(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-536716
(P2024-536716A)
(43)公表日　令和6年10月8日(2024.10.8)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		4B064
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46	ZNA	4B065
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		4C084
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C085
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全123頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-513935(P2024-513935)
(86)(22)出願日　令和4年9月1日(2022.9.1)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月24日(2024.4.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/075847
(87)国際公開番号　WO2023/034923
(87)国際公開日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(31)優先権主張番号　63/240,404
(32)優先日　令和3年9月3日(2021.9.3)
(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,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　521339223
ノヴァロック バイオセラピューティクス， リミテッド
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０８６２８， ユーイング， チャールズ ユーイング ブールバード ８０１
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100103182
弁理士　日野 真美
(74)代理人　100217663
弁理士　末広 尚也
(72)発明者　ペイ，イ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７及び／又はＴＧＦβへの二重特異性及び三重特異性結合タンパク質ならびにそれらの使用

(57)【要約】
本開示は、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体）、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体）、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体）、ならびにＣＤ１３７、ＴＧＦβ、及びＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質（ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体）を提供する。本開示はまた、これらの結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびに癌を治療及び／又は予防するためのそれらの使用の方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβ又はＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質であって、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含む抗体足場モジュール；
（ｂ）ＴＧＦβ又はＣＤ１３７に結合する第三の抗原結合部位を含む、少なくとも一つの第一の結合モジュールを含む、結合タンパク質。
【請求項２】
前記第一の抗原結合部位及び前記第二の抗原結合部位が、
（ｉ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｉｉ）ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項３】
前記抗体足場モジュールが、
配列番号１又は配列番号３において示される重鎖可変領域配列；及び配列番号２又は配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項４】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列；又は
（ｉｉ）配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項５】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び
配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；又は
（ｉｉ）配列番号３において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び
配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項６】
前記抗体足場モジュールが、
配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項７】
一つの第一の結合モジュールを有する、請求項１～６に記載の結合タンパク質。
【請求項８】
二つの第一の結合モジュールを有する、請求項１～６に記載の結合タンパク質。
【請求項９】
前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、前記抗体足場モ

ジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｎ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｎ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、直接的に又はインターリンカーを介して互いに共有結合的に付着されている、先行請求項に記載の結合タンパク質。

【請求項１０】

前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、配列番号５８又は配列番号５９において示される配列を有するインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている、請求項９に記載の結合タンパク質。

【請求項１１】

前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項９に記載の結合タンパク質。

【請求項１２】

前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項９に記載の結合タンパク質。

【請求項１３】

一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々が、異なる抗体足場モジュール配列に又は前記抗体足場モジュール配列の異なる末端に共有結合的に付着されている、請求項１～６及び８～１２のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項１４】

前記第三の抗原結合部位がＴＧＦβに結合する、先行請求項に記載の結合タンパク質。

【請求項１５】

前記第一の結合モジュールが、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む、請求項１４に記載の結合タンパク質。

【請求項１６】

ＴＧＦβＲＩＩの前記細胞外ドメインが、配列番号６７において示される配列を含む、請求項１５に記載の結合タンパク質。

【請求項１７】

二つの第一の結合モジュールを有する、請求項１４～１６に記載の結合タンパク質。

【請求項１８】

前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号５１において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４０において示される配列を含む、請求項１７に記載の結合タンパク質。

【請求項１９】

前記第三の抗原結合部位がＣＤ１３７に結合する、請求項１～１３のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項２０】

前記第一の結合モジュールがｓｃＦｖであり、それは、重鎖可変領域配列及び軽鎖可変配列を含み、前記配列が、直接的に又はｓｃＦｖ融合リンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている、請求項１９に記載の結合タンパク質。

【請求項２１】

前記第一の結合モジュールが、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、又は配列番号５６において示される配列を含む、請求項１９に記載の結合タンパク質。

【請求項２２】

前記第一の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、

（１）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列；

（２）ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２

９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列；又は
（３）ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項１９に記載の結合タンパク質。
【請求項２３】
前記第一の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、
（１）配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列；
（２）配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列；又は
（３）配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項１９に記載の結合タンパク質。
【請求項２４】
二つの第一の結合モジュールを有する、請求項１９～２３に記載の結合タンパク質。
【請求項２５】
（１）前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号３８において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４０において示される配列を含み；
（２）前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４４において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４０において示される配列を含み；
（３）前記抗体足場モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４５において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４６において示される配列を含み；
（４）前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４７において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４０において示される配列を含み；
（５）前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号５０において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４０において示される配列を含む、請求項２４に記載の結合タンパク質。
【請求項２６】
ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質であって、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含む抗体足場モジュール；
（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに
（ｃ）ＣＤ１３７に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュールを含む、結合タンパク質。
【請求項２７】
前記第一の抗原結合部位及び前記第二の抗原結合部位が、
（ｉ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｉｉ）ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項２６に記載の結合タンパク質。
【請求項２８】

前記抗体足場モジュールが、
配列番号１又は配列番号３において示される重鎖可変領域配列；及び配列番号２又は配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項２６に記載の結合タンパク質。
【請求項２９】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列；
（ｉｉ）配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項２６に記載の結合タンパク質。
【請求項３０】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び
配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；又は
（ｉｉ）配列番号３において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び
配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む、請求項２６に記載の結合タンパク質。
【請求項３１】
前記抗体足場モジュールが、
配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む、請求項２６に記載の結合タンパク質。
【請求項３２】
一つの第一の結合モジュールを有する、請求項２６～３１に記載の結合タンパク質。
【請求項３３】
二つの第一の結合モジュールを有する、請求項２６～３１に記載の結合タンパク質。
【請求項３４】
前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｎ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｎ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、直接的に又は第一の結合モジュールインターリンカーを介して互いに共有結合的に付着されている、請求項３２～３３に記載の結合タンパク質。
【請求項３５】
前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、前記第一の結合モジュールインターリンカーが、配列番号５８又は配列番号５９において示される配列を含む、請求項３４に記載の結合タンパク質。
【請求項３６】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項３４に記載の結合タンパク質。
【請求項３７】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結

合的に付着されている、請求項３４に記載の結合タンパク質。
【請求項３８】
一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々が、異なる抗体足場モジュール配列に又は前記抗体足場モジュール配列の異なる末端に共有結合的に付着されている、請求項２６～３１及び３３～３７のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項３９】
前記第一の結合モジュールが、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む、請求項２６～３８に記載の結合タンパク質。
【請求項４０】
ＴＧＦβＲＩＩの前記細胞外ドメインが、配列番号６７において示される配列を含む、請求項３９に記載の結合タンパク質。
【請求項４１】
一つの第二の結合モジュールを有する、請求項２６～４０に記載の結合タンパク質。
【請求項４２】
二つの第二の結合モジュールを有する、請求項２６～４０に記載の結合タンパク質。
【請求項４３】
前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｎ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｎ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、前記第二の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、直接的に又は第二の結合モジュールインターリンカーを介して互いに共有結合的に付着されている、請求項４１～４２に記載の結合タンパク質。
【請求項４４】
前記第二の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、前記第二の結合モジュールインターリンカーが、配列番号５８又は配列番号５９において示される配列を含む、請求項４３に記載の結合タンパク質。
【請求項４５】
前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４３に記載の結合タンパク質。
【請求項４６】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４５に記載の結合タンパク質。
【請求項４７】
前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４３に記載の結合タンパク質。
【請求項４８】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４７に記載の結合タンパク質。
【請求項４９】
一つを上回る第二の結合モジュールがある場合、各々が、異なる抗体足場モジュール配列に又は前記抗体足場モジュール配列の異なる末端に共有結合的に付着されている、請求項２５～４０及び４２～４４のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項５０】
一つの第二の結合モジュールを有し、前記一つの第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４１に記載の結合タンパク質。
【請求項５１】

一つの第二の結合モジュールを有し、前記一つの第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４１に記載の結合タンパク質。

【請求項５２】

二つの第二の結合モジュールを有し、一方の第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着され、他方の第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項４２に記載の結合タンパク質。

【請求項５３】

前記第二の結合モジュールがｓｃＦｖである、請求項２５～５２のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項５４】

前記第二の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、

（１）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列；

（２）ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列；又は

（３）ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項２６～５３のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項５５】

前記第二の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、

（１）配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列；

（２）配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列；又は

（３）配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項５４に記載の結合タンパク質。

【請求項５６】

前記第二の結合モジュールが、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、又は配列番号５６において示される配列を含む、請求項５４に記載の結合タンパク質。

【請求項５７】

二つの第一の結合モジュール及び二つの第二の結合モジュールを有する、請求項２６～３１に記載の結合タンパク質。

【請求項５８】

（１）前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号３８において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含み；

（２）前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号５０において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含み；又は

（３）前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号５１において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号５２において示される配列を含む、請求項５７に記載の結合タンパク質。

【請求項５９】

二つの第一の結合モジュール及び一つの第二の結合モジュールを有する、請求項２６～

３１に記載の結合タンパク質。
【請求項６０】
（１）前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４１において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４２において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含み；又は
（２）前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４３において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４２において示される配列を含み；
前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号３９において示される配列を含む、請求項５９に記載の結合タンパク質。
【請求項６１】
ＣＤ１３７、ＴＧＦβ、及びＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質であって、
（ａ）ＣＤ１３７に結合する第一の抗原結合部位及びＣＤ１３７に結合する第二の抗原結合部位を含む抗体足場モジュール；
（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに
（ｃ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュールを含む、結合タンパク質。
【請求項６２】
前記第一の抗原結合部位及び前記第二の抗原結合部位が、
（ｉ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列；
（ｉｉ）ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｉｉｉ）ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項６１に記載の結合タンパク質。
【請求項６３】
前記抗体足場モジュールが、
配列番号１６、配列番号１８、もしくは配列番号２０において示される重鎖可変領域配列；又は
配列番号１７、配列番号１９、もしくは配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項６１に記載の結合タンパク質。
【請求項６４】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列；
（ｉｉ）配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列；又は

（ｉｉ）配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項６１に記載の結合タンパク質。
【請求項６５】
前記抗体足場モジュールが、
（ｉ）配列番号１６において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列、
配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；
（ｉｉ）配列番号１８において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列、
配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；又は
（ｉｉｉ）配列番号２０において示される重鎖可変領域配列、
配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、
配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列、
配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む、請求項６１に記載の結合タンパク質。
【請求項６６】
前記抗体足場モジュールが、
配列番号７５において示される重鎖配列及び配列番号７６において示される軽鎖配列を含む、請求項６１に記載の結合タンパク質。
【請求項６７】
一つの第一の結合モジュールを有する、請求項６１～６６に記載の結合タンパク質。
【請求項６８】
二つの第一の結合モジュールを有する、請求項６１～６６に記載の結合タンパク質。
【請求項６９】
前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｎ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｎ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、直接的に又は第一の結合モジュールインターリンカーを介して互いに共有結合的に付着されている、請求項６７～６８に記載の結合タンパク質。
【請求項７０】
前記第一の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、前記第一の結合モジュールインターリンカーが、配列番号５８又は配列番号５９において示される配列を含む、請求項６９に記載の結合タンパク質。
【請求項７１】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項６９に記載の結合タンパク質。
【請求項７２】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項６９に記載の結合タンパク質。
【請求項７３】
一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々が、異なる抗体足場モジュール配

列に又は前記抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に付着されている、請求項６１～６６及び６８～７２のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項７４】
前記第一の結合モジュールが、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む、請求項６１～７３のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項７５】
ＴＧＦβＲＩＩの前記細胞外ドメインが、配列番号６７において示される配列を含む、請求項７４に記載の結合タンパク質。
【請求項７６】
一つの第二の結合モジュールを有する、請求項６１～７５に記載の結合タンパク質。
【請求項７７】
二つの第二の結合モジュールを有する、請求項６１～７５に記載の結合タンパク質。
【請求項７８】
前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、前記抗体足場モジュールが、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｎ末端、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｎ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、前記第二の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、直接的に又は第二の結合モジュールインターリンカーを介して互いに共有結合的に付着されている、請求項７６～７７に記載の結合タンパク質。
【請求項７９】
前記第二の結合モジュール及び前記抗体足場モジュールが、第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、前記第二の結合モジュールインターリンカーが、配列番号５８又は配列番号５９において示される配列を含む、請求項７８に記載の結合タンパク質。
【請求項８０】
前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項７８に記載の結合タンパク質。
【請求項８１】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項８０に記載の結合タンパク質。
【請求項８２】
前記第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項７８に記載の結合タンパク質。
【請求項８３】
前記第一の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項８２に記載の結合タンパク質。
【請求項８４】
一つを上回る第二の結合モジュールがある場合、各々が、異なる抗体足場モジュール配列に又は前記抗体足場モジュール配列の異なる末端に共有結合的に付着されている、請求項６１～７５及び７７～８３のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項８５】
一つの第二の結合モジュールを有し、前記一つの第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項７６に記載の結合タンパク質。
【請求項８６】
一つの第二の結合モジュールを有し、前記一つの第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項７６に記載の結合タンパク質。

【請求項８７】
二つの第二の結合モジュールを有し、一方の第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール重鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着され、他方の第二の結合モジュールが、前記抗体足場モジュール軽鎖配列の前記Ｃ末端に共有結合的に付着されている、請求項７７に記載の結合タンパク質。
【請求項８８】
前記第二の結合モジュールがｓｃＦｖである、先行請求項に記載の結合タンパク質。
【請求項８９】
前記第二の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、
（ａ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｂ）ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項６１～８８のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項９０】
前記第二の結合モジュールが、Ｎ末端からＣ末端に、
（１）配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列；又は
（２）配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む、請求項８９に記載の結合タンパク質。
【請求項９１】
前記第二の結合モジュールが、配列番号５７において示される配列を含む、請求項６１～８８のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項９２】
二つの第一の結合モジュール及び二つの第二の結合モジュールを有する、請求項６１～６６のいずれか一項に記載の結合タンパク質。
【請求項９３】
前記抗体足場モジュール及び前記第二の結合モジュールの前記重鎖配列が、配列番号４８において示される配列を含み；ならびに前記抗体足場モジュール及び前記第一の結合モジュールの前記軽鎖配列が、配列番号４９において示される配列を含む、請求項９２に記載の結合タンパク質。
【請求項９４】
前記抗体足場モジュールが定常領域をさらに含む、先行請求項に記載の結合タンパク質。
【請求項９５】
前記定常領域がＦｃサイレンシング変異を含む、請求項９４に記載の結合タンパク質。
【請求項９６】
前記ＦｃサイレンシングがＬＡＬＡ又はＮ２９７Ａである、請求項９５に記載の結合タンパク質。
【請求項９７】
前記定常領域がノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を含む、請求項９４～９６のいずれかに記載の結合タンパク質。
【請求項９８】
前記定常領域が、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４を含む、請求項９４に記載の結合タンパク質。
【請求項９９】
先行請求項に記載の結合タンパク質及び医薬的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。
【請求項１００】

先行請求項に記載の結合タンパク質を、それを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療又は予防する方法。
【請求項１０１】
先行請求項に記載の結合タンパク質をコードする配列を含む、単離ポリヌクレオチド。
【請求項１０２】
請求項１～１０１のいずれか一項に記載の配列をコードする、請求項１０１に記載の単離ポリヌクレオチド。
【請求項１０３】
請求項１０１に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１０４】
請求項１０２に記載のポリヌクレオチド、及び／又は請求項１０３に記載のベクターを含む、細胞。
【請求項１０５】
請求項１０４に記載の細胞を培養することを含む、先行請求項に記載の結合タンパク質の産生のための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本国際特許出願は、２０２１年９月３日に出願された米国仮特許出願第６３／２４０，４０４号の利益を主張するものであり、その内容全体は、参照により本明細書中に組み入れられる。
【０００２】
配列表に関する記述
本出願に関連付けられる配列表は、紙のコピーの代わりにＸＭＬフォーマットにおいて提供され、本明細書により、参照により本明細書中に組み入れられる。配列表を含むＸＬＭファイルの名前は、１２２８６３－５００８＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ．２６．ｋｍである。テキストファイルは約１０８０００バイトであり、２０２２年８月２８日頃に作成され、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。
【０００３】
本開示は免疫療法の分野にあり、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性）、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性）、ならびにＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性）に関する。本開示はまた、ＣＤ１３７、ＴＧＦβ、及びＰＤ－Ｌ１（ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体）に結合する結合タンパク質に関する。本開示はまた、これらの結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列及びそれらを産生する細胞に向けられる。本開示は、これらの結合タンパク質を含む医薬組成物に、ならびに免疫療法のためにＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸及び／又はＣＤ１３７軸を調節するためのそれらの使用の方法にさらに関する。
【背景技術】
【０００４】
免疫チェックポイントは、自己寛容を維持しながら免疫応答の持続性を調節及び制御するために免疫細胞が持つ阻害経路のセットを指す。腫瘍微小環境における免疫チェックポイント分子（例、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、Ｌａｇ－３、ＶＩＳＴＡ、Ｂ７－Ｈ３、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ７３、ＬＡＩＲ１）の上方調節は、エフェクターＴ細胞の抗腫瘍活性を限定する重要な機構として認識されている。
【０００５】
プログラム細胞死－１（ＰＤ－１）は、癌免疫療法のために標的化する主な免疫Ｔ細胞受容体チェックポイント受容体の一つである。ＰＤ－１及びそのリガンドプログラム死リ

ガンド－１及びプログラム死リガンド－２（それぞれＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｔ細胞活性化、寛容、及び免疫病理の間のバランスを調節する共阻害因子として作用する。癌も非存在において、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸は、正常組織における過剰な炎症を防止するように機能し、自己抗原に対する免疫寛容を維持するのに役立つ。癌の存在において、ＰＤ－１経路を破壊させて、腫瘍及び末梢組織の両方において腫瘍免疫耐性の主な機構を提供する。この軸は、腫瘍細胞の生存を増強することにより、癌の発生及び進行を促すために別の目的で使われる。

【０００６】

ＰＤ－ｌリガンド、ＰＤ－Ｌ１（また、分化のクラスター２７４（ＣＤ２７４）として公知である）又はＢ７ホモログ１（Ｂ７－Ｈ１）、及びＰＤ－Ｌ２（また、Ｂ７－ＤＣ又はＣＤ２７３として公知である）は、樹状細胞又はマクロファージの表面上に通常発現される。ＰＤ－Ｌ１はまた、腫瘍細胞上で又は腫瘍微小環境（ＴＭＥ）における非形質転換細胞上に過剰発現される。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の相互作用は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）シグナル伝達の阻害及びＣＤ２８共刺激に導き、究極的にはＴ細胞不活性化及び増殖能力の喪失に導く。腫瘍微小環境におけるＰＤ－Ｌ１発現によって、癌細胞は、患者の抗原特異的Ｔ細胞免疫応答を防止又は避けるための回避機構としてＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント経路を利用することが可能になる。

【０００７】

抗体を用いたＰＤ－１受容体又はそのリガンドの遮断によって、癌細胞からそれらの回避戦略を奪い、抗腫瘍免疫応答を増強する又は促す。今日まで、六つのＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）が、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）の承認を受けている：三つのＰＤ－１阻害剤（ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びセミプリマブ）、及び三つのＰＤ－Ｌ１阻害剤（アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びアベルマブ）。

【０００８】

免疫応答のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント阻害を無効にする治療用モノクローナル抗体を用いた癌免疫療法は、多種多様な悪性腫瘍の治療に変革をもたらしてきた。しかし、一部の初期レスポンダーは、最終的に単独療法に対する後天的抵抗性を発生し、再発性疾患を経験し、有意な数の患者が、一次抵抗性を実証し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１免疫チェックポイント阻害に応答しない。チェックポイント阻害剤治療抵抗性の報告された有病率に照らして、難治性又は再発性癌患者のための追加の治療薬についてのアンメットニーズがある。

【０００９】

ＣＤ１３７（４－１ＢＢ又はＴＮＦＲＳＦ９）は、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーのメンバーである。ＣＤ１３７は、自然免疫細胞及び適応免疫細胞の両方に発現する。それは、腫瘍微小環境（ＴＭＥ）において多面的な役割を果たす。それは、ＴＭＥにおいてＴ細胞上で優位に上方調節され、ＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞の活性化、増殖、及び生存に共刺激を提供する。それはまた、ＴＭＥにおける他の細胞機能、例えばＮＫ細胞がＣＤ８　Ｔ細胞と相互作用するように促すこと、ＤＣ細胞上の腫瘍抗原提示を増強すること、などを調節する。ＣＤ１３７アゴニストは、抗腫瘍免疫応答を増強することができ、ＰＤ１／ＰＤ－Ｌ１遮断抗体を含む、他の抗腫瘍薬剤と相乗的に作用することができる。

