

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-526298
(P2024-526298A)

(43)公表日 令和6年7月17日(2024.7.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64		4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20		4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y	4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全150頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-500135(P2024-500135)	(71)出願人	522240265	ブライト ピーク セラピューティクス エージー スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベック シュトラーセ 1 9 1	
(86)(22)出願日	令和4年7月9日(2022.7.9)				
(85)翻訳文提出日	令和6年3月5日(2024.3.5)			110003797 弁理士法人清原国際特許事務所 パタタピラマン, ウィジャヤ ラーガヴァ ン スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベック シュトラーセ 1 9 1	
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/056361	(74)代理人			
(87)国際公開番号	WO2023/281479			クレフト, ベルトルト スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベック シュトラーセ 1 9 1	
(87)国際公開日	令和5年1月12日(2023.1.12)	(72)発明者			
(31)優先権主張番号	63/219,981			キャラロット, ジャンーフィリップ 最終頁に続く	
(32)優先日	令和3年7月9日(2021.7.9)	(72)発明者			
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/219,989				
(32)優先日	令和3年7月9日(2021.7.9)			最終頁に続く	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者		最終頁に続く	
	最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 チェックポイント阻害剤とIL-2とのコンジュゲート、およびその使用

(57)【要約】

【解決手段】

本開示は、修飾された抗PD-1ポリペプチド、修飾された抗PD-1ポリペプチドを含む医薬組成物、抗PD-1ポリペプチドを作製する方法、および疾患の処置のために修飾された抗PD-1ポリペプチドを使用する方法に関する。一態様では、本開示は、修飾された抗PD-1ポリペプチドを使用して被験体における癌を処置する方法に関する。

【選択図】 図1 A

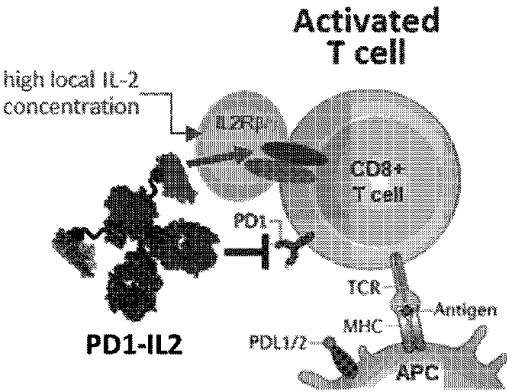


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、
プログラム細胞死タンパク質 1（PD-1）に選択的に結合するポリペプチドと、
修飾された IL-2 ポリペプチドと、
リンカーと
を含み、前記リンカーは、
前記修飾された IL-2 ポリペプチドの非末端残基に共有結合した第 1 の結合点と、
PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドに共有結合した第 2 の結合点と
を含む、組成物。

10

【請求項 2】

組成物であって、
PD-1 に選択的に結合するポリペプチドと、
修飾された IL-2 ポリペプチドと、
リンカーと
を含み、前記リンカーは、
前記修飾された IL-2 ポリペプチドに共有結合した第 1 の結合点と、
PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドの非末端残基に共有結合した第 2 の結合点と

20

【請求項 3】

組成物であって、
PD-1 に選択的に結合するポリペプチドと、
修飾された IL-2 ポリペプチドと、
化学的リンカーであるリンカーと、
を含み、前記リンカーは、
前記修飾された IL-2 ポリペプチドに共有結合した第 1 の結合点と、
PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドに共有結合した第 2 の結合点と
を含む、組成物。

【請求項 4】

前記第 1 の結合点が、前記修飾された IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基 30～110 の領域中の残基にあり、前記 IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 5】

前記第 1 の結合点が、アミノ酸残基 35、37、38、41、42、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105、および 107 からなる群より選択されるアミノ酸残基にあり、前記修飾された IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記第 1 の結合点がアミノ酸残基 42 または 45 にあり、前記修飾された IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 7】

前記第 1 の結合点が、アミノ酸残基 F42Y もしくは Y45、または N 末端残基にある、請求項 2 または 3 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 IL-2 ポリペプチドが、それに共有結合した非リンカーポリマーを含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

50

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが F c 領域を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが抗 P D - 1 抗体または抗原結合断片である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1】

前記抗 P D - 1 抗体または抗原結合断片が F c 領域を含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記第 2 の結合点が前記 F c 領域中のアミノ酸残基にある、請求項 9 または 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記 F c 領域が、配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 、 1 1 、または 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記第 2 の結合点が、配列番号 1 0 5 のアミノ酸残基 2 5 ～ 1 0 5 からなる群より選択されるアミノ酸残基にある、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記第 2 の結合点が、(a) 配列番号 1 0 5 の 2 5 ～ 3 5 の位置のアミノ酸残基、(b) 配列番号 1 0 5 の 7 0 ～ 8 0 の位置のアミノ酸残基、または (c) 配列番号 1 0 5 の 9 5 ～ 1 0 5 のアミノ酸残基である、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記第 2 の位置結合点が、K 2 4 8 アミノ酸残基、K 2 8 8 アミノ酸残基、K 3 1 7 アミノ酸残基、またはそれらの組み合わせ (E u 番号付け) の位置の F c 領域にある、請求項 9 または 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記第 2 の結合点が前記 K 2 4 8 アミノ酸残基にある、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、グラフト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、脱免疫化抗体、または二重特異性抗体である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが抗原結合断片であり、前記抗原結合断片が、F a b 、F a b ' 、F (a b ')₂、二重特異性 F (a b ')₂、三重特異性 F (a b ')₂、可変断片 (F v) 、一本鎖可変断片 (s c F v) 、d s F v 、二重特異性 s c F v 、可変重鎖ドメイン、可変軽鎖ドメイン、可変 N A R ドメイン、二重特異性 s c F v 、A V I M E R (登録商標) 、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、マキシボディ、ラクダ科、V H H 、ミニボディ、イントラボディ、抗体部分 (ドメイン抗体) を含む融合タンパク質、一本鎖結合ポリペプチド、s c F v - F c 、F a b - F c 、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) 、四価タンデムダイアボディ (T a n d A b) 、二重アフィニティー再標的化抗体 (D A R T) 、二重特異性抗体 (b s c A b) 、単一ドメイン抗体 (s d A b) 、融合タンパク質、または二重特異性ジスルフィド安定化 F v 抗体断片 (d s F v - d s F v ') を含む、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物、

【請求項 2 0】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが I g G 、I g M 、I g E 、I g A 、I g D を含むか、またはそれらに由来する、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが前記 I g G を含み、前記 I g G が I g

10

20

30

40

50

G 1、I g G 4であるか、またはそれらに由来する、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、チスレリズマブ、b a i z e a n、O K V O 4 1 1 B 3 N、B G B - A 3 1 7、h u 3 1 7 - 1 / I g G 4 m t 2、シンチリマブ、t y v y t、I B I - 3 0 8、トリパリマブ、T e R u i P u L i、t e r e p r i l、t u o y i、J S - 0 0 1、T A B - 0 0 1、カムレリズマブ (T a m r e l i z u m a b)、H R - 3 0 1 2 1 0、I N C S H R - 0 1 2 1 0、S H R - 1 2 1 0、セミプリマブ (T e m i p l i m a b)、セミプリマブ - r w l c、6 Q V L 0 5 7 I N T、H 4 H 7 7 9 8 N、R E G N - 2 8 1 0、S A R - 4 3 9 6 8 4、ラムプロリズマブ、ペムプロリズマブ、M K - 3 4 7 5、S C H - 9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1、ニボルマブ、B M S - 9 3 6 5 5 8、M D X - 1 1 0 6、O N O - 4 5 3 8、プロルゴリマブ (P r o l g o l i m a b)、F o r t e c a、B C D - 1 0 0、ペンプリマブ、A K - 1 0 5、ジムベレリマブ (Z i m b e r e l i m a b)、A B - 1 2 2、G L S - 0 1 0、W B P - 3 0 5 5、パルスチリマブ、1 Q 2 Q T 5 M 7 E O、A G E N - 2 0 3 4、A G E N - 2 0 3 4 w、ゲノリムズマブ、ゲプタノリマブ、A P L - 5 0 1、C B T - 5 0 1、G B - 2 2 6、ドスタリマブ、A N B - 0 1 1、G S K - 4 0 5 7 1 9 0 A、P O G V Q 9 A 4 S 5、T S R - 0 4 2、W B P - 2 8 5、セルプルリマブ、H L X - 1 0、C S - 1 0 0 3、レチファンリマブ (R e t i f a n l i m a b)、2 Y 3 T 5 I F 0 1 Z、I N C M G A - 0 0 0 1 2、I N C M G A - 0 0 1 2、M G A - 0 1 2、ササンリマブ、L Z Z 0 I C 2 E W P、P F - 0 6 8 0 1 5 9 1、R N - 8 8 8、スパルタリズマブ、P D R - 0 0 1、Q O G 2 5 L 6 Z 8 Z、B M S - 9 8 6 2 1 3、セトレリマブ、J N J - 3 2 8 3、J N J - 6 3 7 2 3 2 8 3、L Y K 9 8 W P 9 1 F、テボテリマブ、M G D - 0 1 3、B C D - 2 1 7、B A T - 1 3 0 6、H X - 0 0 8、M E D I - 5 7 5 2、J T X - 4 0 1 4、カドニリマブ、A K - 1 0 4、B I - 7 5 4 0 9 1、ピジリズマブ、C T - 0 1 1、M D V - 9 3 0 0、Y B L - 0 0 6、A M G - 2 5 6、R G - 6 2 7 9、R O - 7 2 8 4 7 5 5、B H - 2 9 5 0、I B I - 3 1 5、R G - 6 1 3 9、R O - 7 2 4 7 6 6 9、O N O - 4 6 8 5、A K - 1 1 2、6 0 9 - A、L Y - 3 4 3 4 1 7 2、T - 3 0 1 1、A M G - 4 0 4、I B I - 3 1 8、M G D - 0 1 9、O N C R - 1 7 7、L Y - 3 4 6 2 8 1 7、R G - 7 7 6 9、R O - 7 1 2 1 6 6 1、F - 5 2 0、X m A b - 2 3 1 0 4、P d - 1 - p i k、S G - 0 0 1、S - 9 5 0 1 6、S y m - 0 2 1、L Z M - 0 0 9、ブジガリマブ (B u d i g a l i m a b)、6 V D O 4 T Y 3 O O、A B B V - 1 8 1、P R - 1 6 4 8 8 1 7、C C - 9 0 0 0 6、X m A b - 2 0 7 1 7、2 6 6 1 3 8 0、A M P - 2 2 4、B 7 - D C I g、E M B - 0 2、A N B - 0 3 0、P R S - 3 3 2、S T I - 1 1 1 0、S T I - A 1 1 1 0、C X - 1 8 8、m P D - 1、M C L A - 1 3 4、2 4 4 C 8、E N U M 2 2 4 C 8、E N U M C 8、3 8 8 D 4、E N U M 3 8 8 D 4、E N U M D 4、M E D I 0 6 8 0、N V P - L Z V - 1 8 4、または A M P - 5 1 4 を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

【請求項 2 3】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、L Z M - 0 0 9 ドスタリマブ、シンチリマブ (D i n t i l i m a b)、スパルタリズマブ、チスレリズマブ、またはセミプリマブを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

40

【請求項 2 4】

P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、表 1 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記第 2 の結合点が、P D - 1 に選択的に結合する前記ポリペプチド上のリジン残基に対するものである、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 26】

前記第 2 の結合点が、PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドの非末端アミノ酸残基にある、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

前記リンカーがポリマーを含む、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記ポリマーが水溶性ポリマーを含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記水溶性ポリマーが、ポリ（アルキレンオキシド）、多糖類、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリオキサゾリン、ポリ（アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 28 に記載の組成物。

10

【請求項 30】

前記ポリマーが、少なくとも約 0.1 kDa、少なくとも約 0.5 kDa、または少なくとも約 1 kDa の重量平均分子量を有する、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

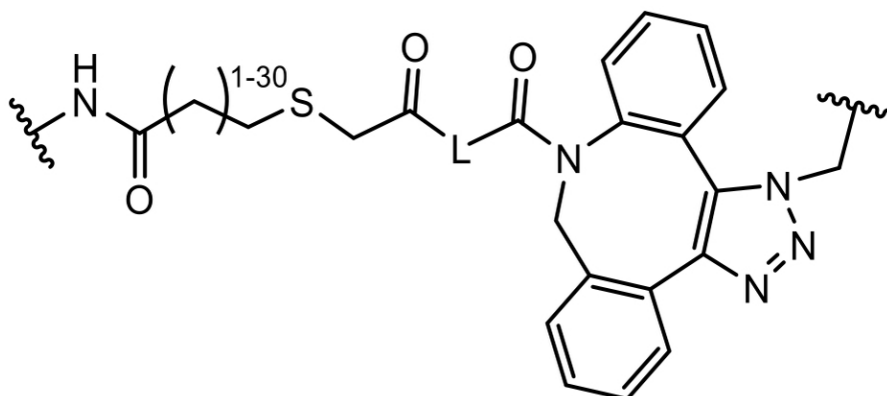
前記リンカーが、前記第 1 の結合点と前記第 2 の結合点との間に少なくとも 50 個の原子の鎖を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

前記リンカーが、構造

20

【化 1】

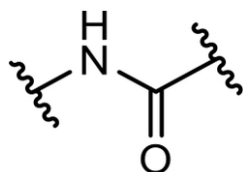


30

を含み、

式中、

【化 2】



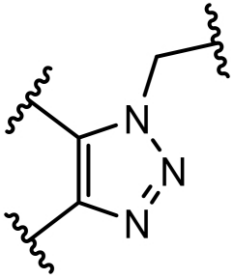
40

は、PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドのリジン残基への前記第 1 の結合点であり、

L は連結基であり、

50

【化 3】



は、前記第 1 の結合点に連結する連結基に対する結合点である、請求項 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 3 3】

前記修飾された IL-2 ポリペプチドが、それに共有結合した非リンカーポリマーを含む、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記非リンカーポリマーが、アミノ酸残基 3 5、3 7、3 8、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、6 0、6 1、6 2、6 4、6 5、6 8、6 9、7 1、7 2、1 0 4、1 0 5、および 1 0 7 からなる群より選択される N 末端アミノ酸残基に結合している、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

PD-1 に選択的に結合するポリペプチドが異種抗体または抗原結合断片を含む、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 3 6】

前記異種抗体または抗原結合断片がリンカーをさらに含み、前記リンカーは、(GS)_n (配列番号 2 4)、(GGS)_n (配列番号 2 5)、(GGGS)_n (配列番号 2 6)、(GGS G)_n (配列番号 2 7)、または (GGS GG)_n (配列番号 2 8)、(GGGS)_n (配列番号 2 9) を含み、ここで、n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 である、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

IL-2 ポリペプチドを含む組成物であって、 30

前記 IL-2 ポリペプチドは、

アミノ酸残基 4 2 に結合した第 1 のポリマーであって、修飾された前記 IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、第 1 のポリマーと、

プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1) に選択的に結合するポリペプチドとを含む、組成物。

【請求項 3 8】

PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが抗 PD-1 抗体または抗原結合断片である、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、モノクローナル、ヒト化、グラフト化、キメラ、ヒト、脱免疫化、または二重特異性である、請求項 3 8 に記載の組成物。 40

【請求項 4 0】

PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、Fab、Fab'、F(ab')₂、二重特異性 F(ab')₂、三重特異性 F(ab')₂、可変フラグメント (Fv)、一本鎖可変フラグメント (scFv)、dsFv、二重特異性 scFv、可変重鎖ドメイン、可変軽鎖ドメイン、可変 NAR ドメイン、二重特異性 scFv、AVIMER (登録商標)、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、マキシボディ、ラクダ科、VHH、ミニボディ、イントラボディ、抗体部分 (ドメイン抗体) を含む融合タンパク質、一本鎖結合ポリペプチド、scFv-Fc、 50

F a b－F c、二重特異性T細胞エンゲージャー（B i T E）、四価タンデムダイアボディ（T a n d A b）、二重アフィニティー再標的化抗体（D A R T）、二重特異性抗体（b s c A b）、単ドメイン抗体（s d A b）、融合タンパク質、二重特異性ジスルフィド安定化F v抗体断片（d s F v－d s F v'）を含む、請求項37～39のいずれか一項に記載の組成物、

【請求項41】

P D－1に選択的に結合する前記ポリペプチドがI g G、I g M、I g E、I g A、I g D抗体を含むか、またはそれらに由来する、請求項37～40のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項42】

P D－1に選択的に結合する前記ポリペプチドが前記I g Gを含み、前記I g GがI g G 1、I g G 4を含むか、またはそれらに由来する、請求項41に記載の組成物。

【請求項43】

P D－1に選択的に結合する前記ポリペプチドが、チスレリズマブ、b a i z e a n、0 K V O 4 1 1 B 3 N、B G B－A 3 1 7、h u 3 1 7－1／I g G 4 m t 2、シンチリマブ、t y v y t、I B I－3 0 8、トリパリマブ、T e R u i P u L i、t e r e p r i l、t u o y i、J S－0 0 1、T A B－0 0 1、カムレリズマブ（T a m r e l i z u m a b）、H R－3 0 1 2 1 0、I N C S H R－0 1 2 1 0、S H R－1 2 1 0、セミプリマブ（T e m i p l i m a b）、セミプリマブ－r w l c、6 Q V L 0 5 7 I N T、H 4 H 7 7 9 8 N、R E G N－2 8 1 0、S A R－4 3 9 6 8 4、ラムプロリズマブ、ペムプロリズマブ、M K－3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1、ニボルマブ、B M S－9 3 6 5 5 8、M D X－1 1 0 6、O N O－4 5 3 8、プロルゴリマブ（P r o l g o l i m a b）、F o r t e c a、B C D－1 0 0、ペンプリマブ、A K－1 0 5、ジムベレリマブ（Z i m b e r e l i m a b）、A B－1 2 2、G L S－0 1 0、W B P－3 0 5 5、バルスチリマブ、1 Q 2 Q T 5 M 7 E O、A G E N－2 0 3 4、A G E N－2 0 3 4 w、ゲノリムズマブ、ゲプタノリマブ、A P L－5 0 1、C B T－5 0 1、G B－2 2 6、ドスタリマブ、A N B－0 1 1、G S K－4 0 5 7 1 9 0 A、P O G V Q 9 A 4 S 5、T S R－0 4 2、W B P－2 8 5、セルプルリマブ、H L X－1 0、C S－1 0 0 3、レチファンリマブ（R e t i f a n l i m a b）、2 Y 3 T 5 I F 0 1 Z、I N C M G A－0 0 0 1 2、I N C M G A－0 0 1 2、M G A－0 1 2、ササンリマブ、L Z Z 0 I C 2 E W P、P F－0 6 8 0 1 5 9 1、R N－8 8 8、スパルタリズマブ、P D R－0 0 1、Q O G 2 5 L 6 Z 8 Z、B M S－9 8 6 2 1 3、セトレリマブ、J N J－3 2 8 3、J N J－6 3 7 2 3 2 8 3、L Y K 9 8 W P 9 1 F、テボテリマブ、M G D－0 1 3、B C D－2 1 7、B A T－1 3 0 6、H X－0 0 8、M E D I－5 7 5 2、J T X－4 0 1 4、カドニリマブ、A K－1 0 4、B I－7 5 4 0 9 1、ヒジリズマブ、C T－0 1 1、M D V－9 3 0 0、Y B L－0 0 6、A M G－2 5 6、R G－6 2 7 9、R O－7 2 8 4 7 5 5、B H－2 9 5 0、I B I－3 1 5、R G－6 1 3 9、R O－7 2 4 7 6 6 9、O N O－4 6 8 5、A K－1 1 2、6 0 9－A、L Y－3 4 3 4 1 7 2、T－3 0 1 1、A M G－4 0 4、I B I－3 1 8、M G D－0 1 9、O N C R－1 7 7、L Y－3 4 6 2 8 1 7、R G－7 7 6 9、R O－7 1 2 1 6 6 1、F－5 2 0、X m A b－2 3 1 0 4、P d－1－p i k、S G－0 0 1、S－9 5 0 1 6、S y m－0 2 1、L Z M－0 0 9、ブジガリマブ（B u d i g a l i m a b）、6 V D O 4 T Y 3 O O、A B B V－1 8 1、P R－1 6 4 8 8 1 7、C C－9 0 0 0 6、X m A b－2 0 7 1 7、2 6 6 1 3 8 0、A M P－2 2 4、B 7－D C I g、E M B－0 2、A N B－0 3 0、P R S－3 3 2、S T I－1 1 1 0、S T I－A 1 1 1 0、C X－1 8 8、m P D－1、M C L A－1 3 4、2 4 4 C 8、E N U M 2 2 4 C 8、E N U M C 8、3 8 8 D 4、E N U M 3 8 8 D 4、E N U M D 4、M E D I 0 6 8 0、N V P－L Z V－1 8 4、またはA M P－5 1 4を含む、請求項37～42のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項44】

P D－1に選択的に結合する前記ポリペプチドが、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、L

10

20

30

40

50

Z M-009、ドスタリマブ、シンチリマブ (D i n t i l i m a b)、スパルタリズマブ、チスレリズマブ、またはセミプリマブを含む、請求項 37~43 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 45】

P D-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが、表 1 の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 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 37~44 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 46】

前記第 1 のポリマーが、第 2 の結合点で P D-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドに共有結合している、請求項 37~45 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

P D-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドが F c 領域を含む、請求項 37~46 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 48】

前記第 2 の結合点が前記 F c 領域中のアミノ酸残基にある、請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記 F c 領域が、配列番号 105 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 47 または 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記第 2 の結合点が、配列番号 105 のアミノ酸配列セットのアミノ酸残基 10~90 からなる群より選択されるアミノ酸残基にある、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記第 2 の結合点が、(a) 配列番号 105 の 25~35 の位置のアミノ酸残基、(b) 配列番号 105 の 70~80 の位置のアミノ酸残基、または (c) 配列番号 105 の 95~105 のアミノ酸残基である、請求項 46~50 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 52】

前記第 1 のポリマーが約 200~約 2000 ダルトンの重量平均分子量を有する、請求項 37~51 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 53】

前記第 1 のポリマーが水溶性ポリマーを含む、請求項 37~52 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 54】

前記第 1 のポリマーが、ポリ(アルキレンオキシド)、多糖類、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリオキサゾリン、ポリ(アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 37~53 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 55】

前記第 1 のポリマーがポリ(アルキレンオキシド)を含む、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

前記修飾された I L-2 ポリペプチドが、前記 I L-2 ポリペプチドに共有結合した第 2 のポリマーをさらに含む、請求項 37~55 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 57】

前記第 2 のポリマーが、前記 F c 領域のアミノ酸残基 35、37、38、41、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105、および 107 からなる群より選択される N 末端アミノ酸残基に共有結合している、請求項 56 に記載の組成物。

【請求項 58】

10

20

30

40

50

前記第2のポリマーが、前記IL-2ポリペプチドの残基45に共有結合している、請求項56または57に記載の組成物。

【請求項59】

前記第2のポリマーが、前記IL-2ポリペプチドの残基Y45に共有結合している、請求項56～58のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項60】

前記第2のポリマーが、第2の結合点で前記IL-2ポリペプチドに共有結合している、請求項56～59のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項61】

前記第2のポリマーが、少なくとも約500ダルトン、少なくとも約1000ダルトン、少なくとも約2000ダルトン、少なくとも約3000ダルトン、少なくとも約4000ダルトン、少なくとも約5000ダルトン、または少なくとも約6000ダルトンの重量平均分子量を有する、請求項56～60のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項62】

前記第2のポリマーが、少なくとも約120ダルトン、少なくとも約250ダルトン、少なくとも約300ダルトン、少なくとも約400ダルトン、少なくとも約500ダルトン、少なくとも約1000ダルトン、少なくとも約2000ダルトン、少なくとも約3000ダルトン、少なくとも約4000ダルトン、少なくとも約5000ダルトン、または少なくとも6000ダルトンの重量平均分子量を有する、請求項56～61のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項63】

PD-1に選択的に結合するポリペプチドが異種抗体または抗原結合断片を含む、請求項37～62のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項64】

前記異種抗体または抗原結合断片がリンカーをさらに含み、前記リンカーは、(GS)_n (配列番号24)、(GGS)_n (配列番号25)、(GGGS)_n (配列番号26)、(GSGS)_n (配列番号27)、または(GSGSG)_n (配列番号28)、(GGGG)_n (配列番号29)を含み、ここで、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である、請求項63に記載の組成物。

【請求項65】

組成物であって、

(a) Fc領域を含み、前記Fc領域が、配列番号105と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗PD-1抗体または抗原結合断片と、

(b) 1つ以上のリンカーであって、

(i) 配列番号105の25～35の位置、

(ii) 配列番号105の70～80の位置、および

(iii) 配列番号105の95～105の位置

からなる群より選択されるアミノ酸残基において前記Fc領域に共有結合した1つ以上のリンカーと、

(c) 前記リンカーに共有結合した1つ以上のサイトカインと

を含む、組成物。

【請求項66】

前記アミノ酸残基が、リジン、チロシン、トリプトファン、またはシステインである、請求項65に記載の組成物。

【請求項67】

前記アミノ酸残基がリジン残基である、請求項65または66に記載の組成物。

【請求項68】

前記抗PD-1抗体または抗原結合断片が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、グラフト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、脱免疫化抗体、または二重特異性抗体である、請求項65～67のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 69】

前記抗PD-1抗体または抗原結合断片がIgG、IgM、IgE、IgA、IgD抗体を含むか、またはそれらに由来する、請求項65～68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 70】

前記抗PD-1抗体または抗原結合断片が前記IgGを含み、前記IgGがIgG1、IgG4を含むか、またはそれらに由来する、請求項69に記載の組成物。

【請求項 71】

前記抗PD-1抗体または抗原結合断片が含み、PD-1に選択的に結合する前記ポリペプチドが、チスレリズマブ、baizean、OKVO411B3N、BGB-A317、hu317-1/IgG4mt2、シンチリマブ、tyvyt、IBI-308、トリパリマブ、TeRuiPuLi、terepril、tuoyi、JS-001、TAB-001、カムレリズマブ(Tamrelizumab)、HR-301210、INCSHR-01210、SHR-1210、セミプリマブ(Temiplimab)、セミプリマブ-rwlc、6QVL057INT、H4H7798N、REGN-2810、SAR-439684、ラムプロリズマブ、ペムプロリズマブ、MK-3475、SCH-900475、h409A11、ニボルマブ、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、プロルゴリマブ(Prolgolimab)、Forteca、BCD-100、ペンプリマブ、AK-105、ジムベレリマブ(Zimberelimumab)、AB-122、GLS-010、WBP-3055、バルスチリマブ、1Q2QT5M7EO、AGEN-2034、AGEN-2034w、ゲノリムズマブ、ゲプタノリマブ、APL-501、CBT-501、GB-226、ドスタリマブ、ANB-011、GSK-4057190A、POGVQ9A4S5、TSR-042、WBP-285、セルブルリマブ、HLX-10、CS-1003、レチファンリマブ(Retifanlimab)、2Y3T5IF01Z、INCMGA-00012、INCMGA-00012、MGA-012、ササンリマブ、LZZ0IC2EWP、PF-06801591、RN-888、スパルタリズマブ、PDR-001、QOG25L6Z8Z、BMS-986213、セトレリマブ、JNJ-3283、JNJ-63723283、LYK98WP91F、テボテリマブ、MGD-013、BCD-217、BAT-1306、HX-008、MEDI-5752、JTX-4014、カドニリマブ、AK-104、BI-754091、ピジリズマブ、CT-011、MDV-9300、YBL-006、AMG-256、RG-6279、RO-7284755、BH-2950、IBI-315、RG-6139、RO-7247669、ONO-4685、AK-112、609-A、LY-3434172、T-3011、AMG-404、IBI-318、MGD-019、ONCR-177、LY-3462817、RG-7769、RO-7121661、F-520、XmAb-23104、Pd-1-pik、SG-001、S-95016、Sym-021、LZM-009、ブジガリマブ(Budigalimumab)、6VDO4TY300、ABBV-181、PR-1648817、CC-90006、XmAb-20717、2661380、AMP-224、B7-DCIg、EMB-02、ANB-030、PRS-332、STI-1110、STI-A1110、CX-188、mPD-1、MCLA-134、244C8、ENUM 224C8、ENUM C8、388D4、ENUM 388D4、ENUM D4、MEDI0680、NVP-LZV-184、またはAMP-514を含む、請求項65～70のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 72】

前記抗PD-1抗体が、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、LZM-009、ドスタリマブ、シンチリマブ(Dintilimumab)、スパルタリズマブ、チスレリズマブ、またはセミプリマブを含む、請求項65～71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 73】

前記抗PD-1抗体または抗原結合断片が、表1のアミノ酸配列と少なくとも80%、

10

20

30

40

50

少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 65～69 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 74】

前記 1 つ以上のサイトカインが、IL-2 ポリペプチド、IL-7 ポリペプチド、IL-18 ポリペプチド、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 65～73 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 75】

前記 1 つ以上のサイトカインが、修飾された IL-2 ポリペプチド、修飾された IL-7 ポリペプチド、修飾された IL-18 ポリペプチド、またはそれらの組合せを含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 76】

前記リンカーが、前記 IL-2 ポリペプチド、前記 IL-7 ポリペプチド、前記 IL-18 ポリペプチド、前記修飾された IL-2 ポリペプチド、前記修飾された IL-7 ポリペプチド、前記修飾された IL-18 ポリペプチド、またはそれらの組み合わせの非末端残基に共有結合している、請求項 74 または 75 に記載の組成物。

【請求項 77】

前記リンカーが、35、37、38、41、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105、および 107 からなる群より選択されるアミノ酸残基に共有結合しており、前記 IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 74～76 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 78】

前記リンカーがアミノ酸残基 45 に共有結合しており、前記修飾された IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 79】

前記リンカーが、前記 IL-2 ポリペプチド中のチロシン残基に共有結合している、請求項 77 または 78 に記載の組成物。

【請求項 80】

前記修飾された IL-2 ポリペプチド、前記修飾された IL-7 ポリペプチド、前記修飾された IL-18 ポリペプチド、またはそれらの組み合わせが、それに共有結合した非リンカーポリマーを含む、請求項 75～79 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 81】

前記非リンカーポリマーが、35、37、38、41、42、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105、および 107 からなる群より選択される N 末端アミノ酸残基に結合しており、前記修飾された IL-2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号 1 に基づく、請求項 80 に記載の組成物。

【請求項 82】

前記リンカーがポリマーを含む、請求項 65～81 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 83】

前記ポリマーが水溶性ポリマーである、請求項 82 に記載の組成物。

【請求項 84】

前記水溶性ポリマーが、ポリ（アルキレンオキシド）、多糖類、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリオキサゾリン、ポリ（アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 83 に記載の組成物。

【請求項 85】

前記ポリマーが、前記第 1 の結合点と前記第 2 の結合点との間に少なくとも 50 個の原

10

20

30

40

50

子の鎖を含む、請求項 82～84 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 86】

前記ポリマーが、少なくとも約 0.5 kDa、少なくとも約 1 kDa、または少なくとも約 5 kDa の重量平均分子量を有する、請求項 82～85 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 87】

前記修飾された IL-2 ポリペプチドが、配列番号 3～23 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 75～86 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 88】

前記 1 つ以上のサイトカインが、2 つの同じ修飾された IL-2 ポリペプチド、2 つの異なる修飾された IL-2 ポリペプチド、修飾された IL-2 ポリペプチドおよび修飾された IL-7 ポリペプチド、修飾された IL-2 ポリペプチドおよび修飾された IL-18 ポリペプチド、または修飾された IL-7 ポリペプチドおよび修飾された IL-18 ポリペプチドを含む、請求項 75～86 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 89】

PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチド、または前記抗 PD-1 抗体もしくは抗原結合断片が、組換えポリペプチドまたは合成ポリペプチドを含む、請求項 1～88 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 90】

医薬組成物であって、

20

- a) 請求項 1～89 のいずれか一項に記載の組成物と、
- b) 1 つ以上の薬学的に許容され得る担体または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 91】

前記医薬組成物が経口投与または経腸投与のために製剤化される、請求項 90 に記載の医薬組成物。

【請求項 92】

前記医薬組成物が静脈内投与または皮下投与のために製剤化される、90 または 91 に記載の医薬組成物。

【請求項 93】

前記医薬組成物が凍結乾燥形態である、請求項 90～92 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 94】

前記 1 つ以上の薬学的に許容され得る担体または賦形剤が、糖質、無機塩、抗酸化剤、界面活性剤、緩衝剤、またはそれらの任意の組み合わせの各々の 1 つ以上を含む、請求項 90～93 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 95】

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える賦形剤を含む、請求項 90～94 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 96】

癌の処置を必要とする被験体において癌を処置する方法であって、有効量の請求項 1～89 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 90～95 のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記被験体に投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 97】

前記癌が、癌腫、肉腫、またはそれらの組み合わせである、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記癌が前記癌腫であり、前記癌腫は、皮膚扁平上皮癌 (CSCC)、尿路上皮癌 (UC)、腎細胞癌 (RCC)、肝細胞癌 (HCC)、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、食道扁平上皮癌 (ESCC)、胃食道接合部 (GEJ) 癌、子宮内膜癌 (EC)、メルケル細胞癌 (MCC)、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 97 に記載の方法。

50

【請求項 99】

前記癌が、黒色腫、肺癌、膀胱癌（BC）、マイクロサテライト不安定性高（MSI-H）／ミスマッチ修復欠損（dMMR）固形腫瘍、腫瘍変異負荷高（TMB-H）固形腫瘍、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、胃癌（GC）、子宮頸癌（CC）、胸膜中皮腫（PM）、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）、原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）、またはそれらの組み合わせである、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 100】

請求項 1～89 のいずれか一項に記載の組成物を作製する方法であって、

a) PD-1 に選択的に結合するポリペプチドの特定の残基に反応性基を共有結合させるステップと、

b) 前記反応性基を、サイトカインに結合した相補的な反応性基と接触させるステップと、

c) 前記組成物を形成するステップとを含む、方法。

【請求項 101】

組成物を作製する方法であって、

プログラム細胞死タンパク質 1（PD-1）に選択的に結合するポリペプチドと、修飾された IL-2 ポリペプチドと、リンカーと

を含み、前記リンカーは、

修飾された IL-2 ポリペプチドの非末端残基に共有結合した第 1 の結合点と、

PD-1 に選択的に結合する前記ポリペプチドに共有結合した第 2 の結合点とを含み、前記方法は、

a) カップリング酵素の存在下でリンカーと反応性である少なくとも 1 つの受容体アミノ酸残基を有する抗 PD-1 抗体または抗原結合断片を提供するステップと、

b) 前記抗体または抗原結合断片と、第一級アミンを含むリンカーであって、前記リンカーは反応性基（R）を含む、リンカーとの反応を、前記少なくとも 1 つの受容体アミノ酸残基と前記リンカーとの間の共有結合の形成を引き起こすことができる酵素の存在下で行うステップと

を含み、

前記共有結合は、前記 R 部分には存在せず、

前記方法は、前記少なくとも 1 つの受容体アミノ酸残基が前記リンカーを介して前記反応性基に共有結合を形成するのに十分な条件下で実施され、前記共有結合は、前記リンカーの前記第 2 の結合点を含む、方法。

【請求項 102】

前記酵素がトランスアミナーゼを含む、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記酵素がトランスグルタミナーゼを含む、請求項 102 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

相互参照

本出願は、2021 年 7 月 9 日に出願された米国仮特許出願第 63／219,981 号、および 2021 年 7 月 9 日に出願された米国仮特許出願第 63／219,989 号の利益を主張するものであり、これらの出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

2021 年には、米国で推定 180 万人の新規癌症例が診断され、600,000 人を超える人々がこの疾患で死亡する。免疫療法は、疾患の処置を支援するために被験体の免疫系を利用する。免疫療法は、処置される疾患の性質に応じて免疫系を活性化または抑制

10

20

30

40

50

するように設計することができる。癌の処置のための様々な免疫療法の目標は、免疫系を刺激し、そうして腫瘍または他の癌性組織を認識して破壊することである。

【0003】

プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) は、免疫系を下方制御し、T細胞炎症活性を抑制することによって自己寛容を促進することによって、人体の細胞に対する免疫系の応答を制御する細胞表面のタンパク質である。プログラム細胞死リガンド1 (PD-L1) は、免疫系の適応アームを抑制する1型膜貫通タンパク質である。PD-1およびPD-L1経路は、内因性免疫抗腫瘍活性に応答して腫瘍細胞によって発揮される適応免疫系耐性機構を表す。PD-1阻害剤、例えば抗PD-1ポリペプチドおよび抗PD-1抗原結合断片は、PD-1免疫チェックポイントタンパク質の活性を遮断するチェックポイント阻害剤抗癌剤である。しかしながら、単剤療法単独では、多くの場合、癌患者において持続的奏功を得るには不十分である。したがって、癌を処置するための改善された治療法が必要とされている。

10

【発明の概要】

【0004】

抗プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) -インターロイキン2 (IL2) イムノコンジュゲートおよびその使用が本明細書に記載される。

【0005】

一態様において、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、リンカーとを含み、該リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドの非末端残基に共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドに共有結合した第2の結合点とを含む、組成物が本明細書に記載される。

20

【0006】

一態様において、PD-1に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、リンカーとを含み、該リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドに共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドの非末端残基に共有結合した第2の結合点とを含む、組成物が本明細書に記載される。

【0007】

別の態様において、PD-1に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、化学的リンカーとを含み、該化学的リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドに共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドに共有結合した第2の結合点とを含む、組成物が本明細書に記載される。

30

【0008】

別の態様において、PD-1に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、化学的リンカーとを含み、該化学的リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドに共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドに共有結合した第2の結合点とを含み、該修飾されたIL-2ポリペプチドは、IL-2受容体βサブユニットに付勢されている、組成物が本明細書に記載される。

【0009】

別の態様において、IL-2ポリペプチドを含む組成物であって、該IL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基42に結合した第1のポリマーであって、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号1に基づく、第1のポリマーと、プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に選択的に結合するポリペプチドとを含む、組成物が本明細書に記載される。

40

【0010】

別の態様において、(a) プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に選択的に結合し、かつFc領域を含み、該Fc領域が、配列番号105と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメントと、(b) 1つ以上のリンカーであって、(i) 配列番号105の25~35位；(ii) 配列番号105の70~80位

50

；および（i i i）配列番号105の95～105位からなる群より選択されるアミノ酸残基においてFc領域に共有結合した1つ以上のリンカーと、（c）該リンカーに共有結合した1つ以上のサイトカインとを含む、組成物が本明細書に記載される。

【0011】

別の態様では、（a）PD-1に選択的に結合し、かつFc領域を含む抗体またはその抗原結合断片と、（b）K246、K248、K288、K290、およびK317（Euナンバリング）からなる群より選択されるアミノ酸残基においてFc領域に共有結合した1つ以上のリンカーと、（c）該1つ以上のリンカーに共有結合した1つ以上のサイトカインとを含む、組成物が本明細書に記載される。

【0012】

PD-1に選択的に結合するポリペプチドは、例えば、抗体などの組換えタンパク質、または合成タンパク質であり得る。

【0013】

別の態様では、a）本明細書に記載される組成物と、b）1つ以上の薬学的に許容され得る担体または賦形剤とを含む、医薬組成物が本明細書に記載される。

【0014】

別の態様では、癌の処置を必要とする被験体において癌を処置する方法であって、該方法は、有効量の明細書に記載される任意の組成物または本明細書に記載される医薬組成物を被験体に投与するステップを含む、方法が本明細書に記載される。

【0015】

別の態様において、本明細書に記載される組成物を製造する方法であって、該方法は、a）PD-1に選択的に結合するポリペプチドの特定の残基に反応性基を共有結合させるステップと、b）反応性基を、サイトカインに結合した相補的な反応性基と接触させるステップと、c）組成物を形成するステップとを含む、方法が本明細書に記載される。

【0016】

別の態様において、組成物を作製する方法であって、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、リンカーとを含み、該リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドの非末端残基に共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドに共有結合した第2の結合点とを含み、該方法は、a）カップリング酵素の存在下でリンカーと反応性である少なくとも1つの受容体アミノ酸残基を有する抗PD-1抗体または抗原結合フラグメントを提供するステップと、b）該抗体または抗原結合断片と、第一級アミンを含むリンカーであって、該リンカーは反応性基（R）を含む、リンカーとの反応を、少なくとも1つの受容体アミノ酸残基とリンカーとの間の共有結合の形成を引き起こすことができる酵素の存在下で行うステップとを含み、該共有結合は、R部分には存在せず、該方法は、少なくとも1つの受容体アミノ酸残基がリンカーを介して反応性基に共有結合を形成するのに十分な条件下で実施され、該共有結合は、リンカーの第2の結合点を含む、方法が本明細書に記載される。

【0017】

別の態様において、組成物を作製する方法であって、PD-1に選択的に結合するポリペプチドと、修飾されたIL-2ポリペプチドと、リンカーとを含み、該リンカーは、修飾されたIL-2ポリペプチドの残基に共有結合した第1の結合点と、PD-1に選択的に結合するポリペプチドに共有結合した第2の結合点とを含み、該方法は、a）官能基化Fc結合アフィニティーペプチドの存在下でリンカーと反応性である少なくとも1つの受容体アミノ酸残基を有するPD-1に選択的に結合するポリペプチドを提供するステップと、b）PD-1に選択的に結合する上記ポリペプチドを、受容体アミノ酸残基と結合することができる反応性基（R）を含むリンカー前駆体と反応させるステップとを含み、該方法は、少なくとも1つの受容体アミノ酸残基がリンカーを介して反応性基に共有結合を形成するのに十分な条件下で実施され、該共有結合は、リンカーの第2の結合点を含む、方法が本明細書に記載される。

【0018】

本開示の更なる態様および利点は、本開示の例示的な実施形態のみが示され説明される以下の詳細な説明から当業者には容易に明らかになるであろう。理解されるように、本開示は、他の様々な実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、すべて本開示から逸脱することなく、種々の明白な点で修正が可能である。したがって、図面および説明は、本質的に例示とみなされるべきであり、限定とみなされるべきではない。

参照による組み込み

【0019】

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる刊行物および特許もしくは特許出願が本明細書に含まれる開示と矛盾する限りにおいて、本明細書は、そのような矛盾する資料に取って代わり、かつ／または優先されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】本開示の抗PD1-IL2イムノサイトカインおよび抗PD1-IL2イムノサイトカインと活性化T細胞とのIL2R β / γ 上方制御およびPD-1阻害を介した相互作用を示す図である。

【図1B】修飾されたコンジュゲート可能なサイトカイン組成物ABの構造を示す図である。

【図2A】1つまたは2つのコンジュゲーションハンドルを導入するための化学修飾技術による抗PD1抗体の部位選択的修飾を示す図である。

【図2B】ペムブロリズマブおよびDBCOコンジュゲーションハンドルを有する修飾されていないペムブロリズマブのQ-TOF質量スペクトルを示す図である。

【図2C】DAR1、DAR2または1~2の混合DARを有するPD1-IL2を生成するための修飾されたIL2サイトカインの部位選択的コンジュゲーションを示す図である。

【図2D】粗ペムブロリズマブおよび組成物ABコンジュゲーション反応のTICクロマトグラム（上）およびインタクトRP-HPLC（下）プロファイルを示す図である。

【図2E】薬物-抗体比1（DAR1）および薬物-抗体比2（DAR2）の種の形成を示す、組成物ABコンジュゲーション反応にコンジュゲートされた粗ペムブロリズマブのQ-TOF質量スペクトルプロファイルを示す図である。

【図2F】組成物ABにコンジュゲートされた精製ペムブロリズマブのインタクトRP-HPLC（左上）プロファイルを示す図である。

【図2G】混合薬物-抗体比（DAR）を有する組成物ABにコンジュゲートされた精製ペムブロリズマブのQ-TOF質量スペクトルプロファイルを示す図である。

【図2H】組成物ABにコンジュゲートされたペムブロリズマブを含む精製イムノサイトカインのSEC-HPLCを示す図である。

【図3】PD1/CD279リガンドと結合する修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を測定するプロットを示す図であり、この図は、ELISAシグナルをy軸上に示し、ビオチン化PD-1タンパク質の投薬量をx軸上に示す。コンジュゲートされていない参照抗体は、ペムブロリズマブ、ニボルマブおよびLZM-009である。この図において試験されたコンジュゲートされた抗体は、組成物A、C、D、E、F、G、およびHである。

【図4】PD1/PDL1経路を妨害する修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を測定するプロットを示す図であり、この図は、エフェクター細胞NFA-TREレポーターの平均発光強度をy軸上に示し、修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の投薬量をx軸上に示す。コンジュゲートされていない参照抗体はペムブロリズマブであり、この図において試験されたコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートされた抗体は組成物 B である。この図において試験された I L - 2 ポリペプチドは、プロロイキンおよび組成物 A A である。

【図 5】p H 6 でヒト新生児型 F c 受容体 (F c R n) に結合する修飾されていない抗 P D 1 抗体およびコンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の能力を測定するプロットを示す図であり、この図は、平均 A l p h a L I S A (登録商標) F c R n - I g G シグナルを y 軸上に示し、修飾されていない抗 P D 1 抗体およびコンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の投薬量を x 軸上に示す。コンジュゲートされていない参照抗体は、ペムブロリズマブおよび L Z M - 0 0 9 である。試験されたコンジュゲートされた抗体は、組成物 A、D、E、H、J、および K である。

【図 6 A】ヒト F c ガンマ受容体 I (C D 6 4)、ヒト F c ガンマ受容体 I I a (C D 3 2 a)、ヒト F c ガンマ受容体 I I b (C D 3 2 b)、およびヒト F c ガンマ受容体 I I I a (C D 1 6) に結合する修飾されていない抗 P D 1 抗体およびコンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の能力を測定するプロットを示す図であり、この図は、平均 E L I S A シグナルを y 軸上に示し、修飾されていない抗 P D 1 抗体およびコンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の投薬量を x 軸上に示す。コンジュゲートされていない参照抗体は、ペムブロリズマブおよび L Z M - 0 0 9 である。試験されたコンジュゲートされた抗体は、組成物 A、C、D、および H である。

【図 6 B】ヒト F c ガンマ受容体 I (C D 6 4)、ヒト F c ガンマ受容体 I I a (C D 3 2 a)、ヒト F c ガンマ受容体 I I b (C D 3 2 b)、およびヒト F c ガンマ受容体 I I I a (C D 1 6) に結合するコンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の能力を測定するプロットを示す図であり、この図は、平均 E L I S A シグナルを y 軸上に示し、コンジュゲートされた抗 P D 1 抗体の投薬量を x 軸上に示す。上から下まで試験されたコンジュゲートされた抗体組成物は、それぞれ組成物 E、J、および K である。

【図 7 A】親非形質導入 M o 7 e (P D 1 -) および安定に形質導入された (P D 1 +) M o 7 e 細胞上の P D - 1 / C D 2 7 9 の表面発現レベルを測定するプロットを示す図である。

【図 7 B】x 軸上に記載されるように、修飾された I L - 2 ポリペプチドまたはイムノサイトカインの処理による、「P D 1 -」としての親 P D 1 - M o 7 e 細胞または「P D 1 +」としての安定な P D 1 + M o 7 e 細胞における y 軸上のリン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (p S T A T 5) の E C 5 0 値を示す図である。P D 1 陰性細胞について示されている測定値は黒塗りの記号で示されており、P D 1 陽性細胞は灰色の白抜き記号で示されている。この図において試験されたコンジュゲートされていない修飾された I L - 2 ポリペプチドは、プロロイキン、および組成物 A B である。修飾された I L - 2 抗 P D - 1 イムノサイトカインは、組成物 A、C、および H である。H e r 2 標的 I L - 2 イムノサイトカインである組成物 O を陰性対照として示す。

【図 8】インビトロでのヒト T 細胞における T e f f および T r e g 細胞の誘導に及ぼす抗 P D 1 抗体にコンジュゲートされていない修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾された I L - 2 ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図である。x 軸上の修飾された I L - 2 ポリペプチドまたはイムノサイトカインに対する用量反応性としての y 軸上のリン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (p S T A T 5) の平均蛍光強度を示している。試験された修飾された I L - 2 ポリペプチドは、組成物 A A である。試験された I L - 2 抗 P D - 1 イムノサイトカインは、組成物 A、B、および C である。

【図 9 A】健常ドナーの末梢血から新たに単離された静止期メモリー (C D 4 5 R A -) およびナイーブ (C D 4 5 R A +) C D 8 + T e f f 細胞上の P D - 1 / C D 2 7 9 の表面発現レベルを測定するプロット、ならびに示された細胞型のイラストを示す図である。

【図 9 B】C D 8 + T e f f 細胞に及ぼす P D - 1 への I L - 2 のコンジュゲートの用量反応効果を示す図である。ヒト T 細胞のインビトロサンプルにおける静止期メモリー (C D 4 5 R A -) およびナイーブ (C D 4 5 R A +) C D 8 + T e f f 細胞の誘導に及ぼす抗 P D 1 抗体にコンジュゲートされていない修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびコン

10

20

30

40

50

ジュゲートされた修飾された I L - 2 ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図であり、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (p S T A T 5) の平均蛍光強度を y 軸上に示し、修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量を x 軸上に示す。この図において試験された修飾された I L - 2 ポリペプチドは、組成物 A A である。この図において試験された I L - 2 抗 P D - 1 イムノサイトカインは、組成物 B である。H e r 2 標的化イムノサイトカイン組成物 N (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) を陰性対照として示す。

【図 10 A】過剰量のコンジュゲートされていない抗 P D 1 抗体ペムブロリズマブの存在下または非存在下でヒト T 細胞のインビトロサンプルにおける静止期ナイーブ (C D 4 5 R A +) C D 8 + T e f f 細胞の誘導に及ぼす抗 P D 1 抗体にコンジュゲートされていない修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾された I L - 2 ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図であり、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (p S T A T 5) の平均蛍光強度を y 軸上に示し、修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量を x 軸上に示す。この図において試験された修飾された I L - 2 ポリペプチドは、組成物 A A であり、この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物 B および対照としての H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 N (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) である。

【図 10 B】過剰量のコンジュゲートされていない抗 P D 1 抗体ペムブロリズマブの存在下または非存在下でヒト T 細胞のインビトロサンプルにおける静止期メモリー (C D 4 5 R A -) C D 8 + T e f f 細胞の誘導に及ぼす抗 P D 1 抗体にコンジュゲートされていない修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾された I L - 2 ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図であり、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子 5 (p S T A T 5) の平均蛍光強度を y 軸上に示し、修飾された I L - 2 ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量を x 軸上に示す。この図において試験された修飾された I L - 2 ポリペプチドは、組成物 A A であり、この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物 B および対照としての H e r 2 標的化イムノサイトカイン組成物 N (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) である。

【図 11 A】h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスにおける C T 2 6 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (平均 ± S E M) 。

