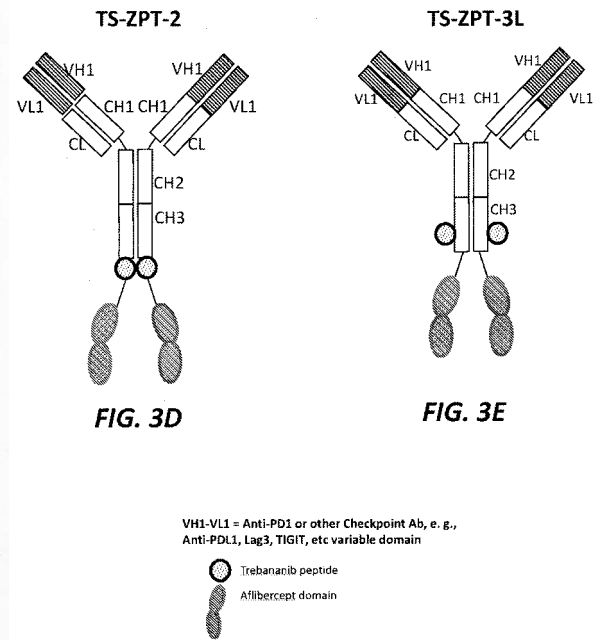
FIG. 2

FIG. 1

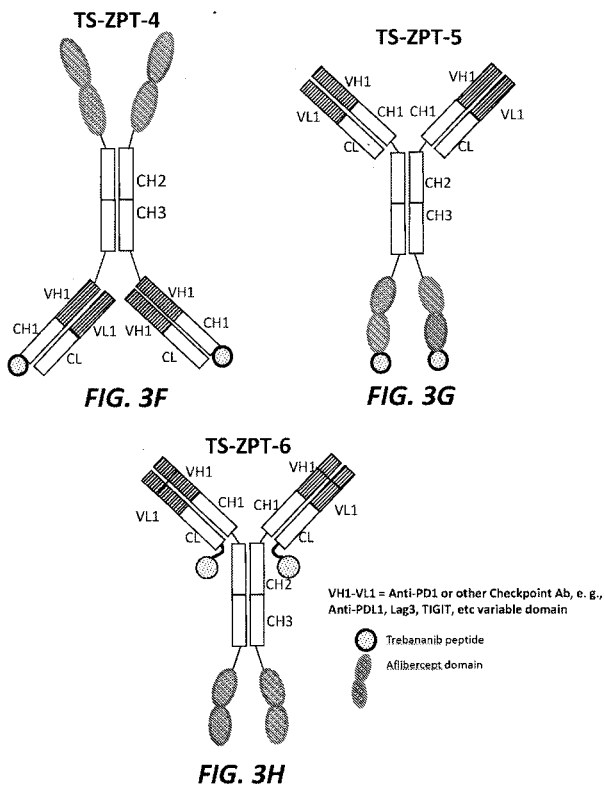
【図 3 A - 3 C】



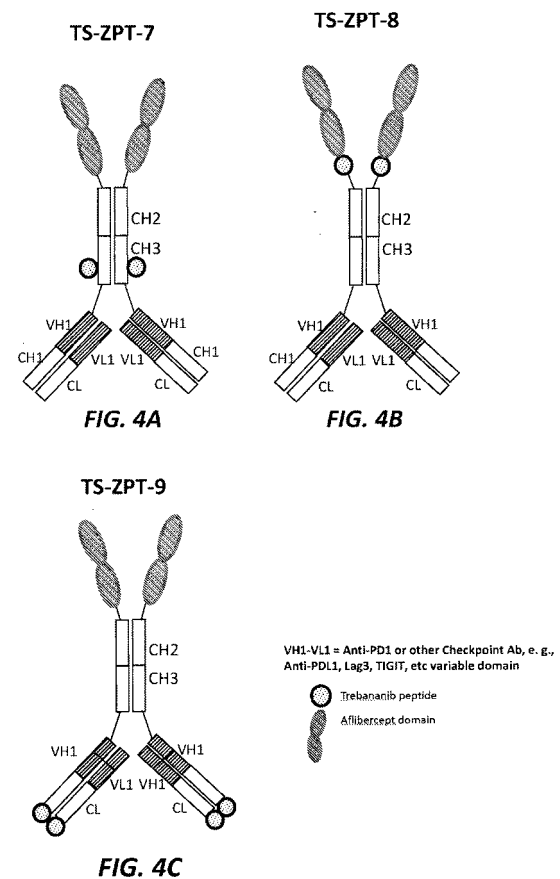
【図 3 D - 3 E】



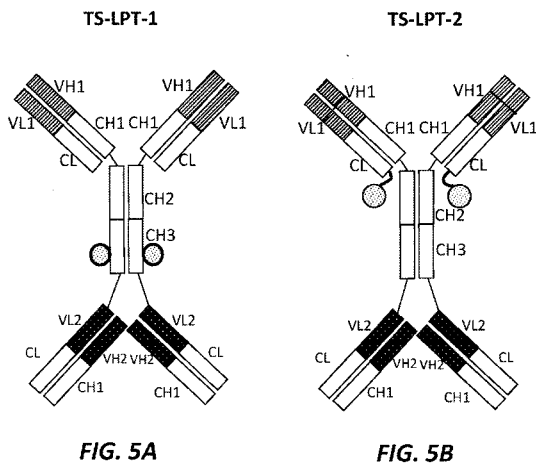
【図 3 F - 3 H】



【図 4 A - 4 C】

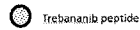


【図 5 A - 5 B】

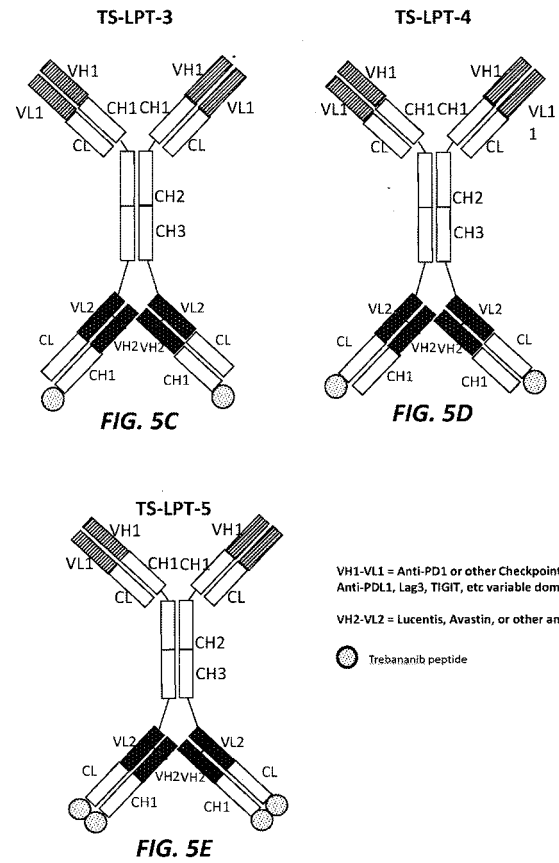


VH1-VL1 = Anti-PD1 or other Checkpoint Ab, e. g.,
Anti-PDL1, Lag3, TIGIT, etc variable domain

VH2-VL2 = Lucentis, Avastin, or other anti-VEGF

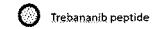


【図 5 C - 5 E】

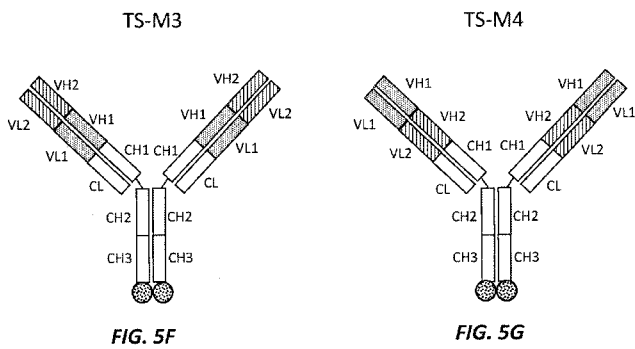


VH1-VL1 = Anti-PD1 or other Checkpoint Ab, e. g.,
Anti-PDL1, Lag3, TIGIT, etc variable domain