【００１０】

ＴＧＦβの分泌は、免疫回避及び腫瘍進行への別の主要な寄与因子である。ＴＧＦβは、Ｔ細胞増殖を防止し、Ｔ細胞及びＮＫ細胞の両方のエフェクター機能を減少させることにより、腫瘍進行及び免疫抑制を促す。それはまた、Ｔ調節細胞の機能を増強し、上皮間葉移行（ＥＭＴ）を誘導する。

【００１１】

ＰＤ１、ＣＤ１３７、及びＴＧＦβは、独立した免疫抑制又は免疫刺激経路を調節するため、ＰＤ１及びＣＤ１３７、ＰＤ１及びＴＧＦを標的化することβ、又はＰＤ１、ＣＤ１３７及びＴＧＦβを標的化することによって、特に免疫除外腫瘍及び免疫不活性腫瘍について、抗腫瘍有効性を増加させることが可能性である。

【発明の概要】
【００１２】
本開示は、例えば、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性）、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性）、ならびにＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性）を含む多重特異性結合タンパク質を提供することにより、上の必要性に対処する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質であり、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマット（例、二つの重鎖及び二つの軽鎖を含むＹ字形状の対称又は非対称の抗体）における抗体足場モジュール；（ｂ）ＣＤ１３７に結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュールを含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質であり、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュールを含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに（ｃ）ＣＤ１３７に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュールを含む結合タンパク質である。
【００１３】
本開示はまた、ＣＤ１３７、ＴＧＦβ、及びＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質（ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性）を含む、ヒトＣＤ１３７に結合する結合タンパク質に関する。より具体的には、本開示は、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質に、ならびにＣＤ１３７を刺激するための、及び持続的な抗腫瘍免疫応答を促すためのそれらの使用に関する。例示的な実施形態では、結合タンパク質は、ＣＤ１３７に結合してもよく、ＣＤ１３７に結合する第一の抗原結合部位及びＣＤ１３７に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュールを含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、（ａ）ＣＤ１３７に結合する第一の抗原結合部位及びＣＤ１３７に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに（ｃ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュールを含む結合タンパク質である。
【００１４】
ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断剤の使用に起因する、免疫療法における進歩にもかかわらず、ＰＤ－Ｌ１及びＴ細胞上の共刺激標的への両方に結合する、ならびに／あるいはＴＧＦβを中和することにより腫瘍微小環境における免疫抑制を逆転させることができる結合タンパク質ついてのニーズがある。三つのＴＧＦβアイソフォームであるＴＧＦβ１、ＴＧＦβ２、及びＴＧＦβ３は、多くの腫瘍において高度に発現され、それは、主に自然免疫系及び適応免疫系の両方を抑制することにより癌進行を促す。及び、それらの血清濃度は予後不良と相関する。腫瘍微小環境では、ＴＧＦβは、間質修飾、血管新生、及び上皮間葉移行（ＥＭＴ）の誘導により腫瘍進行を促す。ＴＧＦβシグナル伝達は、Ｔｒｅｇ細胞の分化を誘導し、骨髄細胞を通じた転移を駆動する。さらに、ＴＧＦβ１は、Ｔ細胞及びＮＫ細胞機能を直接的に阻害することができる。
【００１５】
結合タンパク質は、単一の抗原の二つもしくは三つのエピトープを又は一つを上回る標的抗原に同時に結合することができ、単一特異性治療用抗体又は融合タンパク質により達成することができない複数の機構的機能及び潜在的な相乗的効果を可能にする。有利には

、二つもしくは三つの抗原に結合する結合タンパク質の使用は、複数の治療用薬剤の使用に関連付けられるリスクよりも低い毒性のリスクを有し得る。

【００１６】

大まかに言えば、本明細書中に開示される、開示されている二重特異性体及び三重特異性体は、重鎖ヘテロ二量体化を促すための修飾を伴う又は伴わない天然ＩｇＧ足場に基づいており、抗体ＦａｂもしくはｓｃＦｖ断片及び／又はＩｇＧ足場中のＩｇＧ重鎖もしくは軽鎖のＮ末端もしくはＣ末端に付加されたＴＧＦβＲＩＩ受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）から調製された融合タンパク質から由来する抗原結合部位により寄与される二つ又は三つの結合特異性　（例、ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７及び／又はＴＧＦβ）により特徴付けられる。

【００１７】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体、又はＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の構造的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ｓｃＦｖフォーマットにおける抗ＣＤ１３７を有する、

（ｂ）ｓｃＦｖフォーマットにおける抗ＰＤ－Ｌ１を有する、

（ｃ）ＩｇＧ足場中の抗体軽鎖のＮ末端に融合されたｓｃＦｖを有する、

（ｄ）ＩｇＧ足場中の抗体重鎖のＮ末端に融合されたｓｃＦｖを有する、

（ｅ）ＩｇＧ足場中の抗体軽鎖のＣ末端に融合されたｓｃＦｖを有する、

（ｆ）ＩｇＧ足場中の抗体重鎖のＣ末端に融合されたｓｃＦｖを有する、

（ｇ）一価又は二価フォーマットにおいて存在するＣＤ１３７のｓｃＦｖを有する、

（ｈ）ＩｇＧ足場中の軽鎖のＣ末端に融合されたヒトＴＧＦβＲＩＩを含む、又は

（ｉ）ＩｇＧ足場中の重鎖のＣ末端に融合されたヒトＴＧＦβＲＩＩを含む。

【００１８】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体、及びＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、消耗ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８　Ｔ細胞を標的化し、機能不全腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を再活性化する免疫療法を提供する。ＰＤ－Ｌ１に結合するそのような結合タンパク質は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１耐性に寄与する消耗ＴＣＤ８$^{+}$細胞及び／又は調節性Ｔ細胞において富む微小環境により特徴付けられる固形腫瘍における治療薬として特に有益であり得る。実際には、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１シグナル伝達軸を遮断することによって、ＴＭＥにおいて存在する免疫抑制シグナルが低下し、抗腫瘍免疫性が増強され、それは次に、患者の生存を延長する持続的な臨床応答を産生する。

【００１９】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７又はヒトＴＧＦβのいずれかについて特異的な二重特異性四価分子である。

【００２０】

他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１ならびにＣＤ１３７及びヒトＴＧＦβの両方について特異的な分子である。

【００２１】

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、腫瘍微小環境においてＣＤ１３７発現免疫細胞を標的化する免疫療法を提供するように設計される。ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、固形腫瘍における治療薬として特に有益であり得る。実際には、ＣＤ１３７シグナル伝達軸を活性化することによって、ＴＭＥにおいて存在するＴエフェクター機能が増強され、抗腫瘍免疫性が増強され、それは次に、患者の生存を延長させる持続的な臨床応答を産生し得る。

【００２２】

他の実施形態では、開示されている結合タンパク質は、ＣＤ１３７ならびにＰＤ－Ｌ１及びヒトＴＧＦβの両方に結合する。

【００２３】
一部の実施形態によると、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質は、配列番号１及び３から選択される抗ＰＤ－Ｌ１抗体重鎖（ＨＣ）可変領域配列の三つのＣＤＲならびに配列番号２及び４から選択される軽鎖可変領域配列の三つのＣＤＲからなる群から選択される六つの相補性決定領域（ＣＤＲ）配列のセットを含む。
【００２４】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００２５】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００２６】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、配列番号１もしくは配列番号３において示される重鎖可変領域配列、又は配列番号１もしくは配列番号３と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。
【００２７】
他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、配列番号２もしくは配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、又は配列番号２もしくは配列番号４と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。
【００２８】
他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、配列番号１もしくは配列番号３において示される重鎖可変領域配列、及び配列番号２もしくは配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【００２９】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、以下の組み合わせから選択される重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含む：
（ａ）配列番号１を含む重鎖可変領域配列及び配列番号２を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｂ）配列番号３を含む重鎖可変領域配列及び配列番号４を含む軽鎖可変領域配列。
【００３０】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、
（ａ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｂ）ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００３１】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質が提供され、第一及び第二の抗原結合部位は、ＰＤ－Ｌ１に結合し、抗体足場モジュールは以下を含む：
（ｉ）配列番号１において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、もしくは配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；又は
（ｉｉ）配列番号３において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、もしくは配列番号６４において示される重鎖定常領域配

列、配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列。

【００３２】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質が提供され、第一及び第二の抗原結合部位は、ＰＤ－Ｌ１に結合し、抗体足場モジュールは以下を含む：

配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列。

【００３３】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、表１中に開示される一つ又は複数の重鎖可変領域ＣＤＲならびに／あるいは表２中に開示される一つ又は複数の軽鎖可変領域ＣＤＲを含む。

【００３４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の構造的特徴及び機能的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的である、

（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１と交差反応する、

（ｃ）ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する、又は

（ｄ）Ｔ細胞のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント媒介性阻害を脱抑制する。

【００３５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１の内因性レベルを発現するヒト細胞に、及びヒトＰＤ－Ｌ１を過剰発現するように操作された宿主細胞に特異的に結合する。ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質はまた、ナノモル以下のEC_{50}値を伴って、ヒト又はカニクイザルＰＤ－Ｌ１を過剰発現する細胞に結合し得る。

【００３６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、カニクイザルＰＤ－Ｌ１（ｃｙｎｏＰＤ－Ｌ１）と交差反応し、マウスＰＤ－Ｌ１（ｍｕ－ＰＤ－Ｌ１）との交差反応性結合を実証しない。

【００３７】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、ヒトＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１結合相互作用を破壊する。

【００３８】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、Ｔ細胞のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント媒介性阻害を脱抑制する。

【００３９】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、Ｆｃ　γＲとの架橋活性を消失／最小化するように操作されたＦｃ領域をさらに含み、それは、Ｔ細胞のＦｃ媒介性エフェクター機能をサイレンシング又は排除する。

【００４０】

本開示はまた、ＰＤ－Ｌ１に結合する上の結合タンパク質の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。

【００４１】

本開示はまた、上のポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。

【００４２】

本開示はまた、上のポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。

【００４３】

本開示はまた、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体、及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の治療のために使用され得る。

【００４４】
本開示はまた、患者における癌の治療のための方法に関し、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質の少なくとも一つの治療有効量を、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、患者に投与することを含む。
【００４５】
一部の実施形態によれば、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、配列番号１６、１８、及び２０から選択される抗ＣＤ１３７抗体重鎖（ＨＣ）可変領域配列の三つのＣＤＲならびに配列番号１７、１９、及び２１から選択される軽鎖可変領域配列の三つのＣＤＲからなる群から選択される六つの相補性決定領域（ＣＤＲ）配列のセットを含む。
【００４６】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００４７】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００４８】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【００４９】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、配列番号１６、１８、もしくは２０において示される重鎖可変領域配列、又は配列番号１６、１８、もしくは２０と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。
【００５０】
他の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、配列番号１７、１９、もしくは２１において示される軽鎖可変領域配列、又は配列番号１７、１９、もしくは２１と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。
【００５１】
他の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、配列番号１６、１８、又は２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７、１９、又は２１において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【００５２】
一部の実施形態では、結合する結合タンパク質は、以下の組み合わせから選択される重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含む：
（ａ）配列番号１６を含む重鎖可変領域配列及び配列番号１７を含む軽鎖可変領域配列；
（ｂ）配列番号１８を含む重鎖可変領域配列及び配列番号１９を含む軽鎖可変領域配列；ならびに
（ｃ）配列番号２０を含む重鎖可変領域配列及び配列番号２１を含む軽鎖可変領域配列。
【００５３】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質が提供され、以下：
（ａ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列；

（ｂ）ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列；又は
（ｃ）ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびに／あるいはＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む。

【００５４】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質が提供され、それにおいて、第一及び第二の抗原結合部位はＣＤ１３７に結合し、それにおいて、抗体足場モジュールは以下を含む：、

（ｉ）配列番号１６において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；
（ｉｉ）配列番号１８において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、もしくは配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列；又は
（ｉｉｉ）配列番号２０において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、もしくは配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５もしくは配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列。

【００５５】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質が提供され、それにおいて、第一及び第二の抗原結合部位はＣＤ１３７に結合し、それにおいて、抗体足場モジュールは、配列番号７５において示される重鎖配列及び配列番号７６において示される軽鎖配列を含む。

【００５６】

一部の実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、表３中に開示される一つ又は複数の重鎖可変領域ＣＤＲならびに／あるいは表４中に開示される一つ又は複数の軽鎖可変領域ＣＤＲを含む。

【００５７】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、単独で、又は組み合わせにおいて、以下の構造的及び機能的特徴の一つ又は複数を示す：
（ａ）ヒトＣＤ１３７について特異的である、
（ｂ）カニクイザルＣＤ１３７と交差反応する、
（ｃ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊（例、低下又は防止）する、
（ｄ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す、
（ｅ）ＣＤ１３７シグナル伝達についての架橋依存的アゴニスト活性を持つ、又は
（ｆ）架橋依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。

【００５８】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤ１３７の内因性レベルを発現するヒト細胞に、及びヒトＣＤ１３７を過剰発現するように操作された宿主細胞に特異的に結合する。一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、０．２～１．１ｎＭ（例、０．２ｎＭ、０．３ｎＭ、０．４ｎＭ、０．５ｎＭ、０．６ｎＭ、０．７ｎＭ、０．８ｎＭ、０．９ｎＭ、１．０ｎＭ、又は１．１ｎＭ）の範囲のEC_{50}値を伴って、ヒト又はカニクイザルＣＤ１３７を過剰発現する細胞に結合する。

【００５９】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、高速オン及び高速オフの動態特性を有する。

【００６０】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、カニクイザルＣＤ１３７（ｃｙｎｏＣＤ１３７）と交差反応し、マウスＣＤ１３７（ｍｕ－ＣＤ１３７）との交差反応性結合を実証しない。
【００６１】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤ１３７リガンド／ＣＤ１３７結合相互作用を破壊する。
【００６２】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＣＤ１３７シグナル伝達についての架橋依存的アゴニスト活性を持つ。
【００６３】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、架橋依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。
【００６４】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、Ｆｃ　γＲとの架橋活性を消失／最小化するように操作されたＦｃ領域をさらに含み、それは、Ｔ細胞のＦｃ媒介性エフェクター機能をサイレンシング又は排除する。
【００６５】
本開示はまた、ＣＤ１３７に結合する上の結合タンパク質の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。
【００６６】
本開示はまた、上のポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。
【００６７】
本開示はまた、上のポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。
【００６８】
本開示はまた、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体、及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の治療のために使用され得る。
【００６９】
本開示はまた、ＣＤ１３７に結合する、開示されている結合タンパク質の少なくとも一つの治療有効量を、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、患者に投与することを含む、患者における癌の治療のための方法に関する。
【００７０】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質であり、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＣＤ１３７に結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュールを含む。
【００７１】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。

【００７２】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１又は配列番号３において示される重鎖可変領域配列；及び配列番号２又は配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【００７３】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【００７４】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。
【００７５】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４２において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。
【００７６】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、一つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、二つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含む抗体足場モジュールを有し、それにおいて、この抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又はインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、インターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、インターリンカーは、配列番号５８において示される、ＮからＣ末端の配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、インターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、インターリンカーは、配列番号５９において示される、ＮからＣ末端の配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体において一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列に又は抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に付着されている。
【００７７】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、ｓｃＦｖであり、それは重鎖可変領域配列及び軽鎖可変配列を含み、それにおいて、配列は、直接的に又はｓｃＦｖ融合リンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーはグリシン及びセリンを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは配列Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８において示される配列である。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５９において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５９において示される配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、配列番号５３において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、配列番号５４において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、配列番号５５において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、配列番号５６において示される配列を含む。

【００７８】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む。

【００７９】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体における第一の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む。

【００８０】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号３８において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号４０において示される抗体足場モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号４４において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号４０において示される抗体足場モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号４５において示される抗体足場モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号４６において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号４７において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番

号４０において示される抗体足場モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号５０において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号４０において示される抗体足場モジュールの軽鎖配列を含む。

【００８１】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールは、定常領域をさらに含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、少なくとも一つのＦｃサイレンシング変異を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域中でのＦｃサイレンシング変異は、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ又はＮ２９７Ａである。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、ノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を含む。

【００８２】

一部の実施形態によれば、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体（例、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ１１、１９２３Ａｂ１２、１９２３Ａｂ１３、及び１９２３Ａｂ１８）は、ＰＤ－Ｌ１とその受容体ＰＤ－１の間での相互作用及びＣＤ１３７とそのリガンドの間での相互作用を効果的に遮断することが可能である。開示されているＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールとして本明細書中に開示される、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質（例、１９２３Ａｂ２又は１９２３Ａｂ３）の一つから由来するアミノ酸配列、及びＣＤ１３７の第一の結合モジュールとして本明細書中に開示される、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（例、１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５又は１９２３Ａｂ６）の一つから由来するアミノ酸配列を含む。

【００８３】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１結合相互作用を破壊し、Ｔ細胞のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント媒介性阻害を脱抑制する結合タンパク質を含む。本明細書中に例示されるように、非限定的な例では、ＰＤ－Ｌ１に結合する抗体足場モジュールは、単鎖可変断片（例、リンカーペプチドと接続された、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質の一つの重鎖（ＶＨ）鎖及び軽鎖（ＶＬ）鎖の可変領域の融合タンパク質）（ｓｃＦｖ）を含み得る。

【００８４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＣＤ１３７に結合する、開示されている結合タンパク質の一つから由来する断片で構成されるＣＤ１３７結合モジュールを含む。一実施形態では、ＣＤ１３７結合モジュールは、本明細書中に開示されるＣＤ１３７に結合する結合タンパク質の一つから由来する結合断片の形態であり得る。本明細書中に例示されるように、非限定的な例では、ＣＤ１３７結合モジュールは、一本鎖可変断片（例、リンカーペプチドと接続された、ＣＤ１３７に結合する、開示されている結合タンパク質の一つの重（ＶＨ）及び軽（ＶＬ）鎖の可変領域の融合タンパク質）を含み得る。あるいは、ＣＤ１３７結合モジュールは、ＩｇＧ分子の形態であり得る。

【００８５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ８は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及び二つのＦｃ定常鎖の各々のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来するｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５３）を含む。

【００８６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１１は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及び二つのＦｃ定常鎖の各々のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来するｓｃ

Ｆｖ断片（ＶＬがＶＨに先行する）（配列番号５４）を含む。
【００８７】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１２は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つの定常鎖を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及びＦａｂ中の軽鎖の各々のＮ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来するジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５６）を含む。
【００８８】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１３は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つの定常鎖を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及びＦａｂ中の重鎖の各々のＮ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来するジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５６）を含む。
【００８９】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１８は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及びＦｃ定常鎖の各々のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来するジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５５）を含む。
【００９０】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、以下の組み合わせから選択される可変重鎖配列及び可変軽鎖配列を含む：
（ａ）配列番号３８を含む重鎖配列及び配列番号４０を含む軽鎖配列；
（ｂ）配列番号４４を含む重鎖配列及び配列番号４０を含む軽鎖配列；
（ｃ）配列番号４５を含む重鎖配列及び配列番号４６を含む軽鎖配列；
（ｄ）配列番号４７を含む重鎖配列及び配列番号４０を含む軽鎖配列；ならびに
（ｅ）配列番号５０を含む重鎖配列及び配列番号４０を含む軽鎖配列。
【００９１】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、配列番号３８、４２、４４、４５、４７、及び５０からなる群から選択される重鎖配列、又は配列番号３８、４２、４４、４５、４７、もしくは５０と少なくとも９０％の配列同一性を有するその断片を含む。
【００９２】
他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、配列番号４０及び４６からなる群から選択される軽鎖配列、又は配列番号４０もしくは４６と少なくとも９０％の配列同一性を有するその断片誘導体を含む。
【００９３】
一部の実施形態では、ＣＤ１３７結合モジュールは、ＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用を遮断し、ＣＤ１３７シグナル伝達及びＴ細胞活性化についての架橋依存的アゴニスト活性を持つｓｃＦｖサブユニットである。一部の実施形態では、ＣＤ１３７結合モジュールは、ジスルフィド結合を伴って安定化されたｓｃＦｖサブユニットである。
【００９４】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ結合モジュールが抗体足場モジュールの重鎖又は軽鎖のＣ末端に融合されて、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体を作るＩｇＧフォーマットを有する抗体足場モジュールを含む。
【００９５】
一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＦｃγＲとの架橋活性を消失／最小化するように操作されたＦｃ領域をさらに含み、それは、Ｔ細胞のＦｃ媒介性エフェクター機能をサイレンシング又は排除する。