【図 11 B】処置 7 日後の h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスにおける C T 2 6 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明する棒グラフを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (平均 ± S E M ; * * - 元配置 A N O V A P 値 < 0 . 0 0 1) 。

【図 12 A】処置 7 日後の C T 2 6 腫瘍を有する h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスの血液および腫瘍におけるナイーブ (C D 6 2 L h i g h C D 4 4 L o w) C D 8 + T 細胞の拡大に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (n = 3 ; 平均 ± S E M) 。

【図 12 B】処置 7 日後の C T 2 6 腫瘍を有する h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスの血

10

20

30

40

50

液および腫瘍におけるエフェクターメモリー（CD62L^{陰性}CD44^{high}）CD8⁺T細胞の拡大に及ぼすPD-1標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に1mg/kgおよび2.5mg/kgで単剤として試験された組成物Aである。対照Her2標的イムノサイトカイン組成物O（IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体）も2.5mg/kgで試験された（n=3；平均±SEM）。

【図13A】イムノサイトカインのPD-1標的化および非標的化が、CT26腫瘍を有するhPD1ヒト化BALB/cマウスの血液および腫瘍におけるそれらの持続性に及ぼす効果を説明するプロットを示す図であり、この図は、PD-1標的化イムノサイトカインおよび対照イムノサイトカインの血漿または腫瘍濃度をy軸上に示し、時間をx軸上に示す。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に1mg/kgおよび2.5mg/kgで単剤として試験された組成物Aである。対照Her2標的イムノサイトカイン組成物O（IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体）も2.5mg/kgで試験された（n=3；平均±SD）。

【図13B】PD-1標的化が7日間にわたって腫瘍内のPD1-IL2イムノサイトカインの漸進的な蓄積をどのようにもたらすかを示す図である。対照的に、非標的化対照イムノサイトカイン（Her2-IL2）は、腫瘍内蓄積を示さず、4日以内に消失する。CT26腫瘍を有するhPD1ヒト化BALB/cマウスにおいて分析を実施し、PD-1標的化イムノサイトカインおよび対照イムノサイトカインの腫瘍/血漿濃度の比をy軸上に示し、時間をx軸上に示す。分析されたイムノサイトカインは、単回適用後に1mg/kgおよび2.5mg/kgで単剤として試験された組成物Aである。対照Her2標的イムノサイトカイン組成物O（IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体）が2.5mg/kgで試験された（n=3；平均±SEM）。

【図14A】hPD1 C57BL/6マウスにおけるMC38同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼすコンジュゲートされた抗PD1抗体の単回注射の効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射として1mg/kgで単剤として試験された組成物Hである（n=8；平均±SEM）。

【図14B】処置7日後のhPD1 C57BL/6マウスにおけるMC38同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼすコンジュゲートされた抗PD1抗体の単回注射の効果を説明する棒グラフを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、1mg/kgの単回注射で単剤として試験された組成物Hである（n=8匹の動物；平均±SEM；*一元配置ANOVA P値<0.005）。

【発明を実施するための形態】

【0021】

抗PD-1ポリペプチドが本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、サイトカインなどの細胞シグナル伝達分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、サイトカインはIL-2である。図1Aは、IL-2サイトカインにコンジュゲートされた抗PD-1ポリペプチドを含む例示的なイムノサイトカインを示す。本開示の抗PD-1抗体/IL-2イムノサイトカイン（本明細書ではPD1-IL2と呼ぶ）は、優れた有効性および被験体による潜在的に改善された忍容性を有し得る。いくつかの実施形態では、本開示の抗PD-1-IL2イムノサイトカインは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を直接標的とすることができる。いくつかの実施形態では、抗PD-1-IL2イムノサイトカインは、癌などの疾患を有する被験体に対する抗PD-1ポリペプチドまたはIL-2の治療用量を有意に減少させることができる。

【0022】

抗PD-1-IL2イムノサイトカインは、1つ以上の作用機序によって作用し得る。いくつかの実施形態では、抗PD-1-IL2イムノサイトカインは、腫瘍内のPD-1およびCD8⁺T細胞を標的とすることによってPD-1を阻害することができる。いくつかの実施形態では、抗PD-1-IL2イムノサイトカインは、IL-2Rβγ

を介してT細胞およびNK細胞を活性化することができる。

以下の説明および実施例は、本開示の実施形態を詳細に例示する。本開示は、本明細書に記載される特定の実施形態に限定されず、したがって変化し得ることを理解されたい。当業者は、本開示の範囲内に包含される、本開示の多数の変形および修正が存在することを認識するであろう。

【0023】

本開示の様々な特徴は、単一の実施形態の文脈で記載され得るが、これらの特徴は、別個にまたは任意の適切な組み合わせでも提供され得る。逆に、本開示は、明確にするために別個の実施形態の文脈で本明細書に記載され得るが、本開示は、単一の実施形態でも実施され得る。

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためだけであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

定義

【0024】

すべての用語は、それらの用語が当業者によって理解されるとおりに理解されることが意図される。特段の規定がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および化学用語は、本開示が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

【0025】

以下の定義は、当該技術分野における定義を補足し、現行出願を対象とするものであり、関連するまたは関連のない事例、例えば、共同所有される特許または出願に帰属されるべきではない。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料を本開示の試験の実施に使用することができるが、好ましい材料および方法が本明細書に記載される。したがって、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図するものではない。

【0026】

したがって、本明細書で使用される用語は、特定の事例を説明することのみを目的としており、限定することを意図するものではない。本出願では、単数形の使用は、特段明記しない限り、複数形の使用を含む。本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上明らかに別異に解される場合を除き、複数形も含むことが意図される。

本出願では、「または」の使用は、特段明記しない限り、「および／または」を意味する。本明細書で使用される「および／または」および「それらの任意の組み合わせ」という用語ならびにそれらの文法上の等価物は、互換的に使用することができる。これらの用語は、任意の組み合わせが具体的に企図されることを伝えることができる。単に例示を目的として、以下の語句「A、B、および／またはC」または「A、B、C、またはそれらの任意の組み合わせ」は、「Aを個別に；Bを個別に；Cを個別に；AおよびB；BおよびC；AおよびC；ならびにA、B、およびC」を意味し得る。「または」という用語は、文脈が特に離散的な使用を指す場合を除き、接続的または離散的に使用することができる。

【0027】

「約 (about)」または「およそ (approximately)」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容され得る誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の慣例に従って、1標準偏差以内または1標準偏差超を意味することができる。代替的に、「約 (about)」とは、所与の値の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、または最大1%の範囲を意味し得る。代替的に、特に生物学的系システムまたは生物学的プロセスに関しては、この用語は、値の1桁以内、5倍以内、または2倍以内を意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、特段明記しない限り、「約」という用語は、特定の値について許容され得る誤差範囲内であることを意味している。

【0028】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、「含む (comprising)」(ならびに「含む (comprise)」および「含む (comprises)」などの含む (comprising) の任意の形態)、「有する (having)」(ならびに「有する (have)」および「有する (has)」などの having (有する) の任意の形態)、「含む (including)」(ならびに「含む (includes)」および「含む (include)」などの含む (including) の任意の形態)または「含有する (containing)」(ならびに「含有する (contains)」および「含有する (contain)」などの含有する (containing) の任意の形態)は、包括的またはオープンエンドであり、追加の列挙されていない要素または方法ステップを排除しない。本明細書で論じられる任意の実施形態は、本開示の任意の方法または組成物に関して実施することができ、逆もまた同様であると企図される。さらに、本開示の組成物は、本開示の方法を達成するために使用することができる。

10

【0029】

本明細書における「いくつかの実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」または「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して説明される特定の特徴、構造、または特性が、本開示の少なくともいくつかの実施形態に含まれるが、必ずしもすべての実施形態に含まれるわけではないことを意味する。本開示の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下に定義する。

【0030】

IL-2 ポリペプチドの残基に「結合した」または「共有結合した」基が本明細書で言及される。本明細書で使用される場合、「結合した」または「共有結合した」とは、その基が示された残基に係留されていることを意味し、そのような係留は連結基(すなわち、リンカー)を含み得る。したがって、残基に「結合した」または「共有結合した」基の場合、そのような連結基も包含されることが明確に企図される。

20

【0031】

結合アフィニティーは、単一分子とそのリガンド／結合パートナーとの間の結合相互作用の強度を指す。より高い結合アフィニティーは、より低い結合アフィニティーよりも高い強度の結合を指す。場合によっては、結合アフィニティーは、2つの関連分子間の解離定数 (K_D) によって測定される。 K_D 値を比較する場合、より低い値を有する結合相互作用は、より高い値を有する結合相互作用よりも高い結合アフィニティーを有する。タンパク質-リガンド相互作用の場合、 K_D は、以下の式に従って計算される。

30

【0032】

【数1】

$$K_D = \frac{[L][P]}{[LP]}$$

40

式中、[L] はリガンドの濃度であり、[P] はタンパク質の濃度であり、[LP] はリガンド／タンパク質複合体の濃度である。

【0033】

本明細書では、参照配列に対して特定のパーセント配列同一性を有するか、または参照配列の位置に対応する位置の残基を指す特定のアミノ酸配列(例えば、ポリペプチド配列)を指す。配列同一性は、Matrix BLOSUM62, Gap Costs Existence: 11, Extension: 1、および Compositional Adjustments Conditional Compositional Sc

50

ore Matrix Adjustmentのパラメーターを使用して、タンパク質-タンパク質BLASTアルゴリズムによって測定される。このアライメントアルゴリズムはまた、比較される2つの配列のアライメントの分析を通じて残基が「対応する」位置にあるかどうかを評価するために使用される。

【0034】

「薬学的に許容され得る」という用語は、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって承認されているかもしくは認可されたものであるか、またはヒトを含む動物における使用のために米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されているものを指す。

【0035】

「薬学的に許容され得る賦形剤、担体または希釈剤」とは、薬剤とともに被験体に投与することができ、その薬理活性を破壊せず、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与した場合に非毒性である賦形剤、担体または希釈剤を指す。

【0036】

本開示に適した「薬学的に許容され得る塩」は、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしにヒトまたは動物の組織と接触して使用するのに適していると当該技術分野で一般的に考えられている酸塩または塩基塩であり得る。そのような塩には、アミンなどの塩基性残基の無機塩および有機酸塩、ならびにカルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩が含まれる。特定の薬学的な塩には、酸、例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、リンゴ酸、グリコール酸、フマル酸、硫酸、スルファミン酸、スルファニル酸、ギ酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエチルスルホン酸、硝酸、安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ステアリン酸、サリチル酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、パモ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、プロピオン酸、ヒドロキシマレイン酸、ヨウ化水素酸、フェニル酢酸、アルカン酸、例えば酢酸、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ [式中、 n は0~4である]の塩が含まれるが、これらに限定されない。同様に、薬学的に許容され得るカチオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウムおよびアンモニウムが含まれるが、これらに限定されない。当業者は、本開示および当該技術分野の知識から、更なる薬学的に許容され得る塩には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985)で列挙されたものが含まれることを認識するであろう。一般に、薬学的に許容され得る酸塩または塩基塩は、任意の従来化学的方法によって、塩基性部分または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。簡潔には、そのような塩は、これらの化合物の遊離酸または遊離塩基形態を適切な溶媒中で化学量論量の適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができる。

【0037】

本明細書で提供される範囲は、その範囲内の値のすべてに対する省略表現であると理解される。例えば、1~50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50、ならびに例えば1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、および1.9などの前述の整数間のすべての介在する十進値からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または部分範囲を含むものと理解される。部分範囲に関して、その範囲のいずれかの終点から延びる「入れ子状部分範囲」が特に企図される。例えば、1~50の例示的な範囲の入れ子状部分範囲は、一方の方向に1~10、1~20、1~30および1~40、または他方の方向に50~40、50~30、50~20、および50~10を含み得る。

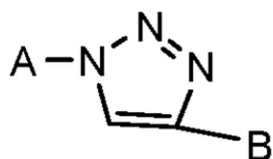
【0038】

本明細書で提供される特定の式および他の例示は、アジド-アルキン環化付加反応から

結果生じるトリアゾール反応生成物を示す。そのような式は、一般に、反応で形成された結果生じるトリアゾールの単一の位置異性体のみを示すが、この式は両方の結果生じる位置異性体を包含することが意図される。したがって、式は、単一の位置異性体（例えば、

【 0 0 3 9 】

【化 1】

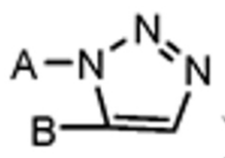


10

）のみを示しているが、他の位置異性体（例えば、

【 0 0 4 0 】

【化 2】



）も包含されることが意図される。

【 0 0 4 1 】

20

「被験体」という用語は、処置、観察、または実験の対象である動物を指す。ほんの一例として、被験体には、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ウシ亜科、ウマ科、イヌ科、ヒツジ科、またはネコ科が含まれるがこれらに限定されない哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 2 】

「任意選択の」または「必要に応じて」とは、後に説明される事象または状況が生じてもよいが、生じなくてもよいことを意味し、その説明は事象もしくは状況が生じる場合の例、または事象もしくは状況が生じない場合の例を含むことを示す。

【 0 0 4 3 】

「部分」という用語は、分子の特定のセグメントまたは官能基を指す。化学部分は、分子に埋め込まれたまたは付加された化学的実体として認識されることが多い。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、「数平均分子量」（ M_n ）という用語は、サンプル中のすべての個々の単位の統計的平均分子量を意味し、式（1）：

【 0 0 4 5 】

【数 2】

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

40

式（1）

式（1）

によって定義され、

式中、 M_i は単位の分子量であり、 N_i はその分子量の単位数である。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、「重量平均分子量」（ M_w ）という用語は、式（2）：

【 0 0 4 7 】

【数 3】

50

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

式 (2)

式 (2)

によって定義される数を意味し、

式中、 M_i は単位の分子量であり、 N_i はその分子量の単位数である。

10

【0048】

本明細書で使用される場合、「ピーク分子量」(M_p)とは、所与の分析方法（例えば、質量分析、サイズ排除クロマトグラフィー、動的光散乱、分析遠心分離など）における最高ピークの分子量を意味する。

【0049】

本明細書で使用される場合、「非標準」アミノ酸は、天然に存在するタンパク質に一般に組み込まれる20個の標準的なアミノ酸の中にはないD型またはL型のアミノ酸残基を指すことができる。

20

【0050】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲーションハンドル (conjugation handle)」とは、相補的な反応性基と接触すると結合を形成することができる反応性基を指す。場合によっては、コンジュゲーションハンドルは、好ましくは、意図される相補的な反応性基を含まない他の分子との実質的な反応性を有しない。コンジュゲーションハンドル、それらのそれぞれの相補的なコンジュゲーションハンドル、および対応する反応生成物の非限定的な例は、下記の表に見出すことができる。表の見出しは、「コンジュゲーションハンドル」または「相補的なコンジュゲーションハンドル」というタイトルの下に特定の反応性基を列挙しているが、コンジュゲーションハンドルへの任意の言及は、代わりに、表に列記されている相補的なコンジュゲーションハンドル（例えば、トランス-シクロオクテンはコンジュゲーションハンドルであってもよく、この場合、テトラジンは相補的なコンジュゲーションハンドルである）を包含し得ることを意図している。場合によっては、アミンコンジュゲーションハンドルおよびアミンに相補的なコンジュゲーションハンドルは、生物学的系におけるアミンの遍在的存在および標的外コンジュゲーションの可能性の増加のために、生物学的系における使用にあまり好ましくない。

30

【0051】

40

50

【表 1】

コンジュゲーションハンドルの表

コンジュゲーション ハンドル	相補的なコンジュゲーションハンドル	反応生成物
スルフヒドリル	α -ハローカルボニル（例えば、プロモアセトアミド）、 α - β 不飽和カルボニル（例えば、マレイミド、アクリルアミド）	チオエーテル
アジド	アルキン（例えば、末端アルキン、置換シクロオクチン（例えば、ジベンゾシクロオクチン（DBCO）、ジフルオロシクロオクチン、ビスクロ[6, 1, 0]ノニンなど）	トリアゾール
ホスフィン	アジド/エステル対	アミド
テトラジン	trans-シクロオクテン	ジヒドロピリダジン
アミン	活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル）	アミド
イソシアネート	アミン	尿素
エポキシド	アミン	アルキルアミン
ヒドロキシルアミン	アルデヒド、ケトン	オキシム
ヒドラジド	アルデヒド、ケトン	ヒドラゾン
アシルトリフルオロ ホウ酸カリウム	O-置換ヒドロキシルアミン（例えば、O-カルバモイルヒドロキシルアミン）	アミド

10

20

【0052】

本出願を通して、「コンジュゲーション」という用語の前に接頭辞を使用して、コンジュゲーションハンドルが連結される機能を示す。例えば、「タンパク質コンジュゲーションハンドル」は、タンパク質に（直接またはリンカーを介して）結合したコンジュゲーションハンドルであり、「抗体コンジュゲーションハンドル」は、抗体に（直接またはリンカーを介して）結合したコンジュゲーションハンドルであり、「リンカーコンジュゲーションハンドル」は、リンカー基に結合したコンジュゲーションハンドルである（例えば、合成タンパク質と抗体とを連結するために使用される二官能性リンカー）。

30

【0053】

「アルキル」という用語は、1～20個の炭素原子を有し、かつ単結合によって分子の残りに結合している直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖ラジカルを指す。最大10個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルと呼ばれ、同様に、例えば、最大6個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_6$ アルキルと呼ばれる。他の数の炭素原子を含むアルキル（および本明細書で定義される他の部分）も同様に表される。アルキル基には、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_1 \sim C_9$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_5$ アルキル、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_2$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ アルキルおよび $C_4 \sim C_8$ アルキルが含まれるが、これらに限定されない。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、n-プロピル、1-メチルエチル、n-ブチル、n-ペンチル、1,1-ジメチルエチル、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、1-エチル-n-プロピルなどが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキルは、メチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、アルキルは、 $-CH(CH_3)_2$ または $-C(CH_3)_3$ である。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、ハロアルキル基は必要に応じて置換されていてもよい。「アルキレン」または「アルキレン鎖」とは、分子の残りをラジカル基に連結する直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖を指す。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態

40

50

では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、ハロアルキル基は必要に応じて置換されていてもよい。

【0054】

「アルケニレン」または「アルケニレン鎖」という用語は、分子の残りをラジカル基に連結する少なくとも1つの炭素-炭素二重結合が存在する直鎖または分岐鎖の二価炭化水素鎖を指す。いくつかの実施形態では、アルケニレンは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、または $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ である。いくつかの実施形態では、アルケニレンは、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ である。

10

【0055】

「アルキニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合が存在するタイプのアルキル基を指す。一実施形態では、アルケニル基は、式 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}^x$ を有し、式中、 R^x は、アルキニル基の残りの部分を指す。いくつかの実施形態では、 R^x は、Hまたはアルキルである。いくつかの実施形態では、アルキニルは、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルなどから選択される。アルキニル基の非限定的な例としては、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_3$ 、および $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ が挙げられる。

20

【0056】

「アリール」という用語は、環を形成する原子の各々が炭素原子である少なくとも1つの芳香族環を含むラジカルを指す。アリール基は必要に応じて置換されていてもよい。アリール基の例としては、フェニルおよびナフチルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アリールはフェニルである。構造に応じて、アリール基はモノラジカルまたはジラジカル（すなわち、アリーレン基）であり得る。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、「アリール」という用語または接頭辞「ar-」（「アラルキル」など）は、必要に応じて置換されているアリールラジカルを含むことを意味する。いくつかの実施形態では、アリール基は、本明細書で定義される部分的に還元されたシクロアルキル基（例えば、1,2-ジヒドロナフタレン）を含む。いくつかの実施形態では、アリール基は、本明細書で定義される完全に還元されたシクロアルキル基（例えば、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン）を含む。アリールがシクロアルキル基を含む場合、アリールは芳香族環炭素原子を介して分子の残りの部分に結合している。アリールラジカルは、縮合、スピロまたは架橋環系を含み得る単環式または多環式（例えば、二環式、三環式もしくは四環式）環系であり得る。

30

【0057】

「シクロアルキル」とは、環を形成する原子（すなわち、骨格原子）の各々が炭素原子である、単環式もしくは多環式非芳香族ラジカルを指す。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、飽和または部分的に不飽和である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、スピロ環式化合物または架橋化合物である。いくつかの実施形態において、シクロアルキルは芳香族環と縮合していてもよい（この場合、シクロアルキルは非芳香族環炭素原子を介して結合している）。シクロアルキル基には、3~10個の環原子を有する基が含まれる。代表的なシクロアルキルには、3~10個の炭素原子、3~8個の炭素原子、3~6個の炭素原子、または3~5個の炭素原子を有するシクロアルキルが含まれるが、これらに限定されない。単環式シクロアルキルには、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが含まれる。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンチルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルまたはシクロヘキセニルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルである。多環式ラジカルには、例えば、アダマンチル、1,2-ジヒドロナフタレニル、1,

40

50

4-ジヒドロナフタレニル、テトラニル、デカリニル、3, 4-ジヒドロナフタレニル-1 (2H)-オン、スピロ [2. 2] ペンチル、ノルボルニルおよびビシクロ [1. 1. 1] ペンチルが含まれる。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、シクロアルキル基は必要に応じて置換されていてもよい。

【0058】

「ヘテロアルキレン」または「ヘテロアルキレン鎖」という用語は、分子の残りをラジカル基に連結する直鎖または分岐鎖の二価ヘテロアルキル鎖を指す。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、ヘテロアルキル基またはヘテロアルキレン基は、下記に記載されるように必要に応じて置換されていてもよい。代表的なヘテロアルキレン基には、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N$ (アルキル) $-CH_2-$ 、 $-CH_2-N$ (アリール) $-CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-OCH_2CH_2OCH_2CH_2O-$ 、または $-OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2O-$ が含まれるが、これらに限定されない。

【0059】

「ヘテロシクロアルキル」という用語は、窒素、酸素、および硫黄から選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含むシクロアルキル基を指す。本明細書において具体的に他の意味を示さない限り、ヘテロシクロアルキルラジカルは、縮合 (アリール環またはヘテロアリール環と縮合している場合、ヘテロシクロアルキルは、非芳香族環原子を介して結合している) または架橋環系を含み得る単環式、または二環式環系であり得る。ヘテロシクリルラジカル中の窒素、炭素または硫黄原子は、必要に応じて酸化されていてもよい。窒素原子は、必要に応じて四級化されていてもよい。ヘテロシクリルラジカルは、部分的または完全に飽和している。そのようなヘテロシクリルラジカルの例としては、ジオキサニル、チエニル [1, 3] ジチアニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、デカヒドロキノリル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル、および1, 1-ジオキソチオモルホリニルが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルという用語はまた、単糖、二糖およびオリゴ糖を含むがこれらに限定されない糖質のすべての環形態を含む。特に明記しない限り、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素および1または2個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素および3または4個のN原子を有する。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素、0~2個のN原子、0~2個のO原子、0~2個のP原子および0~1個のS原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素、1~3個のN原子、0~1個のO原子、および0~1個のS原子を有する。ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数に言及する場合、ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数は、ヘテロシクロアルキルを構成する (ヘテロ原子を含む) 原子 (すなわち、ヘテロシクロアルキル環の骨格原子) の総数と同じではないことが理解される。本明細書で具体的に他の意味を示さない限り、ヘテロシクロアルキル基は必要に応じて置換されていてもよい。

【0060】

「ヘテロアリール」という用語は、窒素、酸素、および硫黄から選択される1個以上の環ヘテロ原子を含むアリール基を指す。いくつかの実施形態において、ヘテロアリールは単環式または二環式である。単環式ヘテロアリールの具体例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリ

10

20

30

40

50

ル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、インダゾール、ベンズイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、およびプテリジンが挙げられる。単環式ヘテロアリアルル具体例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、およびフラザニルが挙げられる。二環式ヘテロアリアルル具体例としては、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、インダゾール、ベンズイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、およびプテリジンが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルルは、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、チアゾリル、チエニル、チアジアゾリルまたはフリルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルルは、環内に0~6個のN原子を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルルは、環内に1~4個のN原子を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルルは、環内に4~6個のN原子を含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアルルは、環内に0~4個のN原子、0~1個のO原子、0~1個のP原子、および0~1個のS原子を含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアルルは、環内に1~4個のN原子、0~1個のO原子、および0~1個のS原子を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルルは、C₁~C₉ヘテロアリアルルである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリアルルは、C₁~C₅ヘテロアリアルルである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリアルルは、5員または6員ヘテロアリアルルである。いくつかの実施形態では、二環式ヘテロアリアルルは、C₆~C₉ヘテロアリアルルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルル基は、本明細書で定義される部分的に還元されたシクロアルキル基またはヘテロシクロアルキル基（例えば、7, 8-ジヒドロキノリン）を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルル基は、本明細書で定義される完全に還元されたシクロアルキル基またはヘテロシクロアルキル基（例えば、5, 6, 7, 8-テトラヒドロキノリン）を含む。ヘテロアリアルルがシクロアルキル基またはヘテロシクロアルキル基を含む場合、ヘテロアリアルルは、ヘテロ芳香族環炭素またはヘテロ原子を介して分子の残りの部分に結合している。ヘテロアリアルルラジカルは、縮合、スピロまたは架橋環系を含み得る単環式または多環式（例えば、二環式、三環式もしくは四環式）環系であり得る。

10

20

30

40

50

【0061】

「必要に応じて置換された」または「置換された」という用語は、言及された基が、D、ハロゲン、-CN、-NH₂、-NH（アルキル）、-N（アルキル）₂、-OH、-CO₂H、-CO₂アルキル、-C（=O）NH₂、-C（=O）NH（アルキル）、-C（=O）N（アルキル）₂、-S（=O）₂NH₂、-S（=O）₂NH（アルキル）、-S（=O）₂N（アルキル）₂、アルキル、シクロアルキル、フルオロアルキル、ヘテロアルキル、アルコキシ、フルオロアルコキシ、ヘテロシクロアルキル、アリアルル、ヘテロアリアルル、アリアルルオキシ、アルキルチオ、アリアルルチオ、アルキルスルホキシド、アリアルルスルホキシド、アルキルスルホン、およびアリアルルスルホンから個別に独立して選択される1つ以上の追加の基で任意に置換されることを意味する。いくつかの他の実施形態では、任意選択の置換基は、D、ハロゲン、-CN、-NH₂、-NH（CH₃）、-N（CH₃）₂、-OH、-CO₂H、-CO₂（C₁~C₄アルキル）、-C（=O）NH₂、-C（=O）NH（C₁~C₄アルキル）、-C（=O）N（C₁~C₄アルキル）₂、-S（=O）₂NH₂、-S（=O）₂NH（C₁~C₄アルキル）、-S（=O）₂N（C₁~C₄アルキル）₂、C₁~C₄アルキル、C₃~C₆シクロアルキル、C₁~C₄フルオロアルキル、C₁~C₄ヘテロアルキル、C₁~C₄アルコキシ、C₁~C₄フルオロアルコキシ、-SC₁~C₄アルキル、-S（=O）C₁~C₄アルキル、および-S（=O）₂C₁~C₄アルキルから独立して選択される。いくつかの実施形態では、任意の置換基は、D、ハロゲン、-CN、-NH₂、-OH、-NH（CH₃）

、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NH$ （シクロプロピル）、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCH_3$ 、および $-OCF_3$ から独立して選択される。いくつかの実施形態では、置換された基は、先行する基の1つまたは2つで置換される。いくつかの実施形態では、脂肪族炭素原子（非環式または環式）上の任意選択の置換基は、オキソ（ $=O$ ）を含む。

【0062】

本明細書で使用される場合、「AJICAP（商標）技術」、「AJICAP（商標）法」、および類似の用語は、所望の官能基化を所望の部位に送達するためのアフィニティーペプチドを使用した抗体および関連分子の部位特異的官能基化のためのシステムおよび方法（現在、味の素バイオフィーマサービス社（「味の素社」）によって製造されている）を指す。AJICAP（商標）方法論の一般的なプロトコルは、少なくとも国際公開第2018199337（A1）号、国際公開第2019240288（A1）号、国際公開第2019240287（A1）号、国際公開第2020090979（A1）号、Matsudaら、*Mol. Pharmaceuticals* 2021, 18, 4058-4066、およびYamadaら、*Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies*, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 5592-5597、および特に米国特許出願公開第20200190165（A1）号明細書の実施例2～4に見出される。いくつかの実施形態では、そのような方法論は、抗体Fc領域（例えば、IgG1 Fc領域）の246位、248位、288位、290位、および317位から選択される位置（EUナンバリング）のリジン残基に所望の官能基化を特異的に組み込む。いくつかの実施形態では、所望の官能基化は、抗体Fc領域の残基248位に組み込まれる（EUナンバリング）。いくつかの実施形態では、248位は、ヒトIgG CH2領域の18番目の残基に対応する（EUナンバリング）。

【0063】

組成物AAは、残基Y45に結合した約0.5 kDaのPEG基と、残基F42Yに結合した第2の約0.5 kDaのPEG基とを含有する、配列番号3に示される配列を有する修飾されたIL-2ポリペプチドを指す。

【0064】

組成物ABは、残基Y45に結合した約0.5 kDaのPEG基と、残基F42Yでのコンジュゲーションを容易にするアジド官能基でキャップした0.5 kDaのPEG基とを含有する、配列番号3に示される配列を有する修飾されたIL-2ポリペプチドを指す。組成物ABのイラスト画像を図1Bに示す。組成物ABおよび関連する修飾されたIL-2ポリペプチドは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第2021140416（A2）号に記載されている。組成物ABに結合したポリマーは、組成物ABとIL-2受容体 α サブユニットとの相互作用を破壊し、かつIL-2受容体 β サブユニットのシグナル伝達に有利に分子をバイアスするように作用し、したがって、IL-2ポリペプチドがWT IL-2と比較してインビボでTeff細胞を拡大および／または刺激する能力を増強する。

【0065】

組成物ACは、残基F42YおよびY45に結合した約0.5 kDaのPEG基を含有する、配列番号3に示される配列を有する修飾されたIL-2ポリペプチドを指す。組成物ACは、グルタル酸リンカー官能基を介してカップリングされた約0.5 kDaのPEG（本明細書で提供される構造7を参照）を介してN末端A残基に結合したアジドコンジュゲーションハンドルを含有する。

【0066】

組成物Aは、組成物ABと抗PD-1抗体ペムブロリズマブまたはLZM-009との反応から調製された抗PD-1抗体／IL-2コンジュゲートを指す。組成物Aは、組成物ABのアジド官能基と、ペムブロリズマブのFc領域の残基K248に結合したDBC O官能基との反応から形成される（EUナンバリング）。DBC O官能基は、味の素社からのAJICAP技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマ

ブに付加される。組成物 A は、薬物－抗体比 1 を有する。

【0067】

組成物 B は、組成物 A B のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 B は、薬物－抗体比 1 . 5 を有する。

【0068】

組成物 C は、組成物 A B のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 C は、薬物－抗体比 2 を有する。

10

【0069】

組成物 D は、組成物 A B のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 8 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 D は、薬物－抗体比 1 を有する。

【0070】

組成物 E は、組成物 A B のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 8 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 E は、薬物－抗体比 2 を有する。

20

【0071】

組成物 F は、組成物 A C のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 F は、薬物－抗体比 1 を有する。

【0072】

組成物 G は、組成物 A C のアジド官能基と、ペムブロリズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してペムブロリズマブに付加される。組成物 G は、薬物－抗体比 2 を有する。

30

【0073】

組成物 H は、組成物 A B のアジド官能基と、L Z M－009 の F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用して L Z M－009 に付加される。組成物 H は、薬物－抗体比 1 を有する。

【0074】

組成物 I は、組成物 A B のアジド官能基と、L Z M－009 の F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用して L Z M－009 に付加される。組成物 I は、薬物－抗体比 2 を有する。

40

【0075】

組成物 J は、組成物 A B のアジド官能基と、L Z M－009 の F c 領域の残基 K 2 8 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用して L Z M－009 に付加される。組成物 J は、薬物－抗体比 1 を有する。

【0076】

組成物 K は、組成物 A B のアジド官能基と、L Z M－009 の F c 領域の残基 K 2 8 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用し

50

て L Z M - 0 0 9 に付加される。組成物 K は、薬物 - 抗体比 2 を有する。

【 0 0 7 7 】

組成物 N は、組成物 A B のアジド官能基と、トラスツズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してトラスツズマブに付加される。組成物 N は、1 薬物 - 抗体比 1 . 6 を有する。

【 0 0 7 8 】

組成物 O は、組成物 A B のアジド官能基と、トラスツズマブの F c 領域の残基 K 2 4 8 に結合した D B C O 官能基との反応から形成される（E U ナンバリング）。D B C O 官能基は、味の素社からの A J I C A P 技術によるアフィニティーペプチドシステムを使用してトラスツズマブに付加される。組成物 O は、薬物 - 抗体比 1 を有する。すべてのイムノ

サイトカイン組成物の概要を下記の表に示す。

【 0 0 7 9 】

【表 2】
組成物の概要

組成物	抗体	V H 配列番号	V L 配列番号	I L - 2 ポリ ペプチド 組成物	I L - 2 ポリ ペプチド 配列番号	D A R	コンジュゲーション 部位
A	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A B	3	1	K 2 4 8
B	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A B	3	1 . 5	K 2 4 8
C	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A B	3	2	K 2 4 8
D	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A B	3	1	K 2 8 8
E	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A B	3	2	K 2 8 8
F	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A C	3	1	K 2 4 8
G	ペムプロリ ズマブ	4 6	4 7	A C	3	2	K 2 4 8
H	L Z M - 0 0 9	7 6	7 7	A B	3	1	K 2 4 8
I	L Z M - 0 0 9	7 6	7 7	A B	3	2	K 2 4 8
J	L Z M - 0 0 9	7 6	7 7	A B	3	1	K 2 8 8
K	L Z M - 0 0 9	7 6	7 7	A B	3	2	K 2 8 8
N	トラスツズ マブ	1 2 1	1 2 2	A B	3	1 . 6	K 2 4 8
O	トラスツズ マブ	1 2 1	1 2 2	A B	3	1	K 2 4 8

【 0 0 8 0 】

サイトカインにコンジュゲートされた抗 P D - 1 ポリペプチド

プログラム細胞死タンパク質 1（P D - 1 および C D 2 7 9 としても知られる）は、T 細胞炎症活性を抑制することによって免疫系を下方制御しかつ自己寛容を促進する役割を果たす細胞表面受容体である。P D - 1 は、活性化 B 細胞、T 細胞、および骨髄細胞上に発現される免疫細胞阻害分子である。P D - 1 は免疫チェックポイントを表し、リンパ節中の抗原特異的 T 細胞におけるアポトーシス（プログラム細胞死）を促進すると同時に、制御性 T 細胞におけるアポトーシスを減少させるという二重の機構を介して自己免疫を防

CD28／CTLA-4／ICOS共刺激受容体ファミリーのメンバーである。PD-1は、すべてジスルフィド結合ホモ二量体であるCTLA-4および他のファミリーメンバーとは対照的に、溶液中および細胞表面上の両方で単量体である。そのリガンドであるPD-L1に結合したときのPD-1阻害受容体を介したシグナル伝達が、自己抗原および腫瘍に対する免疫応答を抑制し、末梢免疫寛容の維持において役割を果たしている。PD-1とPD-L1との間の相互作用は、腫瘍浸潤リンパ球の減少、T細胞受容体媒介増殖の減少、および癌性細胞による免疫回避をもたらす。非限定的で例示的なヒトPD-1アミノ酸配列は、MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWN
PPTFSPALLVVT EGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPS
NQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRA
RRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT
AHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLLVWVLA VIC
RAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREK
TPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRG S ADGPRS
AQPLRPEDGHCSWPL（配列番号120）である。

10

【0081】

1つ以上のサイトカイン分子またはその誘導体にコンジュゲートされたプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に結合するポリペプチド、例えば抗体および抗PD-1抗原結合断片が本明細書で提供される。本明細書で提供されるコンジュゲートは、PD-1に選択的に結合するサイトカインおよびポリペプチドを標的細胞、例えばCD8+Tエフェクター（T_{eff}）細胞に同時に送達するのに有効である。同じ細胞への両方の薬剤のこの同時送達は、IL-2ポリペプチド選択性の改善、IL-2の治療可能性の向上、およびIL-2療法の投与による副作用のリスクの潜在的低減を含む多くの利点を有する。

20

【0082】

本明細書で提供されるコンジュゲート組成物は、リンカーを利用して、PD-1に結合するポリペプチドをサイトカイン、例えばIL-2ポリペプチドおよびその誘導体に結合させる。いくつかの実施形態では、リンカーは、各部分、すなわち、PD-1およびサイトカインに選択的に結合するポリペプチド）に、特定の残基または残基の特定のサブセットにおいて結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、コンジュゲートの集団が実質的に均一になるように、部位選択的に各部分に結合している。これは、コンジュゲーション反応のための試薬をコンジュゲーションされる部分に部位選択的に添加すること、コンジュゲートされる部分をコンジュゲーション反応のための所望の試薬と合成すること、もしくは他の方法で調製すること、またはこれら2つのアプローチの組み合わせを含む、本明細書で提供されるような様々な方法で達成することができる。これらのアプローチを使用して、各部分に対するリンカーの結合部位（例えば特定のアミノ酸残基）を正確に選択することができる。さらに、これらのアプローチは、融合タンパク質に必要とされるようなアミノ酸残基に限定されない様々なリンカーを組成物に用いることを可能にする。リンカーの選択とそれらの部分への正確な結合とのこの組み合わせは、いくつかの実施形態では、例えば、リンカーがサイトカインの受容体と相互作用する位置でサイトカインに結合している場合、リンカーがそれらの部分の1つの活性を調節する機能も果たすことを可能にする。

30

40

【0083】

抗PD-1ポリペプチド

いくつかの実施形態では、本開示の抗PD-1ポリペプチドは、PD-1に特異的に結合する。抗PD-1ポリペプチドは、それが他の物質に結合するよりも高いアフィニティ、アビディティで、より容易に、かつ／またはより長い持続時間で結合する場合、標的に選択的に結合するかまたは優先的に結合する。したがって、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を必ずしも必要としない（ただし、含めることもできる）。一般に、必ずしもそうとは限らないが、特異的結合への言及は、抗体またはその抗原結合断片のアフィニティが、無関係なアミノ酸配列に対する抗体のアフィニティよりも少

50

なくとも2倍大きい、少なくとも3倍大きい、少なくとも4倍大きい、少なくとも5倍大きい、少なくとも6倍大きい、少なくとも7倍大きい、少なくとも8倍大きい、少なくとも9倍大きい、少なくとも10倍大きい、少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍大きい、少なくとも40倍大きい、少なくとも50倍大きい、少なくとも60倍大きい、少なくとも70倍大きい、少なくとも80倍大きい、少なくとも90倍大きい、少なくとも100倍大きい、または少なくとも1000倍大きい優先的結合を意味する。本開示の抗PD-1ポリペプチドまたは抗PD-1抗原結合断片は、PD-1とリガンド（例えば、PD-L1）との相互作用を遮断することができる。

【0084】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原結合ドメインであるか、または抗原結合ドメインと相同である結合ドメインを有する免疫グロブリン（Ig）、ポリペプチド、またはタンパク質を指す。この用語はさらに、「抗原結合断片」および下記に記載される類似の結合断片についての他の交換可能な用語を含む。ネイティブ抗体およびネイティブ免疫グロブリン（Ig）は、一般に、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖とから構成される。各軽鎖は、典型的には、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔を置いて配置された鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の端部に可変ドメイン（「V_H」）を有し、その後いくつかの定常ドメイン（「C_H」）が続く。各軽鎖は、一方の端部に可変ドメイン（「V_L」）を有し、他方の端部に定常ドメイン（「C_L」）を有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと整列しており、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の界面を形成すると考えられている。

【0085】

場合によっては、抗体または抗原結合断片は、単離された抗体または抗原結合断片、精製された抗体または抗原結合断片、組換え抗体または抗原結合断片、修飾された抗体または抗原結合断片、または合成抗体または抗原結合断片を含む。

【0086】

本明細書における抗体および抗原結合断片は、部分的または全体的に合成的に産生され得る。抗体または抗原結合断片は、抗原結合ドメインであり得るか、または抗原結合ドメインと相同であり得る結合ドメインを有するポリペプチドまたはタンパク質であり得る。一例では、抗体または抗原結合断片は、適切なインビボ動物モデルにおいて産生され、次いで単離および／または精製され得る。

【0087】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリン（Ig）を異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2にさらに分割され得る。Igまたはその一部は、いくつかの場合、ヒトIgであり得る。場合によっては、C_H3ドメインは、免疫グロブリン由来であり得る。いくつかの場合、抗体もしくは抗原結合断片、修飾された抗体もしくは抗原結合断片、または結合剤の鎖または一部は、Ig由来であり得る。そのような場合、Igは、IgG、IgA、IgD、IgE、もしくはIgMであり得るか、またはそれらに由来する。IgがIgGである場合、IgはIgGのサブタイプであり得、IgGのサブタイプは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4を含み得る。いくつかの場合、C_H3ドメインは、IgG、IgA、IgD、IgE、およびIgMからなる群より選択される免疫グロブリンに由来し得るか、またはそれらに由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、IgGを含むか、またはIgGに由来する。場合によっては、抗体または抗原結合断片は、IgG1を含むか、またはIgG1に由来する

。場合によっては、抗体または抗原結合断片は、I g G 4を含むか、またはI g G 4に由来する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、I g Mを含むか、I g Mに由来するか、またはI g Mの単量体形態である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、I g Eを含むか、またはI g Eに由来する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、I g Dを含むか、またはI g Dに由来する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、I g Aを含むか、またはI g Aに由来する。

【0088】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（「κ」または「K」）またはラムダ（「λ」）と呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てることができる。

【0089】

抗体の「可変領域」とは、単独でまたは組み合わせて、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域は各々、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域（CDR）によって連結された4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖のCDRは、FRによって近接して一緒に保持され、他方の鎖のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも2つの技術がある：（1）種間配列可変性（例えば、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、（5th Ed. , 1991, National Institutes of Health , Bethesda Md. (1991), pages 647-669 ; これ以降「Kabat」という）；（2）抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（Alizikaniら、（（1997）J. Molec. Biol. 273 : 927-948））。本明細書で使用される場合、CDRは、いずれかのアプローチまたは両方のアプローチの組み合わせによって定義されるCDRを指し得る。

【0090】

抗体に関して、「可変ドメイン」という用語は、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性に使用される抗体の可変ドメインを指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布していない。むしろ、それは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの両方の超可変領域（CDRとしても知られる）と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、「フレームワーク領域」または「FR」と呼ばれる。修飾されていない重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々4つのFR（FR1、FR2、FR3およびFR4）を含有し、主に3つのCDRが散在するβシート構成を採用し、これらは接続するループを形成し、いくつかの場合、βシート構造の一部を形成する。各鎖のCDRは、FRによって近接して一緒に保持され、他方の鎖のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatを参照）。

【0091】

「超可変領域」および「CDR」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。CDRは、抗原に相補的に結合しかつV_H鎖およびV_L鎖の各々についてCDR1、CDR2およびCDR3として知られる3つの配列領域からのアミノ酸残基を含む。軽鎖可変ドメインでは、CDRは、典型的には、およそ残基24～34（CDRL1）、50～56（CDRL2）、および89～97（CDRL3）に対応し、重鎖可変ドメインでは、CDRは、典型的には、Kabatによればおよそ残基31～35（CDRH1）、50～65（CDRH2）、および95～102（CDRH3）に対応する。異なる抗体のCDRは挿入を含有し得るので、アミノ酸ナンバリングは異なり得ることが理解される。Kabatナンバリングシステムは、特異的残基（例えば、軽鎖におけるCDRL1の27A、27B、27C、27D、27Eおよび27F）に付加された文字を利用して異なる抗体間のナンバリングにおける任意の挿入を反映するナンバリングスキームを用いて、そのような挿入を説明する。代替的に、軽鎖可変ド

メインでは、CDRは、典型的には、およそ残基26～32（CDRL1）、50～52（CDRL2）、および91～96（CDRL3）に対応し、重鎖可変ドメインでは、CDRは、典型的には、ChothiaおよびLeskによるおよそ残基26～32（CDRH1）、53～55（CDRH2）、および96～101（CDRH3）に対応する（J. Mol. Biol., 196:901-917（1987））。

【0092】

本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」、「FW」または「FR」は、抗原結合ポケットまたはグループの一部を形成するフレームワークアミノ酸残基を指す。いくつかの実施形態では、フレームワーク残基は、抗原結合ポケットまたはグループの一部であるループを形成し、ループ内のアミノ酸残基は抗原と接触してもしなくてもよい。フレームワーク領域は、一般に、CDR間の領域を含む。軽鎖可変ドメインでは、FRは、典型的には、およそ残基0～23（FRL1）、35～49（FRL2）、57～88（FRL3）、および98～109に対応し、重鎖可変ドメインでは、FRは、典型的には、Kabattによるおよそ残基0～30（FRH1）、36～49（FRH2）、66～94（FRH3）、および103～133に対応する。軽鎖のKabattナンバリングで上述したように、重鎖も同様の様式での挿入を説明する（例えば、重鎖におけるCDRH1の35A、35B）。代替的に、軽鎖可変ドメインでは、FRは、典型的には、およそ残基0～25（FRL1）、33～49（FRL2）53～90（FRL3）、および97～109（FRL4）に対応し、重鎖可変ドメインでは、FRは、典型的には、ChothiaおよびLesk, Idによるおよそ残基0～25（FRH1）、33～52（FRH2）、56～95（FRH3）、および102～113（FRH4）に対応する。FRのループアミノ酸は、抗体重鎖および／または抗体軽鎖の三次元構造の検査によって評価および決定することができる。三次元構造は、そのような位置がループを形成し、かつ／または抗体可変ドメイン内で抗原接触を提供する可能性が高いため、溶媒にアクセス可能なアミノ酸位置について分析することができる。溶媒にアクセス可能な位置のいくつかは、アミノ酸配列の多様性を許容することができ、他の位置（例えば、構造位置）は、一般に、多様性が少ない。抗体可変ドメインの三次元構造は、結晶構造またはタンパク質モデリングに由来し得る。

【0093】

本開示では、必要に応じて、以下の略称（括弧内）：重鎖（H鎖）、軽鎖（L鎖）、重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）、相補性決定領域（CDR）、第1の相補性決定領域（CDR1）、第2の相補性決定領域（CDR2）、第3の相補性決定領域（CDR3）、重鎖第1の相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第2の相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第3の相補性決定領域（VH CDR3）、軽鎖第1の相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖第2の相補性決定領域（VL CDR2）、および軽鎖第3の相補性決定領域（VL CDR3）の略称（括弧内）が、慣用に従って使用される。

【0094】

「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。「Fc領域」は、天然配列Fc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、一般に、Cys226位のアミノ酸残基、またはPro230のアミノ酸残基から、そのカルボキシル末端まで伸びるように定義される。Fc領域中の残基のナンバリングは、KabattのようなEUIンデックスのナンバリングである。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン、CH₂およびCH₃を含む。

【0095】

本開示で有用な「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヘテロコンジュゲートされた抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、グラフト化抗体、脱免疫化抗体、それらの変異体、それらの融合物、それらの免疫コンジュゲート、それらの抗原結合断片、および／または抗体のグリコシル化バリエーション、抗体のアミノ酸配列バリエーション、および共有結合修飾抗体を含む、必要な特異性の抗

原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成を包含するが、これらに限定されない。本明細書で提供される方法およびコンジュゲートの特定の実施形態では、抗体は、抗体とタンパク質との間のリンカーの結合（例えば、A J I C A P（商標）技術などにおけるアフィニティーペプチドを使用したリンカーの結合）を可能にするためにFc領域を必要とする。

【0096】

場合によっては、抗体はモノクローナル抗体である。本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する変異を除いて同一である。典型的には、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原（エピトープ）上の単一の決定基に対するものである。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特性を示し、特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。

【0097】

場合によっては、抗体はヒト化抗体である。本明細書で使用される場合、「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する特異的キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片である非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態を指す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、アフィニティー、および生物学的活性を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基で置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、インポートされたCDRまたはフレームワーク配列にも見られないが、抗体性能をさらに改良および最適化するために含まれる残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）の少なくとも一部を含むであろう。抗体は、例えば、国際公開第99/58572号に記載されているように修飾されたFc領域を有し得る。他の形態のヒト化抗体は、元の抗体に対して変化した1つ以上のCDR（1、2、3、4、5、または6つ）を有し、これは元の抗体からの1つ以上のCDR「に由来する」1つ以上のCDRとも呼ばれる。

【0098】

必要に応じて、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片を免疫原性について評価することができ、必要に応じて脱免疫化することができる（すなわち、抗体は、1つ以上のT細胞エピトープを変化させることによって免疫反応性が低下される）。本明細書で使用される場合、「脱免疫化抗体」とは、抗体配列中の1つ以上のT細胞エピトープが、被験体への抗体の投与後のT細胞応答が、脱免疫化されていない抗体と比較して低下するように修飾されていることを意味する。本明細書に記載される抗体および抗原結合断片に存在する免疫原性およびT細胞エピトープの分析は、ソフトウェアおよび特異的データベースの使用を介して行うことができる。例示的なソフトウェアおよびデータベースには、英国ケンブリッジのAntitope社によって開発されたiTope（商標）が含まれる。iTope（商標）は、ヒトMHCクラスII対立遺伝子へのペプチド結合の分析のためのインシリコ技術である。iTope（商標）ソフトウェアは、ヒトMHCクラスII対立遺伝子へのペプチド結合を予測し、それにより、そのような「潜在的T細胞エピトープ」の位置についての初期スクリーニングを提供する。iTope（商標）ソフトウェアは、ペプチドのアミノ酸側鎖と34個のヒトMHCクラスII対立遺伝子の結合グループ内の特異的結合ポケットとの間の好ましい相互作用を予測する。重要な結合残基の位置は

、試験抗体可変領域配列にまたがる1つのアミノ酸が重複する9merペプチドのインシリコ生成によって得られる。各9merペプチドを、34個のMHCクラスII対立遺伝子の各々に対して試験し、それらの潜在的な「適合」およびMHCクラスII結合グループとの相互作用に基づいてスコア化することができる。MHCクラスII対立遺伝子の>50%に対して高い平均結合スコア(iTope(商標)スコアリング関数で>0.55)を生じるペプチドは、潜在的なT細胞エпитープとみなされる。そのような領域では、MHCクラスIIグループ内のペプチド結合のためのコア9アミノ酸配列を分析して、MHCクラスIIポケット残基(P1、P4、P6、P7、P9)および可能性のあるT細胞受容体(TCR)接触残基(P1、P2、P3、P5、P8)を決定する。任意のT細胞エпитープの同定後、アミノ酸残基の変化、置換、付加、および／または欠失を導入して、同定されたT細胞エпитープを除去することができる。そのような変更は、同定されたエпитープを依然として除去しながら抗体の構造および機能を保存するように行うことができる。例示的な変化には、保存的アミノ酸変化が含まれ得るが、これらに限定されない。