VH2-VL2 = Lucentis, Avastin, or other anti-VEGF

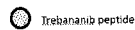


【図 5 F - 5 G】

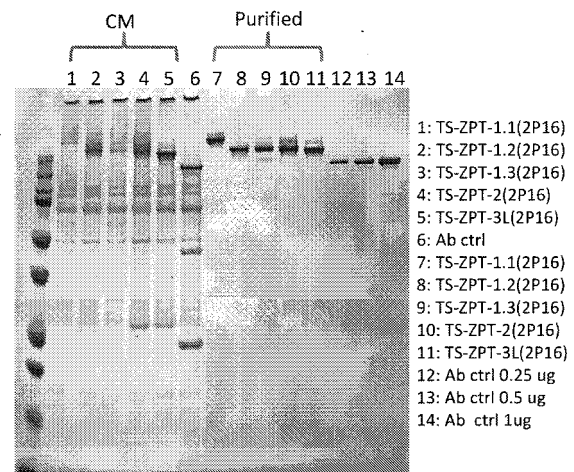


VH1-VL1 = Anti-PD1 or other Checkpoint Ab, e. g.,
Anti-PDL1, Lag3, TIGIT, etc variable domain

VH2-VL2 = Lucentis, Avastin, or other anti-VEGF



【図 6 A】

**FIG. 6A**

【図 6 B】

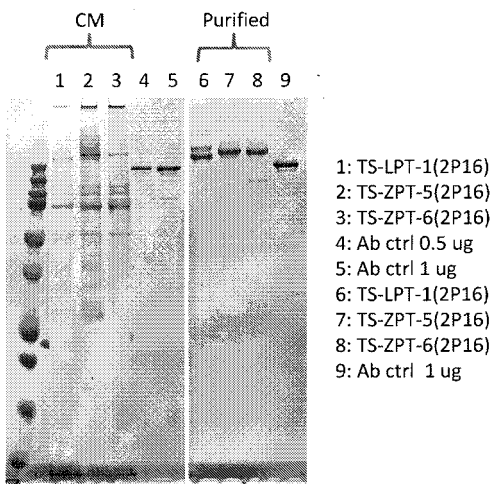


FIG. 6B

【図 7 A – 7 B】

Trispecific Antitumor Antagonists Block Interaction of PD-1 and PD-L1

Antagonist	IC50 (nM)
Benchmark	2.89
TS-ZPT-1.1(2P16)	139.70
TS-ZPT-1.2(2P16)	14.77
TS-ZPT-1.3(2P16)	32.97
TS-ZPT-2(2P16)	4.62
TS-ZPT-3(2P16)	3.55
anti-PD-1 mAb	2.48

FIG. 7A

Antagonist	IC50 (nM)
Benchmark	0.64
TS-ZPT-5(2P16)	1.30
TS-ZPT-6(2P16)	1.16

FIG. 7B

【図 8 A – 8 B】

Trispecific Antitumor Antagonists Block Interaction of VEGF and VEGFR-2

Antagonist	IC50 (nM)
TS-ZPT-2(2P16)	0.11
TS-ZPT-3(2P16)	0.50
TS-ZPT-5(2P16)	0.26
Aflibercept	0.20
Bevacizumab	1.57

FIG. 8A

Antagonist	IC50 (nM)
TS-ZPT-2(2P16)	0.17
TS-ZPT-5(2P16)	1.78
TS-ZPT-6(2P16)	0.66
Aflibercept	0.29
BVZ	1.36

FIG. 8B

【図 9】

Trispecific Antitumor Antagonists Block Interaction of Ang2 and Tie2

Antagonist	IC50 (nM)
TS-ZPT-1.2	0.95
TS-ZPT-2	0.65
TS-ZPT-5	0.40
TS-ZPT-6	0.55
TS-LPT-1	1.26
BVZ-Trebananib	0.57

FIG. 9

【図 10】

Size Exclusion Chromatography of HEK293
transiently produced molecules

Construct	HMW%	Dimer%	LMW%
2P17	1.0	97.3	1.7
TS-ZPT-2(2P17)	0.0	81.5	18.5
TS-ZPT-3L(2P17)	0.0	95.1	4.9
TS-ZPT-5(2P17)	0.6	65.3	34.1

FIG. 10

【図 11】

Size Exclusion Chromatography of stable
CHO cell produced molecules

Construct	HMW%	Dimer%	LMW%
TS-ZPT-2(2P17)	0.6	89.9	9.7
TS-ZPT-5(2P17)	0.7	92.4	6.9
TS-ZPT-3L(2P17) Pool 1	0.5	97.7	1.8
TS-ZPT-3L(2P17) Pool 2	0.9	97.4	1.7

FIG. 11

【図 12 A - 12 B】

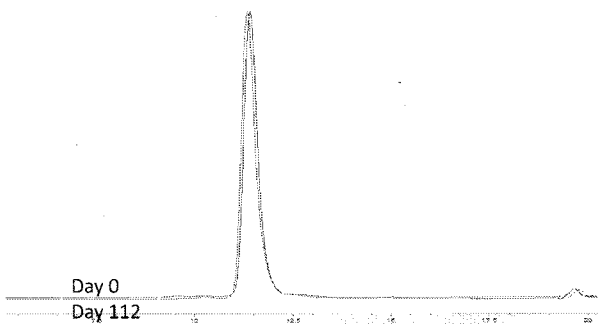


FIG. 12A

Size Exclusion Chromatography of 4
degree stability sample

Day	HMW%	Dimer%	LMW%
0	1.3	97.2	1.5
112	0.8	97.1	2.1

FIG. 12B

【図 13 A - 13 B】

Exemplary Amino acid sequences of TS-ZPT-3L

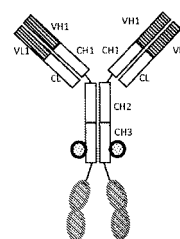
Heavy Chain with peptide and fusion protein

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYHHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSGNS Anti-PD-1
 KYNENFKGRVLTADTSTVYMESSLSRSEDYAVYCASETYDGDYWGQGLTVTVSSAST 2P17 HCVR
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MGGAQQE
 ECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMGSGTKNQVSL
 TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 VMHEALHNHYTQKLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGSSDTRPFVEMYSEIPIIHMTEG
 RELVPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYK
 TNYLTHRQTNTIIVLSPSHGIFLSVGEKLVNCTARTELVNVDNFNWEYPSKQHKKLV
 NRDLKTQSGSEMKKFLSTLTDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID
 NO: 202)

Light Chain

DIQMTQSPFSLASVGDRTITCKASQNVGTNVAWYQKPGKAPKALIASYRYSGVPS Anti-PD-1
 RFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYCCQYYSPYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ 2P17 LCVR
 LKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 201)

FIG. 13A



TS-ZPT-3L(2P17)

VH1-VL1 = Anti-PD1 (2P17)

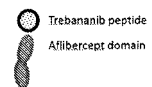


FIG. 13B

【 図 1 4 A − 1 4 B 】

Exemplary Amino acid sequences of TS-ZPT-3S

Heavy Chain with peptide and fusion protein

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYIHVWRQAPGGGLEWMGWIFPGSGNS Anti-PD-1
KYNENFKGRVLTADTSTVYMLSSLRSEDTAVYYCASETYDGDYWGQGLTVTVSSAST 2P17 HCVR
KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVTVSPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMGGQEECE
WDPWTCFHMGGTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSSD
TGRPFVEMYSEIPIHMTGRELVIKRVTSNITVTLKFPDLTLPDGKRIIWDNRKFIIS
NATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRTNTIIDVVLSPSHGIELSVGKLVNCTARTELN
VGIDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLTKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTQSDQGLYTCAASSGL
MTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO: 200)