【００９６】
本開示はまた、本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の治療のために使用され得る。
【００９７】
本開示はまた、患者における癌の治療のための方法に関し、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の少なくとも一つの治療有効量を患者に投与することを含む。
【００９８】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性配列の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。
【００９９】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。
【０１００】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性ポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。
【０１０１】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性ポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。
【０１０２】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質であり、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュールを含む。
【０１０３】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【０１０４】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１又は配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２又は配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１０５】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１０６】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、

配列番号１において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。

【０１０７】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４２において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。

【０１０８】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、一つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、二つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含む抗体足場モジュールを有し、それにおいて、この抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又はインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、インターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、インターリンカーは、配列番号５８において示されるように、Ｎ末端からＣ末端への配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、インターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、インターリンカーは、配列番号５９において示されるように、Ｎ末端からＣ末端への配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体において一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列又は抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に付着されている。

【０１０９】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体における第一の結合モジュールは、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む。例示的な実施形態では、ＴＧＦβＲＩＩ配列の細胞外ドメインは、配列番号６７において示されている。

【０１１０】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、二つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列は、配列番号５１において示される配列を含み；及びそれにおいて、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールの軽鎖配列は、配列番号４０において示されるように、配列をＮ末端からＣ末端まで含む。

【０１１１】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールは、定常領域をさらに含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗

体足場モジュールの定常領域は、少なくとも一つのＦｃサイレンシング変異を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域中のＦｃサイレンシング変異は、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ又はＮ２９７Ａである。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、ノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を含む。

【０１１２】

一部の実施形態によると、本開示は、ＰＤ－Ｌ１とその受容体ＰＤ－１の間での相互作用を効果的に遮断することが可能なＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体（例、１９２３Ａｂ２０）を提供し、ＴＧＦβを隔絶する。開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールとして本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の一つ（例、１９２３Ａｂ２又は１９２３Ａｂ３）から由来するアミノ酸配列の全て又は一部、及びＴＧＦβＲＩＩの全長細胞外ドメイン又はＴＧＦβＲＩＩの切断部（例、Ｎ末端又はＣ末端切断部）を含むアミノ酸配列を含むが、配列が、ＴＧＦβに結合し、その生物学的活性を中和することができることを条件とする。一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質に付加される第一の結合モジュールは、ヒトＴＮＦβＲＩＩ受容体のＥＣＤから由来する組換えＴＧＦβ結合タンパク質である。

【０１１３】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性１９２３Ａｂ２０は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３から由来する二つのＦａｂを有する抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、及び各々がＦｃ定常鎖の各々のＣ末端に付着された、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチド（配列番号６７）を含む。

【０１１４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、表５中に開示される重鎖及び／又は軽鎖配列を含む。他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、表６中に開示される重鎖及び／又は軽鎖配列を含む。

【０１１５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、配列番号５１を含む重鎖配列及び配列番号４０を含む軽鎖配列を含む。

【０１１６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、配列番号４２、４５、及び５１からなる群から選択される重鎖配列、又は配列番号４２、４５、もしくは５１と少なくとも９０％の配列同一性を有するその断片を含む。

【０１１７】

他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、配列番号３９及び４０からなる群から選択される軽鎖配列、又は配列番号３９及び４０と少なくとも９０％の配列同一性を有するその断片誘導体を含む。

【０１１８】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的であり、ヒトＴＧＦβに結合する；

（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１と交差反応する；

（ｃ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する；

（ｄ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；又は

（ｅ）ヒトＴＧＦβを隔絶する；

【０１１９】

本開示はまた、本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の抗体ベースの免疫療法のために使用され得る。

【０１２０】
本開示はまた、患者における癌の治療のための方法に関し、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の少なくとも一つの治療有効量を患者に投与することを含む。
【０１２１】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性配列の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。
【０１２２】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。
【０１２３】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性ポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。
【０１２４】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性ポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。
【０１２５】
本開示はまた、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を提供し、（ａ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第一の抗原結合部位及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに（ｃ）ＣＤ１３７に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュールを含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１に結合する抗体足場モジュール、ヒトＴＧＦβに結合し、その活性を中和することが可能であるＴＧＦβ受容体ＩＩ結合タンパク質から由来するアミノ酸配列を含む第一の結合モジュール、及びＣＤ１３７に結合する第二の結合モジュールを含む組換えタンパク質の形態において構築される。
【０１２６】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、（ｉ）ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【０１２７】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１又は配列番号３において示される重鎖可変領域配列；及び配列番号２又は配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１２８】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１２９】
例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モ

ジュールは、配列番号１において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号３において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号４において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。

【０１３０】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４２において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号４５において示される重鎖配列及び配列番号４０において示される軽鎖配列を含む。

【０１３１】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、一つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、二つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含む抗体足場モジュールを有し、それにおいて、この抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又は第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、第一の結合モジュールインターリンカーは、配列番号５８において示されるように、Ｎ末端からＣ末端への配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、第一の結合モジュールインターリンカーは、配列番号５９において示されるように、Ｎ末端からＣ末端への配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体において一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列に又は抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に付着されている。

【０１３２】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第一の結合モジュールは、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体におけるＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインは、配列番号６７において示される配列を含む。

【０１３３】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖであり、それは、重鎖可変領域配列及び軽鎖可変配列を含み、それにおいて、配列は、直接的に又はｓｃＦｖ融合リンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーはグリシン及びセリンを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは配列Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ

－Ｓｅｒを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８において示される配列である。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５９において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５９において示される配列である。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第二の結合モジュールは、配列番号５３において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第二の結合モジュールは、配列番号５４において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第二の結合モジュールは、配列番号５５において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体における第二の結合モジュールは、配列番号５６において示される配列を含む。

【０１３４】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、二つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含む抗体足場モジュールを有し、それにおいて、抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又は第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。

【０１３５】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、第二の結合モジュールインターリンカーは、配列番号５８において示されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、第二の結合モジュールインターリンカーは、配列番号５９において示されている。

【０１３６】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。

【０１３７】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。

【０１３８】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体において一つを上回る第二の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列に又は抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に付着されている（例、一つの結合モジュールは、抗体足場モジュール中の重鎖のＣ末端に付着されてもよく、他の結合モジュールは、同じ重鎖のＮ末端に付着されてもよい）。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有し、それにおいて、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有し、それにおいて、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、二つの第二の結合モジュールを有し、それにおいて、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、他の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖである。

【０１３９】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む。

【０１４０】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号５３において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号５４において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号５５において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号５６において示される配列を含む。

【０１４１】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、二つの第一の結合モジュール及び二つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号３８において示される抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号３９において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号５０において示さ

れる抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号３９において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号５１において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの重鎖配列；ならびに配列番号５２において示される抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの軽鎖配列を含む。

【０１４２】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、二つの第一の結合モジュール及び一つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号４１において示される抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの重鎖配列；配列番号３９において示される抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列を含み、抗体足場モジュールの重鎖配列は、配列番号４２において示される配列を含む；抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列は、配列番号３９において示される配列を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性抗体が、Ｎ末端からＣ末端へ以下の構造を有する：抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの重鎖配列は、配列番号４３において示される配列を含み；抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列は、配列番号３９において示される配列を含み、抗体足場モジュールの重鎖配列は、配列番号４２において示される配列を含み；抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列は、配列番号３９において示される配列を含む。

【０１４３】

例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールは、定常領域をさらに含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、少なくとも一つのＦｃサイレンシング変異を含む。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域中でのＦｃサイレンシング変異は、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ又はＮ２９７Ａである。例示的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、ノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を含む。

【０１４４】

一部の実施形態によると、本開示は、１）ＰＤ－Ｌ１とその受容体ＰＤ－１間での相互作用を遮断する；２）ＣＤ１３７シグナル伝達についての架橋依存的アゴニスト活性を持つ；及び／又は３）ＴＧＦβの免疫抑制活性を中和するＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体（例、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ９、１９２３Ａｂ１０、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１９）を提供する。

【０１４５】

一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、抗体足場モジュールとして、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の一つ（例、１９２３Ａｂ２又は１９２３Ａｂ３）から由来するアミノ酸配列、及び第一の結合モジュールとして、本明細書中に開示されるヒトＴＧＦβＲＩＩ受容体のＥＣＤから由来するＴＧＦβ結合アミノ酸配列、及びＣＤ１３７の第二の結合モジュールとして、本明細書中に開示される、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質の一つ（例、１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５、又は１９２３Ａｂ６）から由来するアミノ酸配列を含む。

【０１４６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１結合相互作用を破壊し、Ｔ細胞のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント媒介性阻害を脱抑制する抗体足場モジュールを含む。ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールは、ＩｇＧ分子（例、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ９、１９２３Ａｂ１０、１９２３Ａｂ１７、１９２３Ａｂ１９）の形態であり得る。

【０１４７】

一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用を遮断し、ＣＤ１３７シグナル伝達についてのアゴニスト活性を持つ、ＣＤ１３７の第二の結合モジュールをさらに含む。代替的な実施形態では、ＣＤ１３７の第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖ（例、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ９、１９２３Ａｂ１０、１９２３Ａｂ１７、及び１９２３Ａｂ１９）を含み得る。代替的な実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールの重鎖又は軽鎖のＣ末端に融合された第二の結合モジュール（例、ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ）を含み得る。代替的な実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールの重鎖又は軽鎖のＮ末端に融合された第二の結合モジュール（例、ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ）を含み得る。

【０１４８】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する第二の結合モジュールは、ＣＤ１３７への一価結合に寄与する。代替的な実施形態では、ＣＤ１３７に結合する第二の結合モジュールは、ＣＤ１３７への二価結合に寄与する。

【０１４９】

一部の実施形態では、第二の結合モジュールは、ＣＤ１３７　ｓｃＦｖであり、ジスルフィド結合で安定化され得る。

【０１５０】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＴＧＦβの第一の結合モジュールを含む。一部の実施形態では、開示されているＴＧＦβの第一の結合モジュールは、ヒトＴＧＦβＲＩＩ受容体の細胞外ドメインを含む。ＴＧＦβの第一の結合モジュールは、腫瘍微小環境において存在するＴＧＦβの生物学的活性を中和するように機能する。代替的な実施形態では、ＴＧＦβの第一の結合モジュールは、ヒトＴＧＦβに結合することが可能であるヒトＴＮＦβＲＩＩ受容体の切断バージョン（例、Ｎ末端又はＣ末端切断）を含む。

【０１５１】

代替的な実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、ＴＧＦβの第一の結合モジュールが、リンカーを介して、ＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールのＣ末端に又は重鎖もしくは軽鎖のＮ末端に付着されているＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールを含む。

【０１５２】

一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、対称である分子設計を有する抗体足場モジュールを含む（例、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１９）。代替的な実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、非対称設計（例、１９２３Ａｂ９及び１９２３Ａｂ１０）により特徴付けられる。非対称の、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の重鎖のヘテロ二量体化を方向付けるために、ノブ・イントゥ・ホール（ＫＩＨ）技術を適用することができる。

【０１５３】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ７は、１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、各々が二つのＦｃ定常鎖の各々のＣ末端に別々に付着されている、１９２３Ａｂ４から由来するＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＶＨがＶＬに先行する）の形態における二つの第二の結合モジュール（配列番号５３）、及び各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着されている、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）を含む。

【０１５４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ９

は、１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異及びノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を伴う二つのＦｃ定常鎖を有するヘテロ二量体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（例、Ｆｃ定常鎖は配列番号６２及び６３において示される）、ノブＦｃ定常鎖のＣ末端に付着された、１９２３Ａｂ４から由来するＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＶＨがＶＬに先行する）の形態における一つの第二の結合モジュール（配列番号５３）、ならびに各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着されている、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）を含む。

【０１５５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１０は、１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異及びノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を伴う二つのＦｃ鎖を有するヘテロ二量体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（例、Ｆｃ定常鎖は配列番号６２及び６３において示される）、ノブＦｃ定常鎖のＣ末端に付着された、１９２３Ａｂ４から由来するＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＶＬがＶＨに先行する）の形態における一つの第二の結合モジュール（配列番号５４）、ならびに各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着された、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）を含む。

【０１５６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１７は、１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ鎖を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、各々がＦｃ鎖の各々のＣ末端に別々に付着された、１９２３Ａｂ４から由来するジスルフィド結合で安定化されたＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＶＨがＶＬに先行する）の形態における二つの第二の結合モジュール（配列番号５５）、及び各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着された、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）を含む。

【０１５７】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１９は、１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂを有するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ鎖を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着された、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）、及び各々がＦｃ鎖の各々のＣ末端に別々に付着された、１９２３Ａｂ４から由来する二つのＣＤ１３７の第二の結合モジュールジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５６）を含む。

【０１５８】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、表７中に開示される重鎖及び／又は軽鎖配列から由来するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュールを含む。代替的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、表７に従って対になった二つの重鎖及び軽鎖配列の組み合わせを含む。

【０１５９】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、以下の組み合わせから選択される、重鎖配列及び軽鎖配列を含む：

（ａ）配列番号３８を含む重鎖配列及び配列番号３９を含む軽鎖配列；

（ｂ）配列番号４８を含む重鎖配列及び配列番号４９を含む軽鎖配列；

（ｃ）配列番号５０を含む重鎖配列及び配列番号３９を含む軽鎖配列；ならびに

（ｄ）配列番号５１を含む重鎖配列及び配列番号５２を含む軽鎖配列。

【０１６０】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、以下の組み

合わせから選択される、二つの異なる可変重鎖配列（ノブ・イントゥ・ホールフォーマットを使用してヘテロ二量体化するように設計）及び可変軽鎖配列を含む：（ａ）配列番号４１を含む第一の重鎖配列、配列番号４２を含む第二の重鎖配列及び配列番号３９を含む軽鎖配列；ならびに（ｂ）配列番号４３を含む第一の重鎖配列、配列番号４２を含む第二の重鎖配列及び配列番号３９を含む軽鎖配列。

【０１６１】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号３８、４１、４２、４３、４８、５０及び５１からなる群から選択される重鎖配列、又は配列番号３８、４１、４２、４３、４８、５０もしくは５１と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。

【０１６２】

他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、配列番号３９、４９及び５２からなる群から選択される軽鎖配列、又は配列番号３９、４９もしくは５２と少なくとも９０％の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。

【０１６３】

一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、Ｆｃ　γＲとの架橋活性を消失／最小化するように操作されたＦｃ領域をさらに含み、それは、Ｔ細胞のＦｃ媒介性エフェクター機能をサイレンシング又は排除する。

【０１６４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、単独で、又は組み合わせにおいて、以下の機能的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７及びＴＧＦβに結合することが可能である；

（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７と交差反応する；

（ｃ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊（例、低下又は防止）する；

（ｄ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊する（例、低下させる又は防止する）；（ｅ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す；

（ｆ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；

（ｇ）ＴＧＦβシグナル伝達を阻害し、その生物学的活性を中和する；

（ｈ）ＣＤ１３７シグナル伝達へのＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ；

（ｉ）ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する；及び

（ｊ）ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる。

【０１６５】

本開示はまた、本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の治療のために使用され得る。

【０１６６】

本開示はまた、患者における癌の治療のための方法に関し、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の少なくとも一つの治療有効量を患者に投与することを含む。

【０１６７】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性配列の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。

【０１６８】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【０１６９】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性

ポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。
【０１７０】
本開示はまた、本明細書中に記載されるＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性ポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。
【０１７１】
本開示はまた、ＣＤ１３７、ＴＧＦβ、及びＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質を提供し、以下を含む：（ａ）ＣＤ１３７に結合する第一の抗原結合部位及びＣＤ１３７に結合する第二の抗原結合部位を含むＩｇＧフォーマットにおける抗体足場モジュール；（ｂ）ＴＧＦβに結合する第三の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第一の結合モジュール；ならびに（ｃ）ＰＤ－Ｌ１に結合する第四の抗原結合部位を含む少なくとも一つの第二の結合モジュール。一部の実施形態では、本開示はまた、ＣＤ１３７に結合する抗体足場モジュール、ヒトＴＧＦβに結合し、その活性を中和することが可能であるＴＧＦβ受容体ＩＩ結合タンパク質から由来するアミノ酸配列を含む第一の結合モジュール、及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の結合モジュールを含む組換えタンパク質の形態において構築されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体を提供する。
【０１７２】
例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号２２、及びＣＤＲ３：配列番号２３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号２４、ＣＤＲ２：配列番号２５、及びＣＤＲ３：配列番号２６を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号２７、ＣＤＲ２：配列番号２８、及びＣＤＲ３：配列番号２９を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３０、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号３１を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位は、ＣＤＲ１：配列番号３２、ＣＤＲ２：配列番号３３、及びＣＤＲ３：配列番号３４を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号３５、ＣＤＲ２：配列番号３６、及びＣＤＲ３：配列番号３７を含む軽鎖可変領域配列を含む。
【０１７３】
例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１６、配列番号１８、又は配列番号２０において示される重鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１７、配列番号１９、又は配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１７４】
例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１６において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１８において示される重鎖可変領域配列及び配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号２０において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列を含む。
【０１７５】
例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１６において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号１７において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧ

Ｆβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号１８において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号１９において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、配列番号２０において示される重鎖可変領域配列、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、又は配列番号６４において示される重鎖定常領域配列、配列番号２１において示される軽鎖可変領域配列、及び配列番号６５又は配列番号６６において示される軽鎖定常領域配列を含む。

【０１７６】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場部分は、配列番号７５において示される重鎖配列及び配列番号７６において示される軽鎖配列を含む。

【０１７７】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、一つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、二つの第一の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含む抗体足場モジュールを有し、それにおいて、抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又は第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着され、第一の結合モジュールインターリンカーは、配列番号５８において示されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、配列番号５９において示される第一の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。

【０１７８】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体において一つを上回る第一の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列に又は抗体足場モジュール配列の異なる末端に共有結合的に付着されている。

【０１７９】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体における第一の結合モジュールは、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインを含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体におけるＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインは、配列番号６７において示される配列を含む。

【０１８０】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体における第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖであり、それは、重鎖可変領域配列及び軽鎖可変配列を含み、それにおいて、配列は、直接的に又はｓｃＦｖ融合リンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーはグリシン及びセリンを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは配列Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒを含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８におい

て示される配列を含む。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５８において示される配列である。例示的な実施形態では、ｓｃＦｖ融合リンカーは、配列番号５９において示される配列を含む。ＣＤ１３７抗体が足場部分を提供する例示的なＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の実施形態では、第二の結合モジュールは、配列番号５７を含むＰＤ－Ｌ１に結合するｓｃＦｖである。

【０１８１】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、二つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む重鎖配列を含み、それにおいて、抗体足場モジュールは、Ｃ末端及びＮ末端を含む軽鎖配列を含み、第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端、抗体足場モジュール重鎖配列のＮ末端、抗体足場モジュール軽鎖配列のＮ末端、又はそれらの組み合わせに共有結合的に付着されており、場合により、第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、直接的に又は第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。

【０１８２】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、第二の結合モジュールインターリンカー、及び配列番号５８において示される第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュール及び抗体足場モジュールは、配列番号５９において示される第二の結合モジュールインターリンカーを通じて互いに共有結合的に付着されている。

【０１８３】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。

【０１８４】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第一の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。

【０１８５】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体において一つを上回る第二の結合モジュールがある場合、各々は、異なる抗体足場モジュール配列に又は抗体足場モジュールの異なる末端に共有結合的に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有し、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。

【０１８６】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、一つの第二の結合モジュールを有し、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、二つの第二の結合モジュールを有し、一つの第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール重鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着され、他の第二の結合モジュールは、抗体足場モジュール軽鎖配列のＣ末端に共有結合的に付着されている。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖである。

【０１８７】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、ＣＤＲ１：配列番号５、ＣＤＲ２：配列番号６、及びＣＤＲ３：配列番号７を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号８、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１０を含む軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、ＣＤＲ１：配列番号１１、ＣＤＲ２：配列番号１２、及びＣＤＲ３：配列番号１３を含む重鎖可変領域配列；ならびにＣＤＲ１：配列番号１４、ＣＤＲ２：配列番号９、及びＣＤＲ３：配列番号１５を含む軽鎖可変領域配列を含む。

【０１８８】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号１において示される重鎖可変領域配列及び配列番号２において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、Ｎ末端からＣ末端に、配列番号３において示される重鎖可変領域配列及び配列番号４において示される軽鎖可変領域配列を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の第二の結合モジュールは、配列番号５７において示される配列を含む。

【０１８９】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、二つの第一の結合モジュール及び二つの第二の結合モジュールを有する。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、抗体足場モジュール及び第二の結合モジュールの重鎖配列が配列番号４８を含み；ならびに抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールの軽鎖配列が配列番号４９を含む構造を有する。

【０１９０】

例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールは、定常領域をさらに含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、少なくとも一つのＦｃサイレンシング変異を含む。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域中でのＦｃサイレンシング変異は、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ又はＮ２９７Ａである。例示的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の抗体足場モジュールの定常領域は、ノブ・イン・ホール（ＫｉＨ）変異を含む。