10

【0099】

抗体はヒト抗体であり得る。本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体、および／またはヒト抗体を作製するための任意の適切な技術を使用して作製された抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義には、少なくとも1つのヒト重鎖ポリペプチドまたは少なくとも1つのヒト軽鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれる。そのような一例は、マウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体である。一実施形態では、ヒト抗体はファージライブラリーから選択され、そのファージライブラリーはヒト抗体を発現する。ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作製することができる。代替的に、ヒト抗体は、標的抗原に対する抗体を産生するヒトBリンパ球を不死化することによって調製され得る(そのようなBリンパ球は、個体から回収され得るか、またはインビトロで免疫化され得る)。

20

【0100】

本明細書における抗体のいずれも二重特異性であり得る。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有し、かつ本明細書に開示される抗体を使用して調製することができる抗体である。従来、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、2つの重鎖は異なる特異性を有する。二重特異性抗体は、一方のアームに第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を提供する)とから構成され得る。二重特異性分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖を有するこの非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物の分離を容易にする。

30

【0101】

二重特異性抗体を作製するための1つのアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)が免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は、ヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものであり得る。軽鎖結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域(CH1)は、融合体の少なくとも1つに存在することができる。免疫グロブリン重鎖融合体および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。これは、構築に使用される3つのポリペプチド鎖の比率が等しくない場合に最適な収率が得られる実施形態では、3つのポリペプチド断片の相互比率を調整する際の大きな柔軟性を提供する。しかしながら、等しい比での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらす場合、または比が特に重要でない場合、1つの発現ベクターに2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。

40

50

【0102】

場合によっては、本明細書における抗体はキメラ抗体である。非ヒト（例えば、マウス）抗体の「キメラ」形態には、非ヒトIgに由来する最小配列を含有するキメラ抗体が含まれる。ほとんどの場合、キメラ抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部がマウスFcの代わりに挿入されているマウス抗体である。キメラ抗体またはハイブリッド抗体はまた、架橋剤を伴う合成タンパク質化学の適切な方法を使用してインビトロで調製され得る。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチリミデートが挙げられる。

10

【0103】

本明細書では、抗体およびその抗原結合断片、修飾抗体およびその抗原結合断片、ならびに1つ以上の標的抗原上の1つ以上のエピトープに特異的に結合する結合剤が提供される。一例では、結合剤は、単一の抗原上のエピトープに選択的に結合する。別の例では、結合剤は二価であり、単一の抗原上の2つの異なるエピトープに選択的に結合するか、または2つの異なる抗原上の2つの異なるエピトープに結合する。別の例では、結合剤は多価（すなわち、三価、四価など）であり、結合剤は、単一の抗原上の3つ以上の異なるエピトープに結合するか、または2つ以上（複数）の抗原上の3つ以上の異なるエピトープに結合する。

【0104】

本明細書における抗体のいずれかの抗原結合断片も企図される。「抗体の抗原結合部分」、「抗原結合断片」、「抗原結合ドメイン」、「抗体断片」、または「抗体の機能的断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指すために本明細書で互換的に使用される。代表的な抗原結合断片には、限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、二重特異性F(ab')₂、三重特異性F(ab')₂、可変断片(Fv)、一本鎖可変断片(scFv)、dsFv、二重特異性scFv、可変重鎖ドメイン、可変軽鎖ドメイン、可変NARドメイン、二重特異性scFv、AVIMER（登録商標）、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、マキシボディ、ラクダ科、VHH、ミニボディ、イントラボディ、抗体部分（例えば、ドメイン抗体）を含む融合タンパク質、一本鎖結合ポリペプチド、scFv-Fc、Fab-Fc、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE；単一のポリペプチド鎖として産生される2つのscFvであって、各scFvが、本明細書に記載されるCDRの組み合わせまたはVL/VLの組み合わせのアミノ酸配列を含む、2つのscFv）、四価タンデムダイアボディ（TandAb；頭部から尾部への配置における非共有結合性ホモ二量体フォルダーとして産生される抗体断片、例えば、scFvを含むTandAbであって、scFvは、本明細書に記載されるCDRの組み合わせまたはVL/VLの組み合わせを含むアミノ酸配列を含む、TandAb）、二重アフィニティー再標的化抗体（DART；安定化鎖間ジスルフィド結合によって接続された異なるscFv）、二重特異性抗体（bscAb；グリシン-セリンリンカーを介して連結された2つの一本鎖Fv断片）、単一ドメイン抗体（sdAb）、融合タンパク質、または二重特異性ジスルフィド安定化Fv抗体断片（dsFv-dsFv'；可撓性リンカーペプチドによって連結された2つの異なるジスルフィド安定化Fv抗体断片）が含まれる。本発明の特定の実施形態では、完全長抗体（例えば、抗原結合断片およびFc領域）が好ましい。

20

30

40

【0105】

2つの共有結合した抗体または抗体抗原結合断片を含むヘテロコンジュゲートポリペプチドも本開示の範囲内である。適切なリンカーは、結合剤を多量体化するために使用され得る。連結ペプチドの非限定的な例としては、限定されないが、(GS)_n（配列番号24）、(GGS)_n（配列番号25）、(GGGS)_n（配列番号26）、(GGSG)_n（配列番号27）、または(GGSGG)_n（配列番号28）、(GGGG)_n（配

50

列番号 29) が挙げられ、ここで、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である。例えば、連結ペプチドは、 $(GGGGS)_3$ (配列番号 30) または $(GGGGS)_4$ (配列番号 31) であり得る。いくつかの実施形態では、連結ペプチドは、一方の可変領域のカルボキシ末端と、他方の可変領域のアミノ末端との間を約 3.5 nm 架橋する。他の配列のリンカーが設計され、使用されている。次いで、リンカーを、薬物の結合または固体支持体への結合などの追加の機能のために修飾することができる。

【0106】

本明細書で使用される場合、「アビディティー」という用語は、希釈後の解離に対する 2 つ以上の薬剤の複合体の耐性を指す。見かけのアフィニティーは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) または任意の他の適切な技術などの方法によって決定することができる。アビディティーは、スキッチャード解析または任意の他の適切な技術などの方法によって決定することができる。

10

【0107】

本明細書で使用される場合、「アフィニティー」という用語は、2 つの薬剤の可逆的結合の平衡定数を指し、 K_D として表される。本明細書における抗体または抗原結合断片の結合アフィニティー (K_D) は、500 nM、475 nM、450 nM、425 nM、400 nM、375 nM、350 nM、325 nM、300 nM、275 nM、250 nM、225 nM、200 nM、175 nM、150 nM、125 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、50 nM、50 nM、49 nM、48 nM、47 nM、46 nM、45 nM、44 nM、43 nM、42 nM、41 nM、40 nM、39 nM、38 nM、37 nM、36 nM、35 nM、34 nM、33 nM、32 nM、31 nM、30 nM、29 nM、28 nM、27 nM、26 nM、25 nM、24 nM、23 nM、22 nM、21 nM、20 nM、19 nM、18 nM、17 nM、16 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、990 pM、980 pM、970 pM、960 pM、950 pM、940 pM、930 pM、920 pM、910 pM、900 pM、890 pM、880 pM、870 pM、860 pM、850 pM、840 pM、830 pM、820 pM、810 pM、800 pM、790 pM、780 pM、770 pM、760 pM、750 pM、740 pM、730 pM、720 pM、710 pM、700 pM、690 pM、680 pM、670 pM、660 pM、650 pM、640 pM、630 pM、620 pM、610 pM、600 pM、590 pM、580 pM、570 pM、560 pM、550 pM、540 pM、530 pM、520 pM、510 pM、500 pM、490 pM、480 pM、470 pM、460 pM、450 pM、440 pM、430 pM、420 pM、410 pM、400 pM、390 pM、380 pM、370 pM、360 pM、350 pM、340 pM、330 pM、320 pM、310 pM、300 pM、290 pM、280 pM、270 pM、260 pM、250 pM、240 pM、230 pM、220 pM、210 pM、200 pM、190 pM、180 pM、170 pM 未満、またはそれらの間の任意の整数であり得る。結合アフィニティーは、表面プラズモン共鳴 (SPR)、KINEXA (登録商標) バイオセンサー、シンチレーション近接アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ORIGEN 免疫アッセイ (IGEN)、蛍光消光、蛍光移動、酵母ディスプレイ、またはそれらの任意の組み合わせを使用して決定され得る。結合アフィニティーはまた、適切なバイオアッセイを使用してスクリーニングされ得る。

20

30

40

【0108】

本明細書で使用される場合、「アビディティー」という用語は、希釈後の解離に対する 2 つ以上の薬剤の複合体の耐性を指す。見かけのアフィニティーは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) または当業者によく知られている任意の他の技術などの方法によって決定することができる。アビディティーは、スキッチャード解析または当業者によく知られている任意の他の技術などの方法によって決定することができる。

【0109】

50

アフィニティー成熟抗体も本明細書で提供される。抗体のアフィニティーを調整するため、およびCDRを特性決定するために、以下の方法を使用することができる。抗体のCDRを特性決定する、および／または抗体などのポリペプチドの結合アフィニティーを変化させる（例えば改善する）1つの方法は、「ライブラリー走査突然変異誘発」と呼ばれる。一般に、ライブラリー走査突然変異誘発は以下のように働く。CDR中の1つ以上のアミノ酸位置は、2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個）のアミノ酸で置き換えられている。これにより、クローンの小さなライブラリー（いくつかの実施形態では、分析されるアミノ酸位置ごとに1つずつ）が生成され、各々が2つ以上のメンバーの複雑さを有する（2つ以上のアミノ酸がすべての位置で置換されている場合）。一般に、ライブラリーは、ネイティブ（非置換）アミノ酸を含むクローンも含む。各ライブラリーからの少数のクローン、例えば、（ライブラリーの複雑さに応じて）約20～80個のクローンを、標的ポリペプチド（または他の結合標的）に対する結合特異性または結合アフィニティーについてスクリーニングすることができ、結合が増加しているか、同じであるか、減少しているか、または結合がない候補が同定される。結合アフィニティーは、約2倍以上の結合アフィニティーの差を検出するBiacore表面プラズモン共鳴分析を使用して決定され得る。

10

【0110】

場合によっては、抗体または抗原結合断片は、二重特異性または多重特異性であり、2つ以上の抗原に特異的に結合することができる。いくつかの場合、そのような二重特異性または多重特異性抗体または抗原結合断片は、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合することができる。いくつかの場合、二重特異性抗体または抗原結合断片は、二価の抗体または抗原結合断片であり得る。いくつかの場合、多重特異性抗体または抗原結合断片は、二価の抗体または抗原結合断片、三価の抗体または抗原結合断片、または四価の抗体または抗原結合断片であり得る。

20

【0111】

本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、単離、精製、組換え、または合成することができる。

【0112】

本明細書に記載される抗体は、任意の適切な方法によって作製され得る。抗体は、特に高レベル発現ベクターを利用する場合、大量に産生され得ることが多い。

30

【0113】

一実施形態では、本開示の抗PD1抗体または抗PD1抗原結合断片は、本明細書に記載される重鎖可変領域（VH）と軽鎖可変領域（VL）との組み合わせを含む。別の実施形態では、本開示の抗PD1抗体または抗PD1抗原結合断片は、本明細書に記載される相補性決定領域（VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3）の組み合わせを含む。一実施形態において、本開示の抗PD1抗体または抗PD1抗原結合断片は、修飾されたチスレリズマブ、Baizean、OKVO411B3N、BGB-A317、hu317-1/IgG4mt2、シンチリマブ、Tyvyt、IBI-308、トリパリマブ、TeRuiPuLi、TerepriL、Tuoyi、JS-001、TAB-001、カムレリズマブ、HR-301210、INCSHR-01210、SHR-1210、セミプリマブ、セミプリマブ-rwlc、LIBTAYO（登録商標）、6QVL057INT、H4H7798N、REGN-2810、SAR-439684、ラムブロリズマブ、ペムブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）、MK-3475、SCH-900475、h409A11、ニボルマブ、ニボルマブBMS、OPDIVO（登録商標）、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、プロルゴリマブ（Prolgolimab）、Forteca、BCD-100、ペンプリマブ、AK-105、ジムベレリマブ（Zimberelimab）、AB-122、GLS-010、WBP-3055、バルスチリマブ、1Q2QT5M7EO、AGEN-2034、AGEN-2034w、ゲノ

40

50

リムズマブ、ゲプタノリマブ、APL-501、CBT-501、GB-226、ドスタ
ルリマブ、ANB-011、GSK-4057190A、POGVQ9A4S5、TSR
-042、WBP-285、セルブルリマブ、HLX-10、CS-1003、レチファ
ンリマブ (Retifanlimab)、2Y3T5IF01Z、INCMGA-000
12、INCMGA-0012、MGA-012、ササンリマブ、LZZ0IC2EWP
、PF-06801591、RN-888、スパルタリズマブ、NVP-LZV-184
、PDR-001、QOG25L6Z8Z、レトロリマブ／ニボルマブ、BMS-986
213、セトレリマブ、JNJ-3283、JNJ-63723283、LYK98WP
91F、テボテリマブ、MGD-013、BCD-217、BAT-1306、HX-0
08、MEDI-5752、JTX-4014、カドニリマブ、AK-104、BI-7
54091、ピジリズマブ、CT-011、MDV-9300、YBL-006、AMG
-256、RG-6279、RO-7284755、BH-2950、IBI-315、
RG-6139、RO-7247669、ONO-4685、AK-112、609-A
、LY-3434172、T-3011、MAX-10181、AMG-404、IBI
-318、MGD-019、INCB-086550、ONCR-177、LY-346
2817、RG-7769、RO-7121661、F-520、XmAb-23104
、Pd-1-pik、SG-001、S-95016、Sym-021、LZM-009
、ブジガリマブ (Budigalimab)、6VDO4TY300、ABBV-181
、PR-1648817、CC-90006、XmAb-20717、2661380、
AMP-224、B7-DCIg、EMB-02、ANB-030、PRS-332、[
89Zr] デフェロキサミド-ペムブロリズマブ、89Zr-Df-ペムブロリズマブ、
[89Zr] Df-ペムブロリズマブ、STI-1110、STI-A1110、CX-
188、mPD-1 Pb-Tx、MCLA-134、244C8、ENUM 224C
8、ENUM C8、388D4、ENUM 388D4、ENUM D4、MEDI0
680、またはAMP-514を含む。

10

20

30

40

50

【0114】

一実施形態では、本開示の抗PD-1抗体または抗PD-1抗原結合断片は、修飾され
たチスレリズマブ、シンチリマブ、トリパリマブ、Terepril、カムレリズマブ、
セミブリマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、プロルゴリマブ、ペンブリマブ、ジムベ
レリマブ、バルスチリマブ、ゲノリムズマブ、ゲプタノリマブ、ドスタルリマブ、セルプ
リマブ、レチファンリマブ、ササンリマブ、スパルタリズマブ、セトレリマブ、テボテ
リマブ、カドニリマブ、Aピジリズマブ (A Pidilizumab)、LZM-00
9、またはブジガリマブを含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、ニボルマブ、ペムブロリズマブ
、LZM-009、ドスタルリマブ、シンチリマブ、スパルタリズマブ、チスレリズマブ
、またはセミブリマブである。いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、ド
スタルリマブ、シンチリマブ、スパルタリズマブ、またはチスレリズマブである。いくつ
かの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、LZM
-009、またはセミブリマブである。

【0116】

いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、修飾されたペムブロリズマブで
ある。いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、mAB3で修飾される。い
くつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、mAB4で修飾される。

【0117】

示された抗体と同じアミノ酸配列を共有する、本明細書で命名された抗体のジェネリッ
クまたはバイオシミラーのバージョンもまた、抗体の名称が使用されるときに包含される
ことが企図される。いくつかの実施形態において、抗PD-1抗体は、チスレリズマブ、
シンチリマブ、トリパリマブ、Terepril、カムレリズマブ、セミブリマブ、ペム
ブロリズマブ、ニボルマブ、プロルゴリマブ、ペンブリマブ、ジムベレリマブ、バルスチ

リマブ、ゲノリムズマブ、ゲプタノリマブ、ドスタルリマブ、セルプリムマブ、レチファンリマブ、ササンリマブ、スパルタリズマブ、セトレリマブ、テボテリマブ、カドニリマブ、Aピジリズマブ（A P i d i l i z u m a b）、L Z M - 0 0 9、またはブジガリマブのバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、本明細書で提供される抗体のいずれか 1 つのバイオシミラーである。

【 0 1 1 8 】

表 1 は、抗 P D - 1 イムノコンジュゲートを調製するために修飾され得る例示的な抗 P D - 1 ポリペプチド（例えば、抗 P D - 1 抗体）および抗 P D - 1 抗原結合断片の配列を提供する。表 1 はまた、修飾された抗 P D - 1 イムノコンジュゲートにおいて利用され得る C D R の組み合わせを提供することを示す。本明細書における抗 P D - 1 ポリペプチドへの言及は、代替的に、抗 P D - 1 抗原結合断片を指し得る。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
チスレリズマ ブ、Ba i z e an、0 K V O 4 1 1 B 3 N、 B G B - A 3 1 7、h u 3 1 7 - 1 / I g G 4 m t 2 V H	Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L T S Y G V H W I R Q P P G K G L E W I G V I Y A D G S T N Y N P S L K S R V T I S K D T S K N Q V S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R A Y G N Y W Y I D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P P V A 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 V A V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q 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 E 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 L G K	3 2
チスレリズマ ブ、Ba i z e an、0 K V O 4 1 1 B 3 N、 B G B - A 3 1 7、h u 3 1 7 - 1 / I g G 4 m t 2 V L	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S E S V S N D V A W Y Q Q K P G Q P P K L L I N Y A F H R F T G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C H Q A Y S S P Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	3 3
シンチリマブ、 T y v y t、I B I - 3 0 8 V H	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M G L I I P M F D T A G Y A Q K F Q G R V A I T V D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R A E H S S T G T F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F 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 V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G K	3 4
シンチリマブ、 T y v y t、I B I - 3 0 8 V L	D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I S A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N H L P F T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	3 5
トリバリマブ、 T e R u i P u L i、T e r e p r i l、T u o y i、J S - 0 0 1、T A B - 0 0 1 V H	Q G Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T D Y E M H W V R Q A P I H G L E W I G V I E S E T G G T A Y N Q K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R E G I T T V A T T Y Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F 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 V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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	3 6

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
	KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	
トリバリマブ、 TeRu i Pu Li、Tere pri l、Tu oy i、JS- 001、TAB -001 VL	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRV SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSGSHVPLTFTGQGTKLEIKRTVAAPSV FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGGLSSPV TKSFNRGEC	37
カムレリズマ ブ、HR-30 1210、IN CSHR-01 210、SHR -1210 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYMMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGANTYY PDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLYFDFYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSSVVTVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVDSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK	38
カムレリズマ ブ、HR-30 1210、IN CSHR-01 210、SHR -1210 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCLASQTIG TWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLADGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQ VYSIPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGGLSSSPVTKSFN RGEC	39
セミブリマブ、 セミブリマブ- r w l c、L I BTAYO (登 録商標)、6Q VL057IN T、H4H77 98N、REG N-2810、 SAR-439 684 VH	EVQLLES GGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGGGRDITYF ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLKGED TAVYYCVKKGNIYFDFYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSSVVTVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFP PPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVDSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK	40
セミブリマブ、 セミブリマブ- r w l c、L I BTAYO (登 録商標)、6Q VL057IN T、H4H77 98N、REG	DIQMTQSPSSLSASVGDSTITITCRASLSIN TFLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLHGGVPS RFSGSGSGTDFTLTITRTLQPEDFATYYCQQ SSNTPTFTFGPGTVVD FRRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGGLSSSPVTKSFN RGEC	41

【0121】

10

20

30

40

50

【表 3-3】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
N-2810、 SAR-439 684 VL	(ジスルフィド架橋) H22-H96、H131-L214、H144-H200、H2 23-H' 223、H226-H' 226、H258-H318、 H364-H422、H' 22-H' 96、H' 131-L' 21 4、H' 114-H' 200、H' 258-H' 318、H' 36 4-H' 422、L23-L88、L134-L194、L' 23 -L' 88、L' 134-L' 194)	
ラムプロリズマ ブ、ベムプロリ ズマブ、KEY TRUDA (登 録商標)、MK -3475、S CH-9004 75、h409 A11 VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYVMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNF NEKFKNRVTLTITDSSSTTTAYMELKSLQFDD TAVYYCARRDYRFDMGFQYWGQGTITVTVSS ASTKGPSTVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGKTITTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV NLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFQNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTITVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK	46
ラムプロリズマ ブ、ベムプロリ ズマブ、KEY TRUDA (登 録商標)、MK -3475、S CH-9004 75、h409 A11 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVS TSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAAYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVY YCQHSRDLPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	47
ラムプロリズマ ブ、ベムプロリ ズマブ、KEY TRUDA (登 録商標)、MK -3475、S CH-9004 75、h409 A11 VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYVMYWVRQAPGQGLEWMGGFPSNGGTNFN EKFKNRVTLTITDSSSTTTAYMELKSLQFDDT AVYYCARRDYRFDMGFQYWGQGTITVTVSS (ジスルフィド架橋) H22-H96、H134-L218、H147-H203、H2 26-H' 226、H229-H' 229、H261-H321、 H367-H425、H' 22-H' 96、H' 134-L' 21 8、H' 147-H' 203、H' 261-H' 321、H' 36 7-H' 425、L23-L92、L138-L198、L' 23 -L' 92、L' 138-L' 198)	48
ラムプロリズマ ブ、ベムプロリ ズマブ、KEY TRUDA (登 録商標)、MK -3475、S CH-9004 75、h409 A11 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVS TSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAAYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVY YCQHSRDLPITFGGGTKVEIK	49
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O (登録商	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLDCKASGITFS NSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAED TAVYYCATNDYWGQGTITVTVSS	50

【0122】

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
標)、BMS- 936558、 MDX-110 6、ONO-4 538 VH		
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O (登録商 標)、BMS- 936558、 MDX-110 6、ONO-4 538 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQ SSNWPRTFTGQGTKEIK (ジスルフィド架橋) H22-H96、H127-L214、H140-H196、H2 19-H' 219、H222-H' 222、H254-H314、 H360-H418、H' 22-H' 96、H' 127-L' 21 4、H' 140-H' 196、H' 254-H' 314、H' 36 0-H' 418、L-23-L88、L134-L194、L' 2 3-L' 88、L' 134-L' 194)	51
プロログリマ ブ、Forte ca、BCD- 100 VH	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTGGGRITYY ADSVKGRFAISR VNAKNTMYLQMNSLRAED TAVYYCARDEGGGTGWGV LKDWPYGLDAWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPVAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQ KSLSLSLSPGK	52
プロログリマ ブ、Forte ca、BCD- 100 VL	QPVL TQPLSVSVVALGQTARITCGGNNIGSK NVHWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISR AQAGDEADYYCQVW DSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVC L LNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	53
バルスチリマ ブ、1Q2QT 5M7EO、A GEN-203 4、AGEN- 2034w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYY ADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCASNGDHWGQGT L VTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGT KTYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGP P C P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P KDTLMISRTPEVTCVVVDV S Q E D P E V Q F N W YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGL	54
バルスチリマ ブ、1Q2QT	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVS SNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA	55

【0123】

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
5M7EO、A GEN-203 4、AGEN- 2034w VL	RFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQ YNNWPRTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	
ドスタリマ ブ、ANB-0 11、GSK- 4057190 A、POGVQ 9A4S5、T SR-042、 WBP-285 VH	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY QDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCASPY YAMDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKV DKRVESKYGP P C P C P A P E F L G G P S V F L F P PKPKD T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q FNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDG S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	56
ドスタリマ ブ、ANB-0 11、GSK- 4057190 A、POGVQ 9A4S5、T SR-042、 WBP-285 VL	DIQLTQSPSPFLSAYVGD RVTITCKASQDVG TAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGVPS RFSGSGSGTEFTLTISSSLQPEDFATYYCQH YSSYPWTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	57
セルブルリマ ブ、HLX-1 0 VH	OVQLVESGGGLV K P G G S L R L S C A A S G F T F S NYGMSWIROAPGKGLEWVSTISGGGSNIYY ADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCVSY Y G I D F W G Q G T S V T V S S A S T K GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKV DKRVESKYGP P C P C P A P E F L G G P S V F L F P PKPKD T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q FNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSDG S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	58
セルブルリマ ブ、HLX-1 0 VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQDVT TAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCOO HYTIPWTFGGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	59
レチファンリマ ブ、2Y3T5 IF01Z、I NCMGA-0 0012、IN CMGA-00	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSTF SYWMNWVRQAPGQGLEWIGV IHPDSETWL DQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREHYGTSPFAYWGQGT L V T V S S A STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSSG	60

【0124】

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
12、MGA- 012 VH	LYSLSSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSN TKVDKRVESKYGP P C P P C P A P E F 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 V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G	
レチファンリマ ブ、2Y3T5 IF01Z、I NCMGA-0 0012、IN CMGA-00 12、MGA- 012 VL	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V D N Y G M S F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I H A A S N Q G S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y F C Q Q S K E V P Y T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	61
ササンリマブ、 LZZ0IC2 EWP、PF- 0680159 1、RN-88 8 VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y W I N W V R Q A P G Q G L E W M G N I Y P G S S L T N Y N E K F K N R V T M T R D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R L S T G T F A Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F 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 V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G K	62
ササンリマブ、 LZZ0IC2 EWP、PF- 0680159 1、RN-88 8 VL	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L W D S G N Q K N F L T W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W T S Y R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y F Y P H T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	63
スバルタリズマ ブ、NVP-L ZV-184、 PDR-00 1、QOG25 L6Z8Z VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L R I S C K G S G Y T F T T Y W M H W V R Q A T G Q G L E W M G N I Y P G T G G S N F D E K F K N R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R W T T G T G A Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F 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 V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F 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 G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q 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 R L T V D K S R W Q E 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 L G	64
スバルタリズマ ブ、NVP-L ZV-184、	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C K S S Q S L L D S G N Q K N F L T W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L E A E D A A	65

【0125】

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
PDR-00 1、QOG25 L6Z8Z VL	TYCYQNDYSYPYTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
セトレリマブ、 JNJ-328 3、JNJ-6 372328 3、LYK98 WP91F VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGGLLEWMGGIIPIFDTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTLT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPETVCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTITVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSSLGK	66
セトレリマブ、 JNJ-328 3、JNJ-6 372328 3、LYK98 WP91F VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVR SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQ RNYWPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFN RGEC	67
テボテリマブ (Tebote limab)、 MGD-013 VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQDVS SVVAWYQQKPGKAPKLLIYS0ASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQ QHYSSTPWTFGG00GTKLEIKGGGSGGGGQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTSY WMN0WVRQAPGQGLEWIGVIHPSDSEWLD QKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSS00LRSE DTAVYYCAREHYGTSPTFAFWGQGTLTVTSS GGCGGGEVAACEKEVA0ALEKEVA0ALEKEV AALEKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDIT00LYITREPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY0 RVVSVSLTITVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIISKAKGQPREPQVYTO0LPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPPVLDSD0DGSFFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSSLG	68
テボテリマブ (Tebote limab)、 MGD-013 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVD NYGMSFMNWFQQKPGQPPKLOLIHAASNQGG SGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAV YFCQQQSKEVPY00TFGGGTKEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTD0YNMDWVRQAPGQGLEWMGDINPDNGV TIYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYM00ELRS LRSDDTAVYYCAREADYFYFDYWGQGTTLT VSSGGCGGKVAACKE0KVAALKEKVAALK EKVAALKE	69
ビジリズマブ、 CT-011、 MDV-930 0	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCVRVGYDALDYWGQGTLTITVSSAST	70

【0126】

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

抗体または A g 結合断片	配列	配列番号
VH	KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFKNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
ビジリズマブ、 CT-011、 MDV-930 0 VL	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTSTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGTGLEIKRTVAAPS VFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	7 1
SG-001 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRTCKASGLTFS SSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAED TAVYYCATNNDYWGQGTLLTVSS	7 2
SG-001 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNRRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQ YSNWPRTFGQGTKEIK	7 3
LZM-009 VH	EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFT SYMYWVVKQSHGKSLLEWIGGVNPSNGGTNF NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSED SAVYYCARRDYRYDMGF DYWGQGTTLTVSS	7 4
LZM-009 VL	QIVLTQSPA IMSASPG EKVTMTCRASKGVS TSGYSYLHWYQQKPGSSPRLLIYLA SYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTITSRMEAE DAATY YCQHSRELPLTFGTGTRLEIK	7 5
LZM-009 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYMYWVVRQAPGQGLEWMGGVNPSNGGTNF NEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRDYRYDMGF DYWGQGTTLTVSS	7 6
LZM-009 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASKGVS TSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFATY YCQHSRELPLTFGTGTKVEIK	7 7
ブジカリマブ (Budigalimab)、 6VDO4TY 300、ABB V-181、P R-16488 17 VH	EIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT HYGMNWVRQAPGQGLEWVGWVNTYTGEPTY ADDFKGRLTFTLDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTREGEGLGFGDWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFKNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	7 8
ブジカリマブ	DVVMVTQSP LSLPVTTPGEPASISCRSSQSIV	7 9

【0127】

10

20

30

40

50

【表 3－9】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
(B u d i g a l i m a b)、 6 V D O 4 T Y 3 O O、A B B V－1 8 1、P R－1 6 4 8 8 1 7 V L	H S H G D T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H I P V T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	
ラムプロリズマ ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY T R U D A (登 録商標)、MK －3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1 V H C D R 1	N Y Y M Y	8 0
ラムプロリズマ ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY T R U D A (登 録商標)、MK －3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1 V H C D R 2	G I N P S N G G T N F N E K F K N	8 1
ラムプロリズマ ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY T R U D A (登 録商標)、MK －3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1 V H C D R 3	R D Y R F D M G F D Y	8 2
ラムプロリズマ ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY T R U D A (登 録商標)、MK －3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1 V L C D R 1	R A S K G V S T S G Y S Y L H	8 3
ラムプロリズマ ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY T R U D A (登 録商標)、MK －3 4 7 5、S C H－9 0 0 4 7 5、h 4 0 9 A 1 1 V L C D R 2	L A S Y L E S	8 4
ラムプロリズマ	Q H S R D L P L T	8 5

【0 1 2 8】

10

20

30

40

50

【表 3－10】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
ブ、ペムプロリ ズマブ、KEY TRUDA（登 録商標）、MK －3475、S CH－9004 75、h409 A11 VL CDR3		
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VH CDR1	NSGMH	86
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VH CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG	87
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VH CDR3	NDDY	88
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VL CDR1	RASQSVSSYLA	89
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VL CDR2	DASNRAT	90

【0129】

10

20

30

40

【表 3－11】

抗体またはA g 結合断片	配列	配列番号
ニボルマブ、ニ ボルマブBM S、OPDIV O（登録商 標）、BMS－ 936558、 MDX－110 6、ONO－4 538 VL CDR3	QQSSNWPR T	9 1
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VH CDR1	FTFSNYGMS	9 2
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VH CDR2	TISGGGSNIY	9 3
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VH CDR3	VSYYYGIDF	9 4
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VL CDR1	KASQDVT TAVA	9 5
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VL CDR2	WASTRHT	9 6
セルブルリマ ブ、HLX－1 0 VL CDR3	QQHYTIPWT	9 7
SG－001 VH CDR1	GLTFSSSG	9 8
SG－001 VH CDR2	IWYDGSKR	9 9
SG－001 VH CDR3	ATNNDY	1 0 0
SG－001 VL CDR1	RASQSVSSYLA	1 0 1
SG－001 VL CDR2	TASNRAT	1 0 2
SG－001 VL CDR3	QQYSNWPR T	1 0 3
PD－1－Fc －OX40L (コード), S L－27925 2 (コード), TAK－252 (コード)	MQIPQAPWPWWAVLQLGWRPGWF LDSPDRP WNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQ DCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTY LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV PTAHPSPSPRPAGQFQSKYGPPCPSCPAPE FLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCWV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVS SKGLPSSIEKTI SNATGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS	1 0 4

【0130】

10

20

30

40

50

【表 3-12】

抗体または A g 結合断片	配列	配列番号
	L G K I E G R M D Q V S H R Y P R I Q S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D N T S L D D F H V N G G E L I L I H Q N P G E F C V L M Q I P Q A P W P W W A V L Q L G W R P G W F L D S P D R P W N P P T F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E V P T A H P S P S P R P A G Q F Q Q V S H R Y P R I Q S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D N T S L D D F H V N G G E L I L I H Q N P G E F C V L	

10

【0131】

抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 32、34、36、38、40、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、および 78 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する V H を含み得る。抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 33、35、37、39、41、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、および 79 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する V H を含み得る。

20

【0132】

一例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 32 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 33 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 35 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 36 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 38 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 39 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 40 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 46 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 47 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 48 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 49 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 50 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 51 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 52 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 53 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 54 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 55 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 56 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 57 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-1 抗原結合断片は、配列番号 58 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 59 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D-1 ポリペプチドまたは抗 P D-

30

40

50

1 抗原結合断片は、配列番号 60 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 61 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 62 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 63 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 64 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 65 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 66 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 67 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 68 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 69 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 70 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 71 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 72 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 73 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 74 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 75 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 76 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 77 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。別の例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 78 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 79 のアミノ酸配列を有する V L とを含む。

10

20

30

40

【0133】

一例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 80 のアミノ酸配列を有する V H C H R 1 と、配列番号 81 のアミノ酸配列を有する V H C H R 2 と、配列番号 82 のアミノ酸配列を有する V H C H R 3 と、配列番号 83 のアミノ酸配列を有する V L C H R 1 と、配列番号 84 のアミノ酸配列を有する V L C H R 2 と、配列番号 85 のアミノ酸配列を有する V L C H R 3 とを含む。一例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 86 のアミノ酸配列を有する V H C H R 1 と、配列番号 87 のアミノ酸配列を有する V H C H R 2 と、配列番号 88 のアミノ酸配列を有する V H C H R 3 と、配列番号 89 のアミノ酸配列を有する V L C H R 1 と、配列番号 90 のアミノ酸配列を有する V L C H R 2 と、配列番号 91 のアミノ酸配列を有する V L C H R 3 とを含む。一例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 92 のアミノ酸配列を有する V H C H R 1 と、配列番号 93 のアミノ酸配列を有する V H C H R 2 と、配列番号 94 のアミノ酸配列を有する V H C H R 3 と、配列番号 95 のアミノ酸配列を有する V L C H R 1 と、配列番号 96 のアミノ酸配列を有する V L C H R 2 と、配列番号 97 のアミノ酸配列を有する V L C H R 3 とを含む。一例では、抗 P D - 1 ポリペプチドまたは抗 P D - 1 抗原結合断片は、配列番号 98 のアミノ酸配列を有する V H C H R 1 と、配列番号 99 のアミノ酸配列を有する V H C H R 2 と、配列番号 100 のアミノ酸配列を有する V H C H R 3 と、配列番号 101 のアミノ酸配列を有する V L C H R 1 と、配列番号 102 のアミノ酸配列を有する V L C H R 2 と、配列番号 103 のアミノ酸配列を有する V L C H R 3 とを含む。

【0134】

一例では、抗 P D - 1 ポリペプチドは融合タンパク質を含む。そのような融合タンパク質は、例えば、C H O - K 1 細胞において発現される、プログラム細胞死 1 (P D - 1) の細胞外ドメイン (E C D) と、ヒト I g G 4 のヒンジ - C H 2 - C H 3 F c ドメインを介して融合された腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリーメンバー 4 (T N F S F 4 または O X 4 0 L) の E C D とを含む両側 F c 融合タンパク質であり得、ここで、融合タンパク質は、配列番号 104 の例示的なアミノ酸配列を有する。

【0135】

抗 H e r 2 抗体も本明細書で提供される。抗 H e r 2 抗体は、本明細書で提供される I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートさせることができる。いくつかの実施形態では、抗

50

Her 2 抗体は、トラスツズマブ (Herceptin、Roche 社 Herclon、RG597、RO452317) である。トラスツズマブは、EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 121) からなる VH 配列を有する。

10

20

30

40

50

【0136】

トラスツズマブの VL 配列は、DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGLVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 122) である。

【0137】

Fc 領域への修飾

本明細書では、抗 PD-1 ポリペプチドが開示され、ここで、該抗 PD-1 ポリペプチドは Fc 領域を含み、該 Fc 領域は少なくとも 1 つの共有結合した化学的リンカーを含む。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、アスパラギン、グルタミン、システイン、またはリジン残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、リジン、またはシステイン残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、リジン残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗 PD-1 ポリペプチドの定常領域に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗 PD-1 ポリペプチドの定常領域に共有結合している。

【0138】

いくつかの実施形態では、抗 PD-1 ポリペプチドは、Fc 領域を含む。いくつかの実施形態では、Fc 領域は、IgG Fc 領域、IgA Fc 領域、IgD Fc 領域、IgM Fc 領域、または IgE Fc 領域である。いくつかの実施形態では、Fc 領域は、IgG Fc 領域、IgA Fc 領域、または IgD Fc 領域である。いくつかの実施形態では、Fc 領域はヒト Fc 領域である。いくつかの実施形態では、Fc 領域はヒト化されている。Fc 領域。いくつかの実施形態では、Fc 領域は IgG Fc 領域である。場合によっては、IgG Fc 領域は、IgG1 Fc 領域、IgG2a Fc 領域、または IgG4 Fc 領域である。場合によっては、IgG Fc 領域は、IgG1 Fc 領域、IgG2a Fc 領域、または IgG4 Fc 領域である。

【0139】

抗体または抗原結合断片の Fc 媒介エフェクター機能、例えば抗体依存性細胞傷害 (ADCC) および／または補体機能などを低下させるために、1 つ以上の変異を Fc 領域に導入してもよい。場合によっては、修飾された Fc は、S228P Fc 変異を含有するヒト化 IgG4 カップアイソタイプを含む。場合によっては、修飾された Fc は、重鎖 CH2 ドメインが、例えば、(a) L238P、L239E、および P335S；または (2) K248；K288、および K317 などの三重変異で操作されているヒト IgG1 を含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、配列番号105 (Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro1 Glu Xaa Xaa Gly Xaa Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Xaa Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly、ここで、Xaaは、任意の天然に存在するアミノ酸であり得る)に示される配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有する。

10

20

30

【0141】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、配列番号105におけるシステインを含有しない位置にシステイン残基を組み込むことなどによって、Fc領域を特定の残基で修飾またはコンジュゲートしやすくする1つ以上の変異を含む。代替的に、Fc領域は、結合ハンドルを含む修飾天然アミノ酸または非天然アミノ酸、例えばリンカーを介して修飾天然アミノ酸または非天然アミノ酸に連結されたものを組み込むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、Fc領域は、追加のサイトカイン (例えば、IL-2、IL-7、またはIL-18ポリペプチド) へのリンカーの結合を容易にする任意の変異を含まない。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105に示されるネイティブ残基に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のネイティブリジン残基に結合している。

40

【0142】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域の1つのアミノ酸残基に共有結合し得る。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、Fc領域の非末端残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、非末端残基は、抗PD-1ポリペプチドのCH1、CH2、またはCH3領域にある。いくつかの実施形態では、非末端残基は、抗PD-1ポリペプチドのCH2領域にある。

【0143】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の10~90位のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の10~20、10~30、10~40、10~50、10~60、10~70、1~80、10~90、10~100、10~110、10~1

50

20、10～130、10～140、10～150、10～160、10～170、10～180、10～190、または10～200位のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の10～30、50～70、または80～100位のいずれかのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の20～40、65～85、または90～110のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の15～26、55～65、または85～90位のいずれかのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の25～35、70～80、または95～105位のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105の30、32、72、74、79または101位のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のK30、K32、K72、K74、Q79、またはK101のいずれか1つのアミノ酸残基においてFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基30のFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基32のFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基72のFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基74のFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基79のFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号105のアミノ酸残基101のFc領域に結合している。

10

20

30

40

50

【0144】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、（例えば、ポリペプチドを変性させずに）ポリペプチドの機能が維持されるように、癌または炎症関連抗原（例えば、抗PD-1抗体）に選択的に結合するポリペプチドのアミノ酸残基に共有結合している。例えば、ポリペプチドがヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）などの抗体である場合、露出したリジン残基、露出したグルタミン残基および露出したチロシン残基が、以下の位置に存在する（EUNANBARINGによるウェブサイト/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHGNber.htmlを参照）。例示的な露出したリジン残基：CH2ドメイン（246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位、および位置338）CH3ドメイン（360位、414位、および439位）。例示的な露出したグルタミン残基：CH2ドメイン（295位）。例示的な露出したチロシン残基：CH2ドメイン（278位、296位、および300位）CH3ドメイン（436位）。

【0145】

ヒトIgG、例えばヒトIgG1はまた、後の修飾のために理想的に表面露出される残基を提供するために、上に列挙した位置のいずれか1つでリジン、グルタミンまたはチロシン残基で修飾されてもよい。

【0146】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1抗体の定常領域中のアミノ酸残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、CH1、CH2、またはCH3領域のアミノ酸残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、CH2領域中のアミノ酸残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、ヒトIgG FcにおけるEUNANBARINGに従った以下の残基の群：アミノ酸残基1～478、アミノ酸残基2～478、アミノ酸残基1～477、アミノ酸残基2～477、アミノ酸残基10～467、アミノ酸残基30～447、アミノ酸残基50～427、アミノ酸残基100～377、アミノ酸残基150～327、アミノ酸残基200～327、アミノ酸残基240～327、およびアミノ酸残基240～320から選択される1つの残基に共有結合していてもよい。

【0147】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、ヒトIgG Fc領域の1つのリジンまたはグルタミン残基に共有結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域のLys246に共有結合しており、ここで、アミノ酸残基位置番号は、Eunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域のLys248に共有結合しており、ここで、アミノ酸残基位置番号は、Eunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域のLys288に共有結合しており、ここで、アミノ酸残基位置番号は、Eunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域のLys290に共有結合しており、ここで、アミノ酸残基位置番号は、Eunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗体ポリペプチドのFc領域のGln295に共有結合しており、アミノ酸残基位置番号はEunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのLys317に共有結合しており、ここで、アミノ酸残基位置番号は、Eunambリングに基づく。

10

【0148】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、アミノ酸残基のサブセットから選択されるアミノ酸残基に共有結合し得る。いくつかの実施形態では、サブセットは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域の2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域の2つのリジン残基のうちの1つに共有結合し得る。

20

【0149】

いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドは、抗PD-1ポリペプチドのFc領域に共有結合した2つのリンカーを含むであろう。いくつかの実施形態では、2つのリンカーの各々は、抗PD-1ポリペプチドの異なる重鎖に共有結合している。いくつかの実施形態では、2つのリンカーの各々は、同じ残基位置で抗PD-1ポリペプチドの異なる重鎖に共有結合している。いくつかの実施形態では、2つのリンカーの各々は、異なる残基位置で抗PD-1ポリペプチドの異なる重鎖に共有結合している。2つのリンカーが異なる残基位置に共有結合している場合、本明細書で提供される残基位置の任意の組み合わせを組み合わせ使用することができる。

30

【0150】

いくつかの実施形態では、第1の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第1のFc領域のLys248に共有結合しており、第2の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第2のFc領域のLys288に共有結合しており、残基位置番号はEunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、第1の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第1のFc領域のLys246に共有結合しており、第2の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第2のFc領域のLys288に共有結合しており、残基位置番号はEunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、第1の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第1のFc領域のLys248に共有結合しており、第2の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第2のFc領域のLys317に共有結合しており、残基位置番号はEunambリングに基づく。いくつかの実施形態では、第1の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第1のFc領域のLys246に共有結合しており、第2の化学的リンカーは、抗PD-1ポリペプチドの第2のFc領域のLys317に共有結合しており、残基位置番号はEunambリングに基づく。

40

【0151】

Fc領域の修飾方法

50

プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1) に選択的に結合するポリペプチドの修飾されたFc領域を調製する方法、例えば、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカー、コンジュゲーションハンドル、またはサイトカインの結合のための方法も本明細書で提供される。PD-1 に結合する抗体または他のポリペプチドのFc領域の部位特異的修飾のための様々な方法が当該技術分野で公知である。

リンカーを抗体に部位特異的に結合させるように構成されたアフィニティーペプチドによる修飾

【0152】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、リンカー、コンジュゲーションハンドル、またはそれらの組み合わせを組み込むように修飾される。いくつかの実施形態では、修飾は、Fc領域を、リンカーまたは他の基をFc領域に、例えばFc領域の特定の残基に結合させるように構成されたペイロードを有するアフィニティーペプチドと接触させることによって行われる。いくつかの実施形態では、リンカーは、Fc領域の残基と結合を形成する反応性基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）を使用して結合される。いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドは、切断可能なリンカーを含む。切断可能なリンカーは、該リンカーまたは他の基がFc領域に結合した後、アフィニティーペプチドを除去して、Fc領域に結合した所望のリンカーまたは他の基のみを残すことができるように、アフィニティーペプチド上に構成される。次いで、リンカーまたは他の基を使用してさらに、サイトカインまたはサイトカインに結合したリンカーなどの追加の基をFc領域に付加することができる。

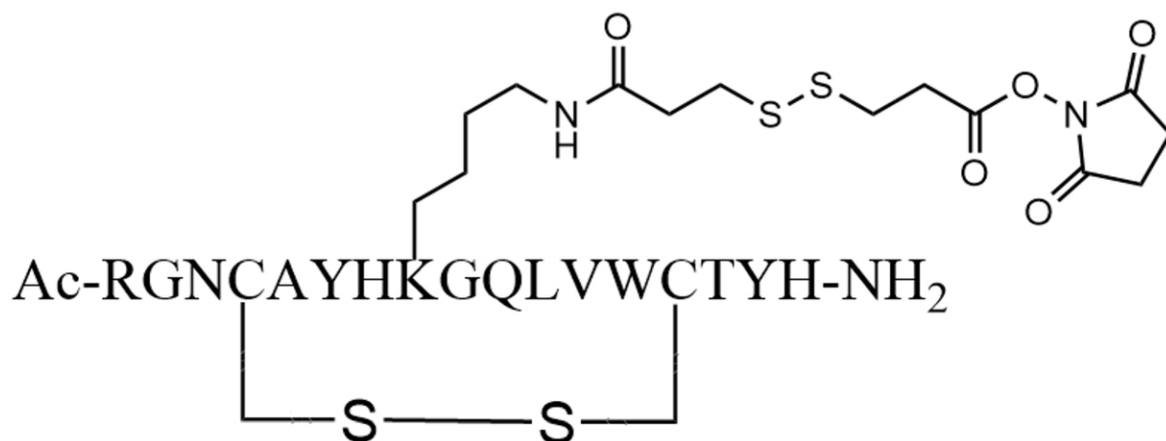
【0153】

そのようなアフィニティーペプチドの非限定的な例は、少なくとも国際公開第2018199337 (A1) 号、国際公開第2019240288 (A1) 号、国際公開第2019240287 (A1) 号、および国際公開第2020090979 (A1) 号に見出すことができ、これらの各々は、あたかもその全体が本明細書に記載されているかのよう参照により組み込まれる。いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドは、抗体のFc領域の1つ以上の特異的残基をリンカー／コンジュゲーションハンドルペイロードに送達するように修飾されたペプチドである。いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドは、(1) QETNPTENLYFQQKNMQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRD DDC (配列番号106)；(2) QTADNQKNMQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRD DDCS QSANLLAEA QQLNDAQAPQA (配列番号107)；(3) QETKNMQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRD DDC (配列番号108)；(4) QETFNKQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRD DDC (配列番号109)；(5) QETFNMQCQRRFYEA L HDPNL NKEQRNARIRSIRD DDC (配列番号110)；(6) QETFNMQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRKDDC (配列番号111)；(7) QETMQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRKDDC (配列番号112)；(8) QETQCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRKDDC (配列番号113)；(9) QETCQRRFYEA L HDPNL NEEQRNARIRSIRKDDC (配列番号114)；(10) QETRGNCAYHKGQLVWCTYH (配列番号115)；および(11) QETRGNCAYHKGQIIWCTYH (配列番号116)の中から選択されるペプチド、またはN末端が1、2、3、4、5つの残基で切断された対応するペプチドに対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有する。本明細書で提供されるように、切断可能なリンカーと、抗体の残基K248にペイロードを結合させることができるコンジュゲーションハンドルペイロードを有する例示的なアフィニティーペプチドを下記に示す (Matsudaら、Chemical Site-Specific Conjugation Platform to Improve the Pharmacokinetics and Therapeutic Index o

f Antibody-Drug Conjugates, J Mol. Pharmaceutics 2021, 18, 11, 4058-4066に報告されている)。

【0154】

【化3】



10

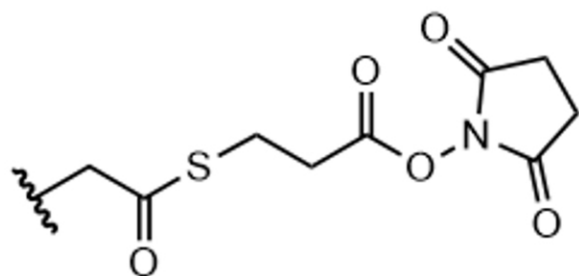
【0155】

Fc領域の別の残基を標的とする別のアフィニティーペプチドは、AJICAP（商標）技術に関して上で引用した参考文献に記載されており、そのようなアフィニティーペプチドを使用して、所望の官能基をFc領域の別の残基に結合させることができる（例えば、K246、K288など）。例えば、上記のアフィニティーペプチドのジスルフィド基を代わりにチオエステルで置き換えて、連結基の切断可能な部分としてスルフヒドリル保護基を提供することができる（例えば、アフィニティーペプチドの関連部分は、

20

【0156】

【化4】



30

の構造、または下記で論じられる切断可能なリンカーの別のものを有するであろう)。

【0157】

本開示のアフィニティーペプチドは、切断可能なリンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドの切断可能なリンカーは、アフィニティーペプチドを、Fc領域に結合することになる基に接続し、リンカーまたはコンジュゲーションハンドルを含む基が結合した後にペプチドが切断され得るように構成される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは二価の基である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、チオエステル基、エステル基、スルファン基；メタンイミン基；オキシビニル基；チオプロパノエート基；エタン-1, 2-ジオール基；(イミダゾール-1-イル)メタン-1-オン基；セレノエーテル基；シリルエーテル基；ジオキシシラン基；エーテル基；ジオキシメタン基；テトラオキソスピロ[5.5]ウンデカン基；アセトアミドエチルホスホラミダイト基；ビス(メチルチオ)-ピラゾロピラゾール-ジオン基；2-オキソ-2-フェニルエチルホルメート基；4-オキシベンジルカルバメート基；2-(4-ヒドロキシ-オキシフェニル)ジアジニル安息香酸基；4-アミノ-2-(2-アミノ-2-オキソエチル)-4-オキソブター-2-エン酸基；2-(2-メチレンヒドラジニル)ピリジン基；N'-メチレンホルモヒドラジド基；またはイソプロピルカルバメー