Trebananib
short peptide

Aflibercept
domain

Light Chain

DIQMTQSPSFSLASVGDRTVITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIVSASVRYSGVPS Anti-PD-1
RFGSGSGSTFTLTISLQPEDFATYYCQQYSPYTFGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ 2P17 LCVR
LKSGTASVCLLNINFPYFPAKQVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 201)

FIG. 14A

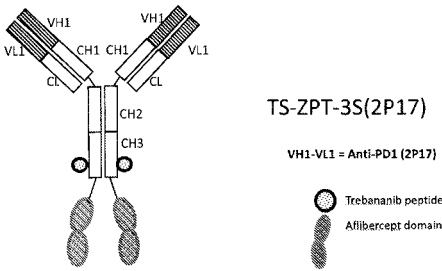


FIG. 14B

【 図 1 5 】

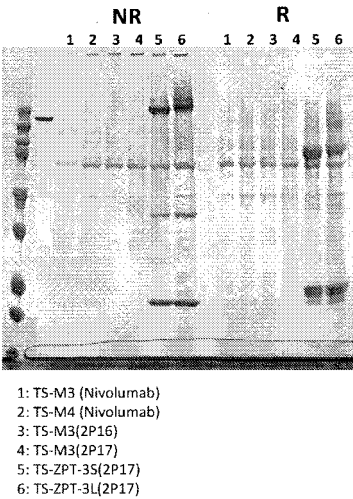


FIG. 15

【 図 1 6 】

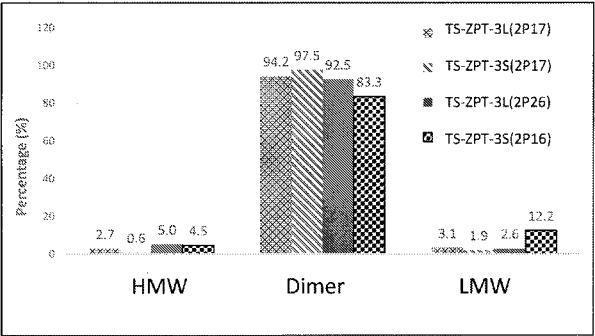


FIG. 16

【 図 1 7 】

Day	TS-ZPT-3L(2P17)			TS-ZPT-3S(2P17)		
	HMW %	Dimer %	LMW %	HMW %	Dimer %	LMW %
0	3.0	93.7	3.4	0.5	97.9	1.6
7	3.2	93.8	3.0	0.8	97.9	1.4
14	3.2	93.7	3.0	0.8	97.9	1.3
20	3.3	93.6	3.1	0.6	97.7	1.7
28	3.3	93.6	3.1	0.7	97.6	1.6
35	3.5	93.2	3.3	0.6	97.6	1.8
42	3.4	93.2	3.4	0.6	97.7	1.7
48	3.2	93.2	3.6	0.8	97.5	1.7

FIG. 17

【図 18 A - 18 B】

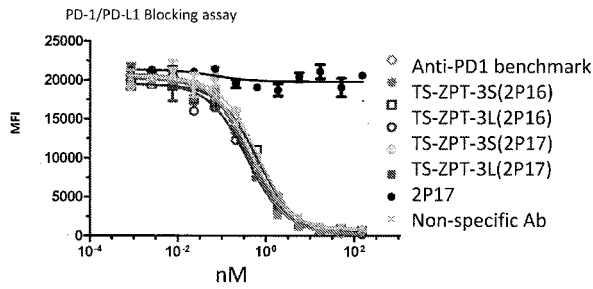


FIG. 18A

PD-1/PDL-1	IC50 (nM)
Anti-PD1 Benchmark Ab	0.44
TS-ZPT-3S(2P16)	0.43
TS-ZPT-3L(2P16)	0.64
TS-ZPT-3S(2P17)	0.37
TS-ZPT-3L(2P17)	0.65
2P17	0.37
Control Ab	N/A

FIG. 18B

【図 19 A - 19 B】

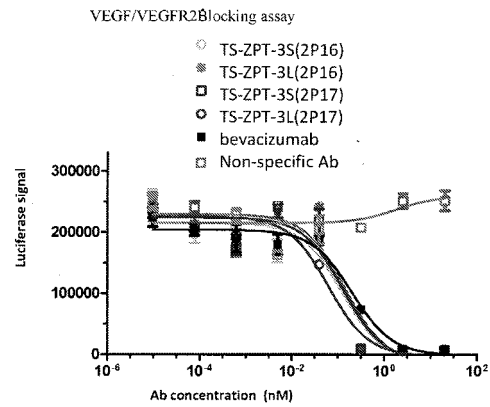


FIG. 19A

VEGF/VEGFR2	IC50 (pM)
TS-ZPT-3S(2P16)	123
TS-ZPT-3L(2P16)	142
TS-ZPT-3S(2P17)	129
TS-ZPT-3L(2P17)	63
Bevacizumab	202
Control	No blocking

FIG. 19B

【図 20 A - 20 B】

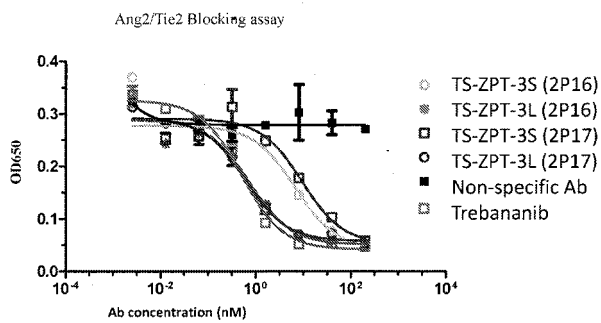


FIG. 20A

Ang2/Tie2	IC50 (nM)
TS-ZPT-3S(2P16)	6.71
TS-ZPT-3L(2P16)	0.73
TS-ZPT-3S(2P17)	9.34
TS-ZPT-3L(2P17)	0.60
Control Ab	N/A
Trebananib	0.50

FIG. 20B

【図 21 A - 21 C】

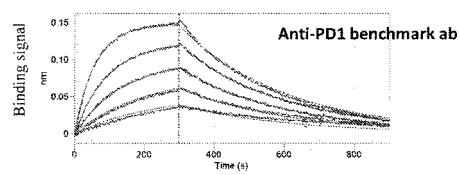


FIG. 21A

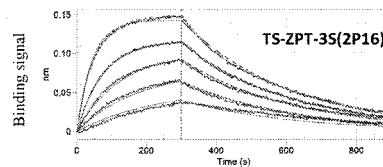


FIG. 21B

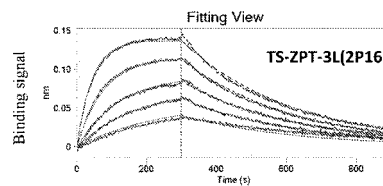


FIG. 21C

【図 2 1 D - 2 1 F】

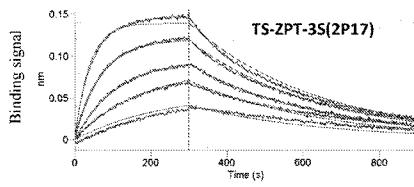


FIG. 21D

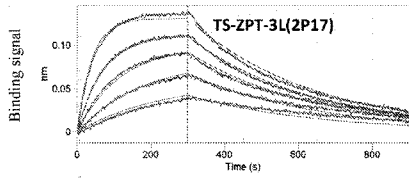


FIG. 21E

PD-1-His (R&D)			
Ab name	K_D (nM)	K_A ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Anti-PD1 Benchmark	7.32E-09	1.98E+05	1.45E-03
TS-ZPT-3S(2P16)	4.76E-09	3.35E+05	1.59E-03
TS-ZPT-3L(2P16)	4.67E-09	3.33E+05	1.55E-03
TS-ZPT-3S(2P17)	3.71E-09	3.94E+05	1.46E-03
TS-ZPT-3L(2P17)	3.84E-09	3.82E+05	1.47E-03