【０１９１】

一部の実施形態によると、本開示は、１）ＣＤ１３７とそのリガンドの間での相互作用を遮断する；２）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する（例、低下させる又は防止する）；及び３）ＴＧＦβの免疫抑制活性を中和する、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体（１９２３Ａｂ１６）を提供する。

【０１９２】

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、抗体足場モジュールとして、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質の一つ（例、１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５又は１９２３Ａｂ６）から由来するアミノ酸配列、及び第一の結合モジュールとして、本明細書中に開示されるヒトＴＧＦβＲＩＩ受容体のＥＣＤか

ら由来するＴＧＦβ結合アミノ酸配列、及びＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールとして、本明細書中に開示されるＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の一つ（例、１９２３Ａｂ２、又は１９２３Ａｂ３）から由来するアミノ酸配列を含む。

【０１９３】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、ＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用を遮断し、ＣＤ１３７シグナル伝達についてのアゴニスト活性を持つ抗体足場モジュールを含む。ＣＤ１３７抗体足場モジュールは、ＩｇＧ分子（例、１９２３Ａｂ１６）又はその結合断片の形態であり得る。

【０１９４】

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１結合相互作用を破壊し、Ｔ細胞のＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント媒介性阻害を脱抑制する、ＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールをさらに含む。代替的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールは、ｓｃＦｖ（例、１９２３Ａｂ１６）を含み得る。代替的な実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、ＣＤ１３７抗体足場モジュールの重鎖又は軽鎖のＣ末端に融合されたＰＤ－Ｌ１　ｓｃＦｖの第二の結合モジュールを含み得る。

【０１９５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールは、ＰＤ－Ｌ１への一価結合に寄与する。代替的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールは、ＰＤ－Ｌ１への二価結合に寄与する。

【０１９６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１のｓｃＦｖの第二の結合モジュールは、ジスルフィド結合で安定化され得る。

【０１９７】

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、ＴＧＦβの第一の結合モジュールとして本明細書中に例示される腫瘍微小環境調節因子を含む。一部の実施形態では、開示されているＴＧＦβの第一の結合モジュールは、ヒトＴＧＦβＲＩＩ受容体の細胞外ドメインを含む。ＴＧＦβの第一の結合モジュールは、腫瘍微小環境において存在するＴＧＦβの生物学的活性を中和するように機能する。代替的な実施形態では、ＴＧＦβの第一の結合モジュールは、ヒトＴＧＦβに結合することが可能であるヒトＴＮＦβＲＩＩ受容体の切断バージョン（例、Ｎ末端又はＣ末端切断）を含み得る。

【０１９８】

代替的な実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、ＣＤ１３７抗体結合モジュールを含み、それにおいて、ＴＧＦβの第一の結合モジュールは、リンカーを介して、ＣＤ１３７抗体結合モジュールの重鎖又は軽鎖のＣ末端に又はＮ末端に付着されている。

【０１９９】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、対称である分子設計を有する。代替的な実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、非対称設計により特徴付けられる。非対称の開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の重鎖のヘテロ二量体化を方向付けるために、ノブ・イントゥ・ホール（ＫＩＨ）技術を適用することができる。

【０２００】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性１９２３Ａｂ１６は、１９２３Ａｂ４からの二つのＦａｂを有するＣＤ１３７抗体足場モジュール、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴う二つのＦｃ鎖を有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号６１）、各々がＦｃ鎖の各々のＣ末端に別々に付着された、１９２３Ａｂ３から由来する二つのＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールｓｃＦｖ（ＶＨがＶＬに先行する）（配列番号５７）、及び各々がＦａｂ中の各軽鎖のＣ末端に別々に付着された、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ド

メインをコードするポリペプチドとしての二つのＴＧＦβの第一の結合モジュール（配列番号６７）を含む。

【０２０１】

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、Ｆｃ　γＲとの架橋活性を消失／最小化するように操作されたＦｃ領域をさらに含み、それは、Ｔ細胞のＦｃ媒介性エフェクター機能をサイレンシング又は排除する。

【０２０２】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の機能的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７及びＴＧＦβに結合することが可能である；

（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７と交差反応する；

（ｃ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊（例、低下又は防止）する；

（ｄ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊（例、低下又は防止）する；

（ｅ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す；

（ｆ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；

（ｇ）ＴＧＦβシグナル伝達を阻害し、その生物学的活性を中和する；

（ｈ）ＣＤ１３７シグナル伝達へのＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ；

（ｉ）ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する；及び

（ｊ）ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる。

【０２０３】

本開示はまた、本明細書中に開示されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の少なくとも一つ、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、媒体及び／又は賦形剤を含む、あるいはそれらからなる医薬組成物を提供する。そのような医薬組成物は、癌の抗体ベースの免疫療法のために使用され得る。

【０２０４】

本開示はまた、患者における癌の治療のための方法に関し、単独で、又は別の治療用薬剤との組み合わせにおいて、本明細書中に開示されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の少なくとも一つの治療有効量を患者に投与することを含む。

【０２０５】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。本開示はまた、本明細書中に記載されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性配列の少なくとも一つをコードする単離ポリヌクレオチド配列を提供する。

【０２０６】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【０２０７】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性ポリヌクレオチド配列の少なくとも一つを含むベクターを提供する。

【０２０８】

本開示はまた、本明細書中に記載されるＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性ポリヌクレオチド配列の一つ、又は上のベクターの一つを含む細胞を提供する。

【図面の簡単な説明】

【０２０９】

前述の概要、ならびに以下の本開示の詳細な説明は、添付図面と併せて読まれる場合に、より良く理解されるであろう。本開示を例証する目的のために、図面中に示されるのは、現在好ましい実施形態である。しかし、本開示は、示される正確な配置、実施例、及び手段に限定されないことが理解されるべきである。

【０２１０】

【図１Ａ】図１Ａ～Ｋは、ＰＤ－Ｌ１に結合する又はＣＤ１３７に結合するヒト結合タン

パク質のＶＨドメイン及びＶＬドメインのアミノ酸配列、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体、及びＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７／ＴＧＦβ三重特異性体のＨＣ配列及びＬＣ配列、ならびに開示されている三重特異性体を調製するために使用されるｓｃＦｖサブユニットを提供する。抗ＰＤ－Ｌ１及び抗ＣＤ１３７のＣＤＲ配列（Ｋａｂａｔナンバリング）は、それらのそれぞれの可変ドメイン配列において下線が引かれている。配列識別子が提供される。

【図１Ｂ】同上。

【図１Ｃ】同上。

【図１Ｄ】同上。

【図１Ｅ】同上。

【図１Ｆ】同上。

【図１Ｇ】同上。

【図１Ｈ】同上。

【図１Ｉ】同上。

【図１Ｊ】同上。

【図１Ｋ】同上。

【０２１１】

【図２】図２Ａ～Ｂは、ＥＬＩＳＡによる、ヒト、マウス及びカニクイザルＰＤ－Ｌ１タンパク質に対するＰＤ－Ｌ１単一特異性体、Ａ）１９２３Ａｂ２及びＢ）１９２３Ａｂ３の結合活性を示す。

【０２１２】

【図３】図３は、画像結合アッセイによる、ヒトＰＤ－Ｌ１発現ＨＥＫ２９３Ｔにおける ＰＤ－Ｌ１単一特異性体の結合活性を示す。

【０２１３】

【図４】図４Ａ～Ｂは、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断レポーターアッセイによる、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－１の相互作用を遮断するための、ＰＤ－Ｌ１単一特異性体、Ａ）１９２３Ａｂ２及びＢ）１９２３Ａｂ３の活性を示す。

【０２１４】

【図５－１】図５Ａ～Ｃは、画像結合アッセイによる、ヒト、マウス、及びカニクイザルＣＤ１３７発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞へのＣＤ１３７単一特異性体の結合活性を示す。

【図５－２】同上。

【０２１５】

【図６】図６は、画像結合アッセイによる、ヒトＣＤ１３７発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞へのＣＤ１３７抗体の結合活性の比較を示す。

【０２１６】

【図７】図７は、バイオレイヤーインターフェロメトリ（ＢＬＩ）による、ＣＤ１３７に対するＣＤ１３７Ｌ結合を遮断するＣＤ１３７単一特異性体の活性を示す。

【０２１７】

【図８】図８は、ヒトＣＤ１３７及びＮＦκＢルシフェラーゼレポーターを発現するＨＥＫ２９３Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞に対するＣＤ１３７単一特異性体の架橋の効果を示す。

【０２１８】

【図９】図９は、ＩＦＮγ分泌を誘導するための抗ＣＤ３で刺激されたヒトＰＢＭＣに対するＣＤ１３７単一特異性体の架橋の効果を示す。

【０２１９】

【図１０－１】図１０Ａは、四つのヒト／マウスハイブリッドＣＤ１３７発現構築物の概略図を示す。ヒトＣＲＤ領域を、それらのマウス対応物により置換し、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞上で一過性に発現させた。図１０Ｂ～Ｆは、ヒトＣＤ１３７野生型（１０Ｂ）及びヒト／マウスハイブリッドＣＤ１３７タンパク質ｍｓＣＲＤ１（１０Ｃ）、ｍｓＣＲＤ２（１０Ｄ）、ｍｓＣＲＤ３（１０Ｅ）及びｍｓＣＲＤ４（１０Ｆ）に対する、ウレルマブ－Ｎ

Ｒ　（ＰＣ２）、ウレルマブ－ＮＲ（ＰＣ３）及び１９２３Ａｂ４の結合活性を示す。
【図１０－２】同上。
【図１０－３】同上。
【０２２０】
【図１１－１】図１１Ａは、ヒト及びマウスＣＤ１３７のＣＲＤ４ドメインの配列アライメントを示す。ヒトＣＤ１３７の五つの発現構築物は、Ｍ１－Ｍ５により示されるようにヒトアミノ酸配列をマウスアミノ酸配列に変化させ、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞上で一過性に発現させることにより生成された。図１１Ｂ～Ｇは、ヒトＣＤ１３７　ＷＴ（１１Ｂ）、ならびに五つの変異ヒトＣＤ１３７タンパク質Ｍ１（１１Ｃ）、Ｍ２（１１Ｄ）、Ｍ３（１１Ｅ）、Ｍ４（１１Ｆ）及びＭ５（１１Ｇ）に対するウレルマブ－ＮＲ（ＰＣ２）及び１９２３Ａｂ４の結合活性を示す。
【図１１－２】同上。
【図１１－３】同上。
【０２２１】
【図１２】図１２は、ＨＤＸ－ＭＳにより同定された、ヒトＣＤ１３７上の１９２３Ａｂ４のエピトープ領域（影付きバーとして描写される）を示す。ボックス領域は、ＣＤ１３７システインリッチドメイン（ＣＲＤ）領域を定義する。
【０２２２】
【図１３－１】図１３Ａ～１３Ｌは、開示されている二重特異性体及び三重特異性体の構造的特色を例証する：１９２３Ａｂ７（Ａ）；１９２３Ａｂ８（Ｂ）、１９２３Ａｂ９（Ｃ）、１９２３Ａｂ１０（Ｄ）、１９２３Ａｂ１１（Ｅ）、１９２３Ａｂ１２（Ｆ）、１９２３Ａｂ１３（Ｇ）、１９２３Ａｂ１６（Ｈ）、１９２３Ａｂ１７（Ｉ）、１９２３Ａｂ１８（Ｊ）、１９２３Ａｂ１９（Ｋ）及び１９２３Ａｂ２０（Ｌ）。
【図１３－２】同上。
【図１３－３】同上。
【０２２３】
【図１４】図１４Ａ～１４Ｂは、開示されている二重特異性体（Ａ）及び開示されている三重特異性体（Ｂ）を含む重鎖及び軽鎖を記載する。
【０２２４】
【図１５】図１５は、結合タンパク質を構築するために使用される抗体足場モジュール及び結合モジュールの構造的及び機能的サブコンポーネントの詳細な説明を提供する。
【０２２５】
【図１６】図１６Ａ～１６Ｂは、画像結合アッセイ（Ａ）及びフローサイトメトリー（Ｂ）による、ヒトＣＤ１３７発現ＨＥＫ２９３Ｔにおける二重特異性抗体及び三重特異性抗体の結合活性を示す。
【０２２６】
【図１７】図１７Ａ～１７Ｂは、ＨＥＫ２９３Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞（Ａ）及びＪｕｒｋａｔ　Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞（Ｂ）を使用した、ＣＤ１３７シグナル伝達に対する二重特異性体及び三重特異性体のアゴニスト活性を示す。
【０２２７】
【図１８Ａ】図１８Ａ～１８Ｂは、標的細胞（Ａ）の存在における又は標的細胞（Ｂ）の非存在におけるＪｕｒｋａｔ　Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞を使用した二重特異性体及び三重特異性体によるＣＤ１３７シグナル伝達の標的細胞依存的活性化を示す。
【図１８Ｂ】同上。
【０２２８】
【図１９】図１９Ａ～１９Ｂは、抗体の異なる領域でＣＤ１３７のｓｃＦｖを融合することにより生成された（Ａ）三重特異性体及び（Ｂ）二重特異性体の標的細胞依存的な活性化ＣＤ１３７シグナル伝達を示す。ＣＤ１３７シグナル伝達活性を、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞ＣＤ１３７レポーター細胞を使用して評価した。
【０２２９】

【図２０】図２０は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断レポーターアッセイによる、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－１の相互作用を遮断するための二重特異性体及び三重特異性体の活性を示す。
【０２３０】
【図２１】図２１は、ＴＧＦβ遮断レポーターアッセイによる、ＴＧＦβ誘導シグナル伝達を遮断するための三重特異性体の阻害活性を示す。
【０２３１】
【図２２】図２２Ａ～２２Ｂは、ＩＦＮγ分泌を誘導するための、抗ＣＤ３で刺激されたヒトＰＢＭＣに対する二重特異性体及び三重特異性体の効果を示す。
【０２３２】
【図２３】図２３Ａ～２３Ｂは、（Ａ）Ｔ細胞媒介性死滅活性ならびに（Ｂ）内因性ＰＤ－Ｌ１を発現するＮＵＧＣ４腫瘍細胞と共培養されたヒトＣＤ８　Ｔ細胞上での二重特異性体及び三重特異性体のＩＦＮγ分泌の誘導を示す。
【０２３３】
【図２４】図２４は、ＣＭＶリコールアッセイにおいてＣＭＶ溶解物で刺激されたヒトＰＢＭＣに対する二重特異性体及び三重特異性体の抗原特異的Ｔ細胞活性化の活性を示す。ＩＦＮγの分泌レベルを、Ｔ細胞活性化の指標として測定した。
【０２３４】
【図２５】図２５は、１９２３Ａｂ１８又は媒体対照を用いた処理時のＭＣ３８－ｈ－ＰＤ－Ｌ１腫瘍担持ｈＣＤ１３７及びｈＤＰ－Ｌ１二重ノックインマウスにおける腫瘍成長を示す。２１日目の異なる処置群からの腫瘍サイズの一元配置分散分析をプロットした。
【０２３５】
【図２６－１】図２６Ａ～２６Ｅは、１９２３Ａｂ１８又は媒体対照を用いた処理時の、ＭＣ３８－ｈ－ＰＤ－Ｌ１腫瘍担持ｈＣＤ１３７及びｈＤＰ－Ｌ１二重ノックインマウスからの腫瘍浸潤リンパ球の分析を示す。（Ａ）ＣＤ３＋ＣＤ４５＋、（Ｂ）ＣＤ４＋ＣＤ３＋、（Ｃ）ＣＤ８＋ＣＤ３＋、（Ｄ）ＣＤ３＋中のＴｒｅｇ、及び（Ｅ）ＣＤ８／Ｔｒｅｇ比率のパーセンテージを要約した。
【図２６－２】同上。
【発明を実施するための形態】
【０２３６】
ＰＤ－１及びそのリガンド、プログラム死リガンド－１及びプログラム死リガンド－２（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｔ細胞活性化、耐性、及び免疫病理の間のバランスを調節する共阻害因子として作用する。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１シグナル伝達軸を標的化することは、著しい治療探索の領域である。本開示は、癌の処置のために使用することができる、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１単一特異性体）、ＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体）、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβに結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体）、ならびにＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及びＣＤ１３７に結合する結合タンパク質（ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性）を含む、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質を提供する。有利なことに、本明細書中に開示される結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１の阻害を可能にし、より低い用量製剤をもたらし、より少ない頻度及び／又はより効果的な投薬をもたらし、低下したコスト及び増加した効率をもたらす。本開示がより容易に理解され得るように、特定の技術用語及び科学用語が以下に具体的に定義される。本文書中の他の箇所で具体的に定義されない限り、本明細書中で使用される他の全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味を有する。
【０２３７】
本開示全体を通して、以下の略語が使用される：
ｍＡｂ又はＭａｂ又はＭＡｂ－モノクローナル抗体。
ＣＤＲ－免疫グロブリン可変領域中の相補性決定領域。
ＶＨ又はＶＨ－免疫グロブリン重鎖可変領域。
ＶＬ又はＶＬ－免疫グロブリン軽鎖可変領域。

Ｆｃ又はＦｃ領域－ＣＨ２及びＣＨ３ドメインならびにヒンジ領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖の定常領域。
Ｆａｂ又はＦａｂ断片－ＶＨ、ＣＨ１及びＶＬ、ＣＬ領域からなる抗体の一価抗原結合断片。
ＦＲ－抗体フレームワーク領域、ＣＤＲ領域を除く免疫グロブリン可変領域
【０２３８】
本明細書中に記載されるように、用語「ＰＤ－Ｌ１」は、バリアント、アイソフォーム、ホモログ、オルソログ、及びパラログを含む。例えば、ヒトＰＤ－Ｌ１タンパク質について特異的な抗体は、特定の場合では、ヒト以外の種からのＰＤ－Ｌ１タンパク質と交差反応し得る。他の実施形態では、ヒトＰＤ－Ｌ１タンパク質について特異的な抗体は、ヒトＰＤ－Ｌ１タンパク質について特別であり得るが、種又は他の種類の交差反応性を示してもよく、あるいは特定の他の種からのＰＤ－Ｌ１と交差反応してもよいが、しかし、全ての他の種とはしなくてもよい（例、サルＰＤ－Ｌ１と交差反応するが、しかし、マウスＰＤ－Ｌ１とはしない）。用語「ヒトＰＤ－Ｌ１」は、ヒト配列ＰＤ－Ｌ１、例えばＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿０５４８６２を有するヒトＰＤ－Ｌ１の完全なアミノ酸配列などを指す。ＰＤ－Ｌ１は、Ｂ７タンパク質ファミリーのメンバーであり、Ｂ７．１及びＢ７．２と約２０％のアミノ酸配列同一性を共有する。ヒトＰＤ－Ｌ１は、それぞれ、マウス及びカニクイザルＰＤ－Ｌ１オルソログと７０％及び９３％のアミノ酸配列同一性を共有する。
【０２３９】
本明細書中で使用される場合、用語「ＰＤ－１」、「ＰＤ１」、「プログラム細胞死タンパク質１」、「ＣＤ２７９」、及び「分化抗原群２７９」（例、Ｇｅｎｅｂａｎｋ受入番号ＮＰ＿００５００９（ヒト））は、Ｔ細胞調節因子の拡張ＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４ファミリーのメンバーであるＩ型膜タンパク質を意味する。ＰＤ１は、細胞外ＩｇＶドメイン、それに続く膜貫通領域を含み、細胞内尾部ＰＤ１は、活性化Ｔ細胞、Ｂ細胞、及びマクロファージの表面上に発現される。
【０２４０】
用語「ＣＤ１３７」は、４－１ＢＢ又はＴＮＦＲＳＦ９（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー９）を指し、ＴＮＦ受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）のメンバーであり、免疫細胞、自然免疫細胞及び適応免疫細胞の両方の活性化後に発現される共刺激分子である。本明細書中で使用される場合、４－１ＢＢは、哺乳動物、例えば、ホモサピエンス（ヒト）（ＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿００１５５２）から由来し得る。本明細書中で記載される場合、用語ＣＤ１３７は、バリアント、アイソフォーム、ホモログ、オルソログ、及びパラログを含む。例えば、ヒトＣＤ１３７タンパク質について特異的な抗体は、特定の場合では、ヒト以外の種からのＣＤ１３７タンパク質と交差反応してもよい。他の実施形態では、ヒトＣＤ１３７タンパク質について特異的な抗体は、ヒトＣＤ－１３７タンパク質について完全に特異的であり得るが、種又は他の種類の交差反応性を示してもよく、あるいは特定の他の種からのＣＤ１３７と交差反応してもよいが、しかし、全ての他の種とはしなくてもよい（例、サルＣＤ１３７と交差反応するが、しかし、マウス４－１ＢＢとはしない）。用語「ｃｙｎｏ　ＣＤ１３７」は、カニクイザルＣＤ１３７、例えばＮＣＢＩ受入番号ＸＰ＿００５５４４９４５．１を有する完全アミノ酸配列などを指す。用語「マウスＣＤ１３７」は、マウス配列４－１ＢＢ、例えばＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿０３５７４２．１を有するマウス４－１ＢＢの完全アミノ酸配列などを指す。本開示中のヒトＣＤ１３７配列は、例えば、保存変異又は非保存領域中の変異を有することにより、ＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿００１５５２のヒトＣＤ１３７とは異なり得るが、本開示中のＣＤ１３７は、ＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿００１５５２のヒトＣＤ１３７と実質的に同じ生物学的機能を有する。
【０２４１】
本明細書中で使用される場合、用語「トランスフォーミング成長因子ベータ」、「ＴＧＦ－ベータ」、又は「ＴＧＦβ」は、任意のＴＧＦ－ベータタンパク質を指し得るが、限