40

50

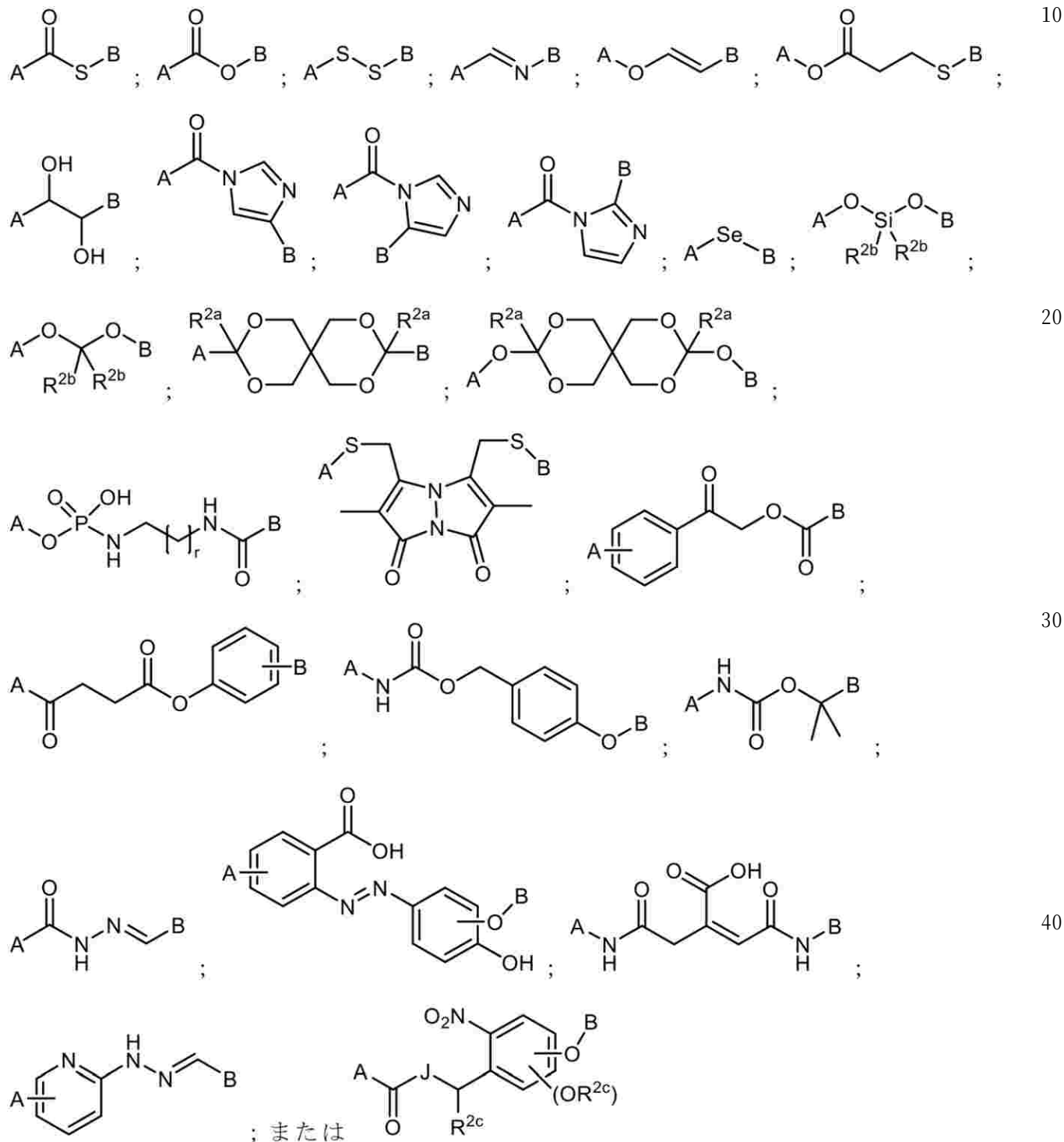
ト基を含み得、それらいずれもが非置換であるかまたは置換されている。アフィニティーペプチドへの切断可能なリンカーの組成および結合点、ならびに関連する使用方法は、少なくとも国際公開第2018199337(A1)号、国際公開第2019240288(A1)号、国際公開第2019240287(A1)号、および国際公開第2020090979(A1)号に記載されている。

【0158】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、

【0159】

【化5】



－ A または B の一方はリンカーの結合点であり、 A または B の他方はアフィニティーペプチドへの結合点であり、

－ 各 R^{2a} は、独立して、H または必要に応じて置換されていてもよいアルキルであり、

－ 各 R^{2b} は、独立して、H または必要に応じて置換されていてもよいアルキルであり、

－ R^{2c} は、H または必要に応じて置換されていてもよいアルキルであり、

－ J は、メチレン、N、S、Si または O 原子であり、

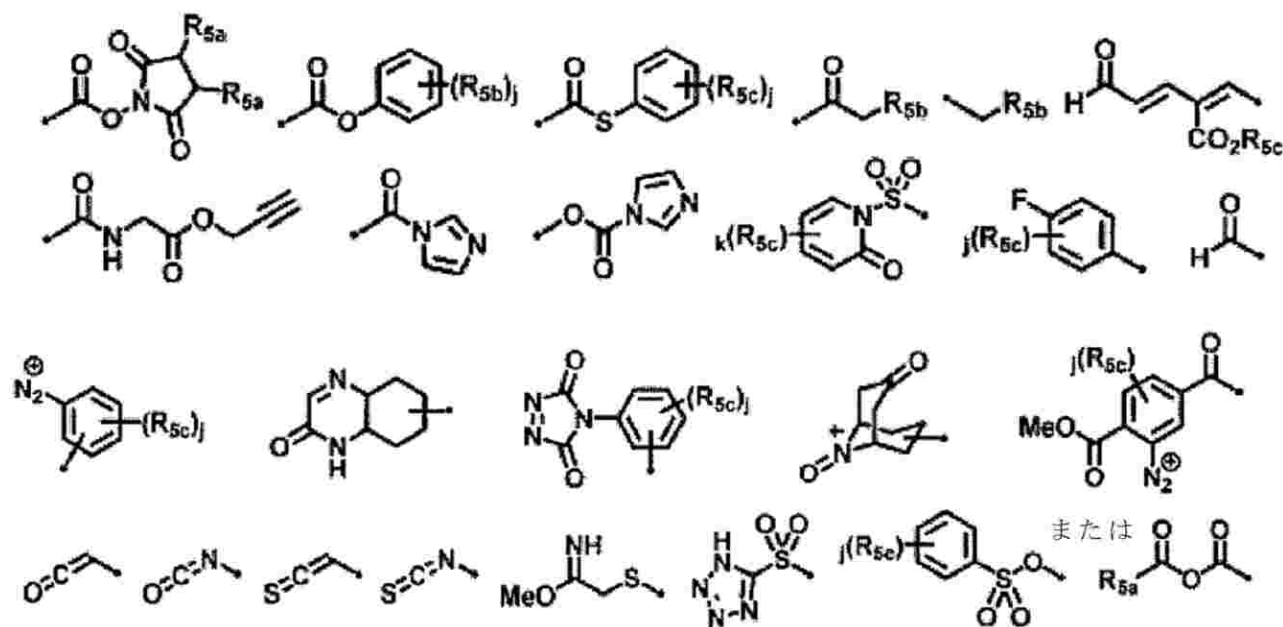
－ r は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である。

【0160】

アフィニティーペプチドは、Fc 領域へのリンカー／コンジュゲーションハンドルの共有結合を可能にするように構成された反応性基を含む。いくつかの実施形態では、反応性基は、リンカーの結合を容易にするために組み込まれた Fc 領域のリジン残基、チロシン残基、セリン残基、システイン残基、または非天然アミノ酸残基などの特定のアミノ酸残基の官能基に対して選択的である。反応性基は、任意の適切な官能基、例えばリジンとの反応のための活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはその誘導体、ペンタフルオロフェニルエステルなど）またはシステインとの反応のためのスルフィドリル反応性基（例えば、 α - β 不飽和カルボニルまたはマレイミドなどの Michael 受容体）であり得る。いくつかの実施形態では、反応性基は：

【0161】

【化6】



であり、

式中、

－ 各 R_{5a} 、 R_{5b} 、および R_{5c} は、独立して、H、ハロゲン、または必要に応じて置換されたアルキルであり、

－ 各 j は、1、2、3、4、または 5 であり、

－ 各 k は、1、2、3、4、または 5 である。

【0162】

いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドは、切断可能なリンカーの切断時に反応性部分が露出するように、反応性部分を所望のアミノ酸残基に送達するために使用される。非限定的な例として、反応性基は、アフィニティーペプチドと Fc 領域との間の相互作用のために抗 PD-1 に選択的に結合するポリペプチドの Fc 領域の所望の残基と共有結合を形成する。この共有結合形成に続いて、切断可能なリンカーは、適切な条件下で

切断され、反応性部分が示される（例えば、切断可能なリンカーがチオエステルを含む場合、切断可能なリンカーの切断後に遊離スルフィド基がFc領域に結合する）。次いで、この新しい反応性部分を使用して、その後、スルフィド反応性基（例えば、 α -ハロゲン化カルボニル基、 α - β 不飽和カルボニル基、マレイミド基など）に係留されたコンジュゲーションハンドルを含む試薬によって、コンジュゲーションハンドルなどの追加の部分を付加することができる。

【0163】

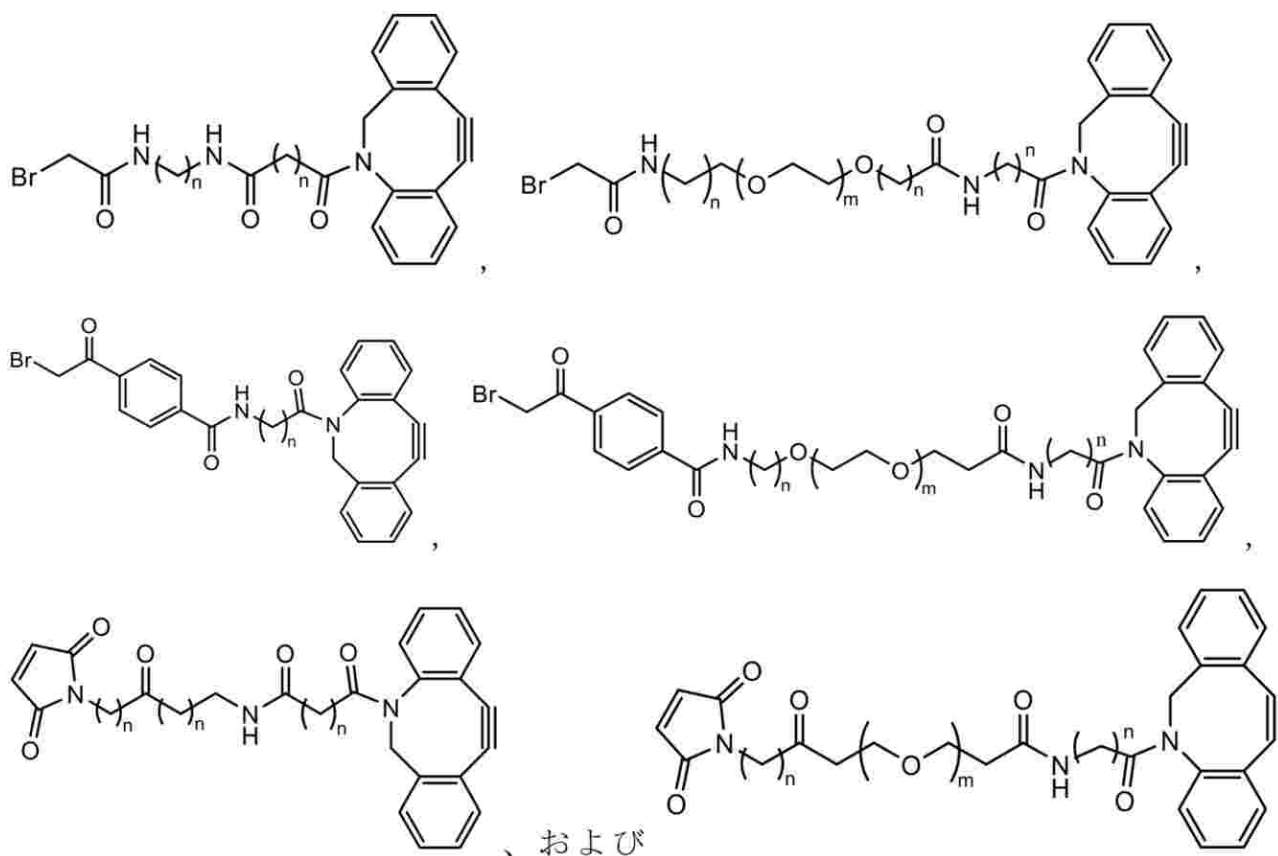
いくつかの実施形態では、アフィニティーペプチドを使用して、遊離スルフィド基をFc領域のリジンに送達する。いくつかの実施形態では、次いで、遊離スルフィド基を二官能性連結試薬と反応させて、新しいコンジュゲーションハンドルをFc領域に結合させる。いくつかの実施形態では、次いで、新しいコンジュゲーションハンドルを使用して、結合したサイトカインへのリンカーを形成する。いくつかの実施形態では、新しいコンジュゲーションハンドルは、アルキン官能基である。いくつかの実施形態では、新しいコンジュゲーションハンドルは、DBC O官能基である。

【0164】

この目的に有用な例示的な二官能性連結試薬は、式A-B-Cのものであり、式中、Aはスルフィド反応性コンジュゲーションハンドル（例えば、マレイミド、 α 、 β -不飽和カルボニル、 α -ハロゲン化カルボニル）であり、Bはライニング基であり、Cは新しいコンジュゲーションハンドル（例えば、DBC Oなどのアルキン）である。二官能性連結試薬の具体的な非限定的な例としては、

【0165】

【化7】



および関連分子（例えば、異性体）が挙げられ、

式中、各nは、独立して1～6の整数であり、各mは、独立して1～30の整数である。

【0166】

代替的に、アフィニティーペプチドは、反応性基とFc領域の残基との間の共有結合形

成直後に（リンカー基などによって）コンジュゲーションハンドルがFc領域に付加されるように構成することができる。そのような場合、アフィニティーペプチドが切断され、コンジュゲーションハンドルは、IL-2ポリペプチド（または他のサイトカイン）へのその後のコンジュゲーションの準備が直ちに整う。

【0167】

別の結合方法－酵素媒介

抗体のFc領域のアフィニティーペプチド媒介修飾は、Fc領域を部位特異的に修飾するために使用することができる他の方法（例えば、使いやすさ、多くの異なる抗体コンジュゲートを迅速に生成する能力、時間のかかるタンパク質工学を行う必要なしに多くの「既製の」市販の抗体を使用する能力など）よりも多くの利点を有するが、修飾を行う他の方法も本開示の範囲内であると企図される。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、本開示は、一般に、1) グルタミン含有タグ、内因性グルタミン（例えば、操作を伴わないネイティブグルタミン、例えば可変ドメイン中のグルタミン、CDRなど）、および／または抗体操作もしくは操作されたトランスグルタミナーゼによって反応性にされた内因性グルタミン；ならびに2) アミンドナー単位、リンカーおよび薬剤部分を含むアミンドナー剤を含むトランスグルタミナーゼ媒介部位特異的抗体－薬物コンジュゲート（ADC）に関する。そのようなトランスグルタミナーゼ媒介部位特異的修飾の非限定的な例は、少なくとも国際公開第2020188061号、米国特許出願公開第2022133904号明細書、米国特許出願公開第2019194641号明細書、米国特許出願公開第2021128743号明細書、米国特許第9764038号明細書、米国特許出願公開第10675359号明細書、米国特許第9717803号明細書、米国特許出願公開第10434180号明細書、米国特許第9427478号明細書の刊行物に見出すことができ、それらは、あたかもその全体が本明細書に記載されているかのように参照により組み込まれる。

20

【0169】

別の態様では、本開示は、次の式を含む操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートを提供する：（Fc含有ポリペプチド-T-A）、式中、Tは、特定の部位で操作されたアシルドナーグルタミン含有タグであり、Aは、アミンドナー剤であり、該アミンドナー剤は、Fc含有ポリペプチドのカルボキシル末端、アミノ末端、または別の部位でアシルドナーグルタミン含有タグに部位特異的にコンジュゲートされており、該アシルドナーグルタミン含有タグは、アミノ酸配列XXQXを含み、Xは、任意のアミノ酸（例えば、Xは、同じまたは異なるアミノ酸であり得る）であり、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートは、295位でのグルタミンからアスパラギンへのアミノ酸置換（Q295N；EUNANBARINGSキーム）を含む。

30

【0170】

いくつかの実施形態では、アシルドナーグルタミン含有タグは、ポリペプチドまたはFc含有ポリペプチド中の反応性Lys（例えば、アシルドナーおよびトランスグルタミナーゼの存在下でアミンドナーとして共有結合を形成する能力）に空間的に隣接していない。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはFc含有ポリペプチドは、同じ位置の野生型ポリペプチドと比較して、カルボキシル末端の最後のアミノ酸位置にアミノ酸修飾を含む。アミノ酸修飾は、アミノ酸の欠失、挿入、置換、変異、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

40

【0171】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドコンジュゲートは、完全長抗体重鎖および抗体軽鎖を含み、アシルドナーグルタミン含有タグは、重鎖、軽鎖、または重鎖と軽鎖との両方のカルボキシル末端に位置する。

【0172】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドコンジュゲートは抗体を含み、該抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性

50

抗体、ミニボディ、ダイアボディ、または抗体断片である。いくつかの実施形態では、抗体はIgGである。

【0173】

別の態様では、次の式を含む操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートを調製する方法が本明細書に記載される：(Fc含有ポリペプチド-T-A)、式中、Tは、特定の部位で操作されたアシルドナーグルタミン含有タグであり、Aは、アミンドナー剤であり、該アミンドナー剤は、Fc含有ポリペプチドのカルボキシル末端、アミノ末端、または別の部位でアシルドナーグルタミン含有タグに部位特異的にコンジュゲートされており、該アシルドナーグルタミン含有タグはアミノ酸配列XXQXを含み、ここで、Xは、任意のアミノ酸（例えば、Xは、同じまたは異なるアミノ酸であり得る）であり、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートは、295位(Q295N; EUNANバリングスキーム)でのグルタミンからアスパラギンへのアミノ酸置換を含み、該方法は、a) Fc含有ポリペプチドとアシルドナーグルタミン含有タグとを含む操作された(Fc含有ポリペプチド)-T分子を提供するステップと、b) トランスグルタミナーゼの存在下で、アミンドナー剤を操作された(Fc含有ポリペプチド)-T分子と接触させるステップと、c) 操作された(Fc含有ポリペプチド)-Tをアミンドナー剤に共有結合させて、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートを形成するステップとを含む。

10

【0174】

別の態様では、式：ポリペプチド-T-Aを含む操作されたポリペプチドコンジュゲートを調製する方法であって、式中、Tは、特定の部位で操作されたアシルドナーグルタミン含有タグであり、Aはアミンドナー剤であり、該アミンドナー剤は、ポリペプチドのカルボキシル末端、アミノ末端、または別の部位でアシルドナーグルタミン含有タグに部位特異的にコンジュゲートされており、該アシルドナーグルタミン含有タグは、アミノ酸配列LLQGPX（配列番号153）（ここで、Xは、AまたはPである）、またはGGLLQGP（配列番号154）を含み、該方法は、a) ポリペプチドとアシルドナーグルタミン含有タグとを含む操作されたポリペプチド-T分子を提供するステップと、b) トランスグルタミナーゼの存在下でアミンドナー剤を操作されたポリペプチド-T分子と接触させるステップと、c) 操作されたポリペプチド-Tをアミンドナー剤に共有結合させて、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲートを形成するステップとを含む、方法が本明細書に記載される。

20

30

【0175】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたポリペプチドコンジュゲート（例えば、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲート、操作されたFab含有ポリペプチドコンジュゲート、または操作された抗体コンジュゲート）は、少なくとも約51%のコンジュゲーション効率を有する。別の態様では、本発明は、本明細書に記載される操作されたポリペプチドコンジュゲート（例えば、操作されたFc含有ポリペプチドコンジュゲート、操作されたFab含有ポリペプチドコンジュゲート、または操作された抗体コンジュゲート）と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0176】

いくつかの実施形態では、関心対象部分(Z)を抗体にコンジュゲートさせる方法であって、(a) カップリング酵素、例えばトランスアミダーゼの存在下で連結試薬（リンカー）と反応性である（例えば、定常領域の一次配列内に）少なくとも1つの受容体アミノ酸残基（例えば、天然に存在するアミノ酸）を有する抗体を提供するステップと、(b) 前述の抗体を、反応性基(R)、必要に応じて保護された反応性基または必要に応じて保護されていない反応性基を含む連結試薬（例えば、第一級アミンを含むリンカー）と反応させステップであって、受容体アミノ酸残基と連結試薬(R部分以外)との間に共有結合を形成させることができる酵素の存在下、連結試薬を介して反応性基(R)に（共有結合的に）連結された受容体アミノ酸残基を含む抗体を得るのに十分な条件下で行うステップとを含む、方法が本明細書に記載される。必要に応じて、抗体または抗体断片の前述の受容体残基は、+2位で非アスパラギン酸残基に隣接している。必要に応じて、+2位の残

40

50

基は非アスパラギン酸残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非アスパラギン酸、非グルタミン残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非アスパラギン酸、非アスパラギン残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非負電荷アミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸以外のアミノ酸）である。必要に応じて、受容体グルタミンは、抗体重鎖のFcドメイン内にあり、必要に応じてCH2ドメインのさらに内部にある。必要に応じて、抗体は、重鎖N297結合グリコシル化を含まない。必要に応じて、受容体グルタミンは295位にあり、+2位の残基は、抗体重鎖の297位（EUインデックスナンバリング）の残基である。

【0177】

一態様では、関心対象部分（Z）を抗体にコンジュゲートさせる方法であって、（a）少なくとも1つの受容体グルタミン残基を有する抗体を提供するステップと、（b）前述の抗体を、反応性基（R）、好ましくは保護された反応性基を含む第一級アミン（リジン系リンカー）を含むリンカーと反応させるステップであって、トランスグルタミナーゼ（T G a s e）の存在下、前述のリンカーを介して反応性基（R）に（共有結合的に）連結された受容体グルタミンを含む抗体を得るのに十分な条件下で行うステップとを含む、方法が本明細書に記載される。必要に応じて、抗体または抗体断片の前述の受容体グルタミン残基は、+2位で非アスパラギン酸残基に隣接している。必要に応じて、+2位の残基は非アスパラギン酸残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非アスパラギン酸、非グルタミン残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非アスパラギン酸、非アスパラギン残基である。一実施形態では、+2位の残基は、非負電荷アミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸以外のアミノ酸）である。必要に応じて、受容体グルタミンは、抗体重鎖のFcドメイン内にあり、必要に応じてCH2ドメインのさらに内部にある。必要に応じて、抗体は、重鎖N297結合グリコシル化を含まない。必要に応じて、受容体グルタミンは295位にあり、+2位の残基は、抗体重鎖の297位（EUインデックスナンバリング）の残基である。

【0178】

第一級アミン（リジン系リンカー）を含むリンカーを介して反応性基（R）に連結された受容体残基または受容体グルタミン残基を含む抗体を、その後、関心対象部分（Z）を含む反応パートナーと反応させて、リンカーを介して目的対象部分（Z）に連結された受容体残基または受容体グルタミン残基を含む抗体を生成することができる。したがって、一実施形態では、本方法は、ステップ（c）：（i）必要に応じて固体支持体上に固定化された、第一級アミン（リジン系リンカー）を含むリンカーを介して反応性基（R）に連結された受容体グルタミンを含むステップb）の抗体を、（ii）目的対象部分（Z）と、反応性基Rと反応することができる反応性基（R'）とを含む化合物と、第一級アミン（リジン系リンカー）を含むリンカーを介して目的対象部分（Z）に連結された受容体グルタミンを含む抗体を得るのに十分な条件下で反応させるステップをさらに含む。好ましくは、目的対象部分（Z）と、反応性基Rと反応することができる反応性基（R'）とを含む前述の化合物は、抗体に対して80倍、40倍、20倍、10倍、5倍または4モル当量未満で提供される。一実施形態では、抗体は、2つの受容体グルタミンを含み、目的対象部分（Z）と反応性基（R'）とを含む化合物は、抗体に対して10モル当量以下で提供される。一実施形態では、抗体は2つのアクセプターグルタミンを含み、目的の部分（Z）および反応性基（R'）を含む化合物は、抗体に対して5モル当量以下で提供される。一実施形態では、抗体は4つの受容体グルタミンを含み、目的対象部分（Z）と反応性基（R'）とを含む化合物は、抗体に対して20モル当量以下で提供される。一実施形態では、抗体は、4つの受容体グルタミンを含み、目的対象部分（Z）と反応性基（R'）とを含む化合物は、抗体に対して10モル当量以下で提供される。一実施形態では、ステップ（b）および／または（c）は水性条件下で行われる。必要に応じて、ステップ（c）は、官能化受容体グルタミン残基を含む抗体のサンプルを固体支持体に固定化して、固定化された抗体を含むサンプルを提供するステップと、固定化された抗体を含むサンプルを化合物と反応させるステップと、必要に応じて任意の未反応の化合物を回収し、その

10

20

30

40

50

ような回収された化合物を固定化された抗体との反応のために固体支持体に再導入するステップと、抗体コンジュゲートを溶出させて、Z部分を含む組成物を提供することを含む。

【0179】

コンジュゲーションハンドル化学

いくつかの実施形態では、PD-1に選択的に結合するポリペプチドの適切に修飾されたFc領域は、PD-1に選択的に結合するポリペプチドをIL-2ポリペプチドにコンジュゲートするために使用されるコンジュゲーションハンドルを含む。

【0180】

IL-2ポリペプチドに結合した相補的な反応性基と反応することができる任意の適切な反応性基をコンジュゲーションハンドルとして使用することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、Cu(I)触媒または「銅フリー」アルキン-アジドトリアゾール形成反応（例えば、歪み促進環化付加）、シュタウディンガーライゲーション、逆電気要請型ディールス・アルダー（IEDDA）反応、「フォトクリック」ケミストリー、トランスシクロクテンとのテトラジン環化付加、またはオレフィンメタセシスおよび鈴木-宮浦もしくは菌頭クロスカップリングなどの金属媒介プロセスのための試薬を含む。

10

【0181】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、「銅フリー」アルキンアジドトリアゾール形成反応のための試薬を含む。前述のアルキンアジドトリアゾール形成反応のためのアルキンの非限定的な例としては、シクロオクチン試薬（例えば、(1R, 8S, 9s)ピシクロ[6.1.0]ノン-4-イン-9-イルメタノール含有試薬、ジベンゾシクロオクチン-アミン試薬、ジフルオロシクロオクチン、またはそれらの誘導体）が挙げられる。いくつかの実施形態では、アルキン官能基はFc領域に結合している。いくつかの実施形態では、アジド官能基はFc領域に結合している。

20

【0182】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、アジド、アルキン、テトラジン、ハリド、スルフィドリル、ジスルフィド、マレイミド、活性化エステル、アルケン、アルデヒド、ケトン、イミン、ヒドラジン、およびヒドラジドから選択される反応基を含む。いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドは、Fc領域のコンジュゲーションハンドルに相補的な反応性基を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルおよび相補的コンジュゲーションハンドルは、「クリック」化学試薬を含む。クリックケミストリー残基の例示的な群は、Heinら、「Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences」Pharmaceutical Research volume 25, pages 2216-2230 (2008); Thirumuruganら、「Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications」, Chem. Rev. 2013, 113, 7, 4905-4979; 米国特許出願公開第20160107999 (A1)号明細書; 米国特許第10266502号明細書; 米国特許出願公開第20190204330 (A1)号明細書に示されており、これらは各々、参照により全体が組み込まれる。

30

40

リンカー構造

【0183】

いくつかの実施形態では、PD-1およびサイトカイン（例えば、IL-2ポリペプチド）に選択的に結合するポリペプチドを結合させるために使用されるリンカーは、両方の部分に結合点を含む。結合点は、本明細書で提供される結合を容易にするための残基のいずれかであり得る。リンカー構造は、2つの部分間の空間的結合を作り出すための任意の適切な構造であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、両方の部分の共有結合を提供する。いくつかの実施形態では、リンカーは化学的リンカー（例えば、融合タンパク

50

質のように発現されたポリペプチドではない)である。

【0184】

いくつかの実施形態では、リンカーはポリマーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリ(アルキレンオキシド)、多糖類、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリオキサゾリン、ポリ(アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、リンカーはポリ(アルキレンオキシド)を含む。いくつかの実施形態では、ポリ(アルキレンオキシド)は、ポリエチレングリコールもしくはポリプロピレングリコール、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、ポリ(アルキレンオキシド)はポリエチレングリコールである。

10

【0185】

いくつかの実施形態では、リンカーは二官能性リンカーである。いくつかの実施形態では、二官能性リンカーは、アミド基、エステル基、エーテル基、チオエーテル基、またはカルボニル基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは非ポリマーリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、非ポリマーの二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、非ポリマーの二官能性リンカーは、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート;マレイミドカプロイル;バリニシトルリン;アリル(4-メトキシフェニル)ジメチルシラン;6-(アリルオキシカルボニルアミノ)-1-ヘキサノール;4-アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール;または(E)-N-(2-アミノエチル)-4-{2-[4-(3-アジドプロポキシ)フェニル]ジアゼニル}ベンズアミドヒドロクロリドを含む。

20

【0186】

リンカーは、分岐鎖または直鎖状であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは直鎖状である。いくつかの実施形態では、リンカーは分岐鎖状である。いくつかの実施形態では、リンカーは、(例えば、第1の結合点と第2の結合点との間に)少なくとも10、20、50、100、500、1000、2000、3000、または5000個の原子の鎖の直鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも10、20、30、40、または50個の原子の鎖の直鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも10個の原子の直鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは分岐鎖状であり、少なくとも10、20、50、100、500、1000、2000、3000、または5000個の原子の鎖の直鎖部分を含む。

30

【0187】

いくつかの実施形態では、リンカーは、約200ダルトン~約2000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、200ダルトン~100,000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、200ダルトン~500ダルトン、200ダルトン~750ダルトン、200ダルトン~1,000ダルトン、200ダルトン~5,000ダルトン、200ダルトン~10,000ダルトン、200ダルトン~20,000ダルトン、200ダルトン~50,000ダルトン、200ダルトン~100,000ダルトン、500ダルトン~750ダルトン、500ダルトン~1,000ダルトン、500ダルトン~5,000ダルトン、500ダルトン~10,000ダルトン、500ダルトン~20,000ダルトン、500ダルトン~50,000ダルトン、500ダルトン~100,000ダルトン、750ダルトン~1,000ダルトン、750ダルトン~5,000ダルトン、750ダルトン~10,000ダルトン、750ダルトン~20,000ダルトン、750ダルトン~50,000ダルトン、750ダルトン~100,000ダルトン、1,000ダルトン~5,000ダルトン、1,000ダルトン~10,000ダルトン、1,000ダルトン~20,000ダルトン、1,000ダルトン~50,000ダルトン、1,000ダルトン~100,000ダルトン、5,000ダルトン~10,000ダルトン、5,000ダルトン~20,000ダルトン、5,000ダルトン~50,000ダルトン、5,000ダルトン~100,000ダルトン、10,000ダルトン~20,000ダルトン、10,000ダルトン~

40

50

50,000ダルトン、10,000ダルトン～100,000ダルトン、20,000ダルトン～50,000ダルトン、20,000ダルトン～100,000ダルトン、または50,000ダルトン～100,000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、200ダルトン、500ダルトン、750ダルトン、1,000ダルトン、5,000ダルトン、10,000ダルトン、20,000ダルトン、50,000ダルトン、または100,000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも200ダルトン、500ダルトン、750ダルトン、1,000ダルトン、5,000ダルトン、10,000ダルトン、20,000ダルトン、50,000ダルトン、または50,000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、最大でも500ダルトン、750ダルトン、1,000ダルトン、5,000ダルトン、10,000ダルトン、20,000ダルトン、50,000ダルトン、または100,000ダルトンの分子量を有する。好ましい実施形態では、リンカーは、5000ダルトン未満、4000ダルトン未満、3000ダルトン未満、または2000ダルトン未満の分子量を有し、リンカーは単分散である（例えば、本明細書におけるコンジュゲート組成物の集団では、PD-L1に特異的に結合するポリペプチドとIL-2ポリペプチド（または他のサイトカイン）との間のリンカー構造の高度の均一性がある）。

10

【0188】

いくつかの実施形態では、リンカーは、反応生成物である1対以上のコンジュゲーションハンドルおよびその相補的コンジュゲーションハンドルを含む。いくつかの実施形態では、反応生成物は、トリアゾール、ヒドラゾン、ピリダジン、スルフィド、ジスルフィド、アミド、エステル、エーテル、オキシム、アルケン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、反応生成物はトリアゾールを含む。反応生成物は、リンカーの任意の部分によって第1の結合点および第2の結合点から分離することができる。いくつかの実施形態では、反応生成物は、リンカーの実質的に中心にある。いくつかの実施形態では、反応生成物は、一方の結合点に他方の結合点よりも実質的に近い。

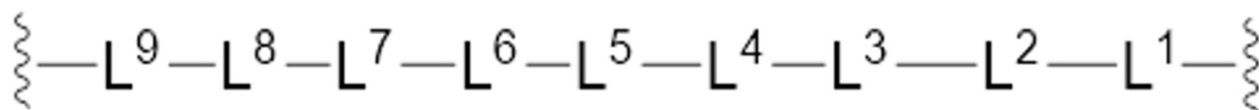
20

【0189】

いくつかの実施形態では、リンカーは式(X)の構造を含み、

【0190】

【化8】



30

式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 、 L^8 、および L^9 の各々は、独立して、 O--- 、 $\text{---NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---N(R}^L\text{)}_2\text{---}$ 、 $\text{---OP(=O)(OR}^L\text{)O---}$ 、 ---S--- 、 ---S(=O)--- 、 $\text{---S(=O)}_2\text{---}$ 、 ---C(=O)--- 、 ---C(=O)O--- 、 ---OC(=O)--- 、 ---OC(=O)O--- 、 $\text{---C(=O)NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---NR}^L\text{C(=O)---}$ 、 $\text{---OC(=O)NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---NR}^L\text{C(=O)O---}$ 、 $\text{---NR}^L\text{C(=O)NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---NR}^L\text{C(=S)NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---CR}^L\text{=N---}$ 、 $\text{---N=CR}^L\text{---}$ 、 $\text{---NR}^L\text{S(=O)}_2\text{---}$ 、 $\text{---S(=O)}_2\text{NR}^L\text{---}$ 、 $\text{---C(=O)NR}^L\text{S(=O)}_2\text{---}$ 、 $\text{---S(=O)}_2\text{NR}^L\text{C(=O)---}$ 、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキレン、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_6$ ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ アルケニレン、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ アルキニレン、置換もしくは非置換の $C_6\sim C_{20}$ アリーレン、置換もしくは非置換 $C_2\sim C_{20}$ ヘテロアリーレン、 $\text{---(CH}_2\text{---CH}_2\text{---O)}_{q_a}\text{---}$ 、 $\text{---(O---CH}_2\text{---CH}_2\text{)}_{q_b}\text{---}$ 、 $\text{---(CH}_2\text{---CH(CH}_3\text{)---O)}_{q_c}\text{---}$ 、 $\text{---(O---CH(CH}_3\text{)---CH}_2\text{)}_{q_d}\text{---}$ 、コンジュゲーションハンドルと相補的コンジュゲーションハンドルとの反応生成物、または存在せず、

40

各 R^L は、独立して、水素、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_4$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1\sim C_4$ ヘテロアルキル、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_6$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_2\sim C_5$ アルキニル、置換もしくは非置換の $C_3\sim C_8$ シクロアルキ

50

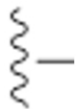
ル、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

q_a 、 q_b 、 q_c および q_d の各々は、独立して 1 ～ 100 の整数であり、

式中、各

【0191】

【化9】



10

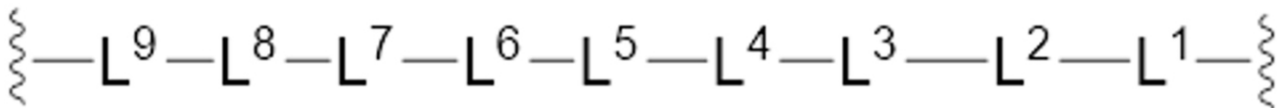
は、PD-1 または サイトカイン（例えば、IL-2 ポリペプチド）に選択的に結合するポリペプチドへの結合点である。

【0192】

いくつかの実施形態では、リンカーは、式 (X^a) の構造を含み、

【0193】

【化10】



20

式中、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 、 L^7 、 L^8 、および L^9 の各々は、独立して、 $-O-$ 、 $-NR^L-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})NR^L-$ 、 $-NR^L(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-N(R^L)_2+$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})N(R^L)_2+$ 、 $-N(R^L)_2+(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-OP(=O)(OR^L)O-$ 、 $-S-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})S-$ 、 $-S(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})C(=O)-$ 、 $-C(=O)(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^L-$ 、 $-C(=O)NR^L(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})C(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=O)-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})NR^LC(=O)-$ 、 $-NR^LC(=O)(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-OC(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=O)O-$ 、 $-NR^LC(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=S)NR^L-$ 、 $-CR^L=N-$ 、 $-N=CR^L$ 、 $-NR^LS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NR^L-$ 、 $-C(=O)NR^LS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NR^LC(=O)-$ 、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキレン、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルキニレン、置換もしくは非置換の $C_6 \sim C_{20}$ アリーレン、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_{20}$ ヘテロアリーレン、 $-(CH_2-CH_2-O)_{q_a}-$ 、 $-(O-CH_2-CH_2)_{q_b}-$ 、 $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{q_c}-$ 、 $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{q_d}-$ 、コンジュゲーションハンドルと相補的コンジュゲーションハンドルとの反応生成物、または存在せず； $(C_1-C_6 \text{ アルキレン})$ であり、

30

40

各 R^L は、独立して、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ ヘテロアルキル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

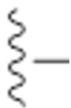
q_a 、 q_b 、 q_c および q_d の各々は、独立して 1 ～ 100 の整数であり、

式中、各

【0194】

50

【化 1 1】



は、PD-1 または サイトカイン（例えば、IL-2 ポリペプチド）に選択的に結合するポリペプチドへの結合点である。

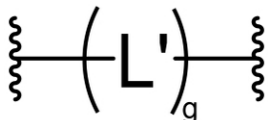
【0 1 9 5】

いくつかの実施形態では、リンカーは、式（X'）の構造を含み、

【0 1 9 6】

10

【化 1 2】



式中、各 L' は、独立して、 $-O-$ 、 $-NR^L-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})NR^L-$ 、 $-NR^L(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-N(R^L)_2^+-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})N(R^L)_2^+-$ 、 $-N(R^L)_2^+(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-OP(=O)(OR^L)O-$ 、 $-S-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})S-$ 、 $-S(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})C(=O)-$ 、 $-C(=O)(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-C(=O)NR^L-$ 、 $-C(=O)NR^L(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})C(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=O)-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキレン})NR^LC(=O)-$ 、 $-NR^LC(=O)(C_1-C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-OC(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=O)O-$ 、 $-NR^LC(=O)NR^L-$ 、 $-NR^LC(=S)NR^L-$ 、 $-CR^L=N-$ 、 $-N=CR^L$ 、 $-NR^LS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NR^L-$ 、 $-C(=O)NR^LS(=O)_2-$ 、 $-S(=O)_2NR^LC(=O)-$ 、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキレン、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルキニレン、置換もしくは非置換の $C_6 \sim C_{20}$ アリーレン、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_{20}$ ヘテロアリーレン、 $-(CH_2-CH_2-O)_{q_a}-$ 、 $-(O-CH_2-CH_2)_{q_b}-$ 、 $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{q_c}-$ 、 $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{q_d}-$ 、コンジュゲーションハンドルと相補的コンジュゲーションハンドルとの反応生成物、または存在せず； $(C_1-C_6 \text{ アルキレン})$ であり、

20

30

各 R^L は、独立して、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ ヘテロアルキル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

40

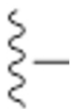
q_a 、 q_b 、 q_c および q_d の各々は、独立して 1 ～ 100 の整数であり、

g は、1 ～ 100 の整数であり、

式中、各

【0 1 9 7】

【化 1 3】



は、修飾 IL-2 ポリペプチドまたは抗体もしくは抗原結合断片への結合点である。

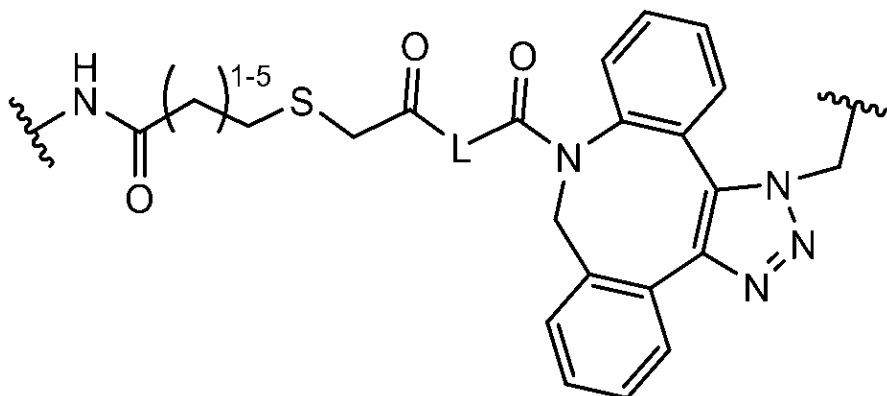
50

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、式 (X) または式 (X a) または式 (X ') のリンカーは、次の構造またはその位置異性体を含み、

【 0 1 9 9 】

【 化 1 4 】

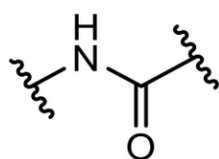


10

式中、

【 0 2 0 0 】

【 化 1 5 】

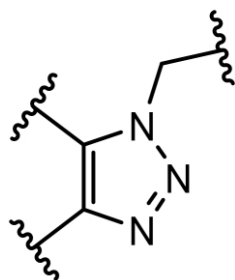


20

は、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドのリジン残基への第 1 の結合点であり、
L は連結基であり、

【 0 2 0 1 】

【 化 1 6 】



30

は、第 1 の結合点に接続する連結基への結合点である。

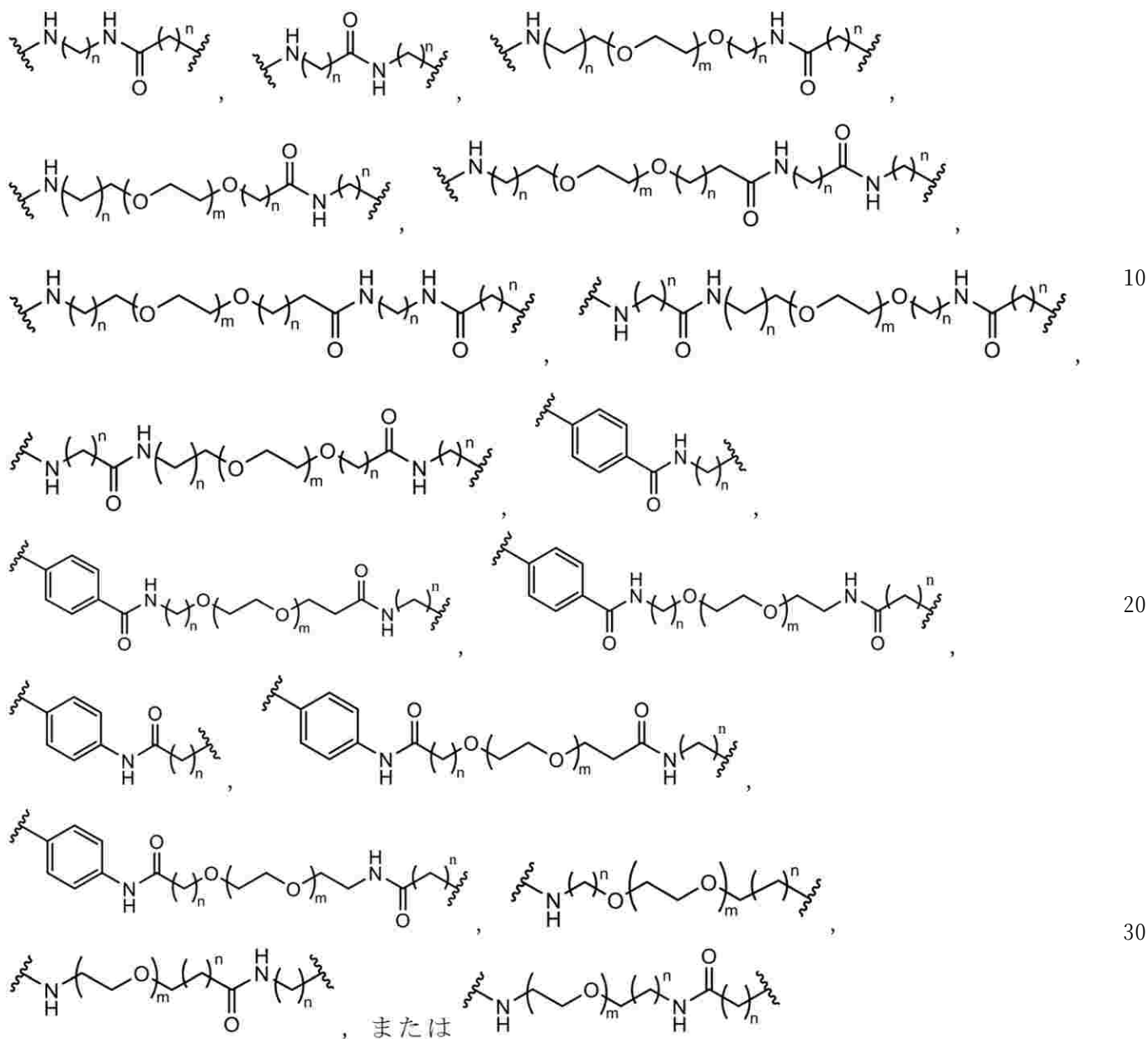
【 0 2 0 2 】

いくつかの実施形態では、L は、構造

【 0 2 0 3 】

40

【化 17】



を有し、

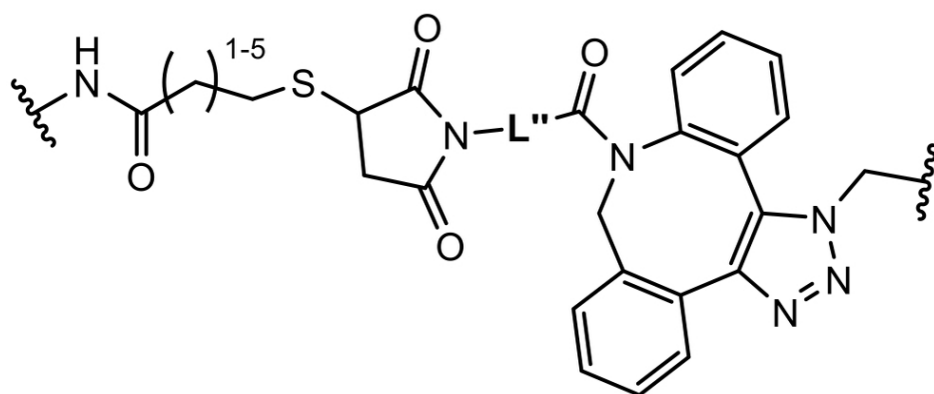
式中、各 n は独立して 1～6 の整数であり、各 m は 1～30 の整数である。いくつかの実施形態では、各 m は、独立して 2 または 3 である。いくつかの実施形態では、各 m は、1～24、1～18、1～12、または 1～6 の整数である。

【0204】

いくつかの実施形態では、式 (X) または式 (Xa) または式 (X') のリンカーは、次の構造またはその位置異性体を含み、

【0205】

【化 1 8】

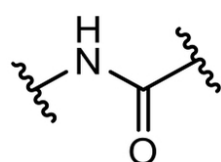


10

式中、

【 0 2 0 6】

【化 1 9】

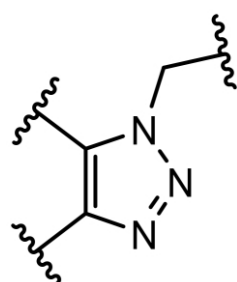


20

は、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドのリジン残基への第 1 の結合点であり、
L は連結基であり、