FIG. 21F

【図 2 2 A - 2 2 C】

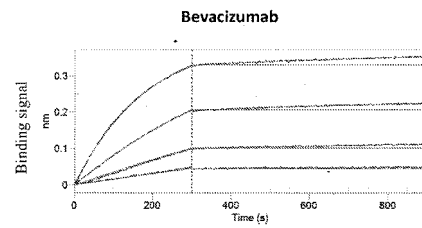


FIG. 22A

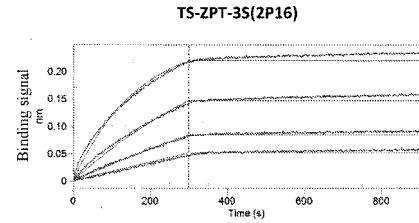


FIG. 22B

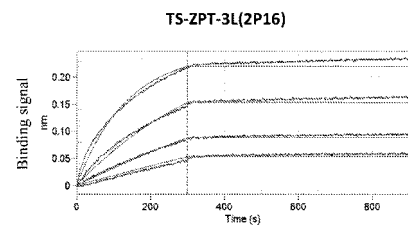


FIG. 22C

【図 2 2 D - 2 2 F】

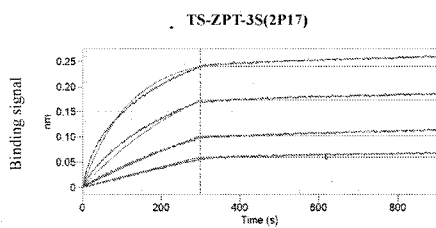


FIG. 22D

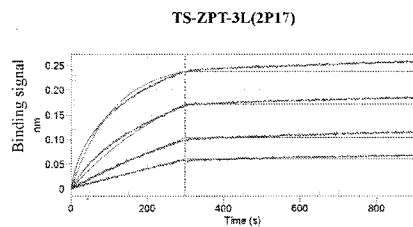


FIG. 22E

rhVEGF165			
Ab name	K_D (pM)	K_A ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Bevacizumab	20.4	1.97E+05	4.00E-06
TS-ZPT-3S(2P16)	6.3	6.83E+05	4.31E-06
TS-ZPT-3L(2P16)	5.3	8.45E+05	4.47E-06
TS-ZPT-3S(2P17)	5.2	9.74E+05	5.03E-06
TS-ZPT-3L(2P17)	4.9	1.02E+06	5.00E-06

FIG. 22F

【図 2 3 A - 2 3 C】

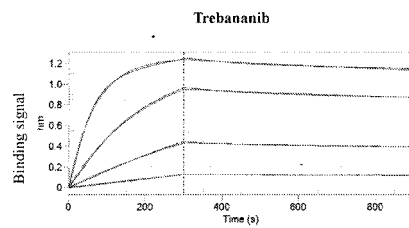


FIG. 23A

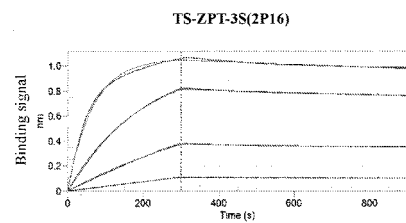


FIG. 23B

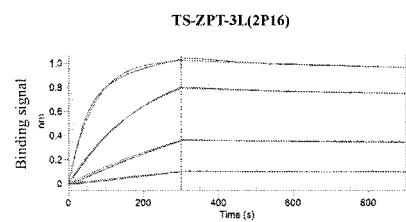


FIG. 23C

【 図 2 3 D - 2 3 F 】

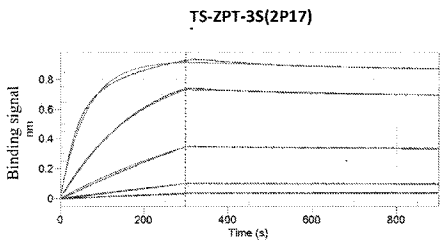


FIG. 23D

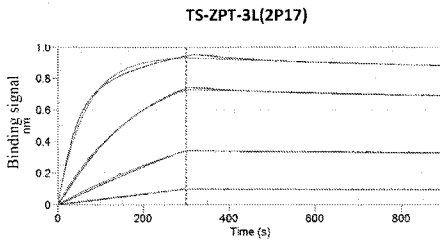


FIG. 23E

Ab name	rhAng2-His		
	K_D (nM)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Trebananib	1.23	$1.19E+05$	$1.46E-04$
TS-ZPT-3S(2P16)	0.87	$1.26E+05$	$1.10E-04$
TS-ZPT-3L(2P16)	0.76	$1.24E+05$	$9.39E-05$
TS-ZPT-3S(2P17)	0.65	$1.34E+05$	$8.66E-05$
TS-ZPT-3L(2P17)	0.70	$1.30E+05$	$9.05E-05$

FIG. 23F

【 図 2 5 】

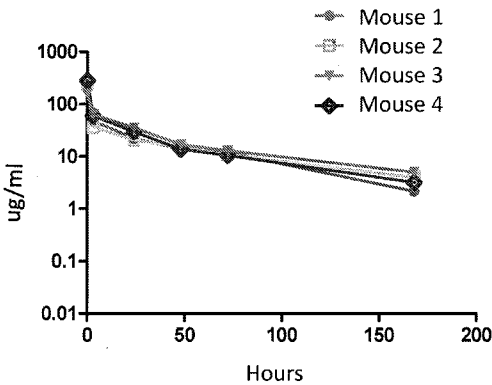


FIG. 25

【 図 2 4 】

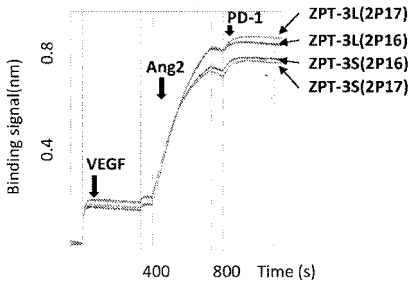


FIG. 24

【 図 2 6 A - 2 6 B 】

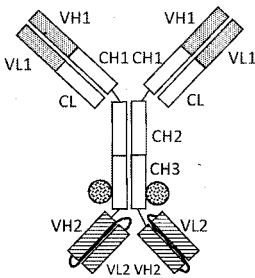


FIG. 26A

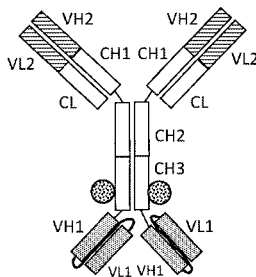


FIG. 26B

VH1 VL1 = Checkpoint #1 e.g. Anti-PD-1, anti-PD-L1 or any other mAb variable domain
VH2 VL2 = Checkpoint #2 Anti-LAG3, anti-TIGIT or any other mAb variable domain
● = trebananib or other biological peptide