定されないが、ＴＧＦ－ベータ１、ＴＧＦ－ベータ２、及びＴＧＦ－ベータ３を含み、天然ＴＧＦ－ベータタンパク質及び合成タンパク質を含み、バリアント及び模倣体を含む。ＴＧＦ－ベータタンパク質は、構造的に類似の調節タンパク質のスーパーファミリーのメンバーであり、限定されないが、哺乳動物ＴＧＦ－β－１、２、及び３、インヒビン、アクチビンならびに骨形態形成タンパク質を含む。成熟ＴＧＦ－ベータは、典型的には、ホモ二量体、例えば、二つの共有結合的に会合されたＴＧＦ－ベータ分子を含む二量体成熟ＴＧＦ－ベータ分子などとして存在する。

【０２４２】

本明細書中で使用される場合、用語「ＴＧＦβ受容体ＩＩ」（「ＴＧＦβＲＩＩ」）は、野生型ヒトＴＧＦβ受容体２型アイソフォームＡ配列もしくはアイソフォームＢ配列、又はＴＧＦβに結合するその一部を有するポリペプチド（例、それぞれ、ＮＣＢＩ参照配列（ＲｅｆＳｅｑ）登録番号ＮＰ＿００１０２００１８もしくはＮＰ＿００３２３３．４のアミノ酸配列）を意味し、例えば、配列番号７４を含む、又は配列番号７４のアミノ酸配列と実質的に同一の配列を有する。ＴＧＦβＲＩＩは、野生型配列のＴＧＦβ結合活性の少なくとも０．１％、０．５％、１％、５％、１０％、２５％、３５％、５０％、７５％、９０％、９５％、又は９９％を保持し得る。発現されたＴＧＦβＲＩＩのポリペプチドは、シグナル配列を欠く。

【０２４３】

本明細書中の用語「抗体」は、最も広い意味において使用され、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、及び三重特異性抗体を含む。

【０２４４】

本明細書中の用語「抗体足場モジュール」は、二つの重鎖及び二つの軽鎖を有するＹ字形状抗体を指す。二つの重鎖は、ジスルフィド結合により互いに連結され、各重鎖は、ジスルフィド結合により軽鎖に連結される。抗体足場は、その重鎖及び／又は軽鎖の一つ又は複数に付着された一つ又は複数の結合モジュールを有し得る。抗体結合足場は、二つのＦａｂ、及び二つの定常領域配列を有するＦｃ部分を含む。

【０２４５】

例示的な抗体、例えばＩｇＧなどは、二つの重鎖及び二つの軽鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中ではＶＨと省略される）及び重鎖定常領域で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中ではＶＬと省略される）及び軽鎖定常領域で構成される。ＶＨ及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存されている領域が点在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域中にさらに細分化され得る。各ＶＨ及びＶＬは、以下の順序においてアミノ末端からカルボキシ末端に配置された、三つのＣＤＲ及び四つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【０２４６】

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」又は「ｍＡｂ」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、例えば、集団を含む個々の抗体は、例えば、天然に生じる変異を含む、又はモノクローナル抗体調製物の産生及び／又は保存中に生じる、可能性のあるバリアント抗体を除いて、同一である、及び／又は同じエピトープに結合する。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対して向けられ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、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられる。このように、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られているとして抗体の特徴を示し、任意の方法による抗体の産生を要求とすると解釈されるべきではない。例えば、本開示に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ方法、組換えＤＮＡ方法、ファージディスプレイ方法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な技術、そのような方法及び本明細書中に記載されるモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法により作製されてもよ

い。

【０２４７】

用語「キメラ抗体」は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が、特定の種から由来する、又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一である、又はそれと相同である組換え抗体を指す一方で、鎖の残りの部分は、別の種から由来する、又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにそのような抗体の断片における対応する配列と同一である、又はそれと相同であり、それらが所望の生物学的活性を示す限りである。また、相補性決定領域（ＣＤＲ）移植を実施して、親和性又は特異性を含む、抗体分子の特定の特性を変化させてもよい。典型的には、可変ドメインは、実験動物、例えば齧歯類などからの抗体（親抗体）から得られ、定常ドメイン配列は、ヒト抗体から得られ、結果として得られたキメラ抗体は、ヒト対象においてエフェクター機能を向けることができ、それが由来する親（例、マウス）抗体よりも有害な免疫応答を誘発する可能性が低くなるようにする。

【０２４８】

「ヒト抗体」は、ヒトにより産生された抗体のものに対応するアミノ酸配列を持つ抗体であり、及び／又は当業者に公知のヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製されている。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に除外する。ヒト抗体は、Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，ｐ．７７（１９８５）；Ｂｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１４７（Ｉ）：８６－９５（１９９１）において記載される方法を含む、当技術分野において公知の様々な技術を使用して産生することができる。また、ｖａｎ Ｄｉｊｋ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅ Ｗｉｎｋｅｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ，５：３６８－７４（２００１）を参照のこと。ヒト抗体は、抗原チャレンジへの応答においてそのような抗体を産生するように改変されているが、しかし、その内因性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば免疫化ＨｕＭａｂマウス（例、ＨｕＭａｂマウスに関する、Ｎｉｌｓ Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－８５９、ＷＯ９８／２４８８４、ＷＯ９４／２５５８５、ＷＯ９３／１２２７、ＷＯ９２／２２６４５、ＷＯ９２／０３９１８及びＷＯ０１／０９１８７を参照のこと）、Ｘｅｎｏｍｉｃｅ（例、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）技術に関する米国特許第６，０７５，１８１号及び第６，１５０，５８４号を参照のこと）又はＴｒｉａｎｎｉマウス（例、ＷＯ２０１３／０６３３９１、ＷＯ２０１７／０３５２５２、及びＷＯ２０１７／１３６７３４を参照のこと）に標的抗原を投与することにより調製することができる。

【０２４９】

用語「ヒト化抗体」は、重鎖及び／又は軽鎖の非ヒト（例、マウス、ラット、又はハムスター）相補性決定領域（ＣＤＲ）と一緒に、可変領域中で一つ又は複数のヒトフレームワーク領域を含むように操作された抗体を指す。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域を除いて完全にヒトである配列を含む。ヒト化抗体は、典型的には、非ヒト化抗体に比べて、ヒトに対する免疫原性が低く、このように、特定の状況において治療的利益を提供する。当業者は、ヒト化抗体を認識し、また、それらの生成のための適切な技術を認識しているであろう。例えば、Ｈｗａｎｇ，Ｗ．Ｙ．Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：３５，２００５；Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：１００２９－１００３３，１９８９；Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－２５，１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－２７，１９８８；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－３６，１９８８；Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：３８３３－３７，１９８９；米国特許第５，２２５，５３９号；第５，５３０，１０１号；第５，５８５，０８９号；第５，６９３，７６１号；第５，６９３，７６２号；第６，１８０，３７０号；及びＳｅｌｉｃｋ ｅｔ ａｌ．、ＷＯ９０／０７８６１を参照のこと。それらの各々が、参

照により、その全体において本明細書中に組み入れられる。
【０２５０】
抗体の「クラス」は、その重鎖により持たれる定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体の五つの主要なクラスがある：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭであり、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、及びＩｇＡ２にさらに分割され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。
【０２５１】
抗体の抗体の用語「抗原結合ドメイン」（又は単に「結合ドメイン」）又は類似の用語は、抗原複合体に特異的に結合する能力を保持する抗体の一つ又は複数の断片を指す。抗体の用語「抗原結合部分」内に包含される結合断片の例は、（ｉ）Ｆａｂ断片、ＶＬドメイン、ＶＨドメイン、ＣＬドメイン及びＣＨ１ドメインからなる一価断片；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）２断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された二つのＦａｂ断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）ＶＨドメイン及びＣＨドメインからなるＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬドメイン及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；（ｖ）ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６）；（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、ならびに（ｖｉｉ）場合により合成リンカーにより連結され得る二つ又はそれ以上の単離されたＣＤＲの組み合わせを含む。
【０２５２】
「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」は、この用語が本明細書中で使用される場合、特定の抗原認識を媒介することに主に関与している重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内の短いポリペプチド配列を指す。各ＶＬ及び各ＶＨ内に三つのＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と呼ばれる）がある。本明細書中で他に記載されない限り、ＣＤＲ及びフレームワーク領域は、Ｋａｂａｔナンバリングスキームに従って注釈付けされる（Ｋａｂａｔ Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｉｎ：ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２，ＵＳＤｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ）。
【０２５３】
他の実施形態では、抗体のＣＤＲは、参照により、その全体において本明細書中に組み入れられる、ＭａｃＣａｌｌｕｍ ＲＭ ｅｔ ａｌ、（１９９６）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６２：７３２－７４５に従って決定することができる。他の実施形態では、抗体のＣＤＲは、ＡｂＭナンバリングスキームに従って決定することができ、それはＡｂＭ超可変領域を指し、それは、Ｋａｂａｔ ＣＤＲ及びＣｈｏｔｈｉａ構造ループの間での妥協を表し、参照により、その全体において本明細書中に組み入れられるＯｘｆｏｒｄ ＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデリングソフトウェア（Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｉｎｃ．）により使用される。ＣＤＲはまた、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｉｎ：Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．における配列比較により定義され得るのに対し、ＨＶＬは、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，１９８７，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７により記載されるように、可変ドメインの三次元構造に従って構造的に定義される。これら二つの方法が、ＣＤＲのわずかに異なる同定をもたらす場合、構造的定義が好まれる。Ｋａｂａｔにより定義されるように、軽鎖可変ドメインにおいて、ＣＤＲ－Ｌ１は約残基２４～３４に、ＣＤＲ－Ｌ２は約残基５０～５６に、及びＣＤＲ－Ｌ３は約残基８９～９７に位置する；重鎖可変ドメインにおいて、ＣＤＲ－Ｈ１は約残基３１～３５に、ＣＤＲ－Ｈ２は約残基５０～６５に、及びＣＤＲ－Ｈ３は約残基９５～１０２に位置する。ＩＭ

ＧＴ及びＮＯＲＴＨは、ＣＤＲの代替的な定義を提供する（Ｌｅｆｒａｎｃ ＭＰ．Ｕｎｉｑｕｅ ｄａｔａｂａｓｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ（１９９７）１８：５０９；及びＮｏｒｔｈ Ｂ，Ｌｅｈｍａｎｎ Ａ，Ｄｕｎｂｒａｃｋ ＲＬＪ．Ａ ｎｅｗ ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ＣＤＲ ｌｏｏｐ ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．（２０１１）４０６：２２８－５６を参照のこと）。加えて、ＣＤＲは、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐ（ＣＣＧ）ナンバリング（Ａｌｍａｇｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ２０１１；７９：３０５０－３０６６及びＭａｉｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ２０１４；８２：１５９９－１６１０）に従って定義され得る。ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３は、従って、所与の抗体について特異的な、固有の及び機能的な特性を定義する。

【０２５４】

抗体の「可変ドメイン」（Ｖドメイン）は、結合を媒介し、特定の抗体の抗原特異性を付与する。しかし、変動性は、可変ドメインの１１０アミノ酸スパンにわたって均等に分布しない。代わりに、Ｖ領域は、各々９～１２アミノ酸長である「超可変領域」又はＣＤＲとして本明細書中で言及される極度の可変性のより短い領域により分離される１５～３０アミノ酸のフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる比較的不変のストレッチからなる。当業者により理解されるように、ＣＤＲの正確なナンバリング及び配置は、異なるナンバリングシステムの間で異なり得る。しかし、可変重鎖及び／又は可変軽鎖配列の開示は、関連付けられるＣＤＲの開示を含むことが理解されるべきである。したがって、各可変重鎖領域の開示は、ｖｈＣＤＲ（例、ｖｈＣＤＲ１、ｖｈＣＤＲ２、及びｖｈＣＤＲ３）の開示であり、各可変軽鎖領域の開示は、ｖｌＣＤＲ（例、ｖｌＣＤＲ１、ｖｌＣＤＲ２及びｖｌＣＤＲ３）の開示である。

【０２５５】

「Ｆｖ」は、緊密な、非共有結合的な会合における一つの重鎖可変領域ドメイン及び一つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これら二つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する、六つの超可変ループ（各々、Ｈ鎖及びＬ鎖からの３ループ）が発せられる。

【０２５６】

「単鎖可変断片」又は「ｓｃＦｖ」は、免疫グロブリンの重鎖（V_H）及び軽鎖（V_L）の可変領域の融合タンパク質を指す。ｓＦｖの総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照のこと。一部の態様では、領域は、１０～約２５アミノ酸の短いリンカーペプチドと接続される。リンカーは、柔軟性のためにグリシンにおいて、ならびに溶解性のためにセリン又はスレオニンにおいて豊富であり得るが、V_HのＮ末端をV_LのＣ末端と接続する、又はその逆であり得る。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、本来の免疫グロブリンの特異性を保持する。ジスルフィド安定化ｓｃＦｖは、ＶＨ又はＶＬ中の特定の残基を変異させることにより、対になったシステインを導入することにより操作することができる。これらの残基は、ＶＨ及びＶＬの界面にある。参考文献Ｗｅａｔｈｅｒｉｌｌ，Ｅ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｔｏｗａｒｄｓ ａ ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ｄｉｓｕｌｐｈｉｄｅ ｓｔａｂｉｌｉｓｅｄ ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ ｆｏｒｍａｔ：ｉｍｐｏｒｔａｎｃｅ ｏｆ ｉｎｔｅｒｃｈａｉｎ ｄｉｓｕｌｐｈｉｄｅ ｂｏｎｄ ｌｏｃａｔｉｏｎ ａｎｄ ｖＬ－ｖＨ ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ ２５，３２１－３２９を参照してください。ＮｏｖａＲｏｃｋは実施例においてＶＨ４４－ＶＬ１００を使用した。

【０２５７】

「フレームワーク」又は「フレームワーク領域」又は「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般的に、四つのＦＲド

メインからなる：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４。
【０２５８】
「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列の選択において最も一般に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンＶＬ配列又はＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般的に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ Ｍｄ．（１９９１），Ｖｏｌｓ．１－３におけるサブグループである。一実施形態では、ＶＬについては、サブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（上記）におけるように、サブグループカッパＩである。一実施形態では、ＶＨについては、サブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（上記）におけるように、サブグループＩＩＩである。
【０２５９】
「ヒンジ領域」は、一般的に、ヒトＩｇＧ１の２１６～２３８（ＥＵナンバリング）又は２２６～２５１（Ｋａｂａｔナンバリング）のストレッチとして定義される。ヒンジは、三つの別個の領域、上部、中間（例、コア）、及び下部ヒンジ中にさらに分割することができる。
【０２６０】
用語「Ｆｃ領域」及び「定常領域」は、定常領域の少なくとも一部分を含む免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために本明細書中で使用される。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及びバリアントＦｃ領域を含む。一実施形態では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６から、又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在しても又は存在しなくてもよい。本明細書中で他に指定されない限り、Ｆｃ領域又は定常領域中でのアミノ酸残基のナンバリングは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）において記載されるように、ＥＵインデックスとも呼ばれる、ＥＵナンバリングシステムに従っている。
【０２６１】
特定のＦｃ受容体との抗体Ｆｃ領域の相互作用から由来する用語「エフェクター機能」は、必ずしも限定されないが、Ｃｌｑ結合、補体依存的細胞傷害性（ＣＤＣ）、ＦｃγＲ媒介性エフェクター機能、例えば抗体依存的細胞傷害性（ＡＤＣＣ）など、抗体依存的細胞媒介性貪食（ＡＤＣＰ）、及び細胞表面受容体の下方調節を含む。そのようなエフェクター機能は、一般的に、抗原結合ドメイン（例、抗体可変ドメイン）と組み合わされるＦｃ領域を要求する。
【０２６２】
用語「Ｔ細胞依存的細胞傷害性」（ＴＤＣＣ）は、分子が腫瘍細胞に同時に結合し、細胞傷害性Ｔ細胞と会合し、Ｔ細胞及び標的細胞を近接させることにより細胞溶解を向け直す場合での一連の事象を記載する。ＡＤＣＣ及びＴＤＣＣの活性化は、両方とも、標的細胞の死滅をもたらす。しかし、これら二つの別個の種類の細胞傷害性の間には、一部の主要な差がある。ＡＤＣＣ効果は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞上に発現されるＦｃγ受容体を通じて媒介され、標的細胞の表面上に付着された抗体の定常領域に結合する。ＴＤＣＣ効果は、標的細胞に近接した細胞傷害性Ｔ細胞を会合させることを通じて媒介される。
【０２６３】
用語「Ｆｃ受容体」又は「ＦｃＲ」は、Ｂリンパ球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、及び肥満細胞を含む特定の免疫細胞の膜に位置付けられる抗原認識において含まれる免疫グロブリンのＦｃ領域に結合する抗体受容体を記載する。ＩｇＧのＦｃ

部分を認識するＦｃ受容体は、Ｆｃガンマ受容体（ＦｃγＲ）と呼ばれる。ＦｃγＲファミリーは、これらの受容体の対立遺伝子バリアント及び選択的スプライシング形態を含む。ＩｇＧ結合のための構造、機能、及び親和性の差に基づいて、ＦｃγＲは、三つの主要な群に分類される：ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ（ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂ）及びＦｃγＲＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩａ及びＦｃγＲＩＩＩｂ）。それらの間で、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）、及びＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）は、ＦｃγＲＩ及びＦｃγＲＩＩＩａのγサブユニット中に、又はＦｃγＲＩＩａの細胞質尾部中に、シグナル伝達モチーフ、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含む活性化受容体である。抗原－抗体複合体の結合後、活性化Ｆｃγ受容体（ヒト：ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＣ、ＦｃγＲＩＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＩＢ及びマウス：ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＩ、ＦｃγＲＩＶ）は、免疫エフェクター機能を誘発する。対照的に、ＦｃγＲＩＩｂ（ＣＤ３２ｂ）は阻害性受容体である。ＦｃγＲＩＩｂの架橋は、免疫受容体チロシンベースの阻害性モチーフ（ＩＴＩＭ）のリン酸化及び阻害性シグナル伝達形質導入に導く（Ｐａｔｅｌ ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１９；１０：２２３．）。

【０２６４】

用語「Ｆｃサイレンシング」は、Ｆｃ ＧＲ及び補体との結合活性を最小化／消失させ、Ｆｃ媒介性エフェクター機能のサイレンシング又は排除に導くように操作されているＦｃ領域を指す。Ｆｃを操作するための戦略は、Ｆｃグリコシル化の修飾、ＩｇＧサブクラスのハイブリッドの使用、あるいはヒンジ及び／又はＣＨ２領域中に一つ又は複数の変異を導入することを含む。Ｆｃをサイレンシングするエフェクター機能及びそれぞれの変異について重要な残基は、当技術分野において公知であり、例えば、Ｓｔｒｏｈｌ，ＷＲ ａｎｄ Ｓｔｒｏｈｌ ＬＭ，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｃ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｏｐｔｉｍａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ”Ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ：Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（２０１２），ｐｐ ２４２、国際特許出願第ＷＯ２０１７００８１６９Ａ１号及び第ＷＯ２０２１０５５６６９号。

【０２６５】

ヒトＩｇＧ１ Ｆｃをサイレンシングするように操作することができる部位についての具体的な、非限定的な例は、全てＥＵナンバリングにおいて、Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｇ２３７、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ｐ３２９、Ｐ３３１を含む。