【 0 2 0 7】

【化 2 0】



30

は、第 1 の結合点に接続する連結基への結合点である。

【 0 2 0 8】

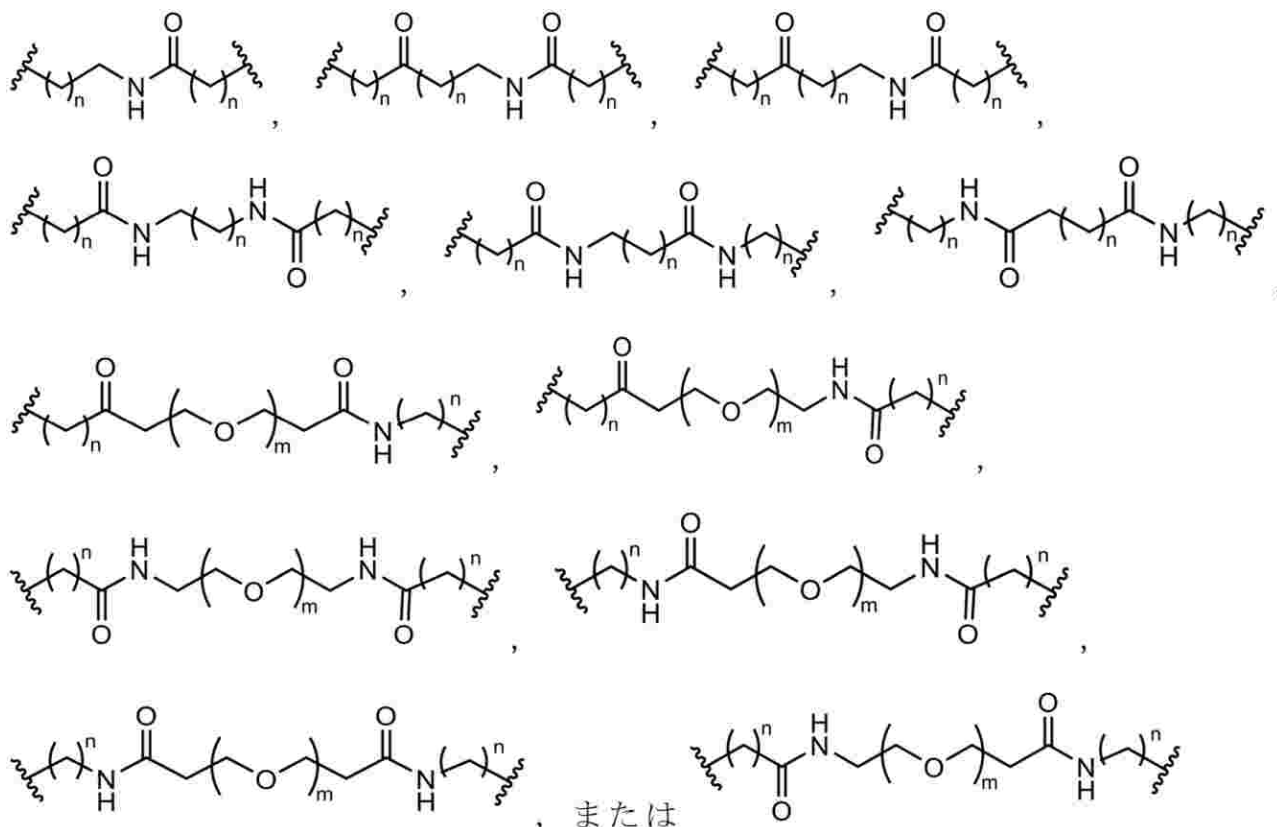
いくつかの実施形態では、L' ' は、

【 0 2 0 9】

40

50

【化 2 1】



10

20

の構造を有し、

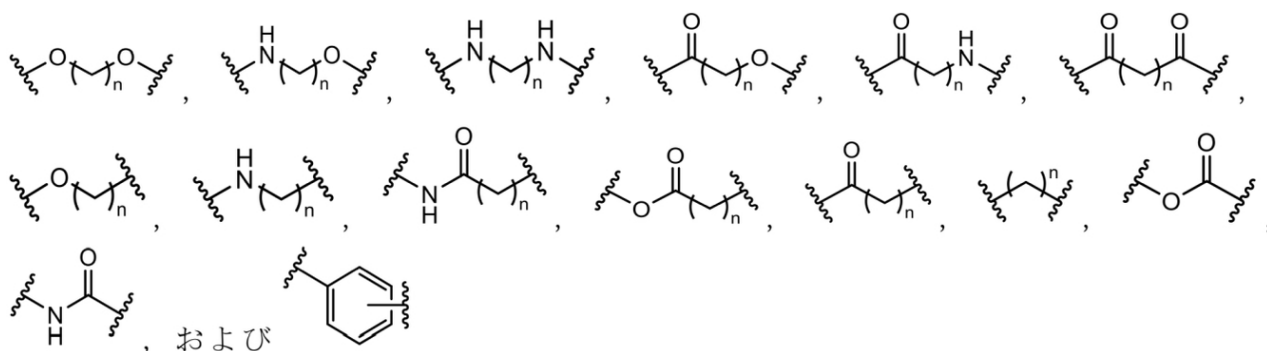
式中、各 n は独立して 1～6 の整数であり、各 m は独立して 1～30 の整数である。いくつかの実施形態では、各 m は、独立して 2 または 3 である。いくつかの実施形態では、各 m は、1～24、1～18、1～12、または 1～6 の整数である。

【0 2 1 0】

いくつかの実施形態では、 L または L' は、各々独立して、

【0 2 1 1】

【化 2 2】



30

40

から選択される 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個、またはそれを超えるサブユニットを含み、

式中、各 n は独立して 1～30 の整数である。いくつかの実施形態では、各 n は、独立して 1～6 の整数である。いくつかの実施形態では、 L または L' は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のサブユニットを含む。

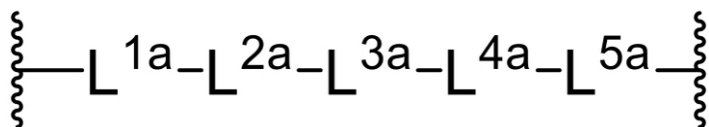
【0 2 1 2】

いくつかの実施形態では、 L または L' は、式 (X') の構造：

【0 2 1 3】

50

【化 2 3】



式中、 L^{1a} 、 L^{2a} 、 L^{3a} 、 L^{4a} 、 L^{5a} の各々は、独立して、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{L}})_2^+-$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{N}(\text{R}^{\text{La}})_2^+(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{L}})_2^+-$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{La}})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキレン})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{S})\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{CR}^{\text{La}}=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{CR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{La}}\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^{\text{La}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{La}}\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^{\text{La}}\text{C}(=\text{O})-$ 、置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキレン、置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニレン、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニレン、置換もしくは非置換の $\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$ アリーレン、置換もしくは非置換 $\text{C}_2\sim\text{C}_{20}$ ヘテロアリーレン、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{\text{qe}}$ 、 $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{\text{qf}}$ 、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O})_{\text{qg}}$ 、 $-(\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2)_{\text{qh}}$ 、コンジュゲーションハンドルと相補的コンジュゲーションハンドルとの反応生成物、または存在せず、

10

20

30

各 R^{La} は、独立して、水素、置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ アルキル、置換もしくは非置換の $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ ヘテロアルキル、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニル、置換もしくは非置換の $\text{C}_2\sim\text{C}_5$ アルキニル、置換もしくは非置換の $\text{C}_3\sim\text{C}_8$ シクロアルキル、置換もしくは非置換 $\text{C}_2\sim\text{C}_7$ ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、

qe 、 qf 、 qg および qh の各々は、独立して1～100の整数である。

【0214】

いくつかの実施形態では、 L または L' は、2～10、2～15、2～20、2～25、または2～30個の原子の直鎖を含む。いくつかの実施形態では、直鎖は、1つ以上のアルキル基（例えば、低級アルキル（ $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ ））、1つ以上の芳香族基（例えば、フェニル）、1つ以上のアミド基、1つ以上のエーテル基、1つ以上のエステル基、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0215】

いくつかの実施形態では、第1の結合点（例えば、サイトカインへの結合点）に接続する連結基は、ポリ（エチレングリコール）を含む。いくつかの実施形態では、連結基は、約2～約30個のポリ（エチレングリコール）単位を含む。いくつかの実施形態では、第1の結合点（例えば、サイトカインへの結合点）に接続する連結基は、アジド（例えば、トリアゾールはアジドの反応生成物である）を含む本明細書で提供されるサイトカインに結合した官能基である。

40

【0216】

いくつかの実施形態では、 L は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{L}}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{L}})_2^+-$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{L}})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{L}}\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{L}}\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{L}}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{L}}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{L}}\text{C}(=\text{S})\text{NR}^{\text{L}}-$ 、 $-\text{CR}^{\text{L}}=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{CR}^{\text{L}}$ 、 $-\text{NR}$

50

$L S (=O)_2-$ 、 $-S (=O)_2 N R^L-$ 、 $-C (=O) N R^L S (=O)_2-$ 、 $-S (=O)_2 N R^L C (=O)-$ 、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキレン、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニレン、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルキニレン、置換もしくは非置換の $C_6 \sim C_{20}$ アリーレン、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_{20}$ ヘテロアリーレン、 $-(CH_2-CH_2-O)_{q_a}-$ 、 $-(O-CH_2-CH_2)_{q_b}-$ 、 $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{q_c}-$ 、 $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{q_d}-$ であり、ここで、各 R^L は、独立して、水素、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_4$ ヘテロアルキル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_6$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニル、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、置換もしくは非置換 $C_2 \sim C_7$ ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールであり、 q_a 、 q_b 、 q_c および q_d の各々は、独立して1～100の整数である。

10

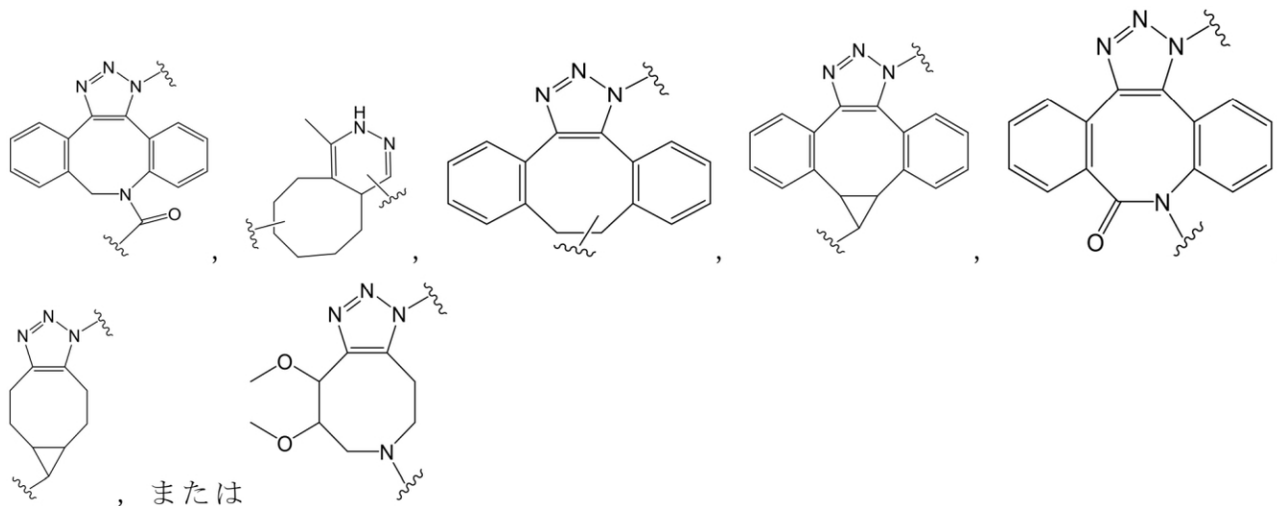
【0217】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルおよび相補的コンジュゲーションハンドルの各反応生成物は、トリアゾール、ヒドラゾン、ピリダジン、スルフィド、ジスルフィド、アミド、エステル、エーテル、オキシム、またはアルケンを独立して含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルおよび相補的コンジュゲーションハンドルの各反応生成物は、トリアゾールを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルおよび相補的コンジュゲーションハンドルの各反応生成物は、

20

【0218】

【化24】



30

の構造、またはその位置異性体もしくは誘導体を含む。

【0219】

いくつかの実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、腫瘍微小環境の近傍で、またはその中で切断される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、腫瘍微小環境の近傍で、またはその中で機械的または物理的に切断される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、腫瘍微小環境の近傍で、またはその中で化学的に切断される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、還元感受性リンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、酸化感受性リンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、腫瘍微小環境の近傍で、またはその中でpHの結果として切断される。いくつかの実施形態では、リンカーは、腫瘍微小環境の近傍で、または腫瘍微小環境中で腫瘍代謝産物によるものである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、腫瘍微小環境の近傍で、またはその中でプロテアーゼによって切断される。

40

【0220】

50

IL-2 サイトカイン

サイトカインは、細胞シグナル伝達において重要な体内で産生されるタンパク質である。サイトカインは免疫系を調節することができ、サイトカイン療法は分子の免疫調節特性を利用して被験体の免疫系を増強し、癌細胞を死滅させる。増強された生物学的活性を示すことができる、サイトカインにコンジュゲートされた抗PD-1ポリペプチドが本明細書に開示される。

【0221】

インターロイキン-2 (IL-2) は、免疫系の調節に重要なサイトカインシグナル伝達分子である。IL-2 は、免疫系が外来細胞型と内因性細胞型との間で分化するのを助け、それによって免疫系が被験体自身の細胞を攻撃するのを防ぐことに関与する。IL-2 は、リンパ球によって発現されるIL-2受容体 (IL-2R) との相互作用を通じてその活性を達成する。これらの結合相互作用を通して、IL-2 は、Tエフェクター (Teff) 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、および制御性T細胞 (Treg) の被験体の集団を調節することができる。

10

【0222】

IL-2 は、単独で、および他の療法と組み合わせて、癌を処置するために使用されてきた。しかしながら、処置としてのIL-2の使用は、IL-2の毒性、血管漏出症候群などの望ましくない副作用、およびIL-2の短い半減期によって制限されてきた。本開示の抗PD-1ポリペプチドへのIL-2のコンジュゲーションは、IL-2ポリペプチド選択性を改善し、IL-2の治療可能性を高め、IL-2療法の投与による副作用のリスクを潜在的に低減することができる。

20

【0223】

本開示は、修飾されたインターロイキン-2 (IL-2) ポリペプチドにコンジュゲートされた抗PD-1ポリペプチドおよび治療剤としてのそれらの使用を記載する。本明細書で提供される修飾されたIL-2ポリペプチドは、免疫療法として、または他の免疫療法レジメンの一部として使用することができる。そのような修飾されたIL-2ポリペプチドは、野生型IL-2とは異なるIL-2受容体 (IL-2R) に対する結合特性を示し得る。一態様では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 複合体 (IL-2R α) に対して減少したアフィニティを有する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、IL-2R $\beta\gamma$ 複合体 (IL-2R β) に対して増加したアフィニティを有する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドとIL-2R β との間の結合アフィニティは、野生型IL-2とIL-2R β との間の結合アフィニティと同じかまたはそれよりも高い。本明細書に記載される実施形態では利用されるIL-2アミノ酸配列の非限定的な例を、下記の表8に提供する。

30

【0224】

本開示のいくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドは、好ましくは、野生型IL-2と比較して、IL-2受容体 β サブユニットを介したシグナル伝達に有利にバイアスされている。いくつかの実施形態では、これは、a) IL-2受容体 α サブユニットへのIL-2ポリペプチドの結合を (例えば、 α サブユニットと接触する残基における変異、 α サブユニットと接触する残基へのポリマーの付加、または α サブユニットと接触する残基へのPD-1に結合するポリペプチドへのリンカーの結合により) 阻害または減少させること、および/またはb) IL-2受容体の β サブユニットへのIL-2ポリペプチドの結合を (例えば、結合を増強する β サブユニットと接触する残基における変異により) 増強することの一方または両方によって達成される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供する免疫サイトカイン組成物のIL-2ポリペプチドは、野生型IL-2と比較して、IL-2受容体 β サブユニットにバイアスされている。IL-2受容体 β シグナル伝達にバイアスされている修飾を有するIL-2ポリペプチドの非限定的な例は、例えば国際公開第2021140416 (A2) 号、国際公開第2012065086 (A1) 号、国際公開第2019028419 (A1) 号、国際公開第2012107417 (A1

40

50

号、国際公開第2018119114(A1)号、国際公開第2012062228(A2)号、国際公開第2019104092(A1)号、国際公開第2012088446(A1)号、および国際公開第2015164815(A1)号に記載されており、これらの各々は、あたかもその全体が本明細書に記載されているかのように参照により組み込まれる。

【0225】

IL-2ポリペプチドへの化学的リンカーの結合点

化学的リンカーによってIL-2ポリペプチドに接続されたPD-1に結合するポリペプチド、例えば抗体を含む組成物が本明細書で提供される。上記で論じられるように、化学的リンカーは、本明細書で提供される位置のいずれかで抗PD-1ポリペプチドに結合され得る。リンカーの第2の結合点は、本明細書で提供されるIL-2ポリペプチドに結合している。

10

【0226】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、アミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、配列番号1のアミノ酸残基1~133のいずれか1つに対応するアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、非末端アミノ酸残基（例えば、配列番号1のアミノ酸残基2~132のいずれか1つ、または配列番号1のアミノ酸残基1~133のいずれか1つであって、N末端またはC末端のいずれかが1個以上のアミノ酸残基によって伸長されている）に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2ポリペプチドの非末端アミノ酸残基に結合しており、IL-2ポリペプチドは、配列番号1と比較してN末端切断部またはC末端短縮部のいずれかを含む。

20

【0227】

いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2受容体(IL-2R)タンパク質またはサブユニットと相互作用するアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2R α サブユニット(IL-2R α)、IL-2R β サブユニット(IL-2R β)、またはIL-2R γ サブユニット(IL-2R γ)と相互作用するアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2R α サブユニット(IL-2R α)と相互作用するアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2R β サブユニット(IL-2R β)と相互作用するアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、化学的リンカーは、IL-2R γ サブユニット(IL-2R γ)と相互作用するアミノ酸残基に結合している。

30

【0228】

いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドへの結合点は、IL-2ポリペプチドと少なくとも1つのIL-2受容体サブユニットとの相互作用が減少または遮断されるように選択される。いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドとIL-2R α との相互作用が低減または遮断されるように、結合点が選択される。いくつかの実施形態では、結合点は、IL-2ポリペプチドとIL-2R β との相互作用が低減されるように選択される。

40

【0229】

いくつかの実施形態では、リンカーは、IL-2ポリペプチドとIL-2受容体 α サブユニット(IL-2R α)との結合を破壊する残基においてIL-2ポリペプチドに結合している。これらの残基の例としては、例えば、国際公開第2019028419(A1)号、国際公開第2020056066号(A1)号、国際公開第2021140416(A2)号、および国際公開第2021216478(A1)号に記載されているように、残基3、5、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、60、61、62、63、64、65、67、68、69、71、72、103、104、105、および107が挙げられ、上記文献の各々は、その全体が記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0230】

いくつかの実施形態では、リンカーは、1～110位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドの残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、1～10、1～20、1～30、30～50、30～70、30～100、40～50、40～70、40～100、または40～110位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、35、37、38、41、42、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、および105、および107位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、35、37、38、41、42、43、44、45、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、および105、および107位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、35、37、38、41、42、43、44、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、および105、および107位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、35、37、38、41、43、44、60、61、62、64、65、68、69、71、72、104、および105、および107位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、35、37、38、39、40、41、42、43、44、45、または46位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、41、42、43、44、および45位のいずれか1つのアミノ酸残基においてIL-2ポリペプチドに結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基1、42または45において結合している。いくつかの実施形態では、リンカーはアミノ酸残基1において結合している。いくつかの実施形態では、リンカーはアミノ酸残基42において結合している。いくつかの実施形態では、リンカーはアミノ酸残基45において結合している。

10

20

30

40

50

【0231】

いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号1に示されるIL-2ポリペプチドの天然アミノ酸残基である残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号1に示されるIL-2ポリペプチドの天然アミノ酸残基の修飾されたバージョンであるアミノ酸残基に結合している。そのような修飾の非限定的な例としては、天然アミノ酸残基へのコンジュゲーションハンドルの組み込みもしくは結合（リンカーを介したものを含む）、または任意の適合性のある方法を使用した天然アミノ酸への化学的リンカーの結合が挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号1のIL-2ポリペプチドと比較して置換アミノ酸残基であるアミノ酸残基に結合している。置換は、追加の官能基（例えば、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、リジン、セリン、トレオニンもしくはチロシン）、任意の天然に存在するアミノ酸の修飾されたバージョンの誘導体、または任意の非天然アミノ酸（例えば、所望の反応性基を含有するアミノ酸、例えば、アジド、アルキンなどのクリックケミストリー試薬）の結合により適した天然アミノ酸に対するものであり得る。置換され得るアミノ酸の非限定的な例としては、 $-\alpha-(9\text{-フルオレニルメチルオキシカルボニル})-\text{L}-\text{ビフェニルアラニン}(\text{Fmoc-L-Bip-OH})$ および $\text{N}-\alpha-(9\text{-フルオレニルメチルオキシカルボニル})-\text{O}-\text{ベンジル}$

ーLーチロシン (Fmoc-L-Tyr (Bzl)-OH) が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な非標準アミノ酸には、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-メトキシフェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-p-セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、p-ボロノフェニルアラニン、O-プロパルギルチロシン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-プロモフェニルアラニン、セレノシステイン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、アジド-リジン (AzK)、チロシンアミノ酸の類似体；グルタミンアミノ酸の類似体；フェニルアラニンアミノ酸の類似体；セリンアミノ酸の類似体；トレオニンアミノ酸の類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、またはアミノ置換アミノ酸、β-アミノ酸；プロリンまたはヒスチジン以外の環状アミノ酸；フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファン以外の芳香族アミノ酸；またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、非標準アミノ酸は、β-アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸および誘導体化側鎖を有するアミノ酸から選択される。いくつかの実施形態では、非標準アミノ酸は、β-アラニン、β-アミノプロピオン酸、ピペリジン酸、アミノカプロン酸、アミノヘプタン酸、アミノピメリン酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、N^α-エチルグリシン、N^α-エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、アローヒドロキシリジン、イソデスモシン、アローイソロイシン、ω-メチルアルギニン、N^α-メチルグリシン、N^α-メチルイソロイシン、N^α-メチルバリン、γ-カルボキシグルタメート、ε-N, N, N-トリメチルリジン、ε-N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N^α-アセチルセリン、N^α-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、および／または他の類似のアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0232】

いくつかの実施形態では、リンカーは非天然アミノ酸残基において結合している。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、コンジュゲーションハンドルを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、修飾されたIL-2ポリペプチドへのリンカーの付加を容易にする。コンジュゲーションハンドルは、本明細書で提供されるコンジュゲーションハンドルのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、非天然アミノ酸に部位特異的に共有結合している。コンジュゲーションハンドルを含むアミノ酸残基の非限定的な例は、例えば、少なくとも国際公開第2015054658 (A1) 号、国際公開第2014036492 (A1) 号、および国際公開第2021133839 (A1) 号、国際公開第2006069246 (A2) 号、および国際公開第2007079130 (A2) 号に見出すことができ、これらの各々は、あたかもその全体が本明細書に記載されているかのように参照により組み込まれる。

【0233】

いくつかの実施形態では、リンカーは、天然アミノ酸で置換されたアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、システイン、リジンまたはチロシン残基で置換されたアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、システイン残基で置換された残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、リジン残基で置換されたアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、チロシン残基で置換されたアミノ酸残基に結合している。

【0234】

いくつかの実施形態では、リンカーは、N末端、A1、K35、F42Y、K43、F

44Y、またはY45のアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、N末端、A1、F42YまたはY45のアミノ酸残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ末端残基に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基A1に結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基F42Yに結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基Y45に結合している。

IL-2ポリペプチドへの修飾

【0235】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、1つ以上の修飾アミノ酸残基を含有する。そのような修飾は、配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1の配列からのアミノ酸の付加および／もしくは欠失、またはアミノ酸残基への部分の付加などの野生型IL-2ポリペプチドの変異の形態をとることができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、配列番号1の配列からの第1のアミノ酸の欠失を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、配列番号1の配列を参照配列として使用して、C125S変異を含む。アミノ酸残基に付加され得る部分には、ポリマー、リンカー、スパーサー、およびそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。特定のアミノ酸残基に付加されると、これらの部分は、野生型IL-2と比較して、修飾されたIL-2ポリペプチドの活性または他の特性を調節することができる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基35～46の範囲内の2つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、1つの修飾は、アミノ酸残基40～43の範囲内である。いくつかの実施形態では、1つの修飾は、アミノ酸残基42にある。いくつかの実施形態では、1つの修飾は、アミノ酸残基44～46の範囲内である。いくつかの実施形態では、1つの修飾は、アミノ酸残基45にある。

【0236】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、1つ以上の修飾アミノ酸残基を含有する。例えば、特定のアミノ酸残基へのポリマーの付加は、修飾されたIL-2ポリペプチドとIL-2R、特に $\alpha\beta\gamma$ 複合体との結合相互作用を破壊する効果を有し得る。いくつかの実施形態では、この相互作用を破壊するためにポリマーが付加される残基には、F42およびY45が含まれる。いくつかの実施形態では、残基42または45に付加されたポリマーは、IL-2ポリペプチドと、PD-1に結合するポリペプチドとの間のリンカーとしても作用する。

【0237】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)ポリマーである。F42残基を別の残基に変異させて、PEGポリマー(またはリンカー)の、例えばチロシン残基への付加を容易にすることができる。ポリマーを、残基F42およびY45の一方または両方、またはそれらの変異体に付加してもよい。これらのポリマーは、IL-2ポリペプチドと、PD-1に選択的に結合するポリペプチドとの間のリンカーの形態であってもよく、またはリンカーに加えて追加のポリマーであってもよい。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、表2から選択される1つ以上のアミノ酸変異を含む。

【0238】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 2

WT I L - 2 残基数 *	WT I L - 2 残基	変異
3 1	Y	H, F, A
3 5	K	R, D, I, L, M, N, P, Q, T, Y
3 6	L	A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, R, S, W, Y
3 8	R	A, D, G, K, N, P, S, Y
4 0	L	D, G, N, S, Y
4 1	T	E, G, Y
4 2	F	A, D, E, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
4 3	K	H, Y
4 4	F	K, Y
4 5	Y	A, D, E, G, K, L, N, Q, R, S, T, V
4 6	M	I, Y
6 1	E	K, M, R, Y
6 2	E	D, L, T, Y
6 4	K	D, E, G, L, Q, R, Y
6 5	P	D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
6 6	L	A, F, Y
6 7	E	A, Y
6 8	E	V, Y
7 2	L	A, D, E, G, K, N, Q, R, S, T, Y
7 4	Q	P, G, A
8 8	N	D, E, A
1 2 5	C	S

* 参照配列としての配列番号 1 に基づく残基位置ナンバリング。

【0239】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、表 3 から選択される 1 つ以上のアミノ酸変異を含む。

【0240】

10

20

30

40

50

【表 5】
表 3

WT I L - 2 残基数*	WT I L - 2 残基	変異
2 0	D	T, Y
3 1	Y	H, F, A
3 5	K	R, D, I, L, M, N, P, Q, T Y
3 8	R	A, D, G, K, N, P, S, Y
4 2	F	A, D, E, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
4 3	K	H, Y
4 5	Y	A, D, E, G, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
6 2	E	D, L, T, Y
6 5	P	D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
6 8	E	V, Y
7 2	L	A, D, E, G, K, N, Q, R, S, T, Y
7 4	Q	P, G, A
8 8	N	D, E, A
1 2 5	C	S

* 参照配列としての配列番号 1 に基づく残基位置ナンバリング。

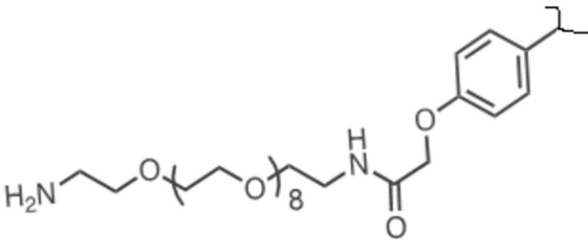
【 0 2 4 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、表 4 から選択される 1 つ以上のポリマーを含む。

【 0 2 4 2 】

【表 6】

表 4

ポリマー識別子 および近似分子 量	ポリマー構造
式 D 5 0 0 D a	

【 0 2 4 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、表 5 に提供される変異およびポリマーを含む。いくつかの実施形態では、表のポリマーの 1 つ以上は、P D - 1 に結合するポリペプチドに結合したリンカーの一部で置き換えられるか、またはそれを含む。

【 0 2 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 5

変異*	ポリマー残基位置	ポリマー
F 4 2 Y	4 2, 4 5	式 D (残基 4 2, 4 5)
なし	4 5	式 D
F 4 2 A	4 5	式 D
F 4 2 Y, L 7 2 G	4 2, 4 5	式 D (残基 4 2, 4 5)
F 4 2 Y, P 6 5 Y	4 2, 6 5	式 D (残基 4 2, 6 5)
F 4 2 Y, P 6 5 Y	4 2, 4 5, 6 5	式 D (残基 4 2, 4 5, 6 5)
R 3 8 Y, F 4 2 Y, E 6 2 Y, E 6 8 Y	3 8, 4 2, 4 5, 6 2, 6 8	式 D (残基 3 8, 4 2, 4 5, 6 2, 6 8)
F 4 2 Y, L 7 2 Y	4 2, 4 5, 7 2	式 D (残基 4 2, 4 5, 7 5)
F 4 2 Y, Y 4 5 K	4 2	式 D
F 4 2 A	4 5	式 D
L 7 2 G	4 5	式 D
F 4 2 Y	4 2, 4 5	式 D (残基 4 2)、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカー (残基 4 5)
F 4 2 Y	4 2, 4 5	式 D (残基 4 5)、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカー (残基 4 2)

* 参照配列としての配列番号 1 に基づく残基位置ナンバリング。

【0 2 4 5】

場合によっては、本明細書に記載される修飾された IL-2 ポリペプチドは、組換えであり得る。本明細書に記載される修飾された IL-2 ポリペプチドはまた、組換えポリペプチドとして発現されるのではなく、化学的に合成される場合がある。合成 IL-2 ポリペプチドは、少なくとも国際公開第 2 0 2 1 1 4 0 4 1 6 (A 2) 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 0 0 2 3 7 6 0 (A 1) 号明細書、および Asahina ら、Angew. Chem. Int. Ed. 2 0 1 5, 5 4, 8 2 2 6-8 2 3 0 に記載されており、これらの各々は、あたかもその全体が本明細書に記載されているかのように参照により組み込まれる。修飾された IL-2 ポリペプチドは、全長修飾された IL-2 ポリペプチドの 1 つ以上の断片を合成し、断片と一緒にライゲートし、ライゲートされた全長ポリペプチドを折り畳むことによって作製することができる。いくつかの実施形態では、修飾された IL-2 ポリペプチドは、アミノ酸配列における F 4 2 Y 変異と、アミノ酸残基 F 4 2 Y に共有結合した約 5 0 0 D a の第 1 の PEG ポリマーと、アミノ酸残基 Y 4 5 に共有結合した約 5 0 0 D a の第 2 の PEG ポリマーと、修飾された IL-2 ポリペプチドの N 末端に共有結合した約 6 k D a の任意の第 3 の PEG ポリマーとを含む。いくつかの実施形態では、PEG ポリマーは、PD-1 に結合するポリペプチドに IL-2 ポリペプチドを結合させたリンカーの一部を含む。

【0 2 4 6】

いくつかの実施形態では、化学的に合成された IL-2 ポリペプチドは、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカーの結合を容易にするために、1 つ以上の残基に結合したコンジュゲーションハンドルを含む。コンジュゲーションハンドルは、本明細書で提供される任意のそのようなコンジュゲーションハンドルであってもよく、リンカーが結合され得る任意の残基に結合されてもよい。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、IL-2 ポリペプチドの残基 4 2 または 4 5 に結合している。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、アジドまたはアルキンを含む。代替的

に、いくつかの実施形態では、コンジュゲーションハンドルは、組換えIL-2ポリペプチドの非天然アミノ酸または修飾された天然アミノ酸に組み込まれる。非天然アミノ酸を有する組換えIL-2ポリペプチドは、例えば、特許協力条約公開の国際公開第2016115168号、国際公開第2002085923号、国際公開第2005019415号、および国際公開第2005003294に記載されている方法を用いて作製することができる。

【0247】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、被験体に投与された場合、TEFFエフェクター（TEFF）またはナチュラルキラー（NK）細胞増殖を増強する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、被験体に投与された場合、制御性T細胞（Treg）の優先的活性化を防止しながら、TEFFまたはNK細胞増殖を増強する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、CD8+TおよびNK細胞を増加させる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、被験体に投与した場合、1に近いTEFF/Treg比を生じる。

【0248】

一態様では、修飾されたインターロイキン-2（IL-2）ポリペプチドを含む修飾されたポリペプチドであって、該修飾されたIL-2ポリペプチドが、共有結合した第1のポリマーを含む、修飾されたポリペプチドが本明細書に記載される。修飾されたインターロイキン-2（IL-2）ポリペプチドを含む修飾されたポリペプチドであって、該修飾されたIL-2ポリペプチドが、残基F42Yに共有結合した第1のポリマーを含み、修飾されたIL-2ポリペプチドの残基位置ナンバリングが、参照配列としての配列番号1に基づく、修飾されたポリペプチドが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、IL-2ポリペプチドと、PD-1に選択的に結合するポリペプチドを結合するリンカーと同じである。いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、リンカーとは異なる追加のポリマーである。別の態様では、修飾されたインターロイキン-2（IL-2）ポリペプチドを含む修飾されたポリペプチドであって、該修飾されたIL-2ポリペプチドが、一次Treg（IL-2R α / β / γ 受容体を発現する）および静止期CD8+TEFF（IL-2R β / γ 受容体を発現する）に対するアゴニストアッセイでの50%効果濃度（EC50）によって測定した場合に、高アフィニティーヘテロ三量体IL-2受容体（IL-2R α / β / γ ）を発現する細胞に対して低下した機能活性および中間アフィニティーヘテロ二量体IL-2受容体（IL-2R β / γ ）を発現する細胞に対してより大きな機能活性を示し、ここで、IL-2R α に対する修飾されたIL-2ポリペプチドのEC50値に対するIL-2R β に対する修飾されたIL-2ポリペプチドのEC50値の比が3：1未満である、修飾されたポリペプチドが本明細書に記載される。場合によっては、修飾されたIL-2ポリペプチドは、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチド、表8または表5に提供される修飾されたIL-2ポリペプチド、表2または表3に提供される変異を有する修飾されたIL-2ポリペプチド、および/または表4に提供されるポリマーを有する修飾されたIL-2ポリペプチドである。

【0249】

生物学的活性

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗PD-1ポリペプチドにコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドを含む免疫コンジュゲートは、腫瘍（例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL））または腫瘍灌流リンパ節内に位置する高レベルのPD-1（CD279）を発現する免疫細胞に対して増強されたアフィニティーを示すが、低または中レベルの表面PD-1を発現する末梢の免疫細胞に対しては低下したアフィニティーを示す。

【0250】

いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドにコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドを含むイムノコンジュゲートは、非標的IL-2ポリペプチドまたは非標的IL-2イムノコンジュゲートと比較して、血漿中での曝露と比較して、腫瘍ま

10

20

30

40

50

たは腫瘍滲流リンパ節内での増強された曝露を示す。いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートの血漿または血清中での曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節内での曝露の比は、非標的IL-2イムノコンジュゲートまたはコンジュゲートされていないIL-2ポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍またはそれを超える。いくつかの実施形態では、腫瘍または腫瘍滲流リンパ節内のPD1-IL2イムノコンジュゲートの半減期は、血漿または血清中のその半減期と比較して10倍～100倍高い。いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートの血漿または血清中での曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節内での曝露の比は、非標的IL-2イムノコンジュゲートまたはコンジュゲートされていないIL-2ポリペプチドと比較して、10倍～100倍、20倍～100倍、30倍～100倍、40倍～100倍、20倍～75倍、30倍～75倍、40倍～100倍、または40倍～75倍高い。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートは、PD-1を標的としないIL-2イムノコンジュゲートまたはIL-2ポリペプチドと比較して、血漿または血清曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節曝露の増大した比を示す。いくつかの実施形態では、抗PD1-IL2イムノコンジュゲートの血漿または血清曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節曝露の比は、PD-1を標的としないIL-2イムノコンジュゲートまたはIL-2ポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍高い。いくつかの実施形態では、抗PD1-IL2イムノコンジュゲートの血漿または血清曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節曝露の比は、PD-1を標的としないIL-2イムノコンジュゲートまたはIL-2ポリペプチドと比較して、10倍～100倍高い。いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートの血漿または血清曝露に対する腫瘍または腫瘍滲流リンパ節曝露の比は、非標的IL-2イムノコンジュゲートまたはIL-2ポリペプチドと比較して、10倍～100倍、20倍～100倍、30倍～100倍、40倍～100倍、20倍～75倍、30倍～75倍、40倍～100倍、または40倍～75倍高い。

20

【0252】

いくつかの実施形態では、PD1-IL2免疫コンジュゲートによって誘導される他の組織における免疫細胞集団（例えば、他の組織における同じタイプの免疫細胞）の拡大に対する腫瘍内（例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL））および腫瘍滲流リンパ節内の免疫細胞集団の拡大の比は、少なくとも1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5またはそれを超える。いくつかの実施形態では、PD1-IL2免疫コンジュゲートによって誘導される他の組織における免疫細胞集団の拡大に対する腫瘍および腫瘍滲流リンパ節内の免疫細胞集団の拡大の比は、約1.5～10、約2～10、約2.5～10、約3～10、約1.5～8、約2～8、約2.5～8、約3～8、約1.5～6、約2～6、約2.5～6、または約3～6である。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、ナイーブCD8+細胞、CD4+ヘルパー細胞、CD8+セントラルメモリー細胞、CD8+エフェクターメモリー細胞、NK細胞、NKT細胞、またはそれらの任意の組み合わせから選択される少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、比は、投与後の指定された時間（例えば、6時間、12時間、24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、または7日間）に測定される。

30

40

【0253】

いくつかの実施形態では、抗PD-1ポリペプチドにコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドを含むPD1-IL2イムノコンジュゲートは、高レベルのPD-1を発現する細胞に対する修飾されたIL-2ポリペプチドのシグナル伝達により、PD-1を発現しないかまたは中程度のレベルのみ発現する細胞と比較して増強された効力を示す。いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートについて、高レベルのPD-1を発現する細胞におけるIL-2経路関与のEC50値（pSTAT5アッセイ）に対する、PD-1を発現しないかまたは中程度のレベルのみ発現する細胞に

50

おけるIL-2経路関与のEC50値(pSTAT5アッセイ)の比は、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも250、少なくとも500、少なくとも750、少なくとも1000、少なくとも1500、少なくとも2000、少なくとも2500、または少なくとも3000である。いくつかの実施形態では、PD1-IL2イムノコンジュゲートについて、高レベルのPD-1を発現する細胞におけるIL-2経路関与のEC50値(pSTAT5アッセイ)に対する、PD-1を発現しないかまたは中レベルのみ発現する細胞におけるIL-2経路関与のEC50値(pSTAT5アッセイ)の比は、PD-1を標的としないIL-2イムノコンジュゲートまたはIL-2ポリペプチドと比較して、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、または少なくとも1000倍である。

10

【0254】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、野生型IL-2とは異なる活性を示す。本明細書で下記に提供されるこれらの修飾された生物学的活性は、いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチド単独(例えば、PD-1に結合するポリペプチドにコンジュゲートされていないか、または他の方法で結合されていない)だけでなく、IL-2ポリペプチドがPD-1に結合するポリペプチドにコンジュゲートされているか、または他の方法で結合されている場合(例えば、修飾された生物学的活性は、コンジュゲートまたは結合時に保持される)にも適用される。したがって、修飾されたIL-2ポリペプチドが、示された活性を有するとして本明細書に記載される場合、本明細書で提供されるイムノサイトカイン組成物(例えば、PD-1に結合するポリペプチドに結合したIL-2ポリペプチド)が同じ活性を有することも企図される。

20

【0255】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、CD4+ヘルパー細胞、CD8+セントラルメモリー細胞、CD8+エフェクターメモリー細胞、ナイーブCD8+細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞集団、またはそれらの組み合わせを拡大することができる。場合によっては、修飾されたIL-2ポリペプチドは、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチド、表8または表5に提供される修飾されたIL-2ポリペプチド、表2または表3に提供される変異を有する修飾されたIL-2ポリペプチド、および/または表4に提供されるポリマーを有する修飾されたIL-2ポリペプチドである。

30

【0256】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、エフェクターT細胞(T_{eff}細胞)の細胞集団を拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも100%、または少なくとも200%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも20%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも30%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも40%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも50%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、T_{eff}細胞の細胞集団を少なくとも100%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチド

40

50

は、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を少なくとも200%拡大する。

【0257】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、エフェクターT細胞（Teff細胞）の細胞集団を拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも5%、最大でも10%、最大でも20%、最大でも30%、最大でも40%、最大でも50%、最大でも75%、最大でも100%、最大でも500%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも5%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも20%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも50%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも100%拡大する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドが集団と接触している場合、Teff細胞の細胞集団を最大でも500%拡大する。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、約0.1~約15、約0.5~約10、約0.75~約5、または約1~約2である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、0.1~15である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、0.1~0.5、0.1~0.75、0.1~1、0.1~2、0.1~5、0.1~10、0.1~15、0.5~0.75、0.5~1、0.5~2、0.5~5、0.5~10、0.5~15、0.75~1、0.75~2、0.75~5、0.75~10、0.75~15、1~2、1~5、1~10、1~15、2~5、2~10、2~15、5~10、5~15、10~15、またはそれらの間の任意の数もしくは範囲である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、0.1、0.5、0.75、1、2、5、10、または15である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、0.1、0.5、0.75、1、2、5、または10である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大されたTreg細胞の細胞集団拡大に対するTeff細胞の細胞集団拡大の比は、0.5、0.75、1、2、5、10、または15である。

20

30

40

【0259】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたIL-2ポリペプチドによって拡大された細胞集団は、インビトロ細胞集団、インビボ細胞集団、またはエクスビボ細胞集団である。いくつかの実施形態では、細胞集団はインビトロ細胞集団である。いくつかの実施形態では、細胞集団はインビボ細胞集団である。いくつかの実施形態では、細胞集団はエクスビボ細胞集団である。細胞集団は、CD4+ヘルパー細胞、CD8+セントラルメモリー細胞、CD8+エフェクターメモリー細胞、ナイーブCD8+細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、またはそれらの組み合わせの集団であり得る。

【0260】

50

いくつかの実施形態では、細胞のレベルは、修飾された I L - 2 ポリペプチドの注射の 1 時間後に測定される。いくつかの実施形態では、細胞のレベルは、修飾された I L - 2 ポリペプチドの注射の 2 時間後に測定される。いくつかの実施形態では、細胞のレベルは、修飾された I L - 2 ポリペプチドの注射の 4 時間後に測定される。いくつかの実施形態では、細胞のレベルは、修飾された I L - 2 ポリペプチド（例えば、インビトロ実験の場合）の注射の 30 分後に測定される。いくつかの実施形態では、細胞のレベルは、特にインビボ実験の場合、延長された時点（例えば、6 時間、12 時間、24 時間、72 時間、96 時間、120 時間、144 時間、168 時間など）で測定される。

【0261】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲート組成物（例えば、リンカーを介して I L - 2 ポリペプチドに結合した P D - 1（例えば、例えばペムブロリズマブまたは L Z M - 009 などの抗 P D - 1 抗体）に結合するポリペプチド）は、2 つの基間の結合の形成後に、成分の少なくとも 1 つに関連する結合アフィニティを維持する。例えば、I L - 2 ポリペプチドに連結された抗 P D - 1 抗体または抗原結合断片を含むイムノコンジュゲート組成物において、いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体またはその抗原結合断片は、1 つ以上の F c 受容体への結合を保持する。いくつかの実施形態では、組成物は、コンジュゲートされていない抗体と比較して、約 5 倍以下、約 10 倍以下、約 15 倍以下、または約 20 倍以下減少する、1 つ以上の F c 受容体への結合を示す。いくつかの実施形態では、1 つ以上の F c 受容体は、F c R n 受容体、F c γ R I 受容体（C D 6 4）、F c γ R I I a 受容体（C D 3 2 α）、F c γ R I I β 受容体（C D 3 2 β）、F c γ R I I I 受容体（C D 1 6 a）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、F c R n 受容体、F c γ R I 受容体（C D 6 4）、F c γ R I I a 受容体（C D 3 2 α）、および F c γ R I I β 受容体（C D 3 2 β）、F c γ R I I I 受容体（C D 1 6 a）の各々への組成物の結合は、コンジュゲートされていない抗体と比較して約 10 倍以下減少する。

【0262】

いくつかの実施形態では、P D - 1（例えば、抗体）に結合するポリペプチドの P D - 1 への結合は、I L - 2 ポリペプチドとのコンジュゲーションによる実質的な影響を受けない。いくつかの実施形態では、P D - 1 へのポリペプチドの結合は、コンジュゲートされていない抗体と比較して約 5 % 以下低下する。

【0263】

部位特異的修飾

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、1 個以上のアミノ酸残基に 1 個以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドの残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号 1 に基づく。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての野生型ヒト I L - 2 ポリペプチドに基づく。場合によっては、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチド、表 8 または表 5 に提供される修飾された I L - 2 ポリペプチド、表 2 または表 3 に提供される変異を有する修飾された I L - 2 ポリペプチド、および／または表 4 に提供されるポリマーを有する修飾された I L - 2 ポリペプチドである。

【0264】

本明細書に記載されるポリペプチドに対する修飾は、タンパク質またはタンパク質断片の野生型バージョンの変異、様々な機能性の付加、アミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または任意の他の改変を包含する。ポリペプチドに付加され得る官能基には、ポリマー、リンカー、アルキル基、検出可能な分子、例えば発色団またはフルオロフォア、反応性官能基、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの個々のアミノ酸に官能基が付加される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドに部位特異的に官能基が付加される。いくつかの実施形態では、官能基は、P D - 1 に選択的に結合するポリペプチドに I L - 2 ポリペプチドを結合させるために使用されるリンカー

の少なくとも一部を含む。

【0265】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、残基35～46の領域からのアミノ酸残基に修飾を含み、残基のナンバリングは配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、修飾は、K35、L36、T37、R38、M39、L40、T41、F42、K43、F44、Y45、またはM46におけるものである。いくつかの実施形態では、修飾はF42にある。いくつかの実施形態では、修飾はY45である。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、N末端残基に修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、C125S変異を含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、A1欠失を含む。いくつかの実施形態では、修飾は、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させるために使用されるリンカーの結合を含む。

10

【0266】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、残基35～46のいずれかのアミノ酸残基に共有結合した第1のポリマーを含み、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、残基39～43のいずれかのアミノ酸残基に共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基F42に共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基F42Yに共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、残基44～46のいずれかのアミノ酸残基に共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基Y45に共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させるリンカーの一部である。いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させたリンカーとは別個の修飾である。

20

【0267】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基35からアミノ酸残基45までの領域中のアミノ酸残基に位置する1つ以上のPEG化チロシンを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG化チロシンは、アミノ酸残基42、アミノ酸残基45、またはその両方に位置する。いくつかの実施形態では、一または複数のPEG化チロシンは、アミノ酸残基42に位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG化チロシンは、アミノ酸残基45に位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG化チロシンは、アミノ酸残基42およびアミノ酸残基45の両方に位置する。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、各々独立して式(I)の構造を有する2つのPEG化チロシンを含む。本明細書で提供される様々なリンカー結合点およびポリマーを有する本明細書で提供される修飾されたIL-2ポリペプチドの非限定的なセットを下記の表7に示す。

30

40

【0268】

50

【表 8】

表 7

I L-2 構築物	リンカー結合点	ポリマー 1 の付着点	ポリマー 2 の付着点
A	N 末端	残基 4 2	残基 4 5
B	N 末端	残基 4 2	なし
C	N 末端	残基 4 5	なし
D	残基 4 2	残基 4 5	なし
E	残基 4 2	N 末端	残基 4 5
F	残基 4 2	N 末端	なし
G	残基 4 5	残基 4 2	なし
H	残基 4 5	N 末端	残基 4 2
I	残基 4 5	N 末端	なし
J	N 末端	残基 6 5	なし
K	残基 6 5	N 末端	なし

10

* 参照配列としての配列番号 1 に基づく残基位置ナンバリング

【0269】

いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは合成である。一態様では、1つ以上のアミノ酸置換を含む修飾された I L-2 ポリペプチドが本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、F 4 2 Y および Y 4 5 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、アミノ酸残基 3 5 ~ 4 5 のいずれか 1 つに位置するホモセリン (H s e) 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、アミノ酸残基 6 1 ~ 8 1 のいずれか 1 つに位置する H s e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、アミノ酸残基 9 4 ~ 1 1 4 のいずれか 1 つに位置する H s e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、1、2、3、またはそれを超える H s e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 4 1、H s e 7 1、H s e 1 0 4、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 4 1、H s e 7 1 および H s e 1 0 4 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、少なくとも 2 つのアミノ酸置換を含み、該少なくとも 2 つのアミノ酸置換は、(a) アミノ酸残基 3 5 ~ 4 5 のいずれか 1 つに位置するホモセリン (H s e) 残基、(b) アミノ酸残基 6 1 ~ 8 1 のいずれか 1 つに位置するホモセリン残基、および (c) アミノ酸残基 9 4 ~ 1 1 4 のいずれか 1 つに位置するホモセリン残基から選択される。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 4 1 および H s e 7 1 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 4 1 および H s e 1 0 4 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 7 1 および H s e 1 0 4 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 4 1 を含む。いくつかの実施形態では、改変 I L-2 ポリペプチドは、H s e 7 1 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、H s e 1 0 4 を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、1、2、3 またはそれを超えるノルロイシン (N l e) 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、残基 1 8 ~ 2 8 のいずれか 1 つに位置する N l e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、アミノ酸残基 3 4 ~ 5 0 のいずれか 1 つに位置する 1 つ以上の N l e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、アミノ酸残基 2 0 ~ 6 0 のいずれか 1 つに位置する N l e 残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、3 つの N l e 置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L-2 ポリペプチドは、N l e 2 3、

20

30

40

50

【 0 2 7 0 】

50

む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 0 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 1 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 2 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 2 3 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0271】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、または少なくとも 9 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、3 ~ 9 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、3 または 4 個のアミノ酸置換、3 ~ 5 個のアミノ酸置換、3 ~ 6 個のアミノ酸置換、3 ~ 7 個のアミノ酸置換、3 ~ 9 個のアミノ酸置換、4 または 5 個のアミノ酸置換、4 ~ 6 個のアミノ酸置換、4 ~ 7 個のアミノ酸置換、4 ~ 9 個のアミノ酸置換、5 または 6 個のアミノ酸置換、5 ~ 7 個のアミノ酸置換、5 ~ 9 個のアミノ酸置換、6 または 7 個のアミノ酸置換、6 ~ 9 個のアミノ酸置換、または 7 ~ 9 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、3 個のアミノ酸置換、4 個のアミノ酸置換、5 個のアミノ酸置換、6 個のアミノ酸置換、7 個のアミノ酸置換、または 9 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、最大でも 4 個のアミノ酸置換、5 個のアミノ酸置換、6 個のアミノ酸置換、7 個のアミノ酸置換、または 9 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上のアミノ酸置換が表 2 から選択される。いくつかの実施形態では、1 つ以上のアミノ酸置換が表 3 から選択される。場合によっては、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチド、表 8 または表 5 に提供される修飾された I L - 2 ポリペプチド、表 2 または表 3 に提供される変異を有する修飾された I L - 2 ポリペプチド、および／または表 4 に提供されるポリマーを有する修飾された I L - 2 ポリペプチドである。

20

30

【0272】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、第 2 の修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、第 3 の修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは、第 2 および第 3 の修飾を含む。

40

【0273】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、配列番号 3 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、配列同一性は、Matrix B L O S U M 6 2、Gap C o s t s E x i s t e n c e : 1 1、E x t e n s i o n : 1、および C o m p o s i t i o n a l A d j u s t m e n t s C o n d i t i o n a l C o m p o s i t i o n a l S c o r e M a t r i x A d j u s t m e n t のパラメーターを使用して、タンパク質-タンパク質 B L A S T アルゴリズムによって測定される。