【図 27】

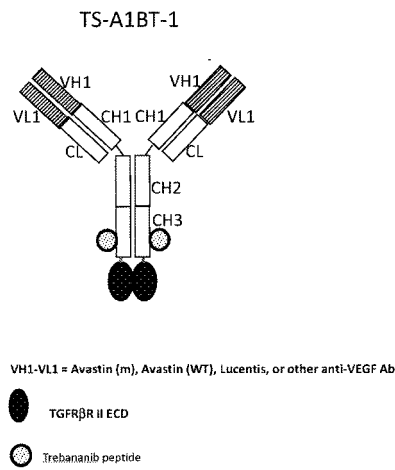


FIG. 27

【図 28】

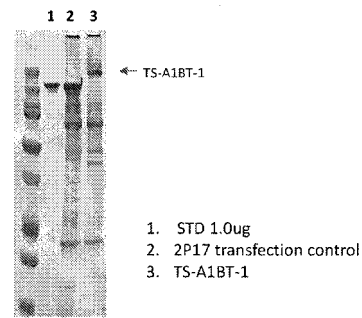


FIG. 28

【図 29】

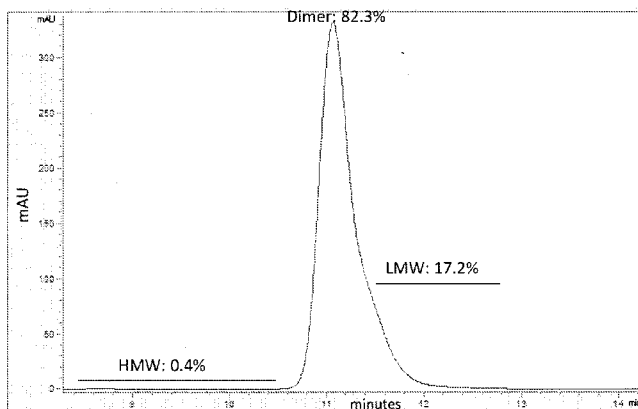


FIG. 29

【図 30A - 30C】

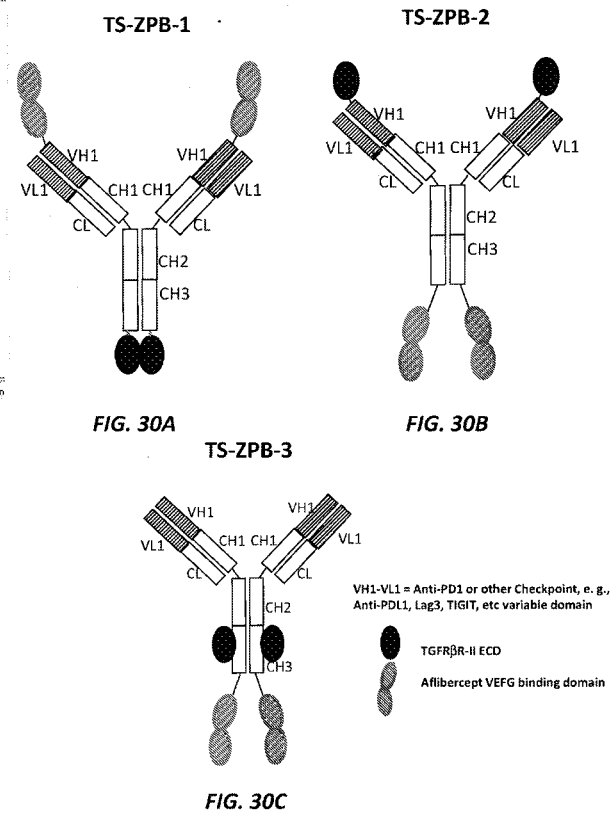
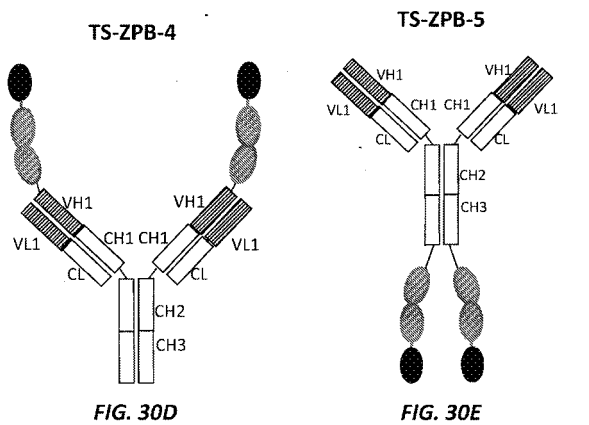


FIG. 30A

FIG. 30B

FIG. 30C

【図 30D - 30F】



【図 31A】

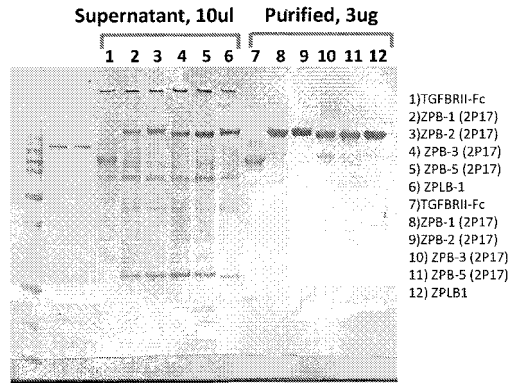


FIG. 31A

【図 32A - 32B】

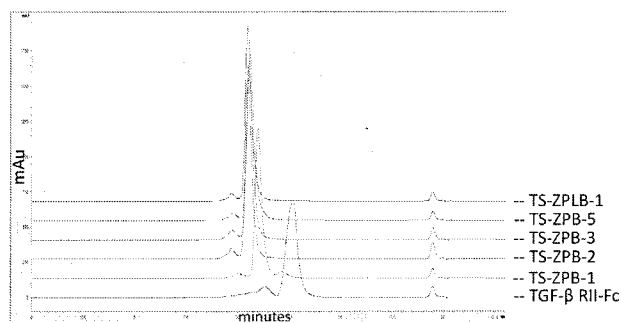


FIG. 32A

Construct	HMW%	Dimer%	LMW%
TS-ZPB-1(2P17)	4.5	89.5	6.0
TS-ZPB-2(2P17)	6.5	92.3	1.2
TS-ZPB-3(2P17)	7.1	91.3	1.5
TS-ZPB-5(2P17)	4.7	95.0	0.3
TS-ZPLB-1	4.8	94.0	1.3
TGFβR II-Fc	15.5	84.3	0.2

FIG. 32B

【図 33A - 33B】

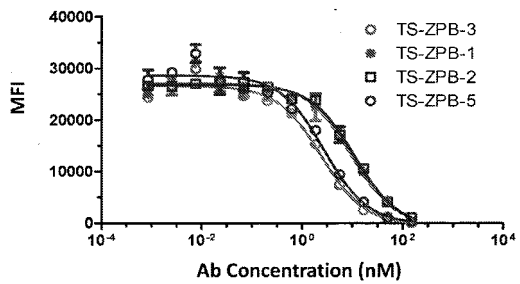


FIG. 33A

Antagonist	IC50 (nM)
TS-ZPB-1(2P17)	9.29
TS-ZPB-2(2P17)	11.05
TS-ZPB-3(2P17)	2.39
TS-ZPB-5(2P17)	2.72

FIG. 33B

【 図 3 4 A - 3 4 B 】

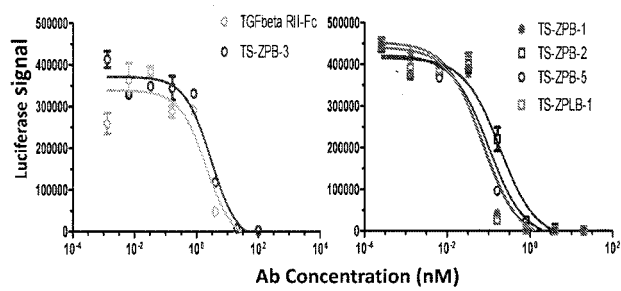


FIG. 34A

Antagonist	IC50 (nM)
TGFβ RII-Fc	2.02
TS-ZPB-1(2P17)	0.07
TS-ZPB-2(2P17)	0.24
TS-ZPB-3(2P17)	2.95
TS-ZPB-5(2P17)	0.17
TS-ZPLB-1	0.11