【０２６６】

本明細書中で使用される場合、用語「Ｔ調節性細胞」又は「Ｔｒｅｇ」は、他の免疫細胞、例えばＣＤ８陽性（ＣＤ８＋）エフェクターＴ細胞などの増殖、活性化、及び細胞傷害能力を抑制する／阻害することにより、調節的な役割を有する免疫系の細胞を指す。調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、マスター転写因子フォークヘッドボックスＰ３（Ｆｏｘｐ３）の発現により特徴付けられる。Ｔｒｅｇ細胞の二つの主要なサブセットがあり、胸腺において発生する「天然」Ｔｒｅｇ（ｎＴｒｅｇ）細胞、及びＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３－従来のＴ細胞から末梢中で生じる「誘導」Ｔｒｅｇ（ｉＴｒｅｇ）細胞である。天然Ｔｒｅｇは、ＣＤ４ Ｔ細胞共受容体、及びＩＬ－２受容体の構成要素であるＣＤ２５の両方を発現するとして特徴付けられる。Ｔｒｅｇは、このように、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋である。核転写因子フォークヘッドボックスＰ３（ＦｏｘＰ３）の発現は、天然Ｔｒｅｇの発生及び機能を決定する定義特性である。Ｔｒｅｇ細胞は、阻害性サイトカイン（例、ＩＬ－１０、ＴＧＦβ、ＩＬ－３５）の分泌、樹状細胞機能／成熟の調節、免疫調節性表面分子（例、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３）の発現、又は細胞溶解（例、グランザイムＡ及び／又はＢ媒介性）による抑制を含む、多数の作用の様式によりそれらの抑制効果を発揮する。

【０２６７】

本明細書中で使用される場合、用語「二重特異性」は、抗体足場モジュール及び第一の結合モジュールを含む結合タンパク質を指し、それにおいて、モジュールは、二つの異なる抗原についての結合特異性を有する抗体及び／又は受容体タンパク質から由来する。一

実施形態では、抗体足場モジュールは、ＰＤ－Ｌ１についての結合特異性を有し、第一の結合モジュールは、例えば、細胞表面タンパク質、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、腫瘍微小環境調節因子、サイトカインなどについての、任意の他の抗原についての結合特異性を有する。別の実施形態では、抗体足場モジュールは、ＣＤ１３７についての結合特異性を有し、第一の結合モジュールは、例えば、細胞表面タンパク質、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、腫瘍微小環境調節因子、サイトカインなどについての、任意の他の抗原についての結合特異性を有する。

【０２６８】

本明細書中で使用される場合、用語「三重特異性体」は、抗体足場モジュールならびに第一の結合モジュール及び第二の結合モジュールを含む結合タンパク質を指し、それにおいて、モジュールは、三つの異なる抗原についての結合特異性を有する抗体及び／又は受容体タンパク質から由来する。一実施形態では、抗体足場モジュールは、ＰＤ－Ｌ１についての結合特異性を有し、第一及び第二の結合モジュールは、任意の他の抗原（他の結合モジュールの抗原を別とする）についての、例えば、細胞表面共刺激受容体（ＣＤ１３７を含むが、しかし、それに限定されない）、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、腫瘍微小環境調節因子、サイトカインなどについての結合特異性を有する。一実施形態では、抗体足場モジュールは、ＣＤ１３７についての結合特異性を有し、第一及び第二の結合モジュールは、任意の他の抗原（他の結合モジュールの抗原を別とする）についての、例えば、細胞表面共刺激受容体（ＰＤ－Ｌ１を含むが、しかし、それに限定されない）、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、腫瘍微小環境調節因子、サイトカインなどについての結合特異性を有する。

【０２６９】

標的分子への抗体の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープへの用語「特異的結合」又は「それに特異的に結合する」又は「それについて特異的である」は、非特異的な相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、対照分子の結合と比較して、分子の結合を決定することにより測定することができる。例えば、特異的結合は、標的と類似している対照分子、例えば、過剰な非標識標的との競合により決定することができる。この場合では、プローブへの標識標的の結合が、過剰な非標識標的により競合的に阻害される場合、特異的結合が示される。本明細書中で使用される、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する用語「特異的結合（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｂｉｎｄｉｎｇ）」又は「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄｓ　ｔｏ）」又は「ついて特異的（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｆｏｒ）」は、例えば、１０－４Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－５Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－６Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－７Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－８Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－９Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－１０Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－１１Ｍもしくはそれ以下、あるいは１０－１２Ｍもしくはそれ以下、又は１０－４Ｍ～１０－６Ｍもしくは１０－６Ｍ～１０－１０Ｍもしくは１０－７Ｍ～１０－９Ｍの範囲中のＫｄを有する分子により示すことができる。当業者には理解されるように、親和性及びＫＤ値は逆相関する。抗原についての高い親和性は、低いＫＤ値により測定される。一実施形態では、用語「特異的結合」は、分子が、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合することを伴わず、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。本明細書中で使用される場合、用語「特異的結合」、「特異的に結合する」、及び「選択的に結合する」は、ＣＤ１３７、ＰＤＬ１及び／又はＴＧＦのエピトープへの抗体結合を指すｂ。

【０２７０】

用語「親和性」は、本明細書中で使用される場合、エピトープへの抗体の結合の強度を意味する。抗体の親和性は、［Ａｂ］×［Ａｇ］／［Ａｂ－Ａｇ］として定義される解離定数Ｋｄにより与えられ、式中、［Ａｂ－Ａｇ］は抗体－抗原複合体のモル濃度であり、［Ａｂ］は非結合抗体のモル濃度であり、［Ａｇ］は非結合抗原のモル濃度である。親和

性定数Ｋａは、１／Ｋｄにより定義される。ｍＡｂの親和性を決定するための方法は、Ｈａｒｌｏｗ、ｅｔ ａｌ．、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８８）、Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．，（１９９２，１９９３）、及びＭｕｌｌｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９２：５８９－６０１（１９８３）において記載されており、それらの参照文献は、参照により本明細書中に完全に組み入れられる。ｍＡｂの親和性を決定するための当技術分野において周知の一つの標準的な方法は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）スクリーニングの使用（例えばＢＩＡｃｏｒｅ（商標）ＳＰＲ分析装置を用いた分析による、など）である。

【０２７１】

「エピトープ」は、抗体とその抗原の間での相互作用の部位又は部位を示す、当技術分野の用語である。（Ｊａｎｅｗａｙ，Ｃ，Ｊｒ．，Ｐ．Ｔｒａｖｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）．Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｅ ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｐａｒｔ ＩＩ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ３－８．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｉｎｃ．）により記載されるように：「抗体は一般的に、高分子、例えばタンパク質などの表面上の小さな領域のみを認識し．．．［特定のエピトープ〕は、タンパク質フォールディングにより一緒になった〔抗原〕ポリペプチド鎖の異なる部分からのアミノ酸で構成される可能性が高い。この種類の抗原決定基は、立体構造的又は不連続エピトープとして公知である。なぜなら、認識される構造が、抗原のアミノ酸配列において不連続であるが、しかし、三次元構造において一緒にされるタンパク質のセグメントで構成されるためである。対照的に、ポリペプチド鎖の単一セグメントで構成されるエピトープは、連続的又は直線的なエピトープと称される」（Ｊａｎｅｗａｙ，Ｃ．Ｊｒ．，Ｐ．Ｔｒａｖｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）．Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｅ ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｐａｒｔ ＩＩ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ３－８．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｉｎｃ．）。

【０２７２】

用語「ＫＤ」は、本明細書中で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指すことが意図される。それは、以下の式により計算される：Ｋｏｆｆ／Ｋｏｎ＝ＫＤ

【０２７３】

用語「IC_{50}」は、本明細書中で使用される場合、それが結合する抗原の生物活性の５０％を中和するために必要な、本明細書中に開示される結合タンパク質の有効濃度を指すことが意図される。

【０２７４】

薬剤及び特定の活性（例、細胞への結合、酵素活性の阻害、免疫細胞の活性化又は阻害）に関する「EC_{50}」は、そのような活性に関するその最大応答又は効果の５０％を産生する作用物質の効率的な濃度を指す。薬剤及び特定の活性に関するEC_{100}は、そのような活性に関するその実質的に最大応答を産生する薬剤の効率的な濃度を指す。

【０２７５】

本明細書中で使用される場合、用語「Ｔ細胞消耗」は、免疫チェックポイント受容体、例えばＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、Ｔ細胞Ｉｇ及びムチンドメイン含有（ＴＩＭ）－３など、ならびにリンパ球活性化遺伝子３の長期の抗原刺激誘導性過剰発現により起こされる、増殖する及びサイトカインを分泌するためのＴ細胞の損なわれた能力として定義される。

【０２７６】

本明細書中で使用される場合、Ｔ細胞上の用語「共刺激受容体」は、ＴＣＲシグナル伝達及びサイトカイン刺激でＴ細胞を完全に活性化するためにシグナル伝達を陽性に誘導することができる細胞表面分子を指す。共シグナル伝達経路は、Ｔ細胞のプライミング及び

活性化において、ならびにＴ細胞の分化、エフェクター機能、及び生存の調節において重大な役割を果たす。共刺激受容体は一般に、２つの群：Ｉｇ受容体スーパーファミリー（ＩｇＳＦ）及びＴＮＦ受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）にカテゴリー化される。

【０２７７】

用語「結合モジュール」は、ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７、ＴＧＦβ、又は任意の他の標的に結合する任意の物質を指し、それは、足場モジュール自体との比較において、本発明の結合タンパク質の特異的活性を増強し得る。結合モジュールの非限定的な例は、アンチカリン、リペボディー、モノボディ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、ｓｃＦａｂ、アフィボディ、フィノマー、ＤＡＲＰｉｎ、ナノボディ、ペプチドアプタマー、及び核酸アプタマーを含む。

【０２７８】

用語「Ｆａｂ」又は「抗原結合断片」は、抗体に結合特異性を付与する酵素消化により典型的には調製される、抗体の二つの同一の断片を指す。抗体のパパイン消化によって、重鎖（Ｈ）鎖（ＶＨ）の可変領域ドメイン、及び一つの重鎖（ＣＨ１）の第一の定常ドメインとともに、軽鎖（Ｌ）鎖全体からなる二つの同一のＦａｂ断片が産生される。抗体のペプシン処理は、二価抗原結合活性を有し、依然として抗原を架橋することが可能な二つのジスルフィド連結Ｆａｂ断片にほぼ対応する、単一の大きなＦ（ａｂ）２断片をもたらす。Ｆａｂ断片は、抗体ヒンジ領域からの一つ又は複数のシステインを含むＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に追加のいくつかの残基を有することにより、Ｆａｂ’断片とは異なる。

【０２７９】

用語「リンカー」は、二つの化学実体間に共有結合を形成する少なくとも一つの原子を指す。用語「リンカー」は、足場モジュールと結合モジュールへの別の共有結合の間に共有結合を形成する少なくとも一つの原子を指し得る。足場モジュール及び結合モジュールが、ペプチド結合を通じてのみ連結される場合、リンカーは「ペプチドリンカー」として言及される。そうでなければ、リンカーは、「化学リンカー」として言及される。さらに、「柔軟なペプチドリンカー」は、大部分が小さい、非極性又は極性のアミノ酸を含むのに対し、「強固なペプチドリンカー」は、アルファ－ヘリックス形成配列を含み、及び／又はプロリン残基において豊富である（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３．Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．６５（１０）：１３５７－１３６９）。

【０２８０】

用語「足場モジュール」は、二つの抗原結合部位を含み、一つ又は複数の結合モジュールについて支持構造として作用し得るタンパク質を指す。結合モジュールは、リンカーを通じて足場モジュールに付着され得る、及び／又は結合モジュールは、足場モジュール中に存在する任意のループ領域中に組み入れられ得る。

【０２８１】

本明細書で、本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形態は、文脈が他に明確に指示しない限り、複数の参照を含むことに注意する。

【０２８２】

Ｔ細胞活性化＆消耗

Ｔ細胞活性化

Ｔ細胞上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上の、ＭＨＣ複合体により提示される抗原に結合する。ＴＣＲ／ＭＨＣ／抗原の結合は、Ｔ細胞の初期活性化を誘発する。Ｔ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）／ＣＤ３複合体を通じたＴ細胞シグナル伝達は、複数のエフェクター経路を活性化するシグナルのアレイを誘発する。

【０２８３】

Ｔ細胞活性化は、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体が生成するシグナルならびに他の細胞表面受容体から発出する及び／又は可溶性メディエーターにより送達されるシグナルの両方により、ポジティブ及びネガティブに調節され、Ｔ細胞が適したリガンドに適当な期間にわたって応答することを確実にする。Ｔ細胞活性化の中心的な考え方は、ＴＣＲを通じたシグナ

ル伝達のみが、アネルギーの状態（共刺激の欠如により誘導され得る、特定の抗原に対するＴ細胞の低応答状態）をもたらすことである。

【０２８４】

複数の表面受容体は、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ５、ＣＤ２、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）を含むＴ細胞について共刺激を提供することが可能であるとして記載されている。ＣＤ２８は、免疫応答の誘導中に発現され、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０及びＣＤ１３７を含むいくつかの他の共刺激分子の発現を促す。

【０２８５】

ＴＣＲ生成調節シグナルはまた、他の共受容体、例えば細胞傷害性Ｔリンパ球抗原－４（ＣＴＬＡ－４）及びプログラム死－１（ＣＤ２７９としても公知のＰＤ－１）などのライゲーションからのシグナルにより補完され、それらの両方が、ＴＣＲ誘発性Ｔ細胞の増殖及び活性化を限定するように機能する。負の調節因子としてのそれらの機能に照らして、ＣＴＬＡ－４及びＰＤ－１が免疫チェックポイントとして記載される。活性化Ｔ細胞上で発現されるＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１リガンド（Ｂ７－Ｈ１又はＣＤ２７４としても公知である）のライゲーションによって、重大な免疫チェックポイントが活性化され、Ｔ細胞寛容、機能不全及びＴ細胞消耗に導かれることが広く公知である。

【０２８６】

炎症性サイトカインの存在における腫瘍抗原ペプチド／ＭＨＣクラスＩ複合体への長期曝露によって、固形腫瘍中に存在するＴ細胞において異なる表現型が誘導され、エフェクター機能の進行性の喪失、阻害性免疫チェックポイント受容体の高い持続的な発現、不十分な増殖能力（Ｐａｕｋｅｎ ＫＥ ａｎｄ Ｗｈｅｒｒｙ ＥＪ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１５；３６（４）：２６５－２７６（２０１５），Ｗｈｅｒｒｙ ＥＪ ａｎｄ Ｋｕｒａｃｈｉ Ｍ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１５ １５（８）：４８６－４９９（２０１５）、代謝調節不全、不十分な記憶の呼び戻し、ならびに異なる転写及びエピジェネティックプログラム（ＭｃＬａｎｅ，Ｌ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７：４５７（２０１９）により特徴付けられる。

【０２８７】

Ｔ細胞消耗

機能不全の又は慢性的に刺激されたＴ細胞は、癌における反復ＴＣＲ刺激時に発生する、マウスモデル及びヒトにおいて見出される異なる系統である（Ｚａｊａｃ ＡＪ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ １８８，２２０５－２２１３（１９９８），Ｂａｋｈｌｉ ＭＹ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ，７１，３３９－３４７（２０１１），Ｗｈｅｒｒｙ ａｎｄ Ｋｕｒａｃｈｉ Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １５，４８６－４９９（２０１５）。炎症性サイトカインの存在における腫瘍抗原ペプチド／ＭＨＣクラスＩ複合体への長期曝露によって、固形腫瘍中に存在するＴ細胞において異なる表現型が誘導され、エフェクター機能の進行性の喪失、阻害性免疫チェックポイント受容体の高い持続的な発現、不十分な増殖能力（Ｐａｕｋｅｎ ＫＥ ａｎｄ Ｗｈｅｒｒｙ ＥＪ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１５；３６（４）：２６５－２７６（２０１５），Ｗｈｅｒｒｙ ＥＪ ａｎｄ Ｋｕｒａｃｈｉ Ｍ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１５ １５（８）：４８６－４９９（２０１５）、代謝調節不全、不十分な記憶の呼び戻し、ならびに異なる転写及びエピジェネティックプログラム（ＭｃＬａｎｅ，Ｌ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７：４５７（２０１９）により特徴付けられる。

【０２８８】

免疫抑制チェックポイントの活性化に起因して生じる負の調節シグナルは、ＴＭＥにおけるエフェクターＴ細胞機能不全についての主な機構であると考えられる。癌研究における腫瘍－抗原特異的応答及び同時進行疾患の存在によって、ＰＤ－１が、消耗についてのマーカーとして同定された。試験によって、チェックポイント遮断が、Ｔ細胞機能を少なくとも部分的に再活性化することができることが示されている（Ｆｕｅｒｔｅｓ Ｍａｒｒａｃｏ ＳＡ，ｅｔ ａｌ Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ６，３１０（２０１５）。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用の遮断は、Ｔ細胞機能を部分的に回復させることが示され

ている。
【０２８９】
ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路
ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路が、広範囲に試験されている（Ｓａｌｍａｎｉｎｅｊａｄ ｅｔ ａｌ．，２０１９；Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．，２０２０；Ｍａｋｕｋｕ ｅｔ ａｌ．，２０２１）。ＰＤ－１は、ＩｇＶ様細胞外ドメイン、それに続く膜貫通領域ならびにＴＣＲシグナル伝達及び調節のための二つのリン酸化部位を伴う細胞内尾部を含む２８８のアミノ酸を伴う５５ｋＤａ膜貫通タンパク質である（Ｉｓｈｉｄａ，Ａｇａｔａ，Ｓｈｉｂａｈａｒａ，＆Ｈｏｎｊｏ）。ＰＤ－Ｌ１は、その細胞外領域中にＩｇ様ドメイン及びＩｇＣ様ドメインを伴う２９０のアミノ酸を伴う１型膜から通過する３３－ｋＤａ糖タンパク質である（Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２０００）。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１は、免疫チェックポイントタンパク質である。
【０２９０】
ＰＤ－１は、様々な活性化免疫細胞、例えば活性化Ｔ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）、活性化単球、樹状細胞（ＤＣ）、マクロファージ、及び未成熟ランゲルハンス細胞などにおいて発現される。ＰＤ－１はまた、抗原に一定に曝露されたＴ細胞の表面上で上方調節され、消耗したＴ細胞のマーカーの一つである（Ａｈｍａｄｚａｄｅｈ ｅｔ ａｌ．，２００９）。ＮＦＡＴ、ＮＯＴＣＨ、ＦＯＸＯ１、及びＩＲＦ９を含む転写因子は、ＰＤ－１発現の転写を誘発する（Ｓｔａｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１４）。サイトカイン、例えばＩＬ－２、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５、ＩＬ－７、及び１型ＩＦＮなどは、ＰＤ－１発現を増強することができる。ＩＬ－６及びＩＬ－１２は、シグナルトランスデューサー及び転写の活性化因子３（ＳＴＡＴ３）及びＳＴＡＴ４を使用して、それぞれ、脾臓ＣＤ８ Ｔ細胞におけるＰＤ－１発現を増加させる（Ｓａｌｍａｎｉｎｅｊａｄ ｅｔ ａｌ．，２０１９）。
【０２９１】
ＰＤ－Ｌ１は、特に炎症条件下で、マクロファージ、Ｂ細胞、ＤＣ、及び一部の上皮細胞のような抗原提示細胞（ＡＰＣ）により構成的に発現される（Ｓｈａｒｐｅ ｅｔ ａｌ．，２００７）。末梢組織中でのＰＤ－Ｌ１の存在が、自己免疫性損傷を防止するために必要である。また、ＰＤ－Ｌ１は、抗腫瘍応答を回避するための「適応免疫機構」として、いくつかの種類の腫瘍細胞、例えば非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、血液悪性腫瘍及びウイルス感染細胞などにより発現される（Ｏｈａｅｇｂｕｌａｍ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。いくつかの転写因子が、癌細胞におけるＰＤ－Ｌ１の転写上方調節において含まれることが明らかになっており、例えば低酸素誘導因子ａ（ＨＩＦ－１ａ）、ＳＴＡＴ３及びＮＦ－ｋＢなどである（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。さらに、浸潤免疫細胞により産生されるサイトカイン、例えばＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＴＮＦａ、ＩＦＮｇ及び成長幹細胞因子など、ならびに細菌ＬＰＳ及びＶＥＧＦは、ＰＤ－Ｌ１遺伝子の発現を上方調節する（Ｊｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。
【０２９２】
ＰＤ－１の生理学的役割は、機能的Ｔ細胞の阻害及びＴ調節性（Ｔｒｅｇ）細胞の発生である。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１のようなＴｒｅｇ及び共阻害性免疫チェックポイントは、免疫系の異常及び慢性活性化ならびに自己抗原に対する免疫反応性を防止するためにフェイルセーフとして作用する。しかし、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路は、抗腫瘍Ｔ細胞応答を避けて、腫瘍免疫回避を促す手段として、癌細胞又は腫瘍関連抗原提示細胞により共選択されることが周知である（Ｈａｒｇａｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。腫瘍は、ＰＤ－Ｌ１を発現することにより宿主免疫監視から回避することができる。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用は、Ｔ細胞の下方調節ならびにそれらのアポトーシス及び腫瘍微小環境からの排除に導き、このように、癌細胞を免疫応答から回避させる（Ｉｗａｉ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。
【０２９３】
ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１の標的化