50

【0274】

本明細書に記載されるような修飾されたIL-2ポリペプチドは、1つ以上の非標準アミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、場合によっては、Tyr 45および／またはPhe 42は、非標準アミノ酸で置換される。いくつかの実施形態では、表2および／または表3に提供される位置に位置する1つ以上のアミノ酸は、1つ以上の非標準アミノ酸で置換される。非標準アミノ酸には、N- α -(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-L-ビフェニルアラニン(Fmoc-L-Bip-OH)およびN- α -(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-O-ベンジル-L-チロシン(Fmoc-L-Tyr(Bzl)-OH)が含まれるが、これらに限定されない。例示的な非標準アミノ酸には、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-メトキシフェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-p-セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、p-ボロノフェニルアラニン、O-プロパルギルチロシン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホチロシン、p-プロモフェニルアラニン、セレノシステイン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、アジド-リジン(AzK)、チロシンアミノ酸の類似体；グルタミンアミノ酸の類似体；フェニルアラニンアミノ酸の類似体；セリンアミノ酸の類似体；トレオニンアミノ酸の類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、またはアミノ置換アミノ酸、 β -アミノ酸；プロリンまたはヒスチジン以外の環状アミノ酸；フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファン以外の芳香族アミノ酸；またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、非標準アミノ酸は、 β -アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸および誘導体化側鎖を有するアミノ酸から選択される。いくつかの実施形態では、非標準アミノ酸は、 β -アラニン、 β -アミノプロピオン酸、ピペリジン酸、アミノカプロン酸、アミノヘプタン酸、アミノピメリン酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、N $^{\alpha}$ -エチルグリシン、N $^{\alpha}$ -エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、アロ-ヒドロキシリジン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、 ω -メチルアルギニン、N $^{\alpha}$ -メチルグリシン、N $^{\alpha}$ -メチルイソロイシン、N $^{\alpha}$ -メチルバリン、 γ -カルボキシグルタメート、 ϵ -N, N, N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N $^{\alpha}$ -アセチルセリン、N $^{\alpha}$ -ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、および／または他の類似のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、Tyr 45および／またはPhe 42は、修飾されたチロシン残基で置換されている。いくつかの実施形態では、修飾されたチロシン残基は、アミノ、アジド、アリル、エステルおよび／またはアミド官能基を含む。いくつかの実施形態では、42または45位の修飾されたチロシン残基は、IL-2ポリペプチドをPD-1に選択的に結合するポリペプチドに結合させるリンカーの結合点として使用される。いくつかの実施形態では、42および／または45位の修飾されたチロシン残基は、前駆体の構造1、構造2、構造3、構造4、または構造5から構築された構造を有し、ここで、構造1は、

【0275】

10

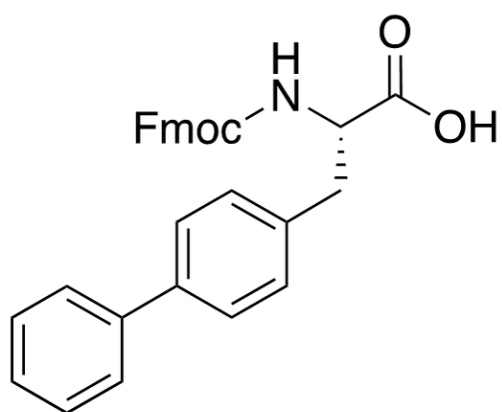
20

30

40

50

【化 2 5】

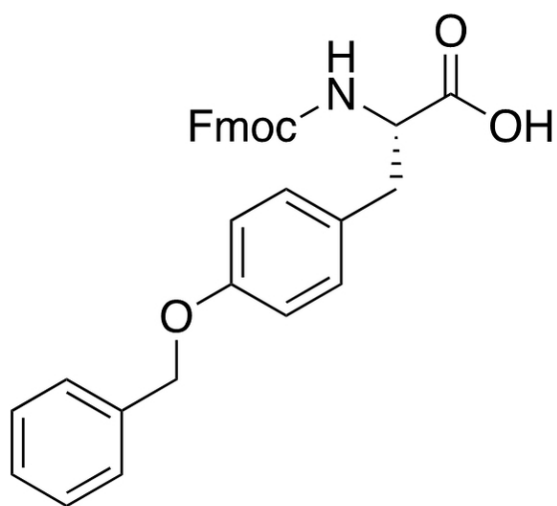


10

構造 1

であり、
構造 2 は、
【0 2 7 6】
【化 2 6】

20



30

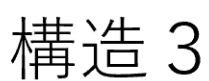
構造 2

であり、
構造 3 は、
【0 2 7 7】

40

50

10



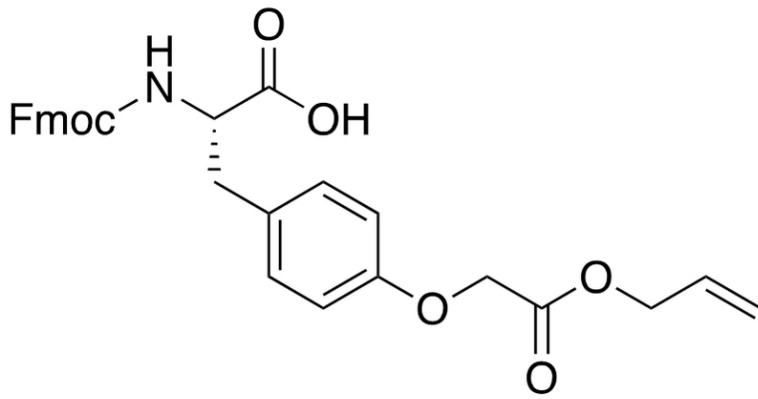
20



30

40

【化 2 9】



構造 5

である。

【0280】

ポリマー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、その上に共有結合した1つ以上のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドに共有結合した1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれを超えるポリマーを含む。いくつかの実施形態では、記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させたリンカーの少なくとも一部を含む。場合によっては、修飾されたIL-2ポリペプチドは、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチド、表4に提供される修飾されたIL-2ポリペプチド、表2または表3に提供される変異を有する修飾されたIL-2ポリペプチド、および／または表3に提供されるポリマーを有する修飾されたIL-2ポリペプチドである。

【0281】

いくつかの実施形態では、第1のポリマーは、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ(アルキレンオキシド)、多糖類、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリオキサゾリン、ポリ(アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーはポリ(アルキレンオキシド)である。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは多糖類である。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーはポリ(エチレンオキシド)である。

【0282】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、IL-2ポリペプチドのN末端に共有結合した第1のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、それに共有結合した第2のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、それに共有結合した第2および第3のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、アミノ酸残基42または45に共有結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、アミノ酸残基F42YまたはY45に共有結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、第2および第3のポリマーは、アミノ酸残基42および45に共有結合しており、ここで、修飾されたIL-2ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、第2および第3のポリマーは、アミノ酸残基F42YおよびY45に

10

20

30

40

50

共有結合しており、ここで、修飾された I L - 2 ポリペプチドのアミノ酸残基位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号 1 に基づく。いくつかの実施形態では、第 1、第 2 または第 3 のポリマーの少なくとも 1 つは、P D - 1 に選択的に結合するポリペプチドに I L - 2 ポリペプチドを結合させるために使用されるリンカーの少なくとも一部を含む。

【0283】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリマーなどの結合したポリマーは、約 120 ダルトン～約 1,000 ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマーは、約 120 ダルトン～約 250 ダルトン、約 120 ダルトン～約 300 ダルトン、約 120 ダルトン～約 400 ダルトン、約 120 ダルトン～約 500 ダルトン、約 120 ダルトン～約 1,000 ダルトン、約 250 ダルトン～約 300 ダルトン、約 250 ダルトン～約 400 ダルトン、約 250 ダルトン～約 500 ダルトン、約 1,000 ダルトン、約 300 ダルトン～約 400 ダルトン、約 300 ダルトン～約 500 ダルトン、約 300 ダルトン～約 1,000 ダルトン、約 400 ダルトン～約 500 ダルトン、約 400 ダルトン～約 1,000 ダルトン、または約 500 ダルトン～約 1,000 ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマーは、約 120 ダルトン、約 250 ダルトン、約 300 ダルトン、約 400 ダルトン、約 500 ダルトン、または約 1,000 ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマーは、少なくとも約 120 ダルトン、約 250 ダルトン、約 300 ダルトン、約 400 ダルトン、または約 500 ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマーは、最大でも約 250 ダルトン、約 300 ダルトン、約 400 ダルトン、約 500 ダルトン、または約 1,000 ダルトンの重量平均分子量を有する。

10

20

【0284】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリマーは、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンオキシド）、多糖類、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリオキサゾリン、ポリ（アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンオキシド）、例えばポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレンオキシド）である。いくつかの実施形態では、各水溶性ポリマーはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、修飾されたポリ（アルキレンオキシド）を含む。いくつかの実施形態では、修飾されたポリ（アルキレンオキシド）は、1 つ以上のリンカー基を含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上のリンカー基は、二官能性リンカー、例えばアミド基、エステル基、エーテル基、チオエーテル基、カルボニル基を含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上のリンカー基は、アミドリリンカー基を含む。いくつかの実施形態では、修飾されたポリ（アルキレンオキシド）は、1 つ以上のスペーサー基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、置換または非置換の C₁～C₆ アルキレン基を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー基は、-CH₂-、-CH₂CH₂-、または-CH₂CH₂CH₂-を含む。いくつかの実施形態では、リンカー基は、生体直交反応（例えば、生体適合性および選択的反応）の生成物である。いくつかの実施形態では、生体直交反応は、Cu（I）触媒または「銅フリー」アルキン-アジドトリアゾール形成反応、シュタウディング-ライゲーション、逆電気要請型ディールス・アルダー（IEDDA）反応、「フォトクリック」ケミストリー、またはオレフィンメタセシスおよび鈴木-宮浦もしくは菌頭クロスカップリングなどの金属媒介プロセスである。いくつかの実施形態では、第 1 のポリマーは、クリックケミストリーを介して I L - 2 ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態において、第 1 のポリマーは、P D - 1 に選択的に結合するポリペプチドに I L - 2 ポリペプチドを結合させるリンカーの少なくとも一部を含む。

30

40

【0285】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾された I L - 2 ポリペプチドは、修飾された I L - 2 ポリペプチドと、抗体およびポリマーなどの誘導体化分子または部分とのコンジュゲーションを容易にする反応基を含む。いくつかの実施形態では、反応基は

50

、カルボン酸由来の活性エステル、混合無水物、ハロゲン化アシル、アシルアジド、ハロゲン化アルキル、N-マレイミド、イミノエステル、イソシアネート、およびイソチオシアネートのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、反応基はアジドを含む。いくつかの実施形態では、反応基は、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させるリンカーの一部を形成する。

【0286】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたIL-2ポリペプチドは、アミノ酸残基に共有結合した化学試薬を含む。いくつかの実施形態では、化学試薬は生体直交試薬を含む。いくつかの実施形態では、化学試薬はアジドを含む。いくつかの実施形態では、化学試薬はアルキンを含む。いくつかの実施形態では、化学試薬は、35~46のアミノ酸残基に結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、39~43のアミノ酸残基に結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、アミノ酸残基42に結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、アミノ酸残基F42Yに結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、44~46のアミノ酸残基に結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、アミノ酸残基45に結合しており、ここで、アミノ酸残基の位置ナンバリングは、参照配列としての配列番号1に基づく。いくつかの実施形態では、化学試薬は、表2または表3に示されるアミノ酸残基のいずれかに結合している。いくつかの実施形態では、化学試薬は、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させるリンカーの一部を形成する。

【0287】

いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、1~10個のポリエチレングリコール鎖を含む。

【0288】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、修飾されたIL-2ポリペプチドに共有結合した第2のポリマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、残基40から残基50までのアミノ酸残基領域に共有結合している。いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、アミノ酸残基Y45に共有結合している。いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、修飾されたIL-2ポリペプチドのN末端に共有結合している。いくつかの実施形態において、第2のポリマーは、PD-1に選択的に結合するポリペプチドにIL-2ポリペプチドを結合させるリンカーの少なくとも一部を含む。

【0289】

いくつかの実施形態では、第2のポリマーは、約120ダルトン~約1,000ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、第2のポリマーは、約120ダルトン~約250ダルトン、約120ダルトン~約300ダルトン、約120ダルトン~約400ダルトン、約120ダルトン~約500ダルトン、約120ダルトン~約1,000ダルトン、約250ダルトン~約300ダルトン、約250ダルトン~約400ダルトン、約250ダルトン~約500ダルトン、約250ダルトン~約1,000ダルトン、約300ダルトン~約400ダルトン、約300ダルトン~約500ダルトン、約300ダルトン~約1,000ダルトン、約400ダルトン~約500ダルトン、約400ダルトン~約1,000ダルトン、または約500ダルトン~約1,000ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、第2のポリマーは、約120ダルトン、約250ダルトン、約300ダルトン、約400ダルトン、約500ダルトン、または約1,000ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、第2のポリマーは、少なくとも約120ダルトン、約250ダルトン、約300ダルトン

、約 400 ダルトン、または約 500 ダルトンの重量平均分子量を有する。いくつかの実施形態において、第 2 のポリマーは、最大でも約 250 ダルトン、約 300 ダルトン、約 400 ダルトン、約 500 ダルトン、または約 1,000 ダルトンの重量平均分子量を有する。

【0290】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリマーは、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンオキシド）、多糖類、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリオキサゾリン、ポリ（アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーはポリ（アルキレンオキシド）である。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーはポリ（エチレンオキシド）である。いくつかの実施形態では、第 2 のポリマーは、クリックケミストリーを介して IL-2 ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態において、第 2 のポリマーは、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドに IL-2 ポリペプチドを結合させるリンカーの少なくとも一部を含む。

10

【0291】

いくつかの実施形態では、第 2 の水溶性ポリマーは、1～10 個のポリエチレングリコール鎖を含む。

【0292】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された IL-2 ポリペプチドは、修飾された IL-2 ポリペプチドに共有結合した第 3 のポリマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、第 3 のポリマーは、アミノ酸残基 40 からアミノ酸残基 50 までのアミノ酸残基領域に共有結合している。いくつかの実施形態では、第 3 のポリマーは、アミノ酸残基 Y45 に共有結合している。いくつかの実施形態では、第 3 のポリマーは、修飾された IL-2 ポリペプチドの N 末端に共有結合している。

20

【0293】

いくつかの実施形態では、各ポリマーは、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンオキシド）、多糖類、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリオキサゾリン、ポリ（アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、各水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレンオキシド）である。いくつかの実施形態では、各水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコールである。

30

【0294】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリマーおよび第 2 のポリマーの各々は、独立して、1～5 個のポリエチレングリコール鎖を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリマーおよび第 2 のポリマーの各々は、独立して、単一のポリエチレングリコール鎖を含む。

【0295】

いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して直鎖または分岐鎖状である。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、直鎖ポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、分岐鎖ポリエチレングリコールである。例えば、いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 のポリマーの各々は、直鎖ポリエチレングリコール鎖を含む。

40

【0296】

いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アミドまたはアミノ基で末端がキャップされている。いくつかの実施形態において、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して、アミノ基で末端がキャップされている。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して、アミド基で末端がキャップされている。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して、アルコキシ基で末端がキャップされている。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立して、アルキル基で末端がキャップされている。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の各々は、独立

50

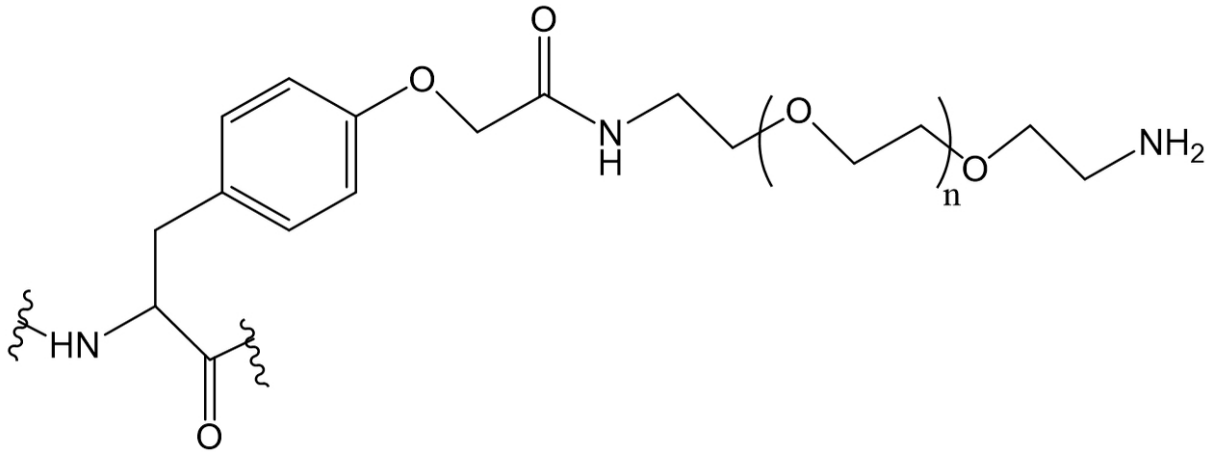
して、ヒドロキシ基で末端がキャップされている。

【0297】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、式(I)の構造を有する1つ以上のPEG化チロシンを含み、

【0298】

【化30】



10

式 (I)

20

式中、 n は、4～30から選択される整数である。いくつかの実施形態では、 n は、4～6、4～8、4～10、4～15、4～20、4～25、4～30、6～8、6～10、6～15、6～20、6～25、6～30、8～10、8～15、8～20、8～25、8～30、10～15、10～20、10～25、10～30、15～20、15～25、15～30、20～25、20～30、または25～30である。いくつかの実施形態では、 n は、4、6、8、10、15、20、25、または30である。いくつかの実施形態では、 n は、少なくとも4、6、8、10、15、20、または25である。いくつかの実施形態では、 n は、最大でも6、8、10、15、20、25、または30である。一態様では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドは、1つまたは2つのアミノ酸残基に共有結合した1つまたは2つの水溶性ポリマーを含む。例えば、いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、表6に示される特性および結合部位を有する1つまたは2つの水溶性ポリマーを含む。

30

【0299】

40

50

【表 9】

表 6．例示的なポリペプチド構造および水溶性ポリマー特性

例示的な ポリペプ チド構造	残基 4 5 に結合した水溶性ポリマー の特性	残基 4 2 に結合した水溶性ポリマー の特性
1	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da
2	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da	なし
3	なし	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da
4	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da、 PD-1 に選択的に結合するポリペ プチドへのリンカーとして必要に応 じて作用する	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da
5	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da	直鎖状；Mw：約 200～約 1000 Da、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカーとして必要に応じて作用する
6	なし	直鎖状； Mw：約 200～約 1000 Da
7	直鎖状；Mw：約 200～約 1000 Da、PD-1 に選択的に結合するポリペプチドへのリンカーとして必要に応じて作用する	なし

10

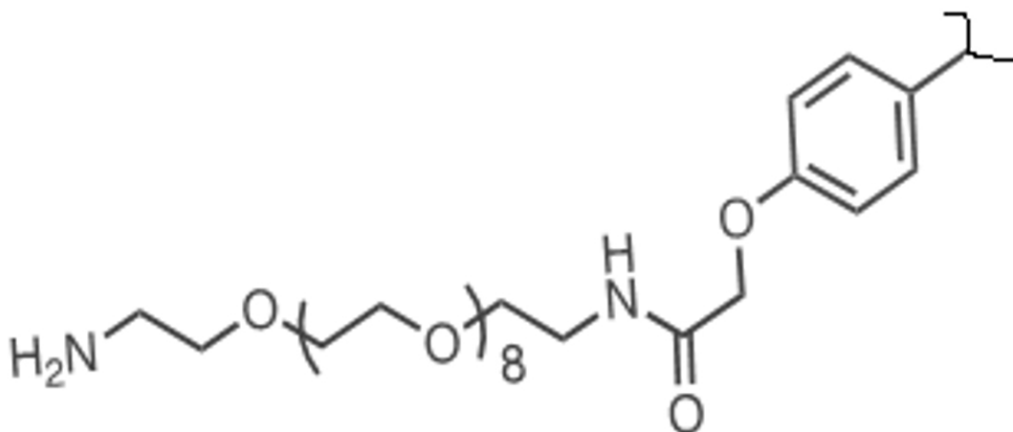
20

いくつかの実施形態では、修飾された IL-2 ポリペプチドに結合することができる水溶性ポリマーは、式 (D) の構造：

【0300】

【化 31】

30



40

式 (D)

を含む。

【0301】

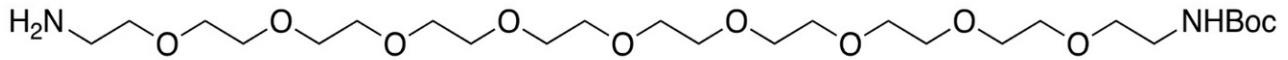
いくつかの実施形態では、ポリマーは、適切な前駆体材料から合成される。いくつかの

50

実施形態では、ポリマーは、構造 6、構造 7、構造 8、または構造 9 の前駆体材料から合成され、構造 6 は、

【0302】

【化32】



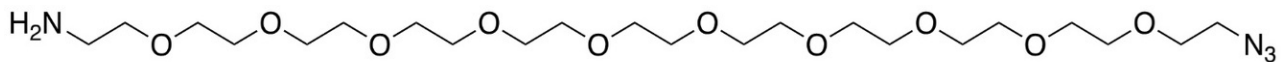
構造 6

であり、

構造 7 は、

【0303】

【化33】



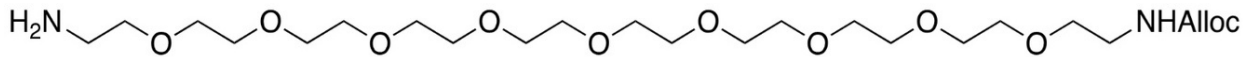
構造 7

であり、

構造 8 は、

【0304】

【化34】



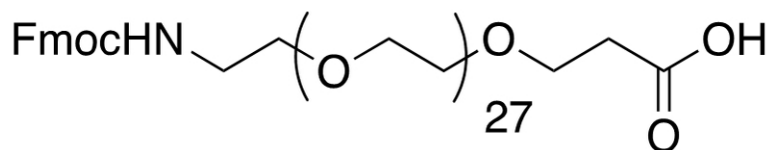
構造 8

であり、

構造 9 は、

【0305】

【化35】



構造 9

である。

【0306】

直交ペイロード

本開示の抗PD-1-IL-2イムノコンジュゲートは、二重直交ペイロードを含み得る。非限定的な一例では、抗PD-1-IL-2イムノコンジュゲートは、抗PD-1ポリペプチドと、1つの修飾されたIL-2ポリペプチドと、化学的直交連結基によって抗PD-1ポリペプチドに連結された1つのペイロードとを含み得る。直交ペイロードは、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、タンパク質、サイトカイン、アルキル基、アリールまたはヘテロアリール基、治療用小分子薬物、ポリエチレングリコール（PEG）部分、脂質、糖、ビオチン、ビオチン誘導体、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、またはペプチド核酸（PNA）であり得、そのいずれも置換、非置換、修飾、または非修飾である。いくつかの実施形態では、直交ペイロードは治療用小分子である。いくつかの実施形態では、直交ペイロードはPEG部分である。いくつかの実施形態では、直交ペイロードは、追加のサイトカイン、例えば、IL-7またはIL-18である。例示

10

20

30

40

50

的な一例において、ヒトIL-7は、DCDIEGKD G K Q Y E S V L M V S I D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H（配列番号117）のアミノ酸配列を有するか、または修飾されたIL-7である。例示的な一例において、ヒトIL-18は、Y F I A E D D E N L E S D Y F G K L E S K L S V I R N L N D Q V L F I D Q G N R P L F E D M T D S D C R D N A P R T I F I I S M Y K D S Q P R G M A V T I S V K C E K I S T L S C E N K I I S F K E M N P P D N I K D T K S D I I F F Q R S V P G H D N K M Q F E S S S Y E G Y F L A C E K E R D L F K L I L K K E D E L G D R S I M F T V Q N E D（配列番号118）のアミノ酸配列を有するか、または修飾されたIL-18である。場合によっては、IL-18のCys68、Glu69、Lys70のうちの1つ以上にコンジュゲーションハンドルを付加することができる。

10

【0307】

医薬組成物

一態様では、本明細書に記載される修飾されたIL-2ポリペプチドに連結されたPD-1に選択的に結合するポリペプチドと、薬学的に許容され得る担体または賦形剤とを含む医薬組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の賦形剤をさらに含み、該1つ以上の賦形剤には、糖質、無機塩、抗酸化剤、界面活性剤、緩衝剤、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれを超える賦形剤をさらに含み、ここで、1つ以上の賦形剤には、糖質、無機塩、抗酸化剤、界面活性剤、緩衝剤、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0308】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、糖質をさらに含む。特定の実施形態では、糖質は、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ピラノシルソルビトール、ミオイノシトール、シクロデキストリン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

30

【0309】

あるいは、またはさらに、医薬組成物は、無機塩をさらに含む。特定の実施形態では、無機塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸ナトリウム、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0310】

代替的に、または追加的に、医薬組成物は抗酸化剤を含む。特定の実施形態では、抗酸化剤は、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、メタ重亜硫酸カリウム、没食子酸プロピル、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、ビタミンE、3，4-ジヒドロキシ安息香酸、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

40

【0311】

代替的に、または追加的に、医薬組成物は、界面活性剤をさらに含む。特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート、ソルビタンエステル、脂質、リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、EDTA、亜鉛、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0312】

あるいは、または加えて、医薬組成物は緩衝液をさらに含む。特定の実施形態では、緩

50

衝剤は、クエン酸、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸、エタノールアミン、ヒスチジン、アミノ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸、乳酸、トリス、H E P E S、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0313】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、非経口投与または経腸投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内（I V）または皮下（S Q）投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は凍結乾燥形態である。

【0314】

一態様では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合する記載のポリペプチドを含む液体または凍結乾燥組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチド修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、凍結乾燥粉末である。いくつかの実施形態では、凍結乾燥粉末は、緩衝剤に再懸濁される。いくつかの実施形態では、緩衝溶液は、緩衝剤、糖、塩、界面活性剤、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、緩衝溶液はリン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、リン酸塩はナトリウム Na_2HPO_4 である。いくつかの実施形態では、塩は塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リン酸緩衝生理食塩水を含む。いくつかの実施形態では、緩衝溶液はマンニトールを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥粉末は、約10mMの Na_2HPO_4 緩衝剤、約0.022%のSDSと、約50mg/mLのマンニトールとを含み、約7.5のpHを有する溶液に懸濁される。

【0315】

剤形

本明細書に記載される修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、様々な剤形であり得る。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、再構成された凍結乾燥粉末として投与される。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、懸濁液として投与される。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、溶液として投与される。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、注射可能な溶液として投与する。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、I V溶液として投与される。いくつかの実施形態では、修飾されたI L - 2ポリペプチドに連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドは、皮下投与または筋肉内投与によって投与される。

【0316】

処置の方法

一態様では、本明細書に記載されるのは、癌の処置を必要とする被験体において癌を処置する方法であって、有効量の、本明細書に記載されるような修飾されたI L - 2ポリペプチドまたは医薬組成物に連結されたP D - 1に選択的に結合するポリペプチドを被験体に投与するステップを含む方法である。いくつかの実施形態では、癌は固形癌である。癌または腫瘍は、例えば、原発性癌または腫瘍または転移性癌または腫瘍であり得る。処置される癌および腫瘍には、黒色腫、肺癌（例えば、非小細胞肺癌（N S C L C）、小細胞肺癌（S C L C）など）、癌腫（例えば、皮膚扁平上皮癌（C S C C）、尿路上皮癌（U C）、腎細胞癌（R C C）、肝細胞癌（H C C）、頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）、食道扁平上皮癌（E S C C）、胃食道接合部（G E J）癌、子宮内膜癌（E C）、メルケル細胞癌（M C C）など）、膀胱癌（B C）、マイクロサテライト不安定性高（M S I - H）／ミスマッチ修復欠損（d M M R）固形腫瘍（例えば、結腸直腸癌（C R C））、腫瘍変異負荷高（T M B - H）固形腫瘍、トリプルネガティブ乳癌（T N B C）、胃癌（G C）、子宮頸癌（C C）、胸膜中皮腫（P M）、古典的ホジキンリンパ腫（c H L）、また

は原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）が含まれるが、これらに限定されない。

【0317】

本明細書では、1つ以上の追加の活性薬剤との併用療法が企図される。いくつかの実施形態では、第2の治療剤は、腫瘍型、腫瘍由来の組織、腫瘍病期、または腫瘍によって発現される遺伝子の変異に基づいて選択される。例えば、抗PD-1抗体は、化学療法剤、免疫チェックポイント阻害剤、免疫アゴニスト、生物学的癌剤、低分子量抗癌剤、合成ペプチド抗癌剤、抗癌タンパク質分解剤、癌特異的薬剤、サイトカイン療法、抗血管新生薬、癌代謝を標的とする薬物、癌細胞表面を破壊のためにマークする抗体、抗体-薬物コンジュゲート、細胞療法、一般的に使用される抗新生物剤、CAR-T療法、腫瘍溶解性ウイルス、非薬物療法、神経伝達遮断薬、または神経成長因子遮断薬のうちの1つ以上と組み合わせて投与することができる。

10

【0318】

いくつかの実施形態では、癌は固形癌である。いくつかの実施形態では、固形癌は、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳癌、乳癌、カルチノイド癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、眼癌、胆嚢癌、消化管間質腫瘍、胚細胞癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、口腔癌、中咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌、小児癌、陰茎癌、下垂体癌、前立腺癌、皮膚癌、軟部組織癌、脊髄癌、胃癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、尿管癌、子宮癌、陰癌、または外陰癌である。

20

【0319】

いくつかの実施形態において、癌は血液癌である。いくつかの実施形態では、血液癌は、白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、AIDS関連リンパ腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫、移植後リンパ増殖性障害、またはワルデンシュトレームマクログロブリン血症である。

【0320】

疾患の徴候または症候の部分的または全体的な緩和または軽減、腫瘍負荷の減少、腫瘍負荷の増加（腫瘍の進行）までの時間の延長を被験体を経験する場合、効果的な奏功が得られ、具体的には、限定されないが、生存期間の延長が挙げられる。予測無増悪生存期間は、疾患の再発回数、病期、および他の因子を含む予後因子に依存して、数ヶ月～数年で測定され得る。生存期間の延長には、少なくとも1ヶ月（月）、約少なくとも2ヶ月、約少なくとも3ヶ月、約少なくとも4ヶ月、約少なくとも6ヶ月、約少なくとも1年、約少なくとも2年、約少なくとも3年、約少なくとも4年、約少なくとも5年などの期間が含まれるが、これらに限定されない。全生存または無増悪生存も、数ヶ月～数年で測定され得る。代替的に、効果的な奏功は、被験体の症候または癌負荷が静止したままであり、悪化しないことであり得る。適応症の処置の更なる適応症を下記により詳細に記載する。いくつかの例では、癌または腫瘍は、少なくとも2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少する。

30

【0321】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドに連結されたPD-1に選択的に結合するポリペプチドは、単回用量の有効量の修飾されたIL-2ポリペプチドで投与され、更なる実施形態では、(i)修飾されたIL-2ポリペプチドに連結されたPD-1に選択的に結合するポリペプチドは、1日1回投与されるか、または(ii)修飾されたIL-2ポリペプチドに連結されたPD-1に選択的に結合するポリペプチドは、被験体に1日の期間にわたって複数回投与されることを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドに連結されたPD-1に選択的に結合するポリペプチドは、毎日、1日置き、1週間に3回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、3日間に1回、4日間に1回、5日間に1回、6日間に1回、隔週、1週間に3回、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回、1ヶ月に1回、1ヶ月に2回、1ヶ月に3回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、

40

50

または6ヶ月に1回投与される。投与には、任意の適切な経路（例えば、非経口、経腸、静脈内、皮下など）による注射が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、組成物は、毎週、2週間に1回、3週間に1回、または4週間に1回投与される。

【0322】

製造方法

一態様では、組成物を作製する方法であって、PD-1に選択的に結合するポリペプチドを提供するステップであって、PD-1に選択的に結合するポリペプチドが反応性基（例えば、コンジュゲーションハンドル）を含む、ステップと、反応性基をサイトカインに結合した相補的な反応性基と接触させるステップと、組成物を形成するステップとを含む、方法が本明細書に記載される。結果生じる組成物は、本明細書で提供される組成物のいずれかである。

10

【0323】

いくつかの実施形態では、PD-1に選択的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、反応性基を含む抗体を提供するステップは、反応性基を抗体に結合させるステップを含む。いくつかの実施形態では、反応性基は、部位特異的に付加される。いくつかの実施形態では、反応性基を抗体に結合させるステップは、抗体を、抗体の特定の残基と結合を形成する反応性官能基を含むアフィニティー基と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、反応性基を抗体に結合させるステップは、抗体を酵素と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、酵素は、反応性基を抗体の特定の残基に部位特異的に結合するように構成される。いくつかの実施形態では、酵素は、グリコシル化酵素またはトランスグルタミナーゼ酵素である。

20

【0324】

いくつかの実施形態では、本方法は、サイトカインに相補的な反応性基を結合させるステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、サイトカインに相補的な反応性基に結合させるステップは、サイトカインを化学的に合成するステップを含む。

【0325】

いくつかの実施形態では、本方法は、修飾されたIL-2ポリペプチドを作製することを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドを作製する方法は、修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片を合成するステップと、断片をライゲートするステップとを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドを作製する方法は、a. 修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片を合成するステップと、b. 断片をライゲートするステップと、c. ライゲートされた断片を折り畳むステップとを含む。

30

【0326】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片は化学的に合成される。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片は、固相ペプチド合成によって合成される。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片は、自動ペプチド合成機で合成される。

【0327】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれを超えるペプチド断片からライゲートされる。いくつかの実施形態では、修飾ペプチドは、2つのペプチド断片からライゲートされる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、3つのペプチド断片からライゲートされる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、4つのペプチド断片からライゲートされる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドは、2～10個のペプチド断片にライゲートされる。

40

【0328】

いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドの2つ以上の断片は一緒にライゲートされる。いくつかの実施形態では、修飾されたIL-2ポリペプチドの3つまたはそれを超える断片は、連続的な様式でライゲートされる。いくつかの実施形態では、

50

修飾された I L - 2 ポリペプチドの 3 つ以上の断片は、ワンポット反応でライゲートされる。

【 0 3 2 9 】

いくつかの実施形態では、ライゲートされた断片は折り畳まれる。いくつかの実施形態では、折り畳みは、修飾された I L - 2 ポリペプチド内に 1 つ以上のジスルフィド結合を形成することを含む。いくつかの実施形態では、ライゲーションした断片を折り畳み工程に供する。いくつかの実施形態では、ライゲーションされた断片は、当技術分野で周知の方法を使用してフォールディングされる。いくつかの実施形態では、ライゲートされたポリペプチドまたは折り畳まれたポリペプチドは、1 つ以上のポリマーをそれに結合させることによってさらに修飾される。いくつかの実施形態では、ライゲートされたポリペプチドまたは折り畳まれたポリペプチドは、P E G 化によってさらに修飾される。いくつかの実施形態では、修飾された I L - 2 ポリペプチドは合成である。

10

I L - 2 ポリペプチドの配列（配列番号）

【 0 3 3 0 】

20

30

40

50

【表 10-1】

表 8

置換	配列番号	配列
なし (WT)	1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVNLQA SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFC QSIISTLT
ΔA1, C125S (アル デスロイキン)	2	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPLEEVNLQA SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, N71 Hse, M104Hse, C125S	3	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEV (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, M46 Hse, N71Hse, M 104Hse, C125S	4	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEV (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, N71 Hse, L72Y, M10 4Hse, C125S	5	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEV (Hse) YAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, M46 N1e, N71Hse, L 72Y, M104Hse, C125S	6	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEV (Hse) YAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, N71 Hse, L72G, M10 4Hse, C125S	7	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEV (Hse) GAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, P65 Y, N71Hse, M10 4Hse, C125S	8	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKYLEEV (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFS QSIISTLT

10

20

30

40

【0331】

50

【表 10-2】

置換	配列番号	配列
M23N1e, M39N1e, T41Hse, M46N1e, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	9	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKYLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, R38Y, M39N1e, T41Hse, F42Y, M46N1e, E62Y, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	10	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTY (N1e) L (Hse) YKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEYLKYLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, M39N1e, T41Hse, M46N1e, H64N1e, E62Y, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	11	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEYLKYLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, M39N1e, T41Hse, M46N1e, E62Y, N71Hse, M104Hse, C125S	12	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEYLKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, M39N1e, T41Hse, K43Y, M46N1e, N71Hse, M104Hse, C125S	13	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FYFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, M39N1e, T41Hse, F44Y, M46N1e, N71Hse, M104Hse, C125S	14	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FKY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
M23N1e, K35Y, M39N1e, T41Hse, M46N1e, N71Hse, M104Hse, C125S	15	APTSSSSTKKKTQLQLEHLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPYLTR (N1e) L (Hse) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT
H16Y, M23N1e, M39N1e, T41Hse, M46Hse, N71Hse, M104Hse, C125S	16	APTSSSSTKKKTQLQLEYLLLDLQ (N1e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (Hse) FKFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTF (Hse) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIIISTLT

10

20

30

40

【0332】

50

【表 10 - 3】

置換	配列番号	配列
H16Y, M23N1e, M39N1e, T41Hs e, F41Y, M45N1 e, N71Hse, M10 4Hse, C125S	17	APTSSSTKKTQLQLEYYLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
D20Y, M23N1e, M39N1e, T41Hs e, M46N1e, N71 Hse, M104Hse, C125S	18	APTSSSTKKTQLQLEHLLLYLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) FKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
D20Y, M23N1e, M39N1e, T41Hs e, F42Y, M46N1 e, N71Hse, M10 4Hse, C125S	19	APTSSSTKKTQLQLEHLLLYLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
M23N1e, K35Y, M39N1e, T41Hs e, F42Y, M46N1 e, N71Hse, M10 4Hse, C125S	20	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPYLTR (N1e) L (H se) YKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, E62 Y, N71Hse, M10 4Hse, C125S	21	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEYLKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, F42 Y, M46N1e, E62 Y, P65Y, N71Hs e, M104Hse, C1 25S	22	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) YKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEYLKYLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFSQ SIISTLT
M23N1e, M39N1 e, T41Hse, M46 N1e, N71Hse, M 104Hse	23	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ (N1 e) ILNGINNYKNPKLTR (N1e) L (H se) FKIFY (N1e) PKKATELKHLQCL EEELKPLEEVL (Hse) LAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELEKGETTF (H se) CEYADETATIVEEFLNRWITFCQ SIISTLT

10

20

30

40

上記の表 8 において、N1e はノルロイシン残基であり、Hse はホモセリン残基である。

【0333】

本開示およびその利点を詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲に定義される本開示の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変更、置換および修飾を行うことができることを理解されたい。

【0334】

本開示は、以下の実施例においてさらに説明されるが、これらの実施例は説明の目的のみに与えられ、本開示をいかなる形でも限定することを意図するものではない。

50

【実施例】

【0335】

実施例1：ペムブロリズマブー（IL-2ポリペプチド）免疫コンジュゲートの調製

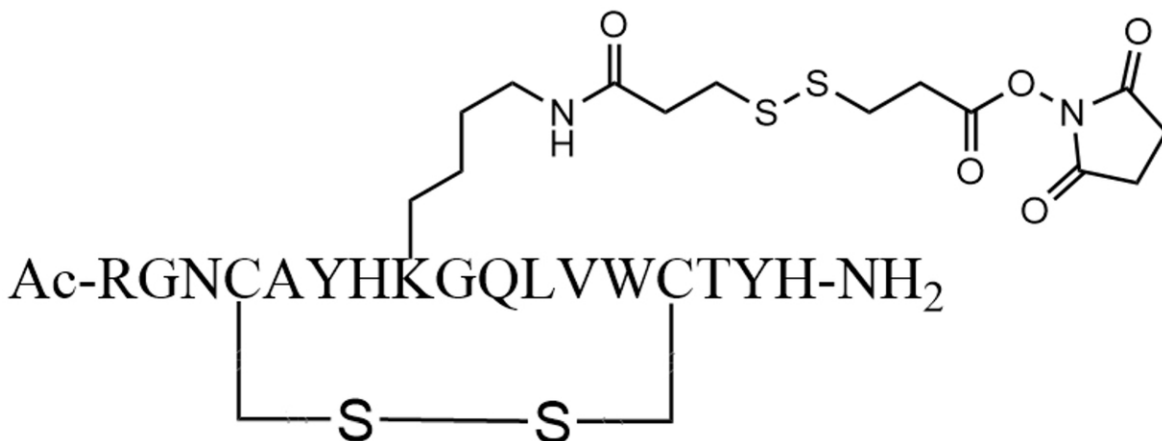
修飾ペムブロリズマブポリペプチドを、米国特許出願公開第20200190165（A1）号明細書の実施例2～4に記載される方法を利用して調製する。簡潔には、DBCOコンジュゲーション基を有するアジキャップ化（味の素社バイオフィーマーサービス社によるAJICAP（商標）であって、これは、少なくとも国際公開第2018199337（A1）号、国際公開第2019240288（A1）号、国際公開第2019240287（A1）号、国際公開第2020090979（A1）号、Matsudaら、Mol. Pharmaceuticals 2021, 18, 4058-4066、およびYamadaら、Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies. Angew. Chem., Int. Ed. 2019, 58, 5592-5597、および特に米国特許出願公開第20200190165（A1）号明細書の実施例2～4に見出される）ペムブロリズマブポリペプチドを（IL-2ポリペプチド）アジドポリペプチドと室温で48時間反応させた。粗ペムブロリズマブー（IL-2ポリペプチド）免疫コンジュゲートを、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、DBCO-PEGによる捕捉、プロテインAクロマトグラフィーまたはDBCO樹脂カラム精製を使用して分離した。

【0336】

AJICAP（商標）方法論のための例示的なプロセスは以下のとおりである：DBCOコンジュゲーションハンドルを含む修飾抗体（例えば、LZM-009のペムブロリズマブなどの抗PD-1抗体）を、米国特許出願公開第20200190165（A1）号明細書の実施例2～4から修飾されたプロトコルを使用して調製する。簡潔には、Fc領域中のリジン残基側鎖に結合した遊離スルフヒドリル基を有する抗PD1抗体を、該抗体を、保護バージョンのスルフヒドリル基（例えば、チオエステルまたは還元可能なジスルフィド）をリジン残基に送達するように構成されたアフィニティーペプチドと接触させることによって調製する。この反応を行うことができる例示的なペプチドは、Matsudaら、Pharmaceuticals 2021, 18, 4058-4066に報告されるとおり、下記に示され、これは、次の抗体のFc領域の残基K248においてNHSEステルを介してスルフヒドリル基を選択的に結合させた：

【0337】

【化36】

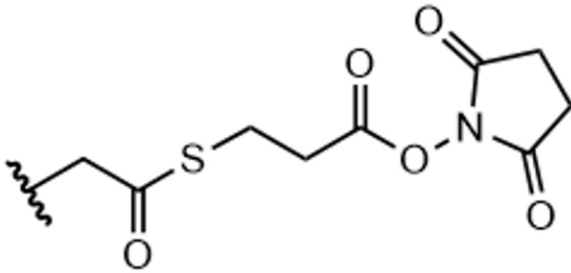


Fc領域の別の残基を標的とする別のアフィニティーペプチドは、AJICAP（商標）技術に関して上で引用した参考文献に記載されており、そのようなアフィニティーペプチドを使用して、所望の官能基をFc領域の別の残基に結合させることができる（例えば、K246、K288など）。例えば、上記のアフィニティーペプチドのジスルフィド基

を代わりにチオエステルで置き換えて、スルフヒドリル保護基を提供することができる（例えば、アフィニティーペプチドの関連部分は、

【0338】

【化37】



10

の構造を有するであろう）。

【0339】

次いで、保護基を除去して、遊離スルフヒドリルを示す（例えば、チオエステルの加水分解またはTCEPによるジスルフィドの還元によって）。次いで、遊離スルフヒドリルを、連結基（例えば、プロモアセトアミド-dPEG（登録商標）4-アミド-DBCO）を介してDBCOコンジュゲーションハンドルに連結されたプロモアセトアミドまたはプロモケトン基を含む二官能性試薬と反応させる。この方法は、存在する1つのDBCO基（DAR1）および／または抗体に結合した2つのDBCO基（DAR2、抗体の各Fcに連結された1つのDBCO基）を有する抗体を産生するために使用することができる。次いで、所望のアジド修飾されたIL-2ポリペプチド（例えば、組成物AB）をDBCO修飾抗体と反応させてイムノサイトカインを産生する。

20

【0340】

別の実施形態では、単一のDBCOコンジュゲーションハンドルを含む抗体を、保護基（例えば、ジスルフィド還元またはチオエステル切断）の適切な除去後に、過剰の抗PD-1抗体を適切にロードしたアフィニティーペプチドと最初に反応させて単一のスルフヒドリルを導入することによって調製する。次いで、スルフヒドリル反応性コンジュゲーションハンドルおよびDBCOコンジュゲーションハンドル（例えば、プロモアセトアミド-dPEG（登録商標）4-アミド-DBCO）を有する二官能性連結基を、単一のスルフヒドリルと反応させて、単一のDBCO含有抗体を産生する。次いで、単一DBCO含有抗体を、適切なアジド含有IL-2（例えば、組成物AB）とコンジュゲートさせて、DARが1の抗PD-1-IL-2イムノコンジュゲートを得る。

30

【0341】

図2Aは、1つまたは2つのコンジュゲーションハンドルを導入するための化学修飾技術による抗PD1抗体の部位選択的修飾を示す。図2Bは、修飾されていないペムプロリズマブおよびAJICAP技術を使用したDBCOコンジュゲーションハンドルへのコンジュゲーションを伴うペムプロリズマブのQ-TOF質量スペクトルを示す。図2Cは、DAR1またはDAR2を有するPD1-IL2を生成するためのIL2サイトカインの部位選択的コンジュゲーションを示す。1～2の混合DARを有するPD1-IL2の集団も調製することができる。図2Dは、粗ペムプロリズマブおよび組成物ABコンジュゲーション反応混合物のTICクロマトグラム（上）およびインタクトRP-HPLC（下）プロファイルを示す。DAR0はIL-2がコンジュゲートされていないペムプロリズマブを表し、DAR1は1つのIL-2がコンジュゲートされたペムプロリズマブを表し、DAR2は2つのIL-2がコンジュゲートされたペムプロリズマブを表す。図2Eは、DAR1およびDAR2種の形成を示す、粗ペムプロリズマブおよび（組成物AB）コンジュゲーション反応混合物のQ-TOF質量スペクトルプロファイルを示す。図2Fは、精製PD1-IL2の代表的なRP-HPLCクロマトグラムを示し、図2Gは、精製PD1-IL2の代表的なQ-TOF質量スペクトルを示し、図2Hは、精製PD1-IL2（組成物B）の代表的な分析SECを示す。

40

50

【0342】

下記の表9は、本明細書で提供される方法または他の箇所に記載される類似の方法に従って調製される様々なイムノサイトカインをまとめたものである。

【0343】

【表11】

表9：イムノサイトカインの特性

組成物	抗体	I L - 2 ポリ ペプチド	D A R	コンジュゲー ション部位	エンドトキシン (E U / m l)	アグリゲート (S E C - H P L C)
A	ペムプロリズマブ	組成物 A B	1	K 2 4 8	< 5	1 . 5 %
B	ペムプロリズマブ	組成物 A B	1 . 5	K 2 4 8	2 . 5	0 %
C	ペムプロリズマブ	組成物 A B	2	K 2 4 8	8 . 9	0 . 9 %
D	ペムプロリズマブ	組成物 A B	1	K 2 8 8	< 5	1 . 7 8 %
E	ペムプロリズマブ	組成物 A B	2	K 2 8 8	< 5 . 5	1 . 0 2 %
F	ペムプロリズマブ	組成物 A C	1	K 2 4 8	6 9 . 7	2 . 5 3 %
G	ペムプロリズマブ	組成物 A C	2	K 2 4 8	7 5 . 6	2 . 6 5 %
H	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	1	K 2 4 8	< 5 . 0	2 . 1 %
I	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	2	K 2 4 8	1 7 . 5	1 . 7 %
J	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	1	K 2 8 8	7 . 8 1	1 . 4 8 %
K	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	2	K 2 8 8	< 0 . 0 0 6	< 5 %
N	トラスツズマブ	組成物 A B	1 . 6	K 2 4 8	1 1 . 3	0 . 2 %
O	トラスツズマブ	組成物 A B	1	K 2 4 8	< 0 . 5	< 0 . 1 %

【0344】

実施例2：PD-1結合ELISAアッセイ（図3）

修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体とPD-1（CD279）との相互作用をELISAアッセイによって測定した。これらの研究のために、Corning社製高結合性ハーフエリアプレート（Fisher Scientific社、スイス国ライナハ）を、25μlの修飾されていない抗PD1抗体またはコンジュゲートされた抗PD1抗体でPBS中2.5μg/mlにおいて4℃で一晩コーティングした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02%Tween20で4回洗浄した。プレート表面を25μlのPBS-0.02%Tween20-1%BSAにより37℃で1時間ブロッキングした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02%Tween20で4回洗浄した。Biolegend社からの25マイクロリットルの組換えヒオチン化PD1/CD279タンパク質（789406、英国ロンドン）を、PBS-0.02%Tween20-0.1%BSA中で23nMから開始して0.0003nMまで5倍段階希釈で添加し、37℃で2時間インキュベートした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02%Tween20で4回洗浄した。PBS-0.02%Tween20-0.1%BSA中で1:500に希釈した25マイクロリットルのstreptavidin-西洋ワサビペルオキシダーゼ（#RABHRP 3、メルク社、スイス国ブフス）を各ウェルに添加し、室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02%Tween20で4回洗浄した。50マイクロリットルのTMB基質試薬（カタログ番号07、Merck社、スイス国ブフス）を各ウェル

に添加し、37℃で5分間インキュベートした。37℃で5分後、50 μl / ウェルの 0.5 M H₂SO₄ 停止溶液を添加することによって、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応を停止した。次いで、ELISA シグナルを、Perkin Elmer 社からの EnSpire プレートリーダー（スイス国シュベルツェンバッハ）で 450 nm で測定した。
【0345】

【表 12】

表 10：ELISA によって測定したイムノサイトカインと PD-1 との相互作用の K_D 値

組成物	抗体	IL-2 ポリペプチド	DAR	コンジュゲーション部位 (Fc 領域の Eu ナンバリング)	K _D (pM)
—	ペムプロリズマブ	—	0	—	37
A	ペムプロリズマブ	組成物 AB	1	K248	60
B	ペムプロリズマブ	組成物 AB	1.5	K248	NT
C	ペムプロリズマブ	組成物 AB	2	K248	56
D	ペムプロリズマブ	組成物 AB	1	K288	31
E	ペムプロリズマブ	組成物 AB	2	K288	29
F	ペムプロリズマブ	組成物 AC	1	K248	36
G	ペムプロリズマブ	組成物 AC	2	K248	41
	LZM-009	—	0	—	35
H	LZM-009	組成物 AB	1	K248	37
I	LZM-009	組成物 AB	2	K248	NT
J	LZM-009	組成物 AB	1	K288	27
K	LZM-009	組成物 AB	2	K288	41
—	ニボルマブ / オブジーボ	—	0	—	66