FIG. 34B

【 図 3 5 A - 3 5 B 】

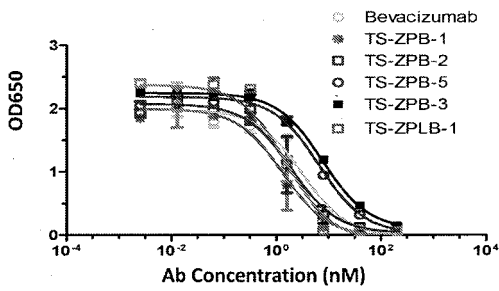


FIG. 35A

Antagonist	IC50 (nM)
Bevacizumab	3.11
TS-ZPB-1	1.32
TS-ZPB-2	1.92
TS-ZPB-3	7.71
TS-ZPB-5	6.58
TS-ZPLB-1	1.57

FIG. 35B

【 図 3 6 A - 3 6 C 】

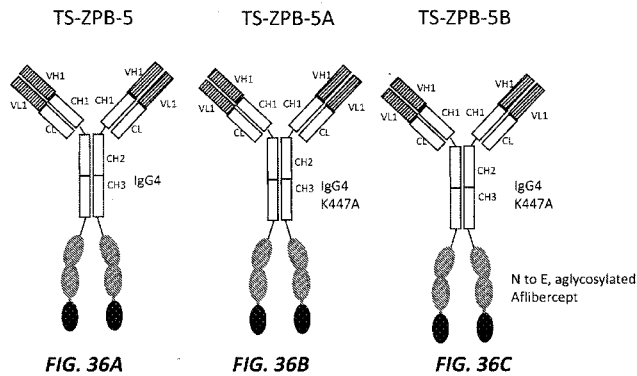


FIG. 36A

FIG. 36B

FIG. 36C

【 図 3 7 】

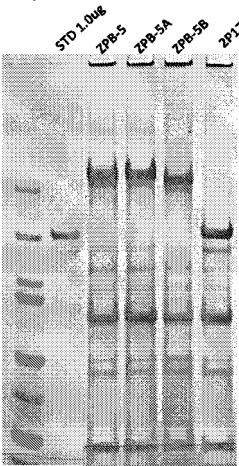


FIG. 37

VH1-VL1 = Anti-PD1 or other Checkpoint, e. g.,
Anti-PDL1, Lag3, TIGIT, etc variable domain