ＰＤ－１は、共通構造を共有する受容体のＢ７／ＣＤ２８ファミリーのメンバーである：免疫グロブリン様細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ及びシグナル伝達モチーフを含む細胞内ドメイン。ＰＤ－１が、そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１により会合される場合、そのような相互作用は、ＳＲＣ相同ホスファターゼＳＨＰ１及びＳＨＰ２の動員に導き、それによって、シグナルが細胞中に伝達される。ＰＤ－１は、主に、適応免疫応答の主要な細胞傷害性エフェクターである活性化Ｔ細胞上で発現され、それが伝達するシグナルは、Ｔ細胞媒介性免疫応答を減衰させるのに役立つ。試験は、ＰＤ－１の阻害効果を遮断することによって、腫瘍細胞に対する有効な免疫応答を誘発させることができることを示した。この相互作用を遮断するＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント阻害剤は、免疫細胞増殖を増加させ、身体の天然抗腫瘍監視システムの有効性を増強する。免疫チェックポイントへの癌の回避の機構を理解することは、免疫療法の送達を個別化するアプローチに対して重大である。

【０２９４】

二つの別々のシグナルが、細胞傷害活性をチェックし続けるＴ細胞を完全に活性化するために要求される。第一は、Ｔ細胞受容体と、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上の主要組織適合性複合体提示抗原エピトープの間での相互作用から生じる。第二は、Ｔ細胞表面及びＡＰＣ表面上の共刺激受容体－リガンド対の会合から生じる。ＰＤ－１は、リガンド結合を介してＴ細胞活性を調節する共阻害受容体の群に属し、それによって、Ｔ細胞は、消耗として公知の状態に陥り、それにおいて、それらは増殖できない、又はそれらのエフェクター機能を実施できない。

【０２９５】

ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の遮断は、消耗した腫瘍浸潤性Ｔリンパ球の機能を再活性化／回復することが示されている。例えば、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１及び抗ＣＴＬＡ－４免疫チェックポイント阻害剤を用いた処理は、機能障害性ＴＩＬを再活性化し、それらの抗腫瘍効果を増強することが報告されている（Ｗｈｅｒｒｙ ａｎｄ Ｋｕｒａｃｈｉ，２０１５；Ｚａｒｏｕｒ，２０１６；Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１９）。

【０２９６】

ＣＤ１３７共刺激経路

ＣＤ１３７は、４－１ＢＢとも呼ばれ、又はＴＮＦＲＳＦ９（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー９）は、活性化Ｔ細胞上に発現される誘導性共刺激受容体として最初に同定されたが、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）の３０ｋＤａ膜貫通糖タンパク質である。４－１ＢＢの現在の理解は、発現が一般的に、活性化依存的であり、活性化Ｔ細胞、活性化ナチュラルキラー（ＮＫ）及びナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、調節性Ｔ細胞、濾胞ＤＣを含む樹状細胞（ＤＣ）、刺激された肥満細胞、分化骨髄細胞、単球、好中球、及び好酸球を含む広範な免疫細胞のサブセットを包含することを示す。４－１ＢＢ発現はまた、腫瘍血管系及びアテローム性硬化性内皮で実証されている。ＣＤ１３７（ＣＤ１３７Ｌ）を刺激するリガンドは、活性化抗原提示細胞（ＡＰＣ）、骨髄前駆細胞、及び造血幹細胞上で発現される（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２００９，２２９，１９２－２１５）。

【０２９７】

ＣＤ１３７は、ナイーブＴ細胞の表面上では検出不能である。刺激ＴＣＲシグナル伝達時に、ＣＤ１３７発現は、刺激後２～３日に誘導し及びピークになり、３日後に低下する。ＣＤ１３７は、活性化Ｔ細胞の細胞表面上に単量体及び二量体の両方として発現する。ＴＮＦＲＳＦのファミリーにおける他のメンバーへの相同性に基づいて、リガンド結合は受容体三量体化を誘導し、受容体の活性化をもたらす。ＴＮＦＲＳＦの一部のメンバーは、細胞表面からの細胞外ドメインの切断後に可溶性形態において存在し得る。可溶性４－１ＢＢ及び可溶性４－１ＢＢＬは、自己免疫疾患及び癌を伴う一部の患者の血清中で検出されている（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ，２００９，２２９，１９２－２１５）。

【０２９８】

ＣＤ１３７はＴＮＦ受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバーであり、その細胞質ドメインにおいて公知の内因性酵素活性を伴わない。それは、シグナルを細胞中に伝達するためのＣＤ１３７シグナロソームを構築するために、アダプタータンパク質のＴＮＦＲ関連因子（ＴＲＡＦ）ファミリーに頼る。ＣＤ１３７Ｌ三量体の結合による、又はアゴニストモノクローナル抗体との架橋によるＣＤ１３７活性化時に、ＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２、及びＴＲＡＦ３が、恐らくは異なる配置を伴うホモ及び／又はヘテロ三量体としてＣＤ１３７の細胞質ドメインに容易に動員され、ＣＤ１３７シグナロソームの構築を開始し、それによって、ＮＦ－κＢ、ならびにＥＲＫ、ＪＮＫ、及びｐ３８　ＭＡＰキナーゼを含むマイトジェン活性化タンパク質　（ＭＡＰ）キナーゼカスケードの下流の活性化がもたらされる（Ｂａｒｔｋｏｗｉａｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１８，２４，１１３８－１１５１）。

【０２９９】

ＣＤ１３７は、効果的なＴ細胞免疫応答を維持する際に、及び免疫学的記憶を生成する際に重要な役割を果たす。ＣＤ１３７の発現プロファイル、ならびに腫瘍免疫について関連するリンパ球の複数のサブセットにおいて頑強なエフェクター応答を増強するその固有の能力によって、ＣＤ１３７が免疫療法のための固有に魅力的な標的になる。

【０３００】

マウス及びヒトＴ細胞の複数の試験は、ＣＤ１３７が細胞増殖、生存、及びサイトカイン産生を促すことを示す。ＣＤ１３７アゴニスト抗体は、細胞溶解性Ｔリンパ球応答を著しく増強することが示されている。単独療法として、又は他の治療、例えばチェックポイント阻害剤などとの組み合わせにおけるアゴニストＣＤ１３７抗体は、予防的及び治療的設定において抗腫瘍利益のエビデンスを提供してきた。ＣＤ１３７の刺激は、インビボで持続的な抗腫瘍保護Ｔ細胞メモリー応答をもたらすことが示されている（Ｆｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　２０１２，６１，１７２１－１７３３）。より最近では、ＣＤ１３７アゴニスト抗体は、腫瘍血管系上の細胞接着分子ＩＣＡＭ－１、ＶＣＡＭ－１、及びＥ－セレクチンの発現を増加させ、腫瘍微小環境中への増加したＴ細胞遊走をもたらすことが示されている（Ｐａｌａｚｏｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，７１（３），８００１－８１１）。

【０３０１】

しかし、ＣＤ１３７－／－マウス及び不可知論ＣＤ１３７抗体の両方が、増強された抗腫瘍活性を示すという不可解な観察は、ＣＤ１３７シグナル伝達の単なる活性化が、その抗腫瘍効果を完全には説明できないことを示す。複数の試験によって、ＣＤ１３７Ｌへの結合時でのＣＤ１３７シグナル伝達が報告されている。最近、ＣＤ１３７Ｌ／ＣＤ１３７相互作用が双方向シグナル伝達をもたらすことを示すエビデンスが蓄積している。ＣＤ１３７Ｌは主に、活性化ＡＰＣ、例えばＤＣなどの上で発現されるため、ＣＤ１３７Ｌからの逆シグナル伝達は、ＤＣの発生及び機能に影響を及ぼすことが報告されている（Ｋｗｏｎ，Ｉｍｍｕｎｅ　Ｎｅｔｗｏｒｋ，２０１５，１５（３），１２１－１２４）。２０１７年に、報告知見によって、これらの逆説的結果を説明する、腫瘍における抗原提示樹状細胞（ＤＣ）におけるＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）による逆シグナル伝達が実証された。具体的には、ＣＤ１３７Ｌ逆シグナル伝達は、ＩＬ１２産生ＣＤ１０３＋ＤＣ及び１型腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）の腫瘍内分化を抑制したが、それは、ＩＦＮγ産生ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球を生成するために重要な役割を果たす。特に、ＣＤ１３７Ｌ遮断は、ＩＬ１２及びＩＦＮγのレベルを増加させたが、それは、腫瘍内のＩＦＮγ産生ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＩＬ１２産生ＣＤ１０３＋ＤＣ、及び１型ＴＡＭの腫瘍内分化をさらに促した。従って、ＤＣにおけるＣＤ１３７Ｌ逆シグナル伝達を遮断しながらＴ細胞におけるＣＤ１３７シグナル伝達を活性化することによって、Ｃ１３７経路の抗腫瘍活性が完全に惹起させるはずである（Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１７，７７（２１），５９８９－６０００）。

【０３０２】

ナイーブマウス及び腫瘍担持マウスにおける高用量のＣＤ１３７アゴニスト抗体は、肝

臓へのＴ細胞浸潤、ならびに肝炎症又は損傷の指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）の上昇を誘導することが報告されている。抗ＣＤ１３７抗体（ウレルマブ、Ｂｒｉｓｔｏｌ　Ｍｙｅｒｓ）の有効性を評価する臨床試験に基づき、ＣＤ１３７活性の活性化によって、治療的抗腫瘍活性を誘発することができる。しかし、肝毒性によって、その臨床開発は限定される。第二の抗ＣＤ１３７（ウトミルマブ、Ｐｆｉｚｅｒ）の臨床的評価は、許容可能な安全性プロファイルを実証したが、しかし、臨床有効性を限定した。今日まで、ＣＤ１３７に対して向けられた、承認された治療用抗体はない。

【０３０３】

ＰＤ／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント及びＣＤ１３７を標的化する二重特異性体

共刺激受容体は、Ｔ細胞のエフェクター機能を調節する際に重要な役割を果たしているため、共刺激経路のアゴニズムによって、チェックポイント阻害有効性が改善され得る、及び持続的な抗腫瘍応答に導き得る。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路及びＴ細胞共刺激分子を標的化するように設計された二重特異性分子は、チェックポイントを脱抑制し、同時にＴ細胞を共刺激して、抗腫瘍免疫性の効率的な誘導を提供し得る。分子設計の態様に依存して、Ｔ細胞活性化は、トランス結合を通じて生じ、ＰＤ－Ｌ１結合に依存的であり、それにより、腫瘍微小環境への免疫活性を効果的に限定し得る。Ｔ細胞上の適切な共刺激標的は、限定されないが、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＣＤ２２６、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＴＮＦＲＳＦ２５、ＬＩＧＨＴ（ＴＮＦＳＦ１４）、ＴＩＭ－１、及びＬＦＡ－１を含む。

【０３０４】

以前の前臨床実験及び臨床データによって、共刺激経路を刺激することが、特に他の免疫活性化戦略との組み合わせにおいて使用される場合、癌におけるＴ細胞応答を再活性化するための強力に有効な戦略であり得ることが明らかに支持された。ＰＤ－Ｌ１及びＴ細胞上の共刺激分子について二重特異性である結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１発現抗原提示細胞（ＡＰＣ）又は腫瘍細胞及び活性化Ｔ細胞への同時結合を媒介し、腫瘍特異的Ｔ細胞、例えば腫瘍浸潤性Ｔ細胞及びＣＤ８$^{+}$細胞溶解性Ｔ細胞などの条件付き活性化をもたらし、アゴニスト抗ＣＤ１３７抗体のオンターゲットオフ腫瘍毒性を軽減するはずである。

【０３０５】

ＴＧＦβ

ＴＧＦβスーパーファミリーは、ＴＧＦβ、ｎｏｄａｌ、アクチビン、レフティー、骨形成タンパク質、ならびに成長及び分化因子を含む、構造的に関連したタンパク質の大きな群である。ＴＧＦβシグナル伝達は、Ｓｍａｄ経路及び非Ｓｍａｄ経路を通じて形質導入される。ＴＧＦβは、ＴＭＥにおける免疫抑制及び免疫監視の回避を媒介する際に決定的な機能を伴う多面的サイトカインである。ＴＧＦβは腫瘍により異常に産生され、主に自然免疫系及び適応免疫系の両方を抑制することにより癌進行を促す。抗腫瘍免疫性の負の調節因子として、ＴＧＦ－βは、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１の有効性を損ない、薬物耐性を誘導する。

【０３０６】

大半の癌腫を伴う患者の約１０～３０％のみが、処置前の腫瘍標本がＰＤ－Ｌ１を発現している患者のみを選択的に登録する治験においてでさえ、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１単独療法で処置された場合に客観的な応答を達成することが報告されている（Ｌｉｐｓｏｎ，ＥＪ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．４２（４）：５８７（２０１５）。この応答の欠如についての一つの可能な説明は、Ｔ細胞のプライミングを阻害する、又はエフェクターＴ細胞機能を抑制するように機能する免疫抑制細胞（例、調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）及び他の因子（例、サイトカイン及び代謝経路）の存在に起因する腫瘍微小環境の免疫抑制的な性質である。抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１治療の効果は、機能亢進性ＴＧＦβシグナル伝達により特徴付けられるＴＭＥにおいて限定的であると報告されている（Ｔａｕｒｉｅｌｌｏ　ＤＶＦ，ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ，５５４：５３８－５４３（２０１８）。

【０３０７】

ＴＧＦβシグナル伝達の効果は、三つのＴＧＦβリガンド（ＴＧＦ－β１－３）により媒介され、それらの全てが、ホモ二量体として、ＴＧＦβ１型（ＴＧＦβＲ１）及び２型受容体ＴＧＦβＲ２を通じて存在する。腫瘍微小環境において、ＴＧＦβシグナル伝達のバランスにおいて密接に関与する多数の細胞状況依存的因子がある（Ｌｉｕ　Ｓ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ　Ｍｅｄ　Ｒｅｐ　１７：６９９－７０４（２０１８）。ＴＧＦβは、抗腫瘍免疫応答を抑制するための重要な因子であることが示されているが、しかし、Ｔ細胞及び腫瘍由来ＴＧＦ－βの正確な役割は、未だに不十分にしか理解されていない。

【０３０８】

Ｔｒｅｇ、単球性骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）、代替的に極性化されたマクロファージ（Ｍ２表現型）、及びそれらの関連する可溶性因子は、抗腫瘍免疫性を抑制することができる、十分に認識されている阻害機構である。ＭＤＳＣは、腫瘍微小環境におけるＴＧＦβの主な供給源であることが報告されている。

【０３０９】

Ｔｒｅｇは、固形腫瘍において一般に見出され、サイトカインを活性化するために、エフェクター細胞と競合すること、及び免疫抑制性サイトカインの分泌を含む、いくつかの機構により免疫抑制を促すことができる。例えば、Ｔｒｅｇは、腫瘍微小環境における形質転換成長因子－ベータ（ＴＧＦβ）のレベルに寄与し、それは、適応免疫プライミング及びエフェクター応答の両方を破壊する免疫抑制因子である。

【０３１０】

腫瘍微小環境調節因子を標的化する治療薬剤の設計は、腫瘍免疫療法を最適化するために使用される、認識されている戦略である。例えば、ＴＧＦβ及び免疫細胞の相互作用は、腫瘍微小環境及び癌進行における重要な調節軸として同定されている。ＴＧＦβは、Ｔｒｅｇの分化を誘導し、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の細胞傷害性を低下させ、免疫細胞の腫瘍浸潤を制限し、及び樹状細胞（ＤＣ）による抗原提示を抑制することにより、多数の免疫細胞の機能を調節する（Ｙｉ，Ｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１４（１）：２７（２０２１）。ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の阻害のための主な戦略は、ＴＧＦ－βの、その受容体への結合に干渉する、細胞内シグナル伝達を遮断する、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して発現を破壊する治療薬剤を設計することである。

【０３１１】

腫瘍微小環境調節因子としてのＴＧＦβ

抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１免疫療法の効果は、高活性ＴＧＦβシグナル伝達により特徴付けられるＴＭＥにおいて限定される。前臨床試験からのデータは、ＴＧＦβを遮断する又はそれと拮抗することによって、ＴＧＦβの免疫抑制効果に寄与するいくつかの因子を潜在的に破壊することができるという前提を支持する。Ｂｕｄｈｕらによる試験によって、Ｔ細胞の抗腫瘍活性が、腫瘍常在性調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞により阻害されたこと、及び免疫抑制がＴｒｅｇ細胞表面上のＴＧＦβの存在に依存的であることが見出された。ＴＧＦ－βに対する遮断抗体は免疫抑制を逆転させ、抗腫瘍応答をブーストした（Ｓ．Ｂｕｄｈｕ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉ．Ｓｉｇｎａｌ．１０，ｅａａｋ９７０２（２０１７）。他の公開されたデータは、ＴＧＦβによって、Ｔ細胞が腫瘍に浸潤することを遮断することにより、抗腫瘍免疫応答が制限されることを示唆している。尿路上皮癌のマウスモデルにおいて実施された試験によって、ＴＧＦ－βシグナル伝達及びＰＤ－Ｌ１を標的化する抗体との併用治療によって、Ｔ細胞が腫瘍に侵入する能力が増加され、腫瘍退縮を誘導し、抗腫瘍免疫応答を増強することが示された（Ｍａｒｉａｔｈａｓａｎ，Ｓ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　５５４，５４４－５４８（２０１８）。

【０３１２】

Ｔａｕｒｉｅｌｌｏ、Ｄ．Ｖ．Ｆ．らは、結腸直腸癌に関連付けられる四つの変異を発現するマウスを試験し、マウスにおける転移が、低下したＴ細胞浸潤及び間質における活性ＴＧＦβにより特徴付けられることを見出した。ＰＤ－１－ＰＤ－Ｌ１免疫チェックポイントの阻害は、モデル系において限定された応答を誘発したが、しかし、ＴＧＦβの阻

害は、転移を防止する強力で持続的な細胞傷害性Ｔ細胞応答を解放した。進行性肝転移性疾患を伴うマウスでは、ＴＧＦβシグナル伝達の遮断によって、腫瘍が抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１治療に感受性になり、増加した生存に導いた（Ｔａｕｒｉｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ５５４，５４４－５４８（２０１８）。

【０３１３】

Ｍ７８２４（ビントラフスプアルファ）は、Ｍｅｒｃｋ　ＫＧａＡ、ドイツ、ダルムシュタット及びＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅにより開発下にある二官能性融合タンパク質である。Ｍ７８２４は、ＴＧＦ－βＲＩＩの可溶性細胞外ドメイン（１３６アミノ酸）のＮ末端に、可動性（Ｇｌｙ$_4$Ｓｅｒ）$_4$Ｇｌｙリンカーを介して遺伝子融合されたヒト化ＩｇＧ１モノクローナル抗体アベルマブから由来するＶＨ配列及びＶＬ配列を含む。それは、全ての三つのＴＧＦ－β（ＴＧＦ－β１－３）リガンドアイソフォームについてのサイトカイントラップとして機能する。

【０３１４】

いくつかの前臨床試験によって、ビントラフスプアルファが、（１）ヒト癌細胞におけるＴＧＦ－β誘導性の上皮間葉転換を予防又は逆転させることが可能であり；腫瘍細胞の可塑性におけるこの変化によって、ヒト腫瘍細胞が免疫媒介性攻撃に、ならびにいくつかの化学療法剤により感受性になること；（２）ナチュラルキラー細胞及びＴ細胞の表現型を変化させ、このように、腫瘍細胞に対するそれらの細胞溶解能力を増強すること；（３）抗体依存的な細胞媒介性細胞傷害性機構を介して、ヒト腫瘍細胞の増強した溶解を媒介すること；（４）Ｔｒｅｇ細胞の抑制活性を低下させること；（５）多数の前臨床モデルにおいて抗腫瘍活性を媒介すること；及び（６）放射線、化学療法ならびにＰＤ－Ｌ１経路及びＴＧＦベータ経路を同時に遮断するように設計されたいくつかの他の免疫療法剤との組み合わせにおいて抗腫瘍活性を増強すること（Ｌｉｎｄ　Ｈ，ｅｔ　ａｌ，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ，Ｆｅｂ；８（１）：ｅ０００４３３（２０２０）が示されている。抗ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβトラップ（ビントラフスプ）を用いた処置は、単一薬剤の抗ＰＤ－Ｌ１又はＴＧＦβトラップタンパク質のものよりも優れていると報告されている相乗的な抗腫瘍効果を誘発することが示されている（ＵＳ９，６７６，８６３）。