NT = 試験せず

【0346】

図 3 は、PD-1 / CD279 リガンドに結合する修飾されていない抗 PD-1 抗体およびコンジュゲートされた抗 PD-1 抗体の能力を説明するプロットを示し、この図は、ELISA シグナルを y 軸上に示し、ビオチン化 PD-L1 タンパク質の投薬量を x 軸上に示す。この図において試験されたコンジュゲートされていない参照抗体とコンジュゲートされた抗体とは、それぞれ、組成物ペムプロリズマブ、ニボルマブ、LZM-009 と、組成物 A、C、D、E、F、G、および H とである。

【0347】

PD-1 / PD-L1 遮断バイオアッセイ：PD-1 / PD-L1 遮断バイオアッセイを使用して、ペムプロリズマブ（IL-2 ポリペプチド）免疫コンジュゲートが PD-1 / PD-L1 相互作用を遮断する能力を決定した。

【0348】

修飾されていない抗 PD-1 抗体およびコンジュゲートされた抗 PD-1 抗体が PD-1 / PD-L1 経路を妨害する能力を、Promega 社からの PD-1 / PD-L1 遮断バイオアッセイ（カタログ番号 J1250、米国ウィスコンシン州マディソン）を使用して測定

した。PD-1 / PD-L1 遮断バイオアッセイは、エフェクター細胞と免疫シナプスを模倣する標的細胞との共培養に基づく生物発光細胞ベースのアッセイである。ヒトPD-1を発現するJurkat T細胞およびNFAT応答エレメント (NFAT-RE) によって駆動されるルシフェラーゼレポーターは、ヒトPD-L1を発現するCHO-K1細胞およびJurkatの同族TCRを活性化するように設計された操作された細胞表面タンパク質によって活性化される。同時相互作用PD-1 / PD-L1は、TCRシグナル伝達を阻害し、NFAT-RE媒介発光を抑制する。PD-1 / PD-L1相互作用を遮断する抗PD-1または抗PD-L1抗体のいずれかを添加すると、阻害性シグナルが放出され、TCR活性化が回復し、NFAT-RE発光レポーターのシグナルが増加することになる。

10

【0349】

簡潔には、PD-L1 aAPC / CHO-K1 標的細胞を白色組織培養-96ウェルプレートに播種し、37℃ / 5% CO₂で一晩培養した。試験分子を、1 μMから開始して0.002 nMまでの4倍連続希釈で測定し、新たに解凍したPD-1 Jurkatエフェクター細胞を添加する前に標的細胞上で10分間プレインキュベートした。37℃ / 5% CO₂で6時間後、活性NFAT-RE発光レポーターをBio-Glo試薬の添加によって評価し、Perkin Elmer社からのEnSpireプレートリーダー (1秒 / ウェル) で測定した (スイス国シュベルツェンバッハ)。

【0350】

図4は、PD1 / PDL1経路を遮断する抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を説明するプロットを示し、この図は、エフェクター細胞NFAT-REレポーターの平均発光強度をy軸上に示し、修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の投薬量をx軸上に示す。この図において試験されたコンジュゲートされていない参照抗体とコンジュゲートされた抗体とは、それぞれペムプロリズマブと組成物Bとである。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、プロロイキンおよび組成物Aである。

20

【0351】

修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体と、ヒト新生児型Fc受容体 (FcRn) とのpH6での相互作用を、Perkin Elmer社からのAlphaLISA (登録商標) ヒトFcRn結合キット (AL3095C) を使用して測定した (スイス国シュベルツェンバッハ)。FcRnおよびIgG結合のAlphaLISA (登録商標) 検出は、IgGコーティングされたAlphaLISA (登録商標) 受容体ビーズを使用して、ストレプトアビジンコーティングされたドナービーズ上に捕捉されたビオチン化ヒトFcRnと相互作用する。参照IgGがFcRnに結合すると、ドナーおよび受容体ビーズが近接し、受容体ビーズ内のエネルギー移動反応のカスケードを引き起こす一重項酸素の移動を可能にし、615 nmでの発光の鋭いピークをもたらす。AlphaLISA (登録商標) 混合物への遊離IgG抗体の添加は、FcRnの参照抗体への結合に対する競合を生じさせ、シグナルの消失をもたらす。

30

【0352】

簡潔には、試験分子を、5 μMから出発して64 pMまで連続希釈で測定し、pH6のMES緩衝剤中の800 nMの組換えビオチン化ヒトFcRnと、40 μg / mlのヒトIgGコンジュゲートされた受容体ビーズと、40 μg / mlのストレプトアビジンコーティングされたドナービーズとからなるAlphaLISA (登録商標) 反応混合物とインキュベートした。23℃、暗所で90分後、AlphaLISA (登録商標) シグナルを、Perkin Elmer社からのEnSpireプレートリーダー (680 nmで励起、615 nmで発光) (スイス国シュベルツェンバッハ) で測定した。

40

【0353】

図5は、pH6でヒト新生児型Fc受容体 (FcRn) に結合する修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を説明するプロットを示し、この図は、平均AlphaLISA (登録商標) FcRn-IgGシグナルをy軸上に示

50

し、修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の投薬量をx軸上に示す。この図において試験されたコンジュゲートされていない参照抗体およびコンジュゲートされた抗体は、それぞれ、ペムプロリズマブ、LZM-009と、組成物A、D、E、H、J、Kとである。

【0354】

【表13】

表11：alphaLISAによって測定した、pH6でのイムノサイトカインとヒトFcRn受容体との相互作用のKD値

組成物	抗体	IL-2ポリペプチド	DAR	コンジュゲーション部位	KD (nM)
ー	ペムプロリズマブ	ー	0	ー	7.31
A	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K248	26.31
B	ペムプロリズマブ	組成物AB	1.5	K248	27.80
C	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K248	85.80
D	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K288	18.56
E	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K288	48.04
F	ペムプロリズマブ	組成物AC	1	K248	NT
G	ペムプロリズマブ	組成物AC	2	K248	NT
	LZM-009	ー	0	ー	15.27
H	LZM-009	組成物AB	1	K248	25.27
I	LZM-009	組成物AB	2	K248	NT
J	LZM-009	組成物AB	1	K288	10.69
K	LZM-009	組成物AB	1.9	K288	27.11

NT：試験せず

【0355】

実施例3：ヒトFcγR結合アッセイ（図6）

修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体と、ヒトFcγR受容体I（FcγRI/CD64）、ヒトFcγR受容体IIa（FcγRIIa/CD32a）、阻害性ヒトFcγR受容体IIb（FcγRIIb/CD32b）およびヒトFcγR受容体III（FcγRIIIa/CD16）との相互作用をELISAによって測定した。簡潔には、Corning社製高結合性ハーフエリアプレート（Fisher Scientific社、スイス国ライナハ）を、25μlの修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体でPBS中2.5μg/mlにおいて4℃で一晩コーティングした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02% Tween 20で4回洗浄した。プレート表面を25μlのPBS-0.02% Tween 20-1% BSAにより37℃で1時間ブロッキングした。次いで、プレートを100μlのPBS-0.02% Tween 20で4回洗浄した。次いで、25マイクロリットルの組換えヒトFcγRI/CD64タンパク質（R&D systems社、1257-Fc-050、CF）、組換えヒトFcγRIIa/CD32a（H167）タンパク質（R&D systems社、9595-CD-050、CF）、組換えヒトFcγRIIb/CD32b Aviタグタンパク質（R&D systems社

、A V I 1 8 7 5 - 0 5 0、C F)、または組換えヒト F c ガンマ R I I I A / C D 1 6 a タンパク質 (R & D s y s t e m s 社、4 3 2 5 - F C - 0 5 0 ; C F) のいずれかを、1 0 0 0 n M ~ 0 . 0 0 1 n M の範囲の 5 倍連続希釈で P B S - 0 . 0 2 % T w e e n 2 0 - 0 . 1 % B S A 中に添加し、3 7 ° C で 2 時間インキュベートした。次いで、プレートを 1 0 0 μ l の P B S - 0 . 0 2 % T w e e n 2 0 で 4 回洗浄した。P B S - 0 . 0 2 % T w e e n 2 0 - 0 . 1 % B S A 中に 1 : 5 0 0 に希釈した 2 5 マイクロリットルのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (# R A B H R P 3、メルク社、スイス国ブフス) を各ウェルに添加し、室温で 3 0 分間インキュベートした。次いで、プレートを 1 0 0 μ l の P B S - 0 . 0 2 % T w e e n 2 0 で 4 回洗浄した。5 0 マイクロリットルの T M B 基質試薬 (カタログ番号 0 7、M e r c k 社、スイス国ブフス) を各ウェルに添加し、3 7 ° C で 5 分間インキュベートした。3 7 ° C で 5 分後、5 0 μ l / ウェルの 0 . 5 M H 2 S O 4 停止溶液を添加することによって、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応を停止した。次いで、E L I S A シグナルを、P e r k i n E l m e r 社からの E n S p i r e プレートリーダー (スイス国シュベルツェンバッハ) で 4 5 0 n m で測定した。暗所、2 3 ° C で 9 0 分後、

10

【0356】

【表14】

表 1 2 : E L I S A によって測定したイムノサイトカインとヒト F c γ 受容体との相互作用の K D 値

20

組成物	抗体	I L - 2 ポリペプチド	D A R	コンジュゲーション部位	F c γ R I C D 6 4 (n M)	F c γ R I I a C D 3 2 a (n M)	F c γ R I I b C D 3 2 b (n M)	F c γ R I I I a C D 1 6 (n M)
	ベムプロリズマブ	—	0	—	0 . 4 8 8	1 6 0 . 2	2 0 9 . 3	2 8 9
A	ベムプロリズマブ	組成物 A B	1	K 2 4 8	1 . 2 6 5	3 1 3 . 7	7 4 4 . 5	3 3 9 . 5
B	ベムプロリズマブ	組成物 A B	1 . 5	K 2 4 8	N T	N T	N T	N T
C	ベムプロリズマブ	組成物 A B	2	K 2 4 8	1 8 . 5 7	3 1 4 . 2	7 8 0 . 2	3 9 0
D	ベムプロリズマブ	組成物 A B	1	K 2 8 8	1 . 2 6 1	4 8 8 . 9	2 0 8 2 . 3	6 0 9 . 0 5
E	ベムプロリズマブ	組成物 A B	2	K 2 8 8	6 . 1 2 8	7 6 7 . 9	5 0 8 4 . 6	1 0 5 5 . 5
F	ベムプロリズマブ	組成物 A C	1	K 2 4 8	N T	N T	N T	N T
G	ベムプロリズマブ	組成物 A C	2	K 2 4 8	N T	N T	N T	N T
	L Z M - 0 0 9	—	0	—	0 . 2 4 8	9 0 4 . 6	5 4 3 . 6	9 2 1 . 5
H	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	1	K 2 4 8	3 . 8 1	1 1 4 2	4 7 0 9	4 8 1 . 1
I	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	2	K 2 4 8	N T	N T	N T	N T
J	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	1	K 2 8 8	2 . 2 9 8	1 1 7 9	6 6 8 3	2 7 2 . 5
K	L Z M - 0 0 9	組成物 A B	1 . 9	K 2 8 8	1 1 . 9 9	1 8 7 3	3 3 4 1	5 4 0 7

30

40

N T : 試験せず

図 6 A は、ヒト F c ガンマ受容体 I (C D 6 4)、ヒト F c ガンマ受容体 I I a (C D 3 2 a)、ヒト F c ガンマ受容体 I I b (C D 3 2 b)、およびヒト F c ガンマ受容体 I

50

IIa (CD16) に結合する修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を説明するプロットを示す図であり、この図は、平均ELISAシグナルをy軸上に示し、修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の投薬量をx軸上に示す。コンジュゲートされていない参照抗体は、ペムブロリズマブ、LZM-009および組成物Aであり、この図において試験されたコンジュゲートされた抗体は、組成物C、DおよびHである。

図6Bは、ヒトFcガンマ受容体I (CD64)、ヒトFcガンマ受容体IIa (CD32a)、ヒトFcガンマ受容体IIb (CD32b)、およびヒトFcガンマ受容体IIa (CD16) に結合する修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の能力を説明するプロットを示す図であり、この図は、平均ELISAシグナルをy軸上に示し、修飾されていない抗PD1抗体およびコンジュゲートされた抗PD1抗体の投薬量をx軸上に示す。この図において試験されたコンジュゲートされた抗体は、組成物E、JおよびKである。

【0357】

実施例4：PD1陽性Mo7e細胞対PD1陰性Mo7e細胞におけるIL2誘導性pSTAT5活性化 (図7A～7B)

ヒトPD-1を安定に発現するヒトMo7e細胞株を樹立した。簡潔には、 250×10^5 個のMo7e細胞に、MOI (感染多重度) 4でヒトPD1遺伝子 (PDCD1 NM_005018; Origene社、カタログ番号: RC210364L3V) を担持するレンチウイルス粒子を形質導入した。完全培養培地 (RPMI、20% FBS、10 ng/ml GM-CSF) 中、 $5 \mu\text{g/ml}$ のポリブレンおよび10mMのHEPESの存在下、 37°C で90分間、1260gでスピンインフェクションを行った。形質導入の5日後、 $0.75 \mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンを添加してPD-1陽性細胞を選択した。PD-1の安定で均一な発現を表面染色によって確認した。

【0358】

PD-1陰性 (親非形質導入株) およびPD-1発現 (形質導入) Mo7e細胞に及ぼす様々なIL-2ポリペプチドの効果を決定するために実験を行った。細胞を100,000細胞/ウェルで分配し、 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ で40分間、949nMから10pMまでの出発濃度で、抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドの10倍連続希釈液で刺激した。インキュベーション後、細胞を、転写因子ホスホ緩衝剤キット (BD Biosciences社) を使用して固定し、透過処理し、その後、PD-1およびpSTAT5の表面免疫染色および細胞内免疫染色を行って、細胞の同定およびSTAT5 (シグナル伝達兼転写活性化因子5) リン酸化のレベルの測定を可能にした。FACS (蛍光活性化細胞選別) 測定は、Acea社からのQuanteonフローサイトメーターを用いて行った。

【0359】

図7Aは、親非形質導入Mo7e (PD1-) および安定に形質導入された (PD1+) Mo7e細胞上のPD-1/CD279の表面発現レベルを説明するプロットを示す。

【0360】

図7Bは、インビトロでのPD1陰性 (黒塗りの記号) およびPD1陽性 (灰色の白抜きの記号) Mo7e細胞に対するIL-2シグナル伝達経路の誘導に及ぼす、抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドの効果を説明するプロットを示し、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子5 (pSTAT5) にの平均EC₅₀値をy軸上に示し、修飾されたIL-2ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量をx軸上に示す。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、プロロイキンおよび組成物ABである。この図において試験されたイムノサイトカインは、対照としての組成物A、C、H、LおよびHer2標的化イムノサイトカイン組成物O (IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラストズマブ抗体) である。

10

20

30

40

50

【0361】

【表15】

表13：PD1⁻およびPD1⁺Mo7e細胞におけるSTAT5リン酸化アッセイのEC₅₀値

組成物	抗体	IL-2ポリペプチド	DAR	コンジュゲーション部位	EC ₅₀ PD1 ⁻ 細胞 (nM)	EC ₅₀ PD1 ⁺ 細胞 (nM)	PD1 ⁻ / PD1 ⁺ 比
プロロイキン	—		—	—	2.925	2.484	1.18
AB	—	組成物AB	—	—	1.03	1.582	0.65
AC	—	組成物AC	—	—	NT	NT	NT
A	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K248	3.437	0.002 ₄	1424
B	ペムプロリズマブ	組成物AB	1.5	K248	NT	NT	NT
C	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K248	3.589	0.001 ₁	3175
D	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K288	NT	NT	NT
E	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K288	NT	NT	NT
F	ペムプロリズマブ	組成物AC	1	K248	NT	NT	NT
G	ペムプロリズマブ	組成物AC	2	K248	NT	NT	NT
H	LZM-00 ₉	組成物AB	1	K248	1.722	0.003	581
I	LZM-00 ₉	組成物AB	2	K248	NT	NT	NT
J	LZM-00 ₉	組成物AB	1	K288	NT	NT	NT
K	LZM-00 ₉	組成物AB	1.9	K288	NT	NT	NT
O	トラスツマブ	組成物AB	1	K248	5.781	1.308	1.62

NT＝試験せず

【0362】

実施例5：初代T細胞におけるIL2誘導性pStat5活性化（図8～10）

ヒトT細胞集団に及ぼす様々なIL-2ポリペプチドの効果を決定するために実験を行った。初代pan⁺T細胞（CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびTreg）を、ficoll勾配遠心分離を使用する末梢血単核細胞（PBMC）精製、続いて磁気ビーズを用いたネガティブ単離、その後、使用するまで凍結保存によって、健常ドナーのバフィーコートから得た。Pan⁺T細胞を解凍し、それらをT細胞培地（RPMI10%FCF、1%グルタミン、1%NEAA、25μMβMeOH、1%NaPyrodate）中で一晚回復させ、PBSによる2回の洗浄ステップの後、細胞をPBSに再懸濁した。必要があれば、細胞を100nMのコンジュゲートされていない抗PD1抗体ペムプロリズマブと37℃で20分間プレインキュベートする。次いで、細胞を200,000細胞／ウェルで分配し、37℃／5%CO₂で40分間、316nMから3pMまでの出発濃度で、抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドの3.16倍連続希釈液で刺激した。インキュベーション後、細胞を、転写因子ホスホ緩衝剤キットを使用して

固定し、透過処理し、その後、CD4、CD8、CD25、FoxP3、CD45RAおよびpSTAT5の表面免疫染色および細胞内免疫染色を行って、細胞サブセットの同定およびStat5（シグナル伝達兼転写活性化因子5）リン酸化のレベルの測定を可能にした。FACS（蛍光活性化細胞選別）測定は、Acea社からのNovoCytまたはQuanteonフローサイトメーターのいずれかを用いて行った。

【0363】

以下のT細胞サブセットのpStat5 MFI（中程度の蛍光強度）シグナルを、野生型または修飾されたIL-2ポリペプチドの濃度に対してプロットした。50%効果濃度（EC₅₀）を、GraphPad PRISMソフトウェアを使用して、可変勾配、4パラメーター解析に基づいて計算した。

【0364】

T細胞サブセット同定のためのゲーティング戦略

【0365】

【表16】

T-R e g	CD4+, CD25 ^{Hi} , FoxP3+
CD8 T e f f	CD8+
ナイーブCD8 T e f f	CD8+, CD45RA+
メモリーCD8 T e f f	CD8+, CD45RA-
CD4 c o n v	CD4+, FoxP3-

【0366】

【表17】

表14：初代ヒトT細胞におけるSTAT5リン酸化アッセイのEC₅₀値

組成物	抗体	IL-2ポリペプチド	DAR	コンジュゲーション部位	EC ₅₀ Treg (nM)	EC ₅₀ CD8 (nM)	CD8/ Treg 比
プロロイキン	—		—	—	0.024	9.526	397
AB	—	組成物AB	—	—	0.385	0.818	2.1
AC	—	組成物AC	—	—	0.386	0.941	2.4
A	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K248	0.411	2.287	5.6
B	ペムプロリズマブ	組成物AB	1.5	K248	0.228	1.013	4.4
C	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K248	0.154	0.833	5.4
D	ペムプロリズマブ	組成物AB	1	K288	0.081	0.996	12.3
E	ペムプロリズマブ	組成物AB	2	K288	NT	NT	NT
F	ペムプロリズマブ	組成物AC	1	K248	7.775	10.72	1.8
G	ペムプロリズマブ	組成物AC	2	K248	0.229	2.211	9.7
H	LZM-009	組成物AB	1	K248	0.098	0.864	8.8
I	LZM-009	組成物AB	2	K248	NT	NT	NT
J	LZM-009	組成物AB	1	K288	NT	NT	NT
K	LZM-009	組成物AB	1.9	K288	NT	NT	NT

【0367】

図8は、ヒトT細胞のインビトロサンプルにおける T_{eff} および T_{reg} 細胞の誘導に及ぼす抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドの効果を説明するプロットを示し、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子5 (pSTAT5) の平均蛍光強度をy軸上に示し、修飾されたIL-2ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量をx軸上に示す。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、組成物AAである。この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物A、B、およびCである。

【0368】

図9Aは、健常ドナーの末梢血から新たに単離された静止期メモリー (CD45RA-) およびナイーブ (CD45RA+) CD8+ T_{eff} 細胞上のPD-1 / CD279の表面発現レベルを説明するプロットを示す。

【0369】

図9Bは、ヒトT細胞のインビトロサンプルにおける静止期メモリー (CD45RA-) およびナイーブ (CD45RA+) CD8+ T_{eff} 細胞の誘導に及ぼす抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドの効果を説明するプロットを示し、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子5 (pSTAT5) の平均蛍光強度をy軸上に示し、修飾されたIL-2ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量をx軸上に示す。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、組成物AAであり、この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物Bおよび対照としてのイムノサイトカイン組成物N (IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラストズマブ抗体) である。

【0370】

図10Aは、過剰量のコンジュゲートされていない抗PD1抗体ペムブロリズマブの存在下または非存在下でヒトT細胞のインビトロサンプルにおける静止期ナイーブ (CD45RA+) CD8+ T_{eff} 細胞の誘導に及ぼす抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図であり、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子5 (pSTAT5) の平均蛍光強度をy軸上に示し、修飾されたIL-2ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量をx軸上に示す。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、組成物AAであり、この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物Bおよび対照としてのHer2標的化イムノサイトカイン組成物N (IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラストズマブ抗体) である。

【0371】

図10Bは、過剰量のコンジュゲートされていない抗PD1抗体ペムブロリズマブの存在下または非存在下でヒトT細胞のインビトロサンプルにおける静止期メモリー (CD45RA-) CD8+ T_{eff} 細胞の誘導に及ぼす抗PD1抗体にコンジュゲートされていない修飾されたIL-2ポリペプチドおよびコンジュゲートされた修飾されたIL-2ポリペプチドの効果を測定するプロットを示す図であり、この図は、リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子5 (pSTAT5) の平均蛍光強度をy軸上に示し、修飾されたIL-2ポリペプチドおよびイムノサイトカインの投薬量をx軸上に示す。この図において試験された修飾されたIL-2ポリペプチドは、組成物AAであり、この図において試験されたイムノサイトカインは、組成物Bおよび対照としてのHer2標的化イムノサイトカイン組成物N (IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラストズマブ抗体) である。

【0372】

実施例6：腫瘍担持マウスにおけるPK / PD研究 (図11～13)

10

20

30

40

50

インビボPK/PD研究をマウスにおいて行った。ナীবな6~8週齡のBALB/c-hPD1雌性マウス(GemPharmatech Co. Ltd社、中国南京)に、腫瘍發生のために0.1mLのPBS中の野生型CT26腫瘍細胞(3×10^5)を左脇腹に皮下接種した。動物をランダム化し(腫瘍体積に基づいて層別化ランダム化を行うExcelベースのランダム化ソフトウェアを使用)、平均腫瘍体積が約 186 mm^3 に達したときに処置を開始した。組成物Aで処置した動物に、修飾されたIL-2ポリペプチドとコンジュゲートされた1、および2.5mg/kgのPD-1抗体を10mL/kg単回ボラス静脈内(i.v.)注射した。対照Her2標的化免疫サイトカイン組成物O(IL-2ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体)で処置した動物に、修飾されたIL-2ポリペプチドとコンジュゲートされた2.5mg/kgの抗Her2抗体の単回10mL/kgボラス静脈内(i.v.)注射を行った。接種後、罹患率および死亡率について動物を毎日チェックした。その時点で、動物を、腫瘍成長ならびに正常な挙動、例えば運動性、食物および水の消費、体重増加/減少(体重を週に2回測定した)、目/毛の艶消しに及ぼす影響ならびに他の任意の異常な影響についてチェックした。腫瘍サイズを、ノギスを使用して二次元的に週3回測定し、体積は、式 $V = 0.5a \times b^2$ を使用して mm^3 で表し、式中、aおよびbは、それぞれ腫瘍の長径および短径である。各サブセット内の動物の数に基づいて、死亡および観察された臨床徴候を記録した。

10

【0373】

薬物動態研究は、9つの時点(5分、1時間、6時間、12時間、24時間、72時間、96時間、120時間、168時間)を含み、各時点につき3匹のマウスをサンプリングした。指示された時点で、尾静脈サンプリングまたは心臓穿刺(エンドポイント)のいずれかを介してEDTAの存在下で血液サンプルを採取した。さらに、注射の72時間後、96時間後、120時間後、168時間後、各群3匹のマウスを殺し、腫瘍サンプルを採取した。

20

【0374】

各マウスからの新鮮な腫瘍サンプルを個々に切り刻み、Cチューブ中の混合酵素で消化した。プログラム「m__imptumor__01__01」を1回実行する前に、GentleMACSDissociatorのスリーブ上にCチューブを取り付けた。次いで、Cチューブを37℃で30分間インキュベートし、その後、別のラウンドのプログラム「m__imptumor__01__01」を行った。消化した組織を70μmセルストレーナーで濾過した。細胞をDPBSで2回洗浄した後、染色した。

30

【0375】

EDTAの存在下で採取したマウス血液を直ちに4,000rpmで5分間、4℃で遠心分離した。採取した血漿(上清)をバイオアナリシスまで-80℃で保存した。次いで、1体積の細胞ペレットを20体積の1×赤血球溶解液と混合した。次いで、3分間インキュベートし、遠心分離した。血液が十分に溶解しなかった場合、血液を再び2mLの1×赤血球溶解液に懸濁し、3分間インキュベートする。

【0376】

細胞をDPBSで2回洗浄した。試験ごとに100μLの再懸濁細胞(1000万/mLの濃度)を96V孔プレートに播種した。遠心分離後、細胞を100μLのDPBSで懸濁した。BV510live/deadを添加し、暗所で4℃で30分間インキュベートした。細胞をDPBSで2回洗浄した。細胞外抗体のインキュベーション後、細胞を染色緩衝剤で2回洗浄し、固定し、30分間透過処理した。精製ラット抗マウスCD16/CD32を5分間のインキュベーションのために添加し、細胞を特異的細胞内抗体仕様に示される手順に従って染色した。次いで、細胞を2回洗浄し、200μLの染色緩衝剤で懸濁する。染色された細胞を、BDFortessaX20フローサイトメーターによって分析した。

40

【0377】

50

【表 18】

表 15：以下の抗体パネルを用いて染色を行った。

#	蛍光色素	抗体	供給元	カタログ番号	クローン
1	B U V 3 9 5	C D 8	B D	5 6 3 7 8 6	5 3 - 6 . 7
2	B U V 7 3 7	F 4 / 8 0	B D	7 4 9 2 8 3	T 4 5 - 2 3 4 2
3	B V 4 2 1	C D 6 2 L	B i o L e g e n d	1 0 4 4 3 6	M E L - 1 4
4	B V 5 1 0	生 / 死	I n v i t r o g e n	L 3 4 9 5 7	-
5	B V 6 0 5	M H C I I	B i o L e g e n d	1 0 7 6 3 9	M 5 / 1 1 4 . 1 5 . 2
6	B V 7 8 5	m u P D - L 1	B i o L e g e n d	1 2 4 3 3 1	1 0 F . 9 G 2
7	B V 7 8 5	アイソタイプ	B i o L e g e n d	4 0 0 6 4 7	R T K 4 5 3 0
8	F I T C	C D 4 5	B D	5 5 3 0 8 0	3 0 - F 1 1
9	P e r C P - C y 5 . 5	C D 4 4	B D	5 6 0 5 7 0	I M 7
10	P E	C D 2 0 6	e B i o s c i e n c e	1 2 - 2 0 6 1 - 8 2	M R 6 F 3
11	P E - C F 5 9 4	C D 4 9 b	B D	5 6 2 4 5 3	D X 5
12	P E - C y 7	C D 4	B i o L e g e n d	1 0 0 4 2 2	G K 1 . 5
13	A P C	h P D - 1	B i o L e g e n d	6 2 1 6 1 0	A 1 7 1 8 8 B
14	A P C	アイソタイプ	B i o L e g e n d	4 0 0 3 2 2	M P C - 1 1
15	A F 7 0 0	C D 1 1 b	B D	5 5 7 9 6 0	M 1 / 7 0
16	A P C - C y 7	C D 3	B i o L e g e n d	1 0 0 2 2 2	1 7 A 2

【0378】

図 11A は、h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスにおける C T 2 6 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (平均 ± S E M)。

【0379】

図 11B は、処置 7 日後の h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスにおける C T 2 6 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明する棒グラフを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (平均 ± S E M ; ** - 一元配置 A N O V A P 値 < 0 . 0 0 1)。

【0380】

図 12A は、処置 7 日後の C T 2 6 腫瘍を有する h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスの血液および腫瘍におけるナイーブ (C D 6 2 L ^{h i g h} C D 4 4 ^{l o w}) C D 8 + T 細胞の拡大に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に 1 m g / k g および 2 . 5 m g / k g で単剤として試験された組成物 A である。対照 H e r 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (I L - 2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も 2 . 5 m g / k g で試験された (n = 3 ; 平均 ± S E M)。

【0381】

図 12B は、処置 7 日後の C T 2 6 腫瘍を有する h P D 1 ヒト化 B A L B / c マウスの血液および腫瘍におけるエフェクターメモリー (C D 6 2 L ^{陰性} C D 4 4 ^{h i g h}) C D 8 + T 細胞の拡大に及ぼす P D - 1 標的化および非標的化イムノサイトカインの効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回

注射スケジュール後に $1\text{ mg} / \text{kg}$ および $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で単剤として試験された組成物 A である。対照 Her 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (IL-2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で試験された ($n = 3$; 平均 $\pm$ SEM)。

【0382】

図 13 A は、イムノサイトカインの PD-1 標的化および非標的化が、CT26 腫瘍を有する hPD1 ヒト化 BALB/c マウスの血液および腫瘍におけるそれらの持続性に及ぼす効果を説明するプロットを示す図であり、この図は、PD-1 標的化イムノサイトカインおよび対照イムノサイトカインの血漿または腫瘍濃度を y 軸上に示し、時間を x 軸上に示す。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に $1\text{ mg} / \text{kg}$ および $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で単剤として試験された組成物 A である。対照 Her 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (IL-2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で試験された ($n = 3$; 平均 $\pm$ SD)。

【0383】

図 13 B は、イムノサイトカインの PD-1 標的化および非標的化が、CT26 腫瘍を有する hPD1 ヒト化 BALB/c マウスの血液と比較した腫瘍におけるそれらの持続性に及ぼす効果を説明するプロットを示す図であり、この図は、PD-1 標的化イムノサイトカインおよび対照イムノサイトカインの腫瘍/血漿濃度の比を y 軸上に示し、時間を x 軸上に示す。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回注射スケジュール後に $1\text{ mg} / \text{kg}$ および $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で単剤として試験された組成物 A である。対照 Her 2 標的イムノサイトカイン組成物 O (IL-2 ポリペプチドにコンジュゲートされたトラスツズマブ抗体) も $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ で試験された ($n = 3$; 平均 $\pm$ SEM)。

【0384】

実施例 7：有効性研究 (図 14 A ~ B)

インビボ有効性研究をマウスにおいて行った。ナイーブな 6 ~ 8 週齢の C57BL/6 - hPD1 雌性マウス (GemPharmatech Co., Ltd 社、中国南京) に、腫瘍発生のために 0.1 mL の PBS 中の MC38 腫瘍細胞 (3×10^5) を右脇腹上部に皮下接種した。動物をランダム化し (腫瘍体積に基づいて層別化ランダム化を行う Excel ベースのランダム化ソフトウェアを使用)、平均腫瘍体積が約 90 mm^3 に達したときに処置を開始した。組成物 H で処置した動物に、修飾された IL-2 ポリペプチドとコンジュゲートされた $1\text{ mg} / \text{kg}$ の PD-1 抗体を $10\text{ mL} / \text{kg}$ 単回ボラス静脈内 (i.v.) 注射した。接種後、罹患率および死亡率について動物を毎日チェックした。その時点で、動物を、腫瘍成長ならびに正常な挙動、例えば運動性、食物および水の消費、体重増加/減少 (体重を週に 2 回測定した)、目/毛の艶消しに及ぼす影響ならびに他の任意の異常な影響についてチェックした。主要評価項目は、腫瘍成長の遅延または完全な腫瘍退縮であった。腫瘍サイズを、ノギスを使用して二次元的に週 3 回測定し、体積は、式 $V = 0.5 a \times b^2$ を使用して mm^3 で表し、式中、a および b は、それぞれ腫瘍の長径および短径である。各サブセット内の動物の数に基づいて、死亡および観察された臨床徴候を記録した。

【0385】

図 14 A は、hPD1 C57BL/6 マウスにおける MC38 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼすコンジュゲートされた抗 PD1 抗体の単回注射の効果を説明するプロットを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、単回 i.v. 注射として $1\text{ mg} / \text{kg}$ で単剤として試験された組成物 H である ($n = 8$; 平均 $\pm$ SEM)。

【0386】

図 14 B は、処置 7 日後の hPD1 C57BL/6 マウスにおける MC38 同系結腸癌腫瘍の成長に及ぼすコンジュゲートされた抗 PD1 抗体の単回注射の効果を説明する棒グラフを示す図である。この図において試験されたイムノサイトカインは、 $1\text{ mg} / \text{kg}$ の単回 i.v. 注射で単剤として試験された組成物 H である ($n = 8$ 匹の動物; 平均 $\pm$ SEM; **一元配置 ANOVA P 値 < 0.005)。

【0387】

実施例8：組成物ABの合成

固相ペプチド合成（SPPS）を使用して合成した個々のペプチドをライゲートすることによって、残基F42Yに結合したアジド-PEG、Y45にPEG基を含有し、かつ配列番号3のアミノ酸配列を有する修飾されたIL-2ポリペプチド組成物ABを合成した。個々のペプチドを、下記に記載される方法を使用して、自動ペプチド合成装置で合成した。本明細書で提供される関連する修飾されたIL-2を、類似のプロトコルを使用して合成した。

【0388】

市販の試薬をSigma-Aldrich社、Acros社、Merck社またはTCI Europe社から購入し、さらに精製することなく使用した。固相ペプチド合成に適した側鎖保護基を有するFmocアミノ酸は、Novabiochem社、Christof Senn Laboratories AG社またはPeptART社から購入し、それらは供給されたまま使用した。ペプチド合成に使用したポリエチレングリコール誘導体は、Polypure社から購入した。Sigma Aldrich社からHPLCグレードCH₃CNを、分析および分取HPLC精製に使用した。

【0389】

ペプチドおよびタンパク質の高分解能質量スペクトル（FTMS）を、マトリックスとして4-ヒドロキシ- α -シアノケイ皮酸（HCCA）を使用して、二重ESI/MALDI-FTICR源を備えたBruker solarix（9.4Tマグネット）で測定した。CDスペクトルは、1.0mm経路長セルを備えたJasco J-715分光計で記録した。スペクトルは、標準感度（100mdeg）、0.5nmのデータピッチ、50nm/分の走査速度、1nmの帯域幅および5回のアキュムレーションで連続走査モードで25℃で採取した。

【0390】

ペプチドおよびタンパク質断片を逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって分析および精製した。ペプチド分析および反応モニタリングは、デュアルポンプ、ミキサーおよびインライン脱気装置、オートサンプラー、可変波長UV検出器（220nmおよび254nmでの溶離液の同時モニタリング）および100 μ lインジェクションループを備えたインジェクターを備えた分析用Jasco機器で行った。ペプチド断片の精製は、20mLインジェクションループを備えたGilson分取機器で行った。両方の場合において、移動相は、0.1%TFAを含むMilliQ-H₂O（緩衝剤A）および0.1%TFAを含むHPLCグレードCH₃CN（緩衝剤B）であった。分析HPLCは、bioZen（商標）インタクトC4カラム（3.6 μ m、150 $\times$ 4.6mm）またはShiseido Capcell Pak MG III（5 μ m、150 $\times$ 4.6mm）カラムを用いて流速1mL/分で行った。分取HPLCを、Shiseido Capcell Pak UG80 C18カラム（5 μ m、内径50mm $\times$ 250mm）を用いて40mL/分の流速で行った。

【0391】

ペプチドセグメントは、Fmoc SPPSケミストリーを使用して、Syro IまたはCS Bio 136Xペプチド合成装置を用いて合成した。側鎖保護基を有する以下のFmocアミノ酸を使用した：Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His(1-Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Nle-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH。Fmoc-シュードプロリンジペプチドを必要に応じて合成に組み込んだ。DMF中20%ピペ

リジンを用いてFmoc脱保護を行い（2×8分）、フィードバックループを用いて304nmのUVでモニタリングして完全なFmoc除去を確実にした。カップリングは、室温または50℃で、Fmoc-アミノ酸（樹脂置換に対して3.0～5.0当量）、カップリング試薬としてHCTUまたはHATU（2.9～4.9当量）およびDMF中のDIPEAまたはNMM（6～10当量）を用いて行った。3分間予備活性化した後、溶液を移し、アミノ酸に応じて30分間または2時間、樹脂上のペプチドと反応させた。いくつかの場合、二重カップリングが必要であった。カップリング後、未反応の遊離アミンをキャッピングするために、樹脂をDMF中20%無水酢酸で処理した。必要に応じてLIC洗浄を行った。アリルエステルの脱保護は、無水ジクロロメタン中のフェニルシラン（24当量）およびパラジウム（0）テトラキス（トリフェニルホスフィン）（0.5当量）を使用して行った。

10

【0392】

SPPSによるペプチドセグメントの合成を、微小切断および対応する樹脂の分析によってモニタリングした。95:2.5:2.5のTFA:DODT:H₂O（α-ケト酸樹脂上で合成されたα-ケト酸セグメント）または95:2.5:2.5のTFA:TIPS:H₂O（2-クロロトリチルポリスチレン樹脂上で合成されたペプチド）の混合物を2時間使用して、ペプチドを樹脂から切断した。樹脂を濾別し、濾液を蒸発させ、冷ジエチルエーテルで処理し、トリチュレートし、遠心分離した。エーテル層を慎重にデカントし、残渣をジエチルエーテルに再懸濁し、トリチュレートし、遠心分離した。エーテル洗浄を2回繰り返した。

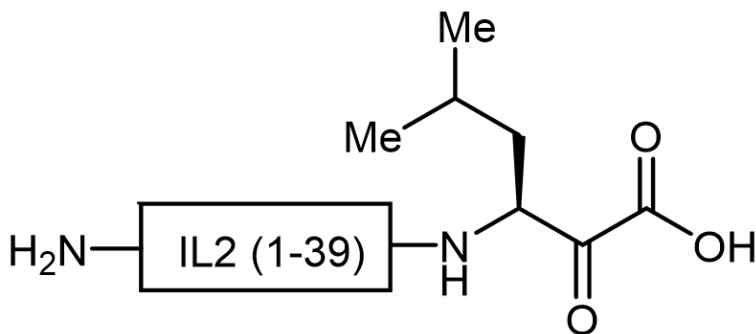
20

【0393】

1.1 IL-2の組成物ABバリエーションの合成
IL-2（1-39）-Leu-α-ケト酸の合成

【0394】

【化38】



30

セグメント 1

IL2（1-39）-Leu-α-ケト酸（配列番号3を参照）を、0.25mmol/gの置換容量を有する保護Fmoc-α-Leu-ケト酸をプリロードしたRinkアミド樹脂上で合成した。そうするために、Fmoc-RinkアミドMBHA樹脂（4g）をDMF中で15分間予備膨潤させ、Fmoc脱保護を行った。Fmoc-ロイシン-保護α-ケト酸（795mg、1mmol、1.00当量）をDMF40mLに溶解し、HATU（361mg、0.95mmol、0.95当量）およびDIPEA（348μL、2mmol、2.00当量）で予備活性化した。カップリングを室温で6時間進行させた。次いで、樹脂をキャップした後、Fmoc脱保護した。セグメントの合成は、一般的方法のセクションに記載される手順を使用して、自動Fmoc SPPSによってAla1まで0.250mmolスケールアップで行った。ペプチド合成の進行を、（95:2.5:2.5）TFA:DODT:H₂Oの混合物を1.5時間使用して微小切断および分析を行うことによってモニタリングした。HPLC分析を60℃でC18カラムを用いて行った。一般的方法に記載される手順に従って、95:2.5:2.5 TFA:

40

50

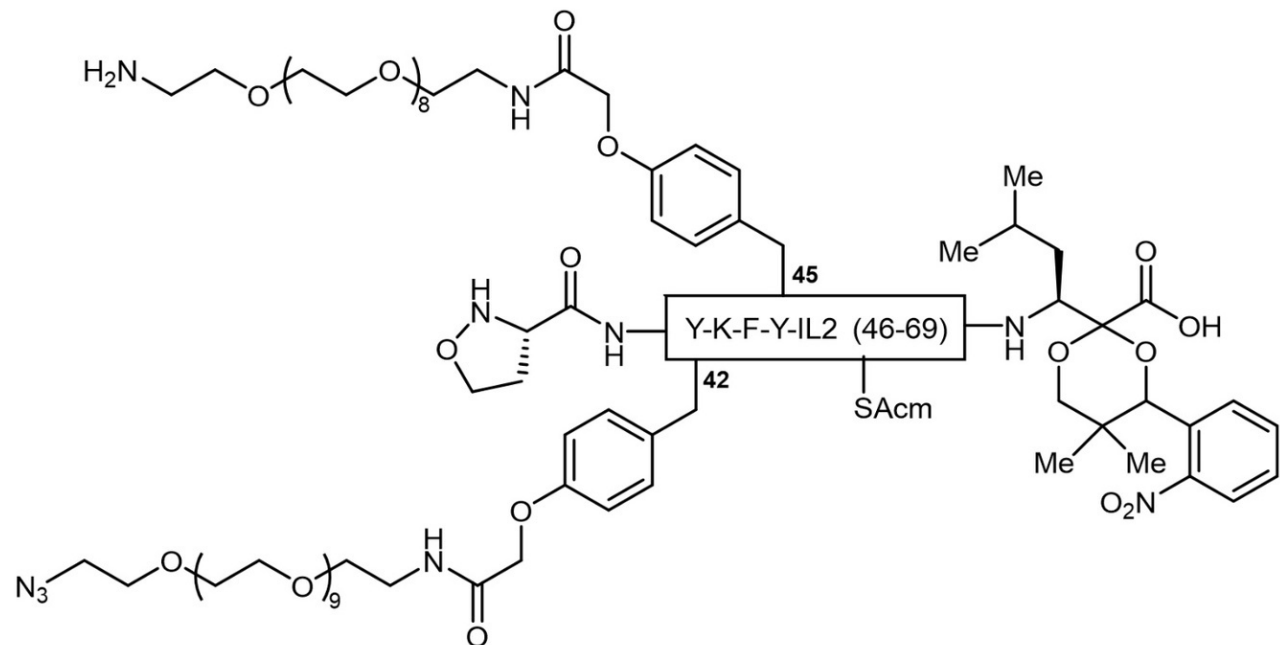
D O D T : H ₂ O (1 5 m L / g 樹脂) の混合物を使用して 2 時間、樹脂からペプチドを切断した。粗 I L 2 (1 - 3 9) の精製を、S h i s e i d o c a p c e l l p a k C 1 8 カラム (5 0 × 2 5 0 m m) を使用し、0 . 1 % T F A を含む 3 0 ~ 8 0 % の C H ₃ C N の勾配で 3 0 分間の分取 H P L C によって行った。純粋な生成物画分をプールし、凍結乾燥させて、6 5 0 m g の純粋な I L 2 (1 - 3 9) 1 - 3 9) - L e u - α - ケト酸を得た (ペプチド合成、樹脂切断および精製ステップについて収率 6 9 %) 。分析 H P L C および E S I - H R M S を使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。m / z c a l c u l a t e d f o r C ₂₀₄ H ₃₄₆ N ₅₆ O ₆₁ [M] : 4 5 5 6 . 5 6 9 4 ; m e a s u r e d : 4 5 5 6 . 5 7 8 3 .