● TGFβR II ECD

● Afiibercept VEGF binding domain

【 図 3 8 】

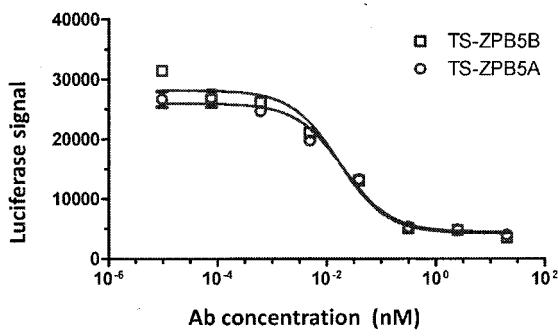


FIG. 38

【 図 3 9 】

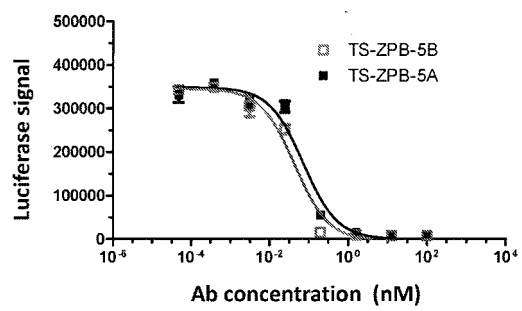


FIG. 39

【 図 4 0 】

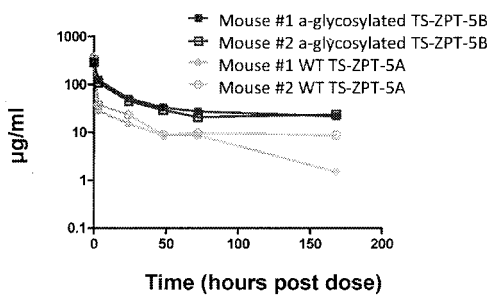


FIG. 40

【 図 4 1 A - 4 1 C 】

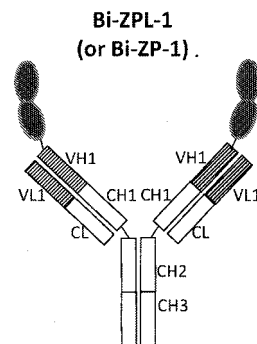


FIG. 41A

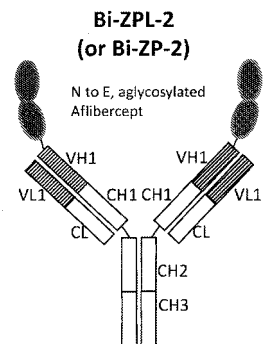


FIG. 41B

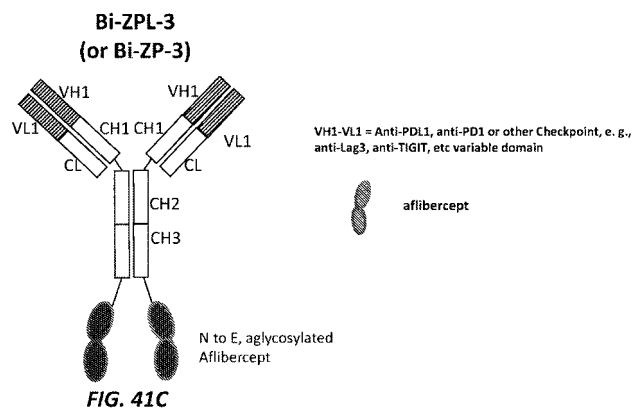


FIG. 41C

【 図 4 2 A - 4 2 B 】

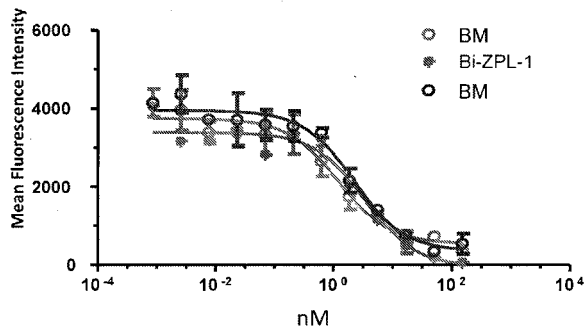


FIG. 42A

Antagonist	IC50 (nM)
BM	2.14
Bi-ZPL-1	3.30

FIG. 42B

【 図 4 3 A - 4 3 B 】

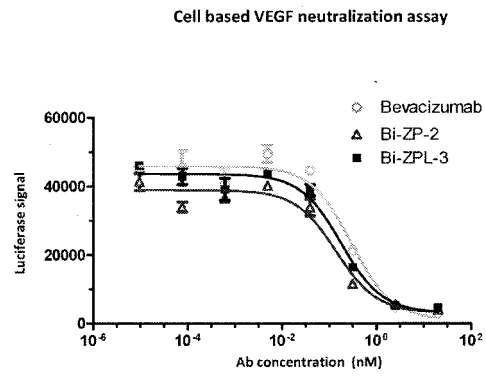


FIG. 43A

	IC50 (nM)
Bevacizumab	0.29
Bi-ZP-2	0.14
Bi-ZPL-3	0.18

FIG. 43B

【 図 4 4 】

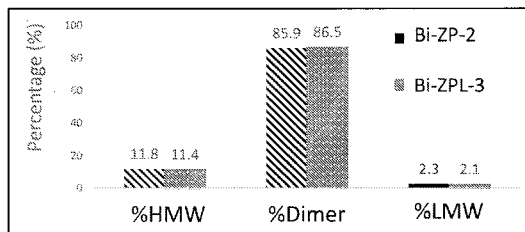


FIG. 44

【 図 4 5 】

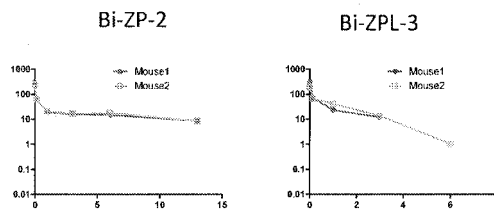


FIG. 45

【図 46 A】

SEQ ID No.	Description	Sequence
299	T-01 HFR1	QVQLQESGPGELVYPSQTLSTCTVSGYSIT
300	T-01, 02, 05, 07 HFR2	WIRQPGQGLEWMG
301	T-01, 06 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
302	T-01 HFR4	WGQGTSTVTVSS
303	T-01, 03, 04, 05, 06, 07, 10 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
304	T-01 LFR2	WHQKPKGAPKRLIY
305	T-01, 02 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP
306	T-01, 06 LFR4	FGGGTKLEIK
307	T-02 HFR1	QVQLQESGPGELVYPSQTLSTCTVSGYSIT
308	T-02 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
309	T-02, 05, 07 HFR4	WGQGTSTVTVSS
310	T-02 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
311	T-02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
312	T-02 LFR4	FGGGTKLEIK
313	T-03, 04 HFR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
314	T-03, 04, 05 HFR2	WVQAPGQGLEWMG
315	T-03, 04 HFR3	RVITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
316	T-03 HFR4	WGQGTSTVTVSS
317	T-03, 05, 06, 10 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
318	T-03, 05 LFR4	FGAGTKLEIK
319	T-04, 05, 08, 09, 10 HFR4	WGQGTSTVTVSS
320	T-04 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
321	T-04 LFR4	FGAGTKLEIK
322	T-05 HFR1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYTF
323	T-05 HFR3	RVITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
324	T-06 HFR1	QVQLQESGPGELVYPSQTLSTCTVSGGSVS
325	T-07 HFR1	EVQLQESGPGELVYPSQTLSTCTVSGGSVS
326	T-07 HFR3	RVITMSVDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCTR
327	T-07 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
328	T-07 LFR4	FGGGTKLEIK
329	T-08 HFR1	QVQLVQSGSELKPGASVKVCKASGYTFT
330	T-08, 10 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
331	T-08 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
332	T-08 LFR1	DVVMITQSPSLPVLTPQPSIS
333	T-08 LFR2	WVQAPGQGLEWMG
334	T-08 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
335	T-08 LFR4	FGAGTKLEIK
336	T-09 HFR1	QVTLKESGPTLVKPTQTTLTCTFSGPSLS
337	T-09 HFR2	WIRQPGQGLEWMG
338	T-09 HFR3	RLTITKDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
339	T-09 LFR1	QAVVTQSPSLVPSGGTVITC
340	T-09 LFR2	WVQAPGQGLEWMG
341	T-09 LFR3	WVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
342	T-09 LFR4	FGGGTKLEIK
343	T-10 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
344	T-10 HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
345	T-10 LFR4	FGGGTKLEIK

FIG. 46A

【図 46 B】

SEQ ID NO.	Description	Sequence
346	PD-01 HFR1	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
347	PD-01 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
348	PD-01 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
349	PD-01 HFR4	WGQGTSTVTVSS
350	PD-01 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
351	PD-01, 02, 03, 04, PL-02, 03 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
352	PD-01, 02, 03, 04 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
353	PD-01, PL-05 LFR4	FGGGTKLEIK
354	PD-02, 03, 04 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
355	PD-02 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
356	PD-02 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCTR
357	PD-02, 04, 05, 06; PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR4	WGQGTSTVTVSS
358	PD-02, 04 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
359	PD-02, 04, 05; PL-01, 04, 06, 07, 08 LFR4	FGGGTKLEIK
360	PD-03, 04, 05, 06; PL-02, 03, 04, 08 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
361	PD-03, 04; PL-01 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCA
362	PD-03; PL-05 HFR4	WGQGTSTVTVSS
363	PD-03 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
364	PD-03 LFR4	FGGGTKLEIK
365	PD-04, 05; PL-01, 04, 06, 07, 08 LFR4	FGGGTKLEIK
366	PD-05, 06; PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
367	PD-05 HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
368	PD-05 LFR1	DVLTQSPASLAVSPGQRATITC
369	PD-05 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
370	PD-05 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTINPVEANDTAVYYC
371	PD-06 HFR3	RVITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA
372	PD-06 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
373	PD-06 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
374	PD-06 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
375	PD-06 LFR4	FGGGTKLEIK
376	PL-01 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
377	PL-01, 02, 03, 04, 08 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
378	PL-01, 04, 08 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
379	PL-01, 04, 08 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
380	PL-02 HFR3	KATMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
381	PL-02, 03 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
382	PL-02, 03 LFR4	FGGGTKLEIK
383	PL-03, 08 HFR4	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
384	PL-04 HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
385	PL-05 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
386	PL-05 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
387	PL-05 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
388	PL-05 LFR1	DVMTQSPSSLSASVGDRTVITC
389	PL-05 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
390	PL-05 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
391	PL-06, 07 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
392	PL-06, 07 HFR3	RVITSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
393	PL-06 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
394	PL-06 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
395	PL-06 LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
396	PL-07 LFR1	EVLTQSPATLSLSPGERATITC
397	PL-07 LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
398	PL-07 LFR3	IPARFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC

FIG. 46B

【図 46 C】

SEQ ID NO.	Description	Sequence
399	2L2A.1 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
400	2L2A.1 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
401	2L2A.1 HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
402	2L2A.1, 2L2A.6, 3L1A HFR4	WGQGTSTVTVSS
403	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
404	2L2A.1 LFR2	WLQKPKGAPKRLIY
405	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
406	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR4	FGGGTKLEIK
407	2L2A.6 HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
408	2L2A.6 HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
409	2L2A.6 3L1A HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYCAR
410	2L2A.6, 3L1A LFR2	WLQKPKGAPKRLIY
411	2L27B HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
412	2L27B HFR2	WVRQAPGQGLEWMG
413	2L27B HFR3	RVITMTSDTSKNGFSLSSVTAADTAVYYC
414	2L27B HFR4	FDYWDGGYVEHFDYWGQGTSTVTVSS
415	2L27B LFR2	WYQKPKGAPKRLIY
416	3L1A HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT
417	3L1A LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC
418	3L1A LFR2	WLQKPKGAPKRLIY
419	3L1A LFR3	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
420	3L1A LFR4	FGGGTKLEIK

FIG. 46C

【配列表】

2021532170000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/39982

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07K 16/22, 16/28, 16/46 (2019.01) CPC - C07K 16/22, 16/2818, 16/2863, 16/468, 16/2803 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2017/0275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC.) 28 September 2017; abstract; paragraphs [0011], [0012], [0015], [0047], [0049], [0063], [0096], [0108], [0109], [0115], [0117], [0130]</td> <td>1-2, 3/1-2, 14</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0099150 A1 (HOUSTON et al.) 11 May 2006; paragraphs [0511], [0767]</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016/187594 A1 (HARPOON THERAPEUTICS, INC.) 24 November 2016; entire document</td> <td>1-2, 3/1-2, 14-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2017/0275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC.) 28 September 2017; abstract; paragraphs [0011], [0012], [0015], [0047], [0049], [0063], [0096], [0108], [0109], [0115], [0117], [0130]	1-2, 3/1-2, 14	---		15	Y	US 2006/0099150 A1 (HOUSTON et al.) 11 May 2006; paragraphs [0511], [0767]	15	A	WO 2016/187594 A1 (HARPOON THERAPEUTICS, INC.) 24 November 2016; entire document	1-2, 3/1-2, 14-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 2017/0275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC.) 28 September 2017; abstract; paragraphs [0011], [0012], [0015], [0047], [0049], [0063], [0096], [0108], [0109], [0115], [0117], [0130]	1-2, 3/1-2, 14															
---		15															
Y	US 2006/0099150 A1 (HOUSTON et al.) 11 May 2006; paragraphs [0511], [0767]	15															
A	WO 2016/187594 A1 (HARPOON THERAPEUTICS, INC.) 24 November 2016; entire document	1-2, 3/1-2, 14-15															
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 18 November 2019 (18.11.2019)		Date of mailing of the international search report 03 DEC 2019															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/39982

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-13, 19-27, 32
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-***Please See Supplemental Page-***

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

1-2, 3/1-2, 14-15; PD-1 variable domain (first targeting domain); SEQ ID NO: 284 (peptide linker)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/39982

***Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking: ***

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-3, 14-15, anti-PD-1 variable domain (first targeting domain), and SEQ ID NO: 284 (peptide linker) are directed toward trispecific antitumor antagonists that bind specifically to an immune checkpoint regulator and components of the angiogenesis pathways.