【 0 3 9 5 】

組成物 A B の O p r - I L 2 (4 2 - 6 9) 光保護 L e u - α - ケト酸の合成

【 0 3 9 6 】

【 化 3 9 】



セグメント 2

O p r - I L 2 (4 2 - 6 9) (配列番号 3 を参照) 光保護 L e u - α - ケト酸セグメントを、0 . 2 5 m m o l / g の置換容量を有する F m o c - ロイシン - 光保護 α - ケト酸をプリロードした R i n k アミド M B H A 樹脂上で調製した。そうするために、4 g の F m o c - R i n k アミド M B H A 樹脂を D M F で 1 5 分間膨潤させ、F m o c 脱保護を行った。F m o c - ロイシン - 光保護 α - ケト酸 (7 9 5 m g 、 1 m m o l 、 1 . 0 0 当量) を D M F 4 0 m L に溶解し、H A T U (3 6 1 m g 、 0 . 9 5 m m o l 、 0 . 9 5 当量) および D I P E A (3 4 8 μ L 、 2 m m o l 、 2 . 0 0 当量) で予備活性化した。得られた反応物を室温で 6 時間攪拌した。次いで、樹脂をキャッピングし、その後、F m o c 脱保護した。セグメントの合成は、一般的方法のセクションに記載される手順を使用して、自動 F m o c S P P S によって 0 . 1 5 1 m m o l スケールで N l e 4 6 まで行った。C y s (A c m) - O H (樹脂に対して 1 0 当量) を、D I C (樹脂に対して 5 当量) を使用して室温で 2 時間、対称無水物法による C y s 5 8 のカップリングに使用した。予め形成されたアミノ酸 F m o c - T y r (A c 0 . 5 k D a P E G) - O H (3 当量) を、H A T U (2 . 9 当量) および D I P E A (6 当量) を使用した単一カップリングによって 4 5 位にカップリングした。P h e 4 4 および L y s 4 3 を自動 S P P S によってカップリングさせ、その後、F m o c T y r - アリルアセテートおよび B o c - 5 - (S) - オキサプロリンをそれぞれ 4 2 位および 4 1 位で手動カップリングさせた。アリル

エステル脱保護は、フェニルシラン（449 μ L、3.6 mmol、2.4当量）および Pd(PPh₃)₄（87 mg、0.075 mmol、0.5当量）を使用して、室温で30分間、確立された標準条件に従って行った。脱保護後、O-（2-アミノエチル）-O'-（2-アジドエチル）ノナエチレングリコール（237 mg、0.450 mmol、3当量）を50℃で1.5時間カップリングした。ペプチド合成の進行を、（95：2.5：2.5）TFA：DODT：H₂Oの混合物を1.5時間使用して微小切断および分析を行うことによってモニタリングした。HPLC分析を60℃でC18カラムを用いて行った。一般的な方法に記載される手順に従って、95：2.5：2.5 TFA：DODT：H₂O（15 mL/g 樹脂）の混合物を使用して2時間、樹脂からペプチドを切断した。冷エーテル：ペンタン混合物（1：1）を使用して、粗ペプチドを処理および洗浄した。粗IL2（42～69）の精製を、2段階勾配を用いたShiseido capcell pak C18カラム（50×250 mm）を使用した分取HPLCによって行った：最初に、5分で0.1% TFAを含むMQ-H₂O中10～30% CH₃CN、次いで30分で0.1% TFAを含むMQ-H₂O中30～60% CH₃CN。純粋な生成物画分をプールし、凍結乾燥させて、117.4 mgの純粋なIL2（42～69）を得た（ペプチド合成、樹脂切断および精製ステップについて収率16%）。分析HPLCおよびESI-HRMSを使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。m/z calculated for C₂₃₀H₃₇₆N₄₆O₇₄S [M]：4998.6794；measured 4998.6749。

10

20

【0397】

組成物ABのFmoc-Opr IL2（72-102）-Phe- α -ケト酸の合成

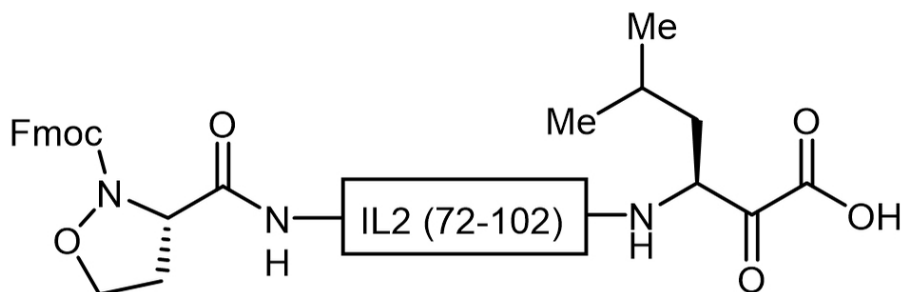
【0398】

【化40】

30

40

50



セグメント 3

Fmoc-Opr IL2（72-102）-フェニルアラニン- α -ケト酸を、約0.25 mmol/gの置換容量を有するFmoc-Phe-プロトン化 α -ケト酸をプリロードしたRinkアミドChemMatrix樹脂上で合成した。カップリング試薬としてHCTUを使用して、自動Fmoc SPPSによってAla73まで0.588 mmolスケールで合成を行った。残基72、Fmoc-Leuのカップリングは、カップリング試薬としてHATUを用いて行った。カップリングを45℃でさらに2回繰り返して、完全なカップリングを確実にした。HATU（樹脂に対して2.95当量）およびNMM（樹脂に対して6.00当量）を使用して室温で2時間、Fmoc-5-オキサプロリン（樹脂に対して3.00当量）を遊離アミンに手でカップリングさせた。ペプチド合成の進行を、（95：2.5：2.5）TFA：DODT：H₂Oの混合物を2時間使用して微小切断および分析を行うことによってモニタリングした。HPLC分析を60℃でC18カラムを用いて行った。95：2.5：2.5 TFA：DODT：H₂O（15 mL/g 樹脂）の混合物を2.0時間使用して、ペプチドを樹脂から切断した。粗セグメントの精製を、60℃で予熱したShiseido Capcell Pak C18カラム（50×250 mm）を使用し、30分で0.1% TFAを含む20～75%のCH₃CNの勾配で分取HPLCによって行った。純粋な生成物画分をプールし、凍結乾燥

させて、Fmoc-Opr-IL2 (72-102)-Phe- α -ケト酸を>98%の純度で得た（合成、切断および精製ステップに対して147.9mg、収率6%）。分析HPLCおよびESI-HRMSを使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。
 m/z calculated for $C_{184}H_{285}N_{47}O_{53}$ [M] : 4001.1051; measured 4001.1227。

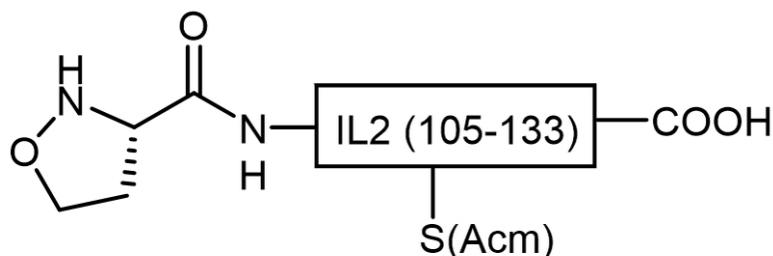
【0399】

Opr-IL2 (105-133) の合成

【0400】

【化41】

10



セグメント 4

Opr-IL2 (105~133) を、0.25mmol/g の置換容量を有する Fmoc-Thr-OH をプリロードした 2-クロロトリチル樹脂上で合成した。カップリング（ジイソプロピルエチルアミン、メタノール）後、自動 Fmoc SPPS によって Glu106 まで 0.34mmol スケール（樹脂 1.5g）で合成を行った。Cys(Acm)-OH（樹脂に対して 10 当量）を、DIC（樹脂に対して 5 当量）を使用して室温で 2 時間、対称無水物法による Cys105 のカップリングに使用した。次いで、Boc-5-オキサプロリン（樹脂に対して 2.00 当量）を、HATU（1.95 当量）および NMM（4 当量）を使用して遊離アミン樹脂（free amine on-resin）にカップリングした。ペプチド合成の進行を、(95:2.5:2.5) TFA: TIPS: H₂O の混合物を 1.5 時間使用して微小切断および分析を行うことによってモニタリングした。HPLC 分析を 60℃ で C18 カラムを用いて行った。95:2.5:2.5 TFA: TIPS: H₂O (15mL/g 樹脂) の混合物を 2.0 時間使用して、ペプチドを樹脂から切断した。粗 Opr-IL2 (105~133) の精製を、60℃ で予熱した Shiseido Capcell Pak C4 カラム (50×250mm) を使用し、10 分で 0.1% TFA を含む 10~65% の CH₃CN の勾配で、次いで 20 分で 0.1% TFA を含む 65~95% の CH₃CN の勾配で分取 HPLC によって行った。純粋な生成物画分をプールし、凍結乾燥させて、Opr-IL2 (105~133) を>98% の純度で得た（合成、切断および精製ステップに対して 108.5mg、収率 9%）。分析 HPLC および ESI-HRMS を使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。
 m/z calculated for $C_{158}H_{242}N_{37}O_{52}S$ [M+H] : 3521.7145; found 3521.7140。

20

30

40

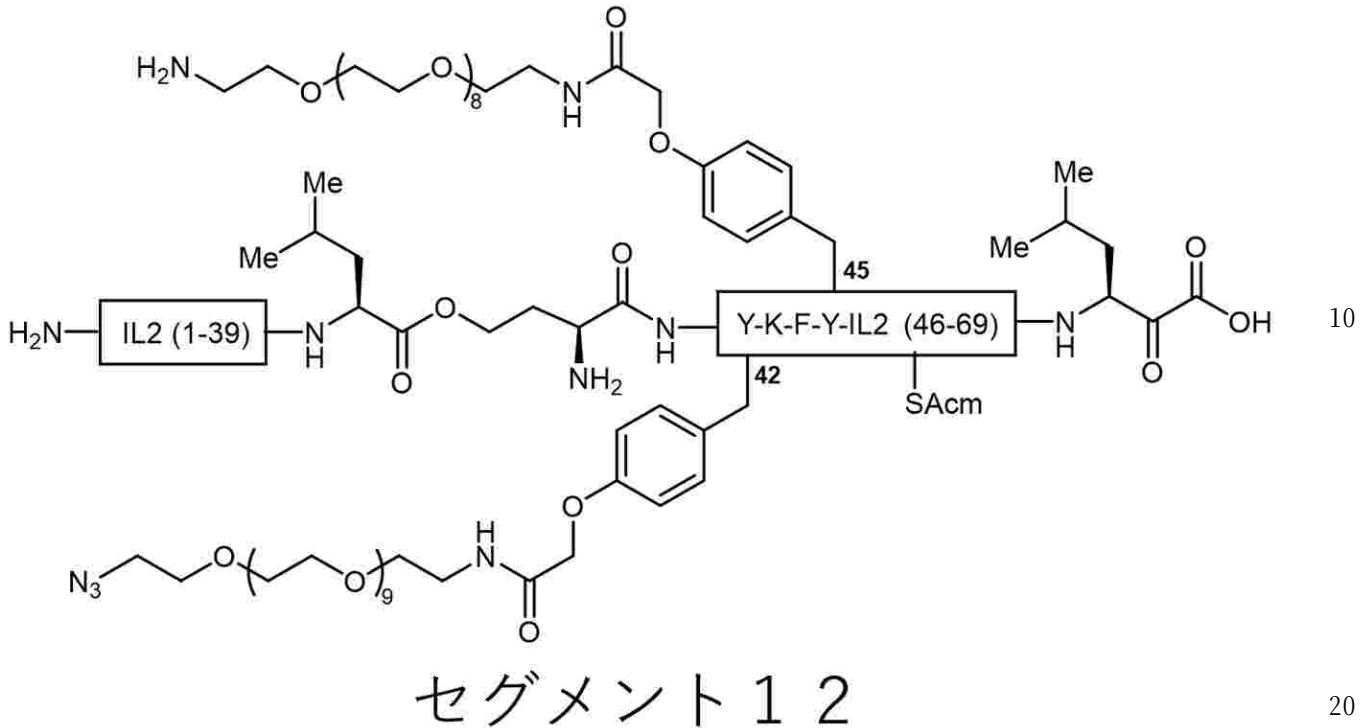
【0401】

KAHA ライゲーションによる組成物 AB の IL2-Seg12 の合成

【0402】

50

【化 4 2】



K A H Aライゲーション：S e g 1（44mg、9.6 μ mol、1.2当量）および S e g 2（40mg、8.0 μ mol、1当量）を、0.1Mシュウ酸（400 μ L、20mM）を含有するDMSO：H₂O（9：1）に溶解し、60℃で20時間反応させた。ライゲーションバイアルをアルミニウム箔に包むことによって光から保護した。K A H Aライゲーションの進行は、P h e n o m e n e x C18カラム（150×4.6mm）を使用して、移動相として0.1% T F Aを含有するC H₃ C N／H₂Oを用いて、7分で5～95%のC H₃ C Nの勾配で60℃でu H P L Cによってモニタリングした。

【0403】

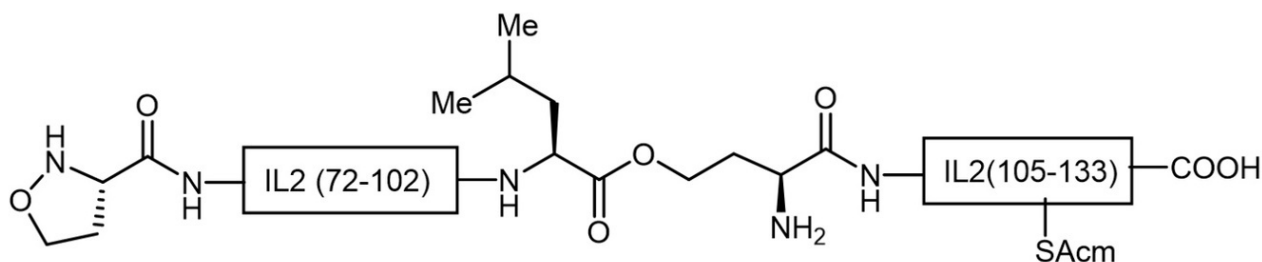
光脱保護および精製：ライゲーションの完了後、混合物を、0.1% T F Aを含有するC H₃ C N／H₂O（1：1）で約20倍（8mL）に希釈し、365nmの波長で1時間照射した。光分解反応の完了は、前述の方法を使用してu H P L Cにサンプルを注入することによって確認した。光脱保護されたサンプルを、S h i s e i d o C a p c e l l P a c k U G 8 0 C18カラム（50×250mm）を60℃に保ち、2段階勾配：水中のC H₃ C Nの二重勾配：0.1% T F A：5分で10～35%、次いで35分で35～65%、溶離液として0.1% T F Aを含有するC H₃ C NおよびM Q－H₂Oを用いて40mL／分の流量で、分取H P L Cによって精製した。生成物を含有する画分をプールし、凍結乾燥させて、純粋なS e g 12を得た（ライゲーションおよび精製ステップに対して25.4mg、収率40%）。m/z calculated for C₄₂₂H₇₀₉N₁₀₁O₁₃₀S [M]：9304.1694；measured 9304.1639。

【0404】

K A H Aライゲーションによる組成物A BのI L 2－S e g 3 4の調製のためのK A H Aライゲーション

【0405】

【化 4 3】



セグメント 3 4

10

ライゲーション：Seg 3（136 mg、34 μmol 、1.2当量）および Seg 4（100 mg、28.40 μmol 、1当量）を、0.1 M シュウ酸（1.8 mL、15 mM）を含有する DMSO/H₂O（9：1）に溶解し、60℃で16時間反応させた。K A H A ライゲーションの進行は、Phenomenex C18 カラム（150×4.56 mm）を使用して、移動相として0.1% TFA を含有する CH₃CN/H₂O を使用して、7分で30～70%の CH₃CN の勾配で60℃で uHPLC によってモニタリングした。

【0406】

Fmoc 脱保護および精製：ライゲーションの完了後、反応混合物を DMSO（6 mL）で希釈し、5%のジエチルアミン（300 μL ）を添加し、反応混合物を室温で7分間振盪した。精製用のサンプルを調製するために、それを TFA（300 μL ）を含有する DMSO（4 mL）で希釈した。

20

【0407】

サンプルを、60℃に保った Shiseido Capcell Pack UG80 C18 カラム（50×250 mm）で、35分で0.1% TFA を含む水中30～70%の CH₃CN の勾配を使用し、40 mL/分の流量で分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する画分をプールし、凍結乾燥させて、純粋な Seg 34（ライゲーションおよび精製後に43.4 mg、収率21%）を得た。分析 HPLC および ESI-HRMS を使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。m/z calculated for C₃₂₆H₅₁₆N₈₄O₁₀₁S [M]：7255.7545；measured：7255.7653。

30

【0408】

K A H A ライゲーションによる IL2 線状タンパク質組成物 A B の調製のための最終的な K A H A ライゲーション

ライゲーション：Seg 12（59.2 mg、6.35 μmol 、1.2当量）および Seg 34（38.5 mg、5.3 μmol 、1当量）を、0.1 M シュウ酸（423 μL 、15 mM）を含有する DMSO/H₂O（9：1）に溶解し、ライゲーションを60℃で24時間進行させた。K A H A ライゲーションの進行は、60℃で Shiseido Capcell Pak UG80 C18 カラム（250×4.6 mm）および移動相として0.1% TFA を含有する CH₃CN/H₂O を使用して、14分で30～95%の CH₃CN の勾配で分析 HPLC によってモニタリングした。

40

【0409】

精製：ライゲーションの完了後、反応混合物を150 μL の DMSO で希釈し、その後、0.1% TFA（7 mL）を含有する（1：1）CH₃CN：H₂O の混合物でさらに希釈した。サンプルを、60℃で予熱した Shiseido Capcell Pack UG80 C18 カラム（50×250 mm）を使用した分取 HPLC に注入することによって、2段階勾配：5分で10～40%および35分で40～80%、流速：溶離液として0.1% TFA を含有する CH₃CN および MQ-H₂O を用いて40 mL/分で精製した。生成物を含有する画分をプールし、凍結乾燥させて、Acm を有する純粋な組成

50

物 A B 線状タンパク質（ライゲーションおよび精製ステップに対して 42.3 mg、収率 48%）を得た。分析 HPLC および ESI-HRMS を使用して、生成物の純度および正確な質量を確認した。 m/z calculated for $C_{747}H_{1225}N_{185}O_{229}S_2$ [M] : 16515.9340 ; measured 16515.9008。

【0410】

Acm 脱保護：Acm を有するペプチド IL2 線状タンパク質（35.4 mg、2.14 μ mol）を AcOH/H₂O（1:1）（8.6 mL、0.25 mM）に溶解し、86 mg の AgOAc（1% m/v）を溶液に添加した。混合物を光から保護して 50℃ で 2.5 時間振盪した。HPLC によって確認される反応の完了後、サンプルを、0.1% TFA を含有する CH₃CN:H₂O（1:1）で希釈し、60℃ に保たれた Shiseido CapCell Pak UG80 C18 カラム（20×250 mm）を使用する分取 HPLC によって精製した。2 段階勾配：5 分で 10～40% および 30 分で 40～95%、流速：10 mL/分、溶離液として 0.1% TFA を含有する CH₃CN および MQ-H₂O を精製のために使用した生成物を含有する画分をプールし、凍結乾燥させて、純粋な IL2 線状タンパク質（脱保護および精製ステップに対して 26.1 mg、収率 74%）を得た。 m/z calculated for $C_{741}H_{1215}N_{183}O_{227}S_2$ [M] : 16373.8597 ; measured : 16373.8253。

10

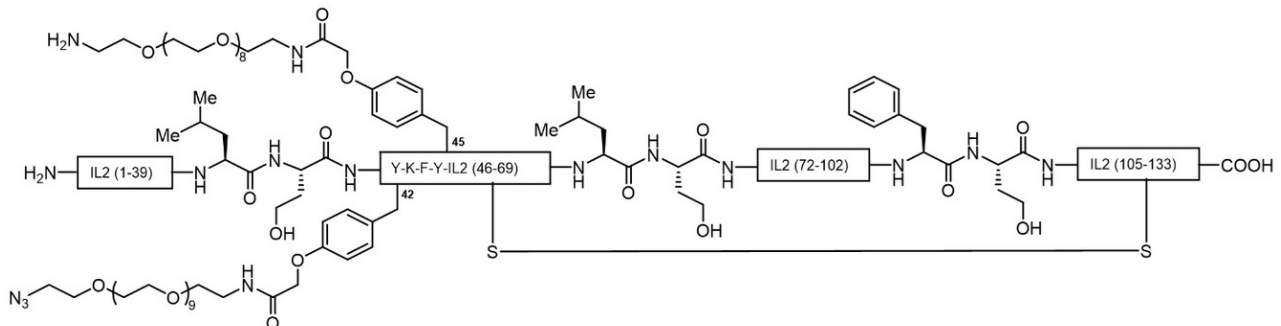
20

【0411】

折り畳まれた IL-2 組成物 A B の合成

【0412】

【化 44】



30

組成物 A B

線状タンパク質の再編成：線状タンパク質（20 mg、1.221 μ mol）を、0.1 M Tris および 30 mM 還元型グルタチオン（81 mL、15 μ M タンパク質濃度）を含有する 6 M Gu·HCl 水溶液に溶解し、これを 6 M 水性 HCl によって pH 8.0 に調整した。混合物を 50℃ で 2 時間穏やかに振盪し、25℃ で bioZen（商標）3.6 μ m インタクト C4 カラム（150×4.6 mm）を使用する分析逆相 HPLC によって、18 分で 0.1% TFA を含む MQ-H₂O 中 30～95% の CH₃CN の勾配で、流速：1.0 mL/分でモニタリングした。

40

【0413】

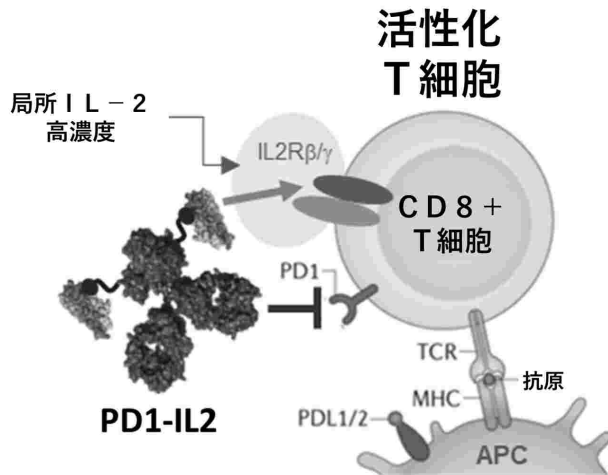
線状再構成タンパク質の折り畳み：前の溶液を室温に冷却し、0.1 M Tris および 1.5 mM 酸化グルタチオンを含有する第 2 の緩衝剤（240 mL）で pH 8.0 に 3 倍希釈した。混合物を室温で保存し、bioZen（商標）3.6 μ m インタクト C4 カラム（150×4.6 mm）を使用した分析 HPLC によって 25℃ で、18 分で 0.1% TFA を含む 30～95% のアセトニトリルの勾配で、流速：1.0 mL/分でモニタリングした。20 時間後、折り畳み溶液を 10% TFA 水溶液で約 pH 3 に酸性化し、Shiseido Proteonavi C4 カラム（20×250 mm）を使用して、0.1% TFA を含む 5～40～95% のアセトニトリルの 2 段階勾配で 60 分、流速：

50

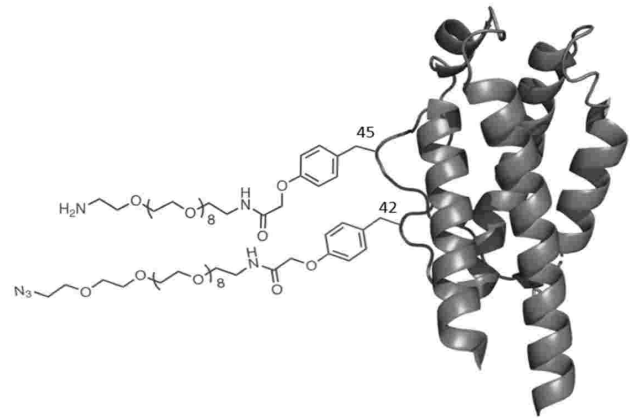
10.0 mL / 分で分取HPLCを用いて精製した。折り畳まれたIL2タンパク質を含有する画分を一緒にプールし、凍結乾燥した。純粋な折り畳まれたタンパク質(3.5 mg、収率18%)の純度および同一性を、分析RP-HPLCおよび高分解能ESI質量分析によってさらに確認した。 m/z calculated for $C_{741}H_{1213}N_{183}O_{227}S_2$ [M]: 16371.8441; measured: 16371.8107で、組成物ABの合成の成功を確認した。

【図面】

【図1A】



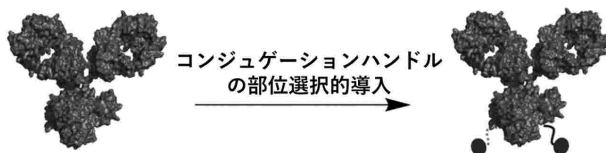
【図1B】



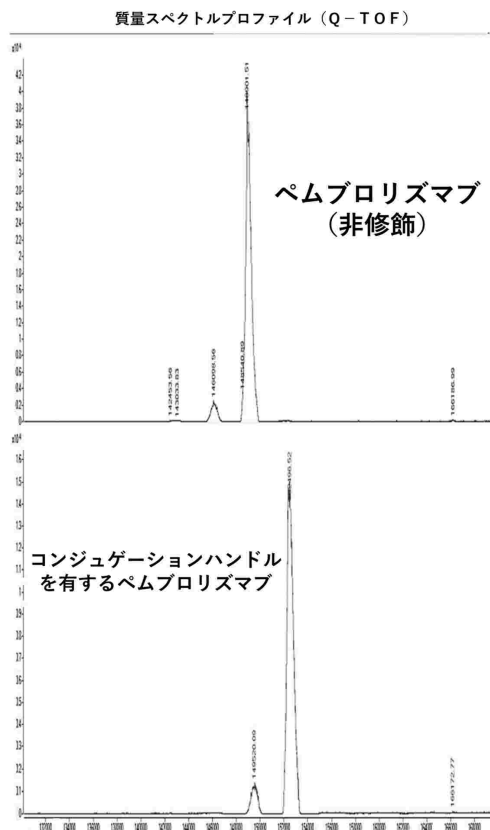
10

20

【図2A】



【図2B】



30

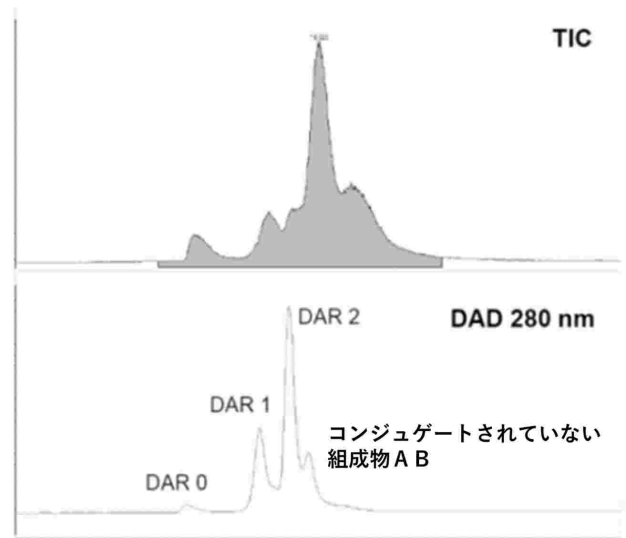
40

50

【図 2 C】

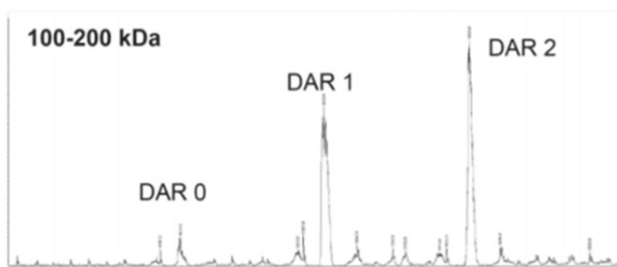


【図 2 D】

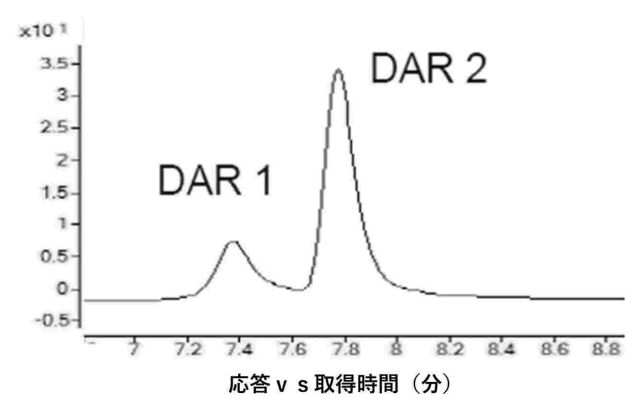


10

【図 2 E】



【図 2 F】



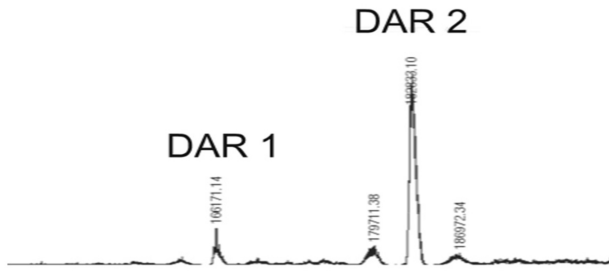
20

30

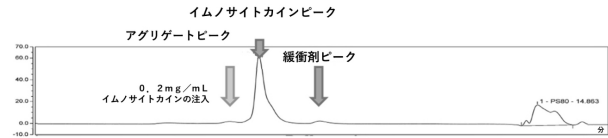
40

50

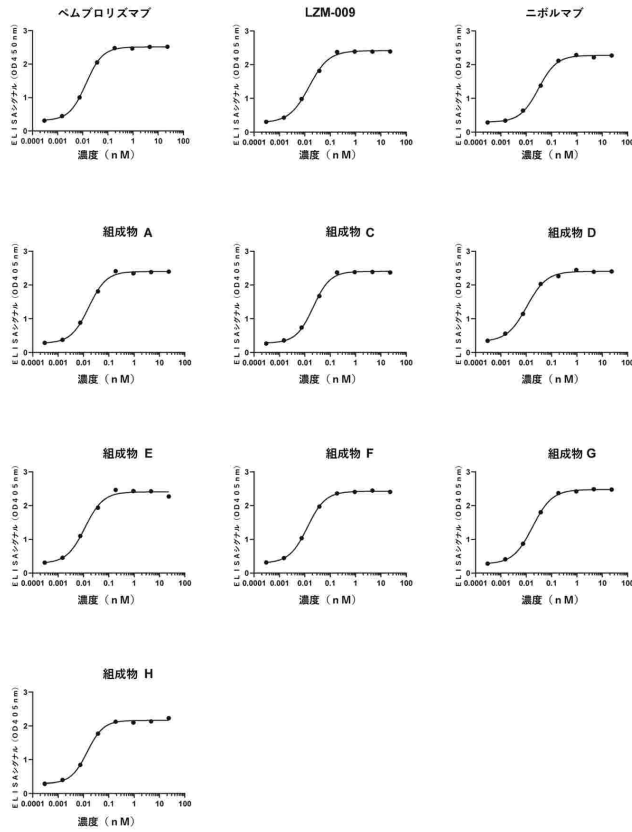
【図 2 G】



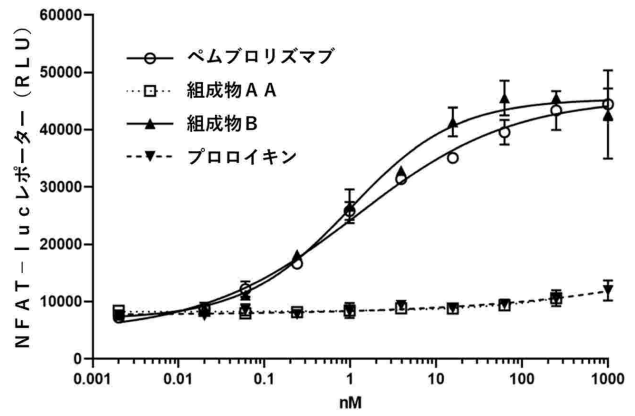
【図 2 H】



【図 3】



【図 4】



10

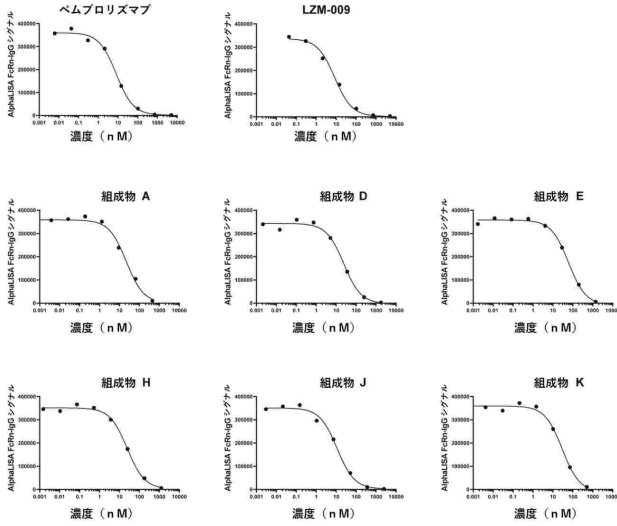
20

30

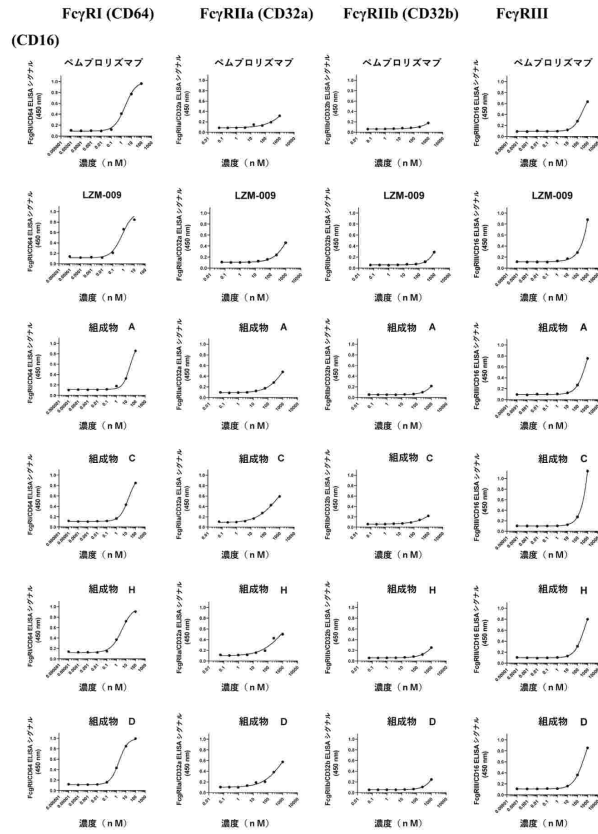
40

50

【図 5】



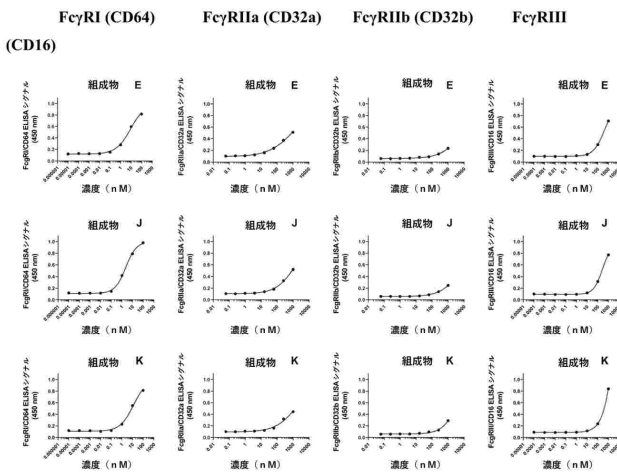
【図 6 A】



10

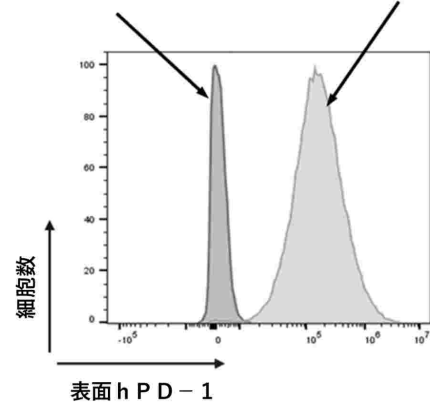
20

【図 6 B】



【図 7 A】

親 PD 1-Mo 7 e 細胞株 安定な PD 1+Mo 7 e 細胞株

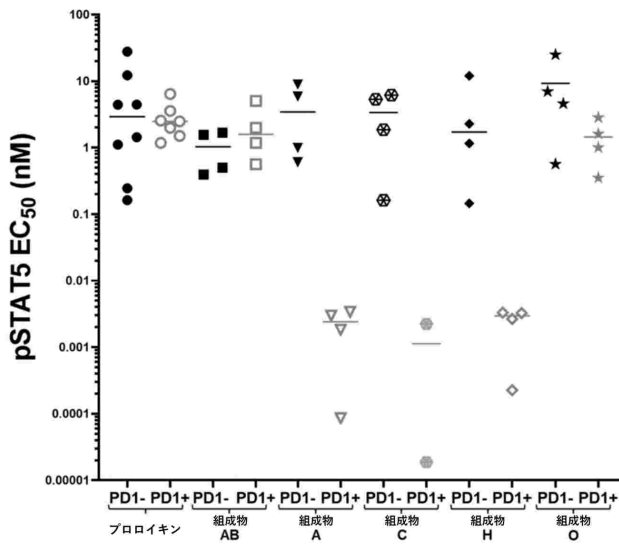


30

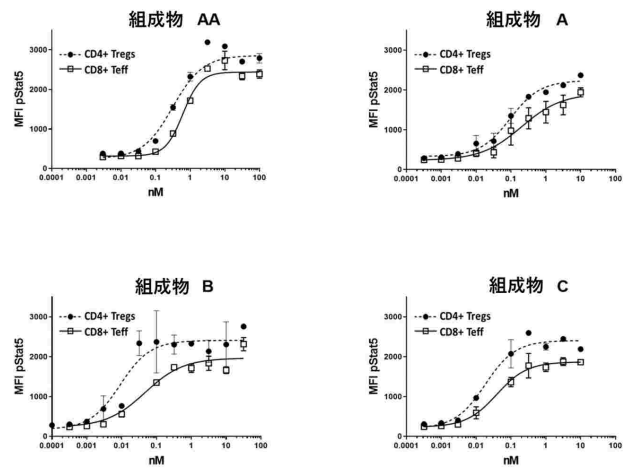
40

50

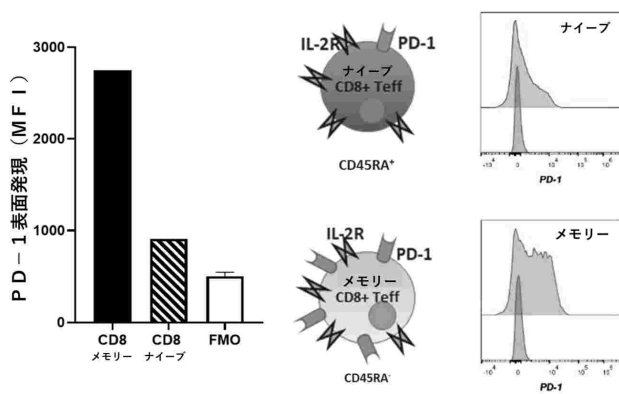
【図 7 B】



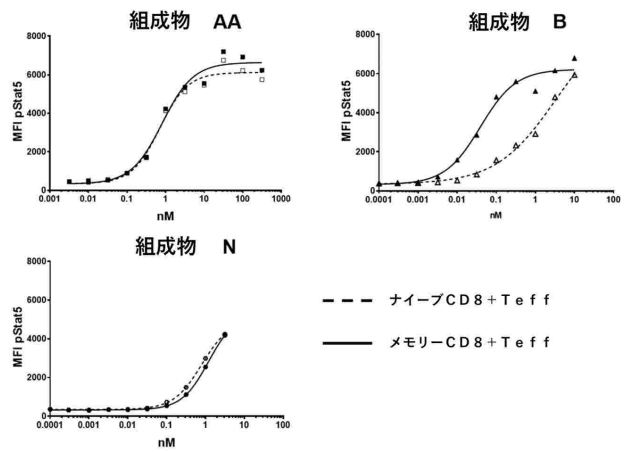
【図 8】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

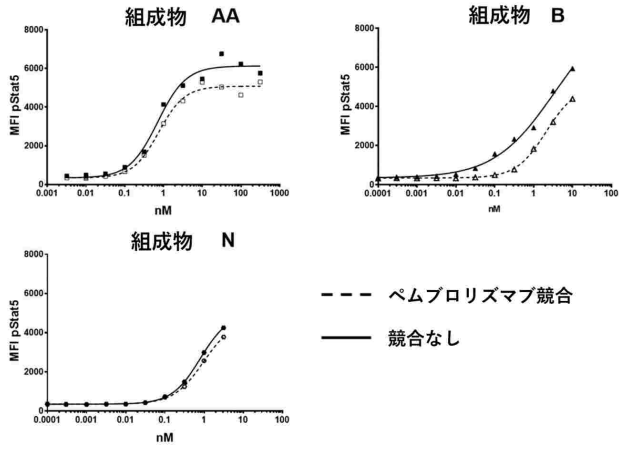
20

30

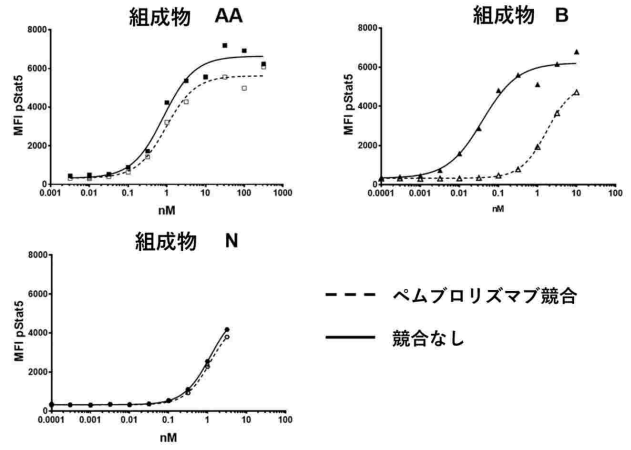
40

50

【図 10 A】

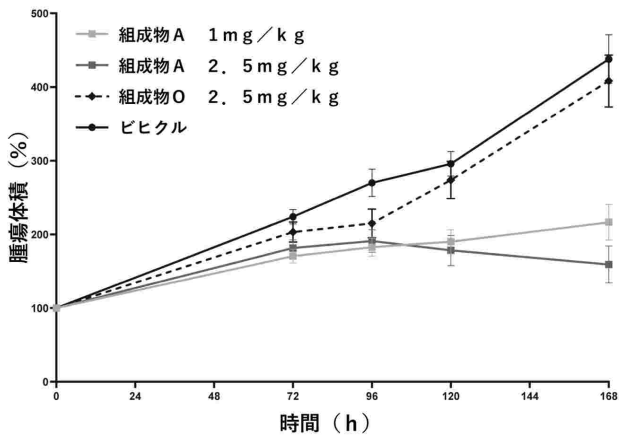


【図 10 B】

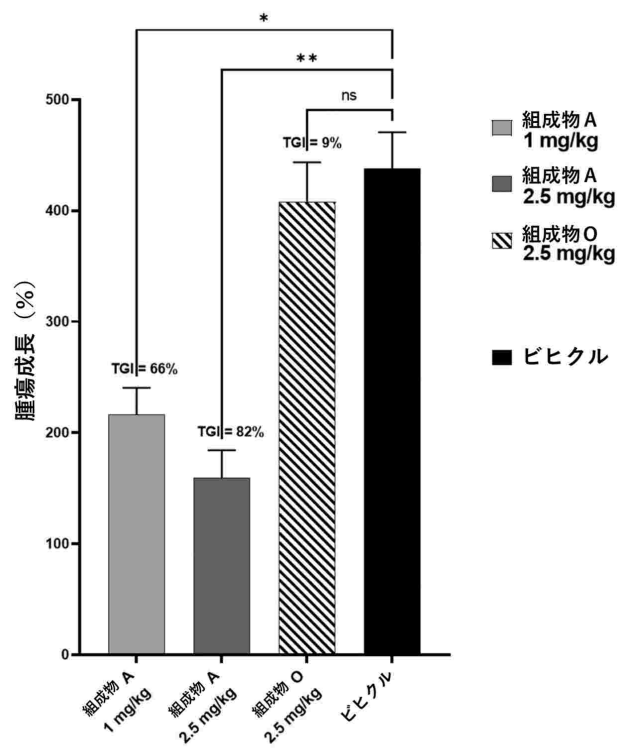


10

【図 11 A】



【図 11 B】



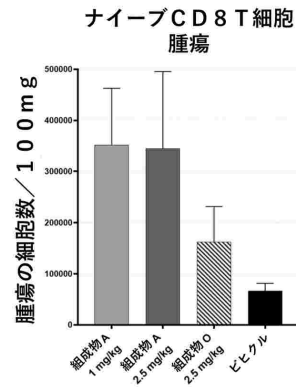
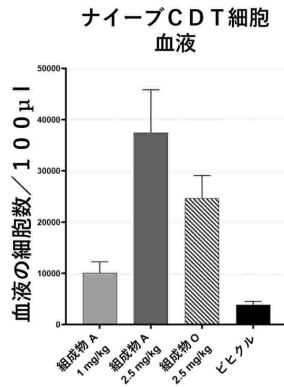
20

30

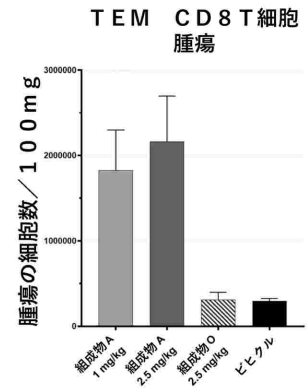
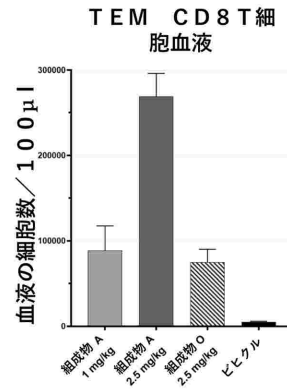
40

50

【図 1 2 A】

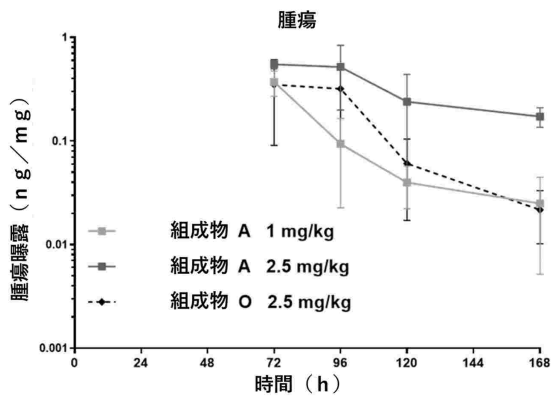
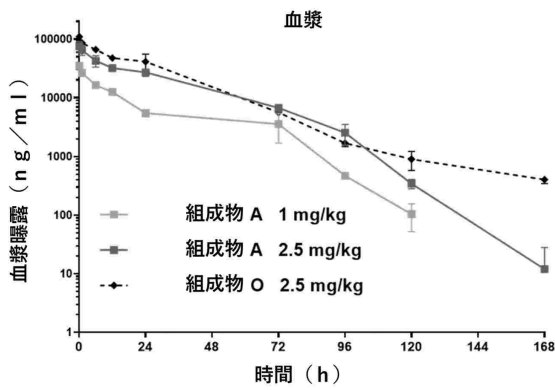


【図 1 2 B】

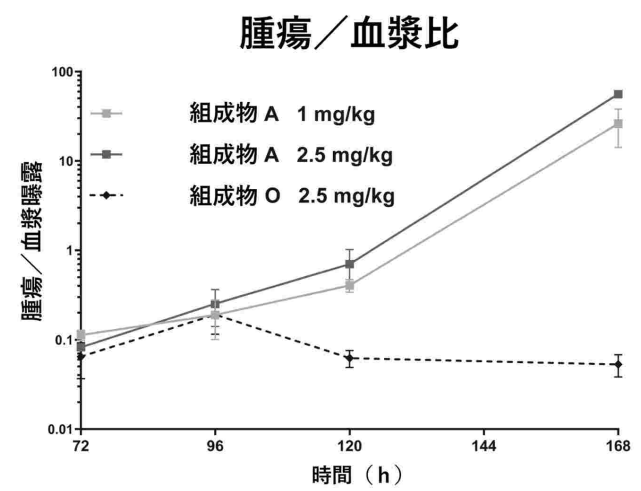


10

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



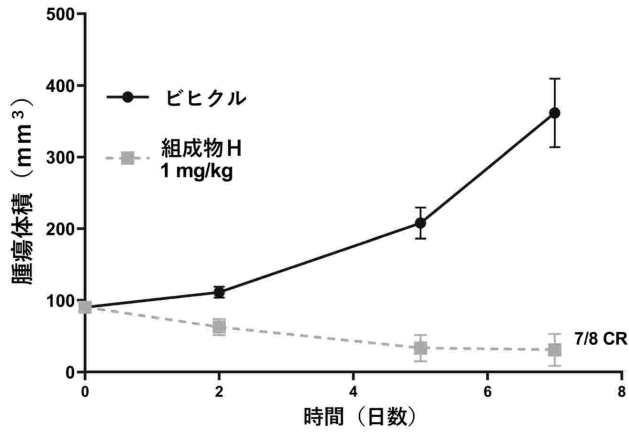
20

30

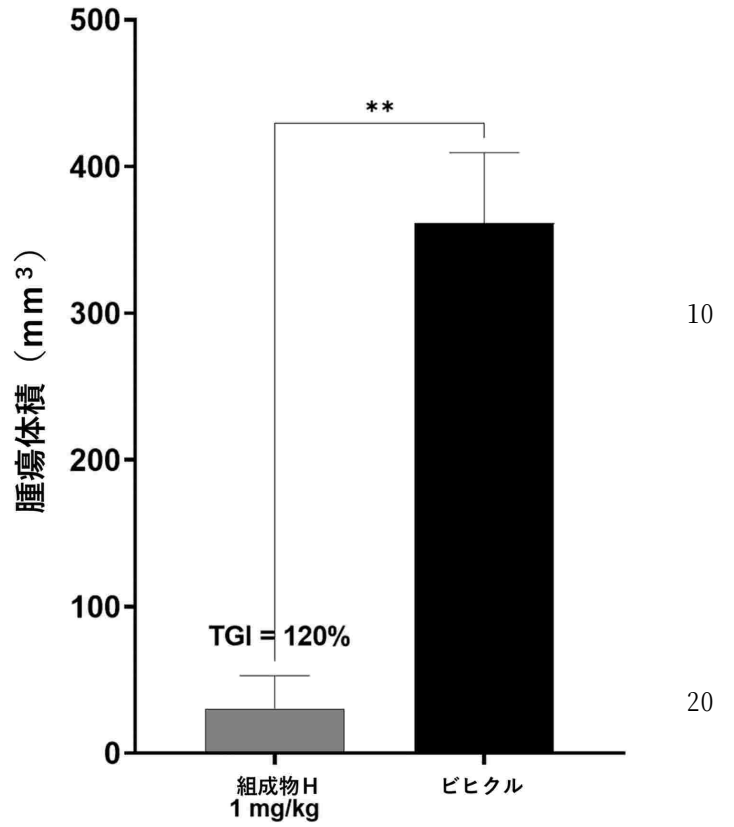
40

50

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【配列表】

2024526298000001.xml

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/056361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTIAN KLEIN ET AL: "Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 6, no. 3, 11 January 2017 (2017-01-11), page e1277306, XP055489641, DOI: 10.1080/2162402X.2016.1277306 abstract page 3 page 9 page 12 figures -----	1-103
X	WO 2018/189220 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 18 October 2018 (2018-10-18) examples claims -----	1-103
X	US 7 507 406 B2 (EMD SERONO RES CT INC [US]) 24 March 2009 (2009-03-24) examples claims -----	1-103
X	US 7 517 526 B2 (MERCK PATENT GMBH [DE]) 14 April 2009 (2009-04-14) examples claims -----	1-103
X	GILLIES STEPHEN D ET AL: "An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma", BLOOD, vol. 105, no. 10, 15 May 2005 (2005-05-15), pages 3972-3978, XP002468216, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2004-09-3533 abstract page 3975 - page 3976 figures; tables ----- -/--	1-103

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/056361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WANG XINGXING ET AL: "T Cell-Signaling-Responsive Conjugate of Antibody with siRNA to Overcome Acquired Resistance to anti-PD-1 Immunotherapy", ADVANCED THERAPEUTICS , vol. 5, no. 1 5 October 2021 (2021-10-05), page 2100161, XP055963907, ISSN: 2366-3987, DOI: 10.1002/adtp.202100161 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/fu 11-xml/10.1002/adtp.202100161 abstract page 4 figures page 8, left-hand column -----	1-103
X, P	PATTABIRAMAN VIJAYA R ET AL: "Abstract 2138: Creating next-generation biologics using a novel chemistry platform technology", CANCER RESEARCH, vol. 82, no. 12_suppl, 8 April 2022 (2022-04-08), - 13 April 2022 (2022-04-13), page 2138, XP055968969, ISSN: 0099-7374, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2022-2138 Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/cancerres/art icle/82/12_Supplement/2138/700401/Abstract -2138-Creating-next-generation-biologics> abstract -----	1-103

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/056361

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/056361

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021119516	A1	17-06-2021	AU 2020403148 A1 CA 3164353 A1 CN 115151279 A EP 4072593 A1 KR 20220115611 A WO 2021119516 A1	30-06-2022 17-06-2021 04-10-2022 19-10-2022 17-08-2022 17-06-2021
US 2020317787	A1	08-10-2020	CN 111527109 A EP 3733716 A1 JP 2021511069 A US 2020317787 A1 WO 2019129053 A1	11-08-2020 04-11-2020 06-05-2021 08-10-2020 04-07-2019
WO 2020233515	A1	26-11-2020	AU 2020280411 A1 CA 3136855 A1 CN 113784728 A EP 3969051 A1 KR 20220009380 A US 2022233711 A1 WO 2020233515 A1	28-10-2021 26-11-2020 10-12-2021 23-03-2022 24-01-2022 28-07-2022 26-11-2020
WO 2018189220	A1	18-10-2018	AU 2018250875 A1 BR 112019021411 A2 CA 3058279 A1 CN 110505883 A EP 3609537 A1 IL 269558 A JP 2020516638 A KR 20190136076 A TW 201902918 A US 2020188526 A1 WO 2018189220 A1	03-10-2019 05-05-2020 18-10-2018 26-11-2019 19-02-2020 28-11-2019 11-06-2020 09-12-2019 16-01-2019 18-06-2020 18-10-2018
US 7507406	B2	24-03-2009	AT 336514 T AU 4314801 A CA 2399832 A1 CN 1406249 A DE 60122286 T2 DK 1252192 T3 EP 1252192 A2 ES 2269366 T3 HU 0204475 A2 JP 5179689 B2 JP 5572665 B2 JP 2003522200 A JP 2012176969 A MX PA02007733 A PT 1252192 E US 2002147311 A1 US 2006034836 A1 US 2009264627 A1 WO 0158957 A2	15-09-2006 20-08-2001 16-08-2001 26-03-2003 02-08-2007 20-11-2006 30-10-2002 01-04-2007 28-04-2003 10-04-2013 13-08-2014 22-07-2003 13-09-2012 10-09-2004 31-01-2007 10-10-2002 16-02-2006 22-10-2009 16-08-2001
US 7517526	B2	14-04-2009	AT 368475 T AU 7172901 A BR 0112111 A CA 2412845 A1 CN 1529619 A	15-08-2007 14-01-2002 06-05-2003 10-01-2002 15-09-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/056361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		DE 60129695 T2	05-06-2008
		DK 1294401 T3	08-10-2007
		EP 1294401 A2	26-03-2003
		ES 2288967 T3	01-02-2008
		HU 0300868 A2	28-07-2003
		JP 5390055 B2	15-01-2014
		JP 2004501981 A	22-01-2004
		KR 20030064275 A	31-07-2003
		MX PA02012734 A	25-04-2003
		PL 358582 A1	09-08-2004
		PT 1294401 E	09-11-2007
		SK 982003 A3	04-05-2004
		US 2003049227 A1	13-03-2003
		US 2010297060 A1	25-11-2010
		WO 0202143 A2	10-01-2002
		ZA 200300759 B	28-04-2004

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/61	(2017.01)	A 6 1 K	47/61
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	47/56	(2017.01)	A 6 1 K	47/56
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	14/55	(2006.01)	C 0 7 K	14/55

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB
,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,W
S,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベックシュトラーセ 1 9 1

(72)発明者 アルバレス サンチェス, ルーベン

スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベックシュトラーセ 1 9 1

(72)発明者 ミュラー, マガリ

スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベックシュトラーセ 1 9 1

(72)発明者 アレヴァロールイス, マチルデ

スイス 4 0 5 7 バーゼル クリベックシュトラーセ 1 9 1

F ターム (参考)

4C076 AA30 AA95 BB13 BB16 BB29 CC27 CC41 DD01 DD66 EE06
EE13 EE16 EE23 EE30 FF51 FF61 FF704C084 AA02 BA37 BA41 DA01 DA12 DA14 MA44 MA55 MA60 MA66
NA13 ZB264C085 AA14 AA16 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 DD84 EE01
GG02 GG04

4H045 AA10 AA30 BA41 BA56 DA02 DA04 DA76 EA20