The antitumor antagonists will be searched to the extent that they encompass an anti-PD-1 variable domain (first exemplary first targeting domain) and SEQ ID NO: 284 (first exemplary peptide linker). Applicant is invited to elect additional targeting domain(s) and/or peptide linker(s), with specified SEQ ID NO: for each linker or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional targeting domain(s) and/or linker sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3 (each in-part) and 14-15 (each in-part), encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass an anti-PD-1 variable domain (first targeting domain) and SEQ ID NO: 284 (peptide linker). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected targeting domain(s) and sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an anti-PD-L1 variable domain (first targeting domain).

Groups II+, Claims 16-18, 26-31, anti-PD-1 variable domain (first targeting domain); SEQ ID NO: 192 (heavy chain) and SEQ ID NO: 284 (peptide linker) are directed toward antitumor antagonists that bind specifically to an immune checkpoint regulator and components of the angiogenesis pathways and components of the TGF pathway.

The antitumor antagonists can be searched to the extent that they encompass an anti-PD-1 variable domain (first exemplary first targeting domain), SEQ ID NO: 192 (first exemplary heavy chain) and SEQ ID NO: 284 (first exemplary peptide linker). Applicant is invited to elect additional targeting domain(s) and/or heavy chain sequence(s) and peptide linker(s), with specified SEQ ID NO: for each heavy chain and/or linker or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional targeting domain(s), and/or heavy chain sequence(s) and/or linker sequence(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 16-18 and 26-31 (each in-part), encompass this first named invention and thus these claims can be searched without fee to the extent that they encompass an anti-PD-1 variable domain (first targeting domain), SEQ ID NO: 192 (heavy chain) and SEQ ID NO: 284 (peptide linker). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected targeting domain(s) and/or heavy chain sequence(s) and/or linker chain sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an anti-PD-L1 variable domain (first targeting domain).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include a targeting domain comprising a TGF- β pathway inhibitor, not present in any of Groups I+.

Groups I+ and II+ share the technical features including: a trispecific antagonist, comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; a first targeting domain comprising one or more anti-PD-1 variable domains or one or more anti-PD-L1 variable domains; a second targeting domain comprising a component of VEGFR; and a third targeting domain; and a linker comprising at least one of SEQ ID NOs: 284-289.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2017/0275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC) (hereinafter 'Gensun').

Gensun discloses a trispecific antagonist (abstract), comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; paragraph [0012]); a first targeting domain comprising one or more immunoglobulin variable domains selected from the group consisting of anti-PD-1 variable domains (abstract; paragraphs [0115], [0117]); a second targeting domain that binds specifically to VEGF (abstract) and comprises one or more peptide domains derived from VEGFR (binds to VEGFR (comprises one or more peptide domains derived from VEGFR); paragraphs [0049]; [0106]); and a third targeting domain (a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway; abstract; paragraph [0109]); and a linker linking the targeting domains (a linker linking the targeting domains; paragraph [0007]), wherein the linker is rich in glycine for flexibility, as well as serine for solubility (wherein the linker is rich in glycine for flexibility, as well as serine for solubility; paragraph [0058]); wherein the linker comprises SEQ ID NO: 285 (wherein the linker comprises the sequence Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (wherein the linker comprises SEQ ID NO: 285); paragraph [0031], SEQ ID NO: 28, residues 212-221, and 345-354; wherein the sequence Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 285).

No technical features are shared between the sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Continued Within the Next Supplemental Box

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/39982

-***-Continued from Previous Supplemental Page-***-

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a trispecific antagonist, comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; a first targeting domain comprising one or more immunoglobulin variable domains selected from the group consisting of anti-PD-1 variable domains, anti-PD-L1 variable domains, anti-TIGIT variable domains and anti-LAG-3 variable domains; a second targeting domain that binds specifically to VEGF and comprises one or more peptide domains derived from VEGFR; and a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway; these shared technical features are previously disclosed by Gensun, as above.

Gensun discloses a trispecific antagonist (abstract), comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; paragraph [0012]); a first targeting domain comprising one or more immunoglobulin variable domains selected from the group consisting of anti-PD-1 variable domains (abstract; paragraphs [0115], [0117]); a second targeting domain that binds specifically to VEGF (abstract) and comprises one or more peptide domains derived from VEGFR (binds to VEGFR (comprises one or more peptide domains derived from VEGFR); paragraphs [0049]; [0106]); and a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway (a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway; abstract; paragraph [0109]).

No technical features are shared between the heavy chain sequences and linker sequences of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups II+ were considered to share the technical features including: a trispecific antagonist, comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; a first targeting domain comprising one or more anti-PD-1 variable domains or one or more anti-PD-L1 variable domains; a second targeting domain comprising a component of VEGFR; and a third targeting domain comprising a TGF- β pathway inhibitor; these shared technical features are previously disclosed Gensun, as above, in view of the publication entitled 'M7824, a Novel Bifunctional Anti-PD-L1/TGF β Trap Fusion Protein, Promotes Anti-tumor Efficacy as Monotherapy and in Combination with Vaccine' by Knudson, et al. (hereinafter 'Knudson').

Gensun discloses a trispecific antagonist (abstract), comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain (comprising: an immunoglobulin scaffold comprising a CH1 domain, a CH2 domain and a CH3 domain; paragraph [0012]); a first targeting domain comprising one or more immunoglobulin variable domains selected from the group consisting of anti-PD-1 variable domains (abstract; paragraphs [0115], [0117]); a second targeting domain that binds specifically to VEGF (abstract) and comprises one or more peptide domains derived from VEGFR (binds to VEGFR (comprises one or more peptide domains derived from VEGFR); paragraphs [0049]; [0106]); and a third targeting domain (a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway; abstract; paragraph [0109]). Gensun further discloses an angiogenesis pathway inhibitor (a third targeting domain comprising a peptide inhibitor of the angiotensin/Tie-2 signaling pathway; abstract; paragraph [0109]).

Gensun does not disclose a TGF- β pathway inhibitor.

Knudson discloses an antitumor antagonist (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph) comprising: a first targeting domain comprising a TGF- β 1 RII extracellular domain (ECD) (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph). Knudson further discloses that TGF β promotes tumor progression through its effects on angiogenesis (e1426519-1, second column).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Gensun, to provide include a TGF- β pathway inhibitor, as taught by Knudson, in order to provide a superior method of treating proliferative disorders with the antitumor antagonists.

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Gensun and Knudson reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/13

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

2. T W E E N

(72)発明者 シェン ジャッキー ズィー

アメリカ合衆国 9 1 3 6 2 カリフォルニア州 サウザンド オークス、 ローレン オーク ド
ライヴ 5 5 9

(72)発明者 リウ ボウ

アメリカ合衆国 9 1 3 6 0 カリフォルニア州 サウザンド オークス、 アpartment ビ
イ 9、 ローリー レイン 5 5 5

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB31 CC23 DD32 DD35 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 FA74