【０３１５】

観察された相乗効果は、免疫細胞上のＰＤ－１と腫瘍細胞上のＰＤ－Ｌ１の間での相互作用の同時遮断及び腫瘍微小環境におけるＴＧＦβの中和に起因する（ＵＳ９，６７６，８６３）。相乗効果は、二つの主要な免疫回避機構の同時遮断に基づくと推定される。ＴＧＦβの枯渇は、腫瘍微小環境におけるＴＧＦβサイトカインレベルに拮抗すること（腫瘍細胞の抗ＰＤ－Ｌ１標的化の結果として）、及びＰＤ－Ｌ１受容体媒介性エンドサイトーシスを通じたＴＧＦβの破壊により達成される（ＵＳ９，６７６，８６３）。

【０３１６】

ＰＤ／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント及びＴＧＦβを標的化するＰＤ－Ｌ１結合タンパク質

ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβの二重遮断が、相乗的な抗腫瘍活性を有することが報告されている（Ｃｈｅｎ，Ｘ　ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　１４３：２５６１（２０１８）及びＹｉ，Ｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１４（１）：２７（２０２１）。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸及びＴＧＦβの免疫抑制効果が相補的で独立していることを考慮すると、抗ＰＤ－Ｌ１免疫療法の有効性を増強するために、ＴＧＦβシグナル伝達を遮断することが可能であるＰＤ－Ｌ１結合タンパク質を設計することが合理的である（Ｙｉ，Ｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１４（１）：２７（２０２１））。また、ＰＤ－Ｌ１に結合し、ＴＧＦ－β経路アンタゴニストを含む二重又は三重特異性結合タンパク質は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１単独療法に抵抗性の患者のための効果的な選択肢を提供し得る（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｈｅｍａｔｏｌ　Ｏｎｃｏｌ，１４：５５（２０２１））。

【０３１７】

抗ＰＤ－Ｌ１免疫療法の有効性を増強するために、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸及びＴＧＦβシグナル伝達経路を同時に遮断することができる結合タンパク質が提供される。一部の

実施形態では、結合タンパク質はまた、ＣＤ１３７に結合し、Ｔ細胞応答性を促す共刺激シグナルを提供することができる。

【０３１８】

ＰＤ－Ｌ１単一特異性体

一部の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１単一特異性体（１９２３Ａｂ２及び１９２３Ａｂ３）は、ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的である（例、特異的に結合する）。これらの結合タンパク質及びそれらの断片は、ＣＤＲ配列の固有のセット、ＰＤ－Ｌ１についての特異性により特徴付けられ、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１シグナル伝達の強力な阻害活性を示す。より具体的には、一態様では、本開示は、ヒトＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質、及び単剤療法としての、又は腫瘍微小環境に局在化された細胞のＰＤ－Ｌ１媒介性活性を調節するための他の抗癌剤との組み合わせにおけるそれらの使用に関する。代替的な実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質はまた、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント阻害からエフェクターＴ細胞を脱抑制する／放出するように設計された二重特異性体及び三重特異性体のサブユニットとして使用することができる。

【０３１９】

代替的な態様では、本開示は、ＰＤ－Ｌ１に結合する二重特異性体又は三重特異性体を設計するための、ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質の使用、及びＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイントを脱抑制し、Ｔ細胞活性化を促すためのそれらの使用に関する。

【０３２０】

例示的な実施形態では、本発明は、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質を提供し、以下を含む抗体足場モジュールを含む：（ａ）表１中の１９２３Ａｂ２についてのＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域配列；及び表２中の１９２３Ａｂ２についてのＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域配列。

【０３２１】

例示的な実施形態では、本発明は、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質を提供し、以下を含む抗体足場モジュールを含む：（ａ）表１中の１９２３Ａｂ３についてのＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域配列；及び表２中の１９２３Ａｂ３についてのＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域配列。

【表１】

表１：ＰＤ－Ｌ１結合重鎖可変領域のＣＤＲ配列

PD-L1 特異性体の参照番号	CDR1	CDR2	CDR3
1923Ab2	配列番号5	配列番号6	配列番号7
1923Ab3	配列番号11	配列番号12	配列番号13

【表２】

表２：ＰＤ－Ｌ１結合軽鎖可変領域のＣＤＲ配列

PD-L1 特異性体の参照番号	CDR1	CDR2	CDR3
1923Ab2	配列番号8	配列番号9	配列番号10
1923Ab3	配列番号14	配列番号9	配列番号15

【０３２２】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、ＶＨ（例えば、配列番

号１及び３）及びＶＬ（例えば、配列番号２及び４）を含む重鎖領域配列を伴うモノクローナル、キメラ、二重特異性又は三重特異性であることができ、定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４であってもよい。さらなる実施形態では、本発明の抗体は、Ｆｃサイレンシング変異（Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ又はＮ２９７Ａ）を伴うヒトＩｇＧ１型である。

【０３２３】

一部の実施形態では、開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体がＦｃ操作されることが有利である。

【０３２４】

なおさらなる実施形態では、本発明は、重鎖配列及び軽鎖配列を含むＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質を提供し、それにおいて、重鎖配列は、配列番号４２又は４５と少なくとも８５％の配列同一性を有し、軽鎖配列は、配列番号４０と少なくとも８５％の配列同一性を有する。

【０３２５】

一実施形態では、開示されている抗体は、ヒト又はカニクイザルＰＤ－Ｌ１に結合し、ヒトＰＤ－Ｌ１とＰＤ１受容体の間での相互作用を遮断することが可能である。

【０３２６】

一実施形態では、結合タンパク質は、５×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＫＤを伴って、好ましくは２×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＫＤを伴って、及びさらにより好ましくは１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＫＤを伴ってヒトＰＤ－Ｌ１に結合する。

【０３２７】

さらなる実施形態では、本発明は、ヒトＰＤ－Ｌ１、又はその断片に結合する結合タンパク質に関し、それは、本明細書中に記載される、本発明による抗体（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ）とＰＤ－Ｌ１への結合について交差競合する。

【０３２８】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１又はその断片に結合する結合タンパク質は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の構造的及び機能的特徴の一つ又は複数を示す：（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的である、（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１と交差反応する、（ｃ）ＰＤ－１へのＰＤ－Ｌ１の結合を破壊する、又は（ｄ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを除去する。

【０３２９】

ＰＤ－Ｌ１に結合する、開示されている結合タンパク質によるＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１相互作用の破壊及び活性化チェックポイントの脱抑制を、複数のインビトロアッセイを使用して検討した。抗ＰＤ－Ｌ１部分の生物活性は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断アッセイを使用してＴＣＲシグナル伝達を回復させる、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を破壊するその能力により決定された。

【０３３０】

ＣＤ１３７単一特異性体

一部の実施形態では、開示されているＣＤ１３７単一特異性体（１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５、及び１９２３Ａｂ６）は、ヒトＣＤ１３７について特異的である（例、特異的に結合する）。これらの結合タンパク質及びそれらの断片は、ＣＤＲ配列の固有のセット、ＣＤ１３７についての特異性により特徴付けられ、単独療法として又は他の抗癌剤との組み合わせにおいて癌免疫療法において有用である。本明細書中で実証されるように、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質はまた、ＰＤ１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイント阻害から放出されたエフェクターＴ細胞を再活性化するように設計された二重特異性体及び三重特異性体のサブユニットとして使用することができる。より具体的には、本開示は、ヒトＣＤ１３７に結合する結合タンパク質に、及び腫瘍微小環境に局在化された細胞のＣＤ１３７媒介性活性を調節するためのそれらの使用に関する。

【０３３１】

例示的な実施形態では、本発明は、（ａ）ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を提供

し、（ａ）表３中の１９２３Ａｂ４についてのＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域配列；及び表４中の１９２３Ａｂ４についてのＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域配列を含む抗体足場モジュールを含む。

【０３３２】

例示的な実施形態では、本発明は、（ａ）ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を提供し、（ａ）表３中の１９２３Ａｂ５についてのＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域配列；及び表４中の１９２３Ａｂ５についてのＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域配列を含む抗体足場モジュールを含む。

【０３３３】

例示的な実施形態では、本発明は、（ａ）ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を提供し、（ａ）表３中の１９２３Ａｂ６についてのＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域配列；及び表４中の１９２３Ａｂ６についてのＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域配列を含む抗体足場モジュールを含む。

【表３】

表３：ＣＤ１３７結合重鎖可変領域のＣＤＲ配列

CD137単一特異性体の参照番号	CDR1	CDR2	CDR3
1923Ab4	配列番号5	配列番号22	配列番号23
1923Ab5	配列番号27	配列番号28	配列番号29
1923Ab6	配列番号32	配列番号33	配列番号34

【表４】

表４：ＣＤ１３７結合軽鎖可変領域のＣＤＲ配列

CD137単一特異性体の参照番号	CDR1	CDR2	CDR3
1923Ab4	配列番号24	配列番号25	配列番号26
1923Ab5	配列番号30	配列番号9	配列番号31
1923Ab6	配列番号35	配列番号36	配列番号37

【０３３４】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質は、ＶＨ（例えば、配列番号１６、１８、及び２０）及びＶＬ（例えば、配列番号１７、１９、及び２１）を含む重鎖領域配列を伴うモノクローナル、キメラ、二重特異性又は三重特異性であってもよく、定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４であってもよい。さらなる実施形態では、本発明の抗体は、Ｆｃサイレンシング変異（Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ又はＮ２９７Ａ）を伴うヒトＩｇＧ１型である。

【０３３５】

一部の実施形態では、開示されている抗ＣＤ１３７抗体がＦｃ操作されることが有利である。

【０３３６】

なおさらなる実施形態では、本発明は、重鎖配列及び軽鎖配列を含むＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を提供し、それにおいて、重鎖配列は、重鎖配列：配列番号７５と少なくとも８５％の配列同一性を有する：及び軽鎖配列は、軽鎖配列：配列番号７６と少なくとも８５％の配列を有する。

【０３３７】

出願人は、より良好な免疫療法のためのオンターゲットオフ腫瘍毒性及び免疫抑制設定を克服するための所望のプロファイルを実証する、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質を発見しようと試みた。ＣＤ１３７に結合する、開示されている結合タンパク質は、抗Ｐ

Ｄ－１／ＰＤ－Ｌ１耐性に寄与する、消耗したＴ細胞又は調節性Ｔ細胞において富む腫瘍微小環境について特に有益であり得る。

【０３３８】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質及びその断片は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の構造的及び機能的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＣＤ１３７について特異的である、

（ｂ）カニクイザルＣＤ１３７と交差反応する、

（ｃ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊（例、低下又は防止）する、

（ｄ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す、

（ｅ）ＣＤ１３７シグナル伝達に対する架橋依存的アゴニスト活性を持つ、又は

（ｆ）架橋依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。

【０３３９】

一実施形態では、開示されている結合タンパク質は、架橋剤の存在においてＣＤ１３７シグナル伝達を活性化する。一次ＰＢＭＣを使用したＴ細胞活性化アッセイでは、それらは、架橋依存的な様式において抗ＣＤ３刺激ＩＦＮ－ガンマ放出を増強した。

【０３４０】

一部の実施形態では、開示されている結合タンパク質は、ヒトＣＤ１３７及びカニクイザルＣＤ１３７の両方に結合することが有利である。カニクイザル（例、マカカ・ファスシリカリス）において細胞上に発現されるＣＤ１３７との交差反応性が有利である。なぜなら、それは、代替抗体を使用する必要を伴わずに、抗体分子の動物テストを可能にするためである。ＣＤ１３７、１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５及び１９２３Ａｂ６に結合する、開示されている結合タンパク質は、全てが、著しい親和性を伴ってカニクイザルからのＣＤ１３７に結合する。開示されている抗体はマウスＣＤ１３７に結合しないが、ヒト化ＣＤ１３７マウスが利用可能であり、インビボでの前臨床マウス腫瘍モデルにおいて、開示されている抗体の有効性を試験するために使用することができる。

【０３４１】

開示されている抗ＣＤ１３７抗体によるＴ細胞活性化を、複数のインビトロアッセイを使用して調べた。抗ＣＤ１３７部分の生物活性は、ＣＤ１３７を過剰発現し、ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターを保有するアッセイ細胞を使用して、架橋依存的ＣＤ１３７シグナル伝達を誘導するその能力により決定された。また、架橋抗ＣＤ１３７は、ＰＢＭＣにおける抗ＣＤ３刺激ＩＦＮγ放出を増強させる。

【０３４２】

一部の実施形態では、本明細書中に開示される結合タンパク質は、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み得る。当業者は、保存的アミノ酸置換が、類似の構造的又は化学的特性、例えば、類似の側鎖などを有する別のアミノ酸を用いた、一つのアミノ酸の置換であることを認識するであろう。例示的な保存的置換は、当技術分野、例えば、Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅ，Ｔｈｅ Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｃｏｍｐａｎｙ，４ｔｈ Ｅｄ．（１９８７）において記載されている。

【０３４３】

「保存的修飾」は、アミノ酸配列を含む結合タンパク質の結合特徴に有意に影響を及ぼさない、又はそれを変化させないアミノ酸修飾を指す。保存的修飾は、アミノ酸置換、付加、及び欠失を含む。保存的置換は、アミノ酸が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、十分に定義されており、酸性側鎖（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性側鎖（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性側鎖（例、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、非荷電極性側鎖（例、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン）、芳香族側鎖（例、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン）、脂肪族側鎖（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオ

ニン）、アミド（例、アスパラギン、グルタミン）、ベータ分岐側鎖（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び硫黄含有側鎖（システイン、メチオニン）を伴うアミノ酸を含む。さらに、ポリペプチド中の任意の天然残基はまた、アラニンスキャニング変異誘発について以前に記載されたように、アラニンで置換され得る（ＭａｃＬｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ａｃｔａ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｓｃａｎｄ Ｓｕｐｐｌ ６４３：５５－６７；Ｓａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ａｄｖ Ｂｉｏｐｈｙｓ ３５：１－２４）。本明細書中に開示される結合タンパク質へのアミノ酸置換は、公知の方法、例えば、ＰＣＲ変異誘発により作製され得る（米国特許第４，６８３，１９５号）。

【０３４４】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１６、１８、又は２０において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変重鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１６、１８、又は２０の可変重鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１６、１８、又は２０の可変重鎖配列を含み、重鎖可変配列において一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号１６、１８、又は２０の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３４５】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１６、１８、又は２０において示される結合タンパク質重鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変重鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号１６、１８、又は２０において示される可変重鎖配列及び配列番号１７、１９、又は２１において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３４６】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１７、１９、又は２１において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変軽鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１７、１９、又は２１の可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１７、１９、又は２１の可変軽鎖配列を含み、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、軽鎖可変配列中の１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号１７、１９、又は２１の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３４７】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号１７、１９、又は２１において示される結合タンパク質軽鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変軽鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号１６、１８、又は２９において示される可変重鎖配列及び配列番号１７、１９、又は２１において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３４８】

ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体

特定の実施形態では、本開示は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体から由来するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール及び抗ＣＤ１３７抗体から由来するＣＤ１３７の第一の結合モジュールを含むＰ

ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体を提供し、それにおいて、二重特異性体は、ＣＤ１３７を刺激し、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。

【０３４９】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、表５中に開示される重鎖　を含む。例えば、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、１９２３Ａｂ３のＶＨから由来するＣＤＲ配列のセットを伴うＨＣ、及びＦｃ受容体機能を減少又は切断するためのアミノ酸修飾を伴う又は伴わない改変ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域を含み得る。一部の実施形態では、ＨＣは、本明細書中に開示されるＣＤ１３７に結合する結合タンパク質、例えば１９２３Ａｂ４のＶＨ領域及びＶＬ領域から由来するＣＤＲ配列のセットを伴うｓｃＦｖをさらに含み得る。一部の実施形態では、ｓｃＦｖは、ＨＣのＮ又はＣ末端に位置付けられるリンカーによりＨＣに付着され得る。

【０３５０】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、表５中に開示される軽鎖　を含む。例えば、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、１９２３Ａｂ３のＶＬから由来するＣＤＲ配列のセットを伴うＬＣを含み得る。一実施形態では、ＬＣは、本明細書中に開示されるＣＤ１３７に結合する結合タンパク質、例えば１９２３Ａｂ４のＶＨ領域及びＶＬ領域から由来するＣＤＲ配列のセットを伴うｓｃＦｖをさらに含み得る。一部の実施形態では、ｓｃＦｖは、ＬＣのＮ又はＣ末端に位置付けられるリンカーによりＬＣに付着され得る。

【表５】

表５：ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体

二重特異性体参照番号	重鎖(HC)	軽鎖(LC)
1923Ab8	配列番号38	配列番号40
1923Ab11	配列番号44	配列番号40
1923Ab12	配列番号45	配列番号46
1923Ab13	配列番号47	配列番号40
1923Ab18	配列番号50	配列番号40

【０３５１】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ８（図１３Ｂ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＡｂ３重鎖のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来する二つのｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）を含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ８の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、開示されている結合タンパク質のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号３８及び配列番号４０において提供される。

【０３５２】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１１（図１３Ｅ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＡｂ３重鎖のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来する二つのｓｃＦｖ断片（ＶＬがＶＨに先行する）を含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ１１の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号４４及び配列番号４０において提供される。

【０３５３】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１２（図１３Ｆ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＡｂ３軽鎖のＮ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来する二つのジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）を含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ１２の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号４５及び配列番号４６において提供される。
【０３５４】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１３（図１３Ｇ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＡｂ３重鎖のＮ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来する二つのジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）を含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ１３の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号４７及び配列番号４０において提供される。
【０３５５】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性１９２３Ａｂ１８（図１３Ｊ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＡｂ３重鎖のＣ末端に付着された１９２３Ａｂ４から由来する二つのジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）を含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ１８の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号５０及び配列番号４０において提供される。
【０３５６】
抗ＰＤ－Ｌ１部分の生物活性は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断アッセイを使用してＴＣＲシグナル伝達を回復させる、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を破壊するその能力により決定された。抗ＣＤ１３７部分の生物活性は、ＣＤ１３７を過剰発現し、ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターを保有するアッセイ細胞を使用して、架橋依存的ＣＤ１３７シグナル伝達を誘導するその能力により決定された。
【０３５７】
一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、単独で、又は組み合わせにおいて、以下の特徴の一つ又は複数を示す：
（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的であり、ヒトＣＤ１３７に結合する；
（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７と交差反応する；
（ｃ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する；
（ｄ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊（例、低下又は防止）する；
（ｅ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す；
（ｆ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；
（ｇ）ＣＤ１３７シグナル伝達に対するＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ；
（ｈ）ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する；
（ｉ）ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる；
（ｊ）ＭＣ３８－ｈＰＤ－Ｌ１同系腫瘍モデルを使用して、ヒトＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７ノックインにおいて抗腫瘍有効性を実証する；
（ｋ）腫瘍微小環境においてＣＤ８＋Ｔ細胞を増加させる；
（ｌ）腫瘍微小環境においてＴｒｅｇ細胞のパーセンテージを減少させる；及び
（ｍ）腫瘍微小環境の外側のオンターゲット毒性を減少させる。
【０３５８】
特定の実施形態では、二重特異性体は、免疫細胞増殖、生存、細胞溶解活性ＣＤ８　Ｔ細胞及びサイトカインの分泌を増強する能力を有する。特定の実施形態では、開示されて

いるＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体は、ＣＭＶリコールアッセイにおいてヒトＴ細胞を活性化することが示されており、単一特異性抗体の組み合わせよりも大きな効力を伴う。

【０３５９】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される結合タンパク質は、以下からなる群より選択される特徴を持つ：ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する、Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害性シグナルを除去する、ＣＤ１３７シグナル伝達へのＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する、ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる、ＭＣ３８－ｈＰＤ－Ｌ１同系腫瘍モデルを使用してヒトＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７ノックインにおいて抗腫瘍有効性を実証する、腫瘍微小環境においてＣＤ８＋／Ｔ細胞を増加させる、及び腫瘍中のＴｒｅｇ細胞のパーセンテージを減少させる。

【０３６０】

特定の実施形態では、二重特異性体は、ＣＤ１３７及びＰＤ－Ｌ１発現細胞に結合する能力を有する。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への二重特異性体の結合は、ＰＤ－１とのその相互作用を破壊し、それによって、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞におけるＴＣＲシグナル伝達の回復がもたらされる。また、ＰＤ－Ｌ１結合二重特異性体はＣＤ１３７シグナル伝達を活性化するのに対し、単一特異性抗ＰＤ－Ｌ１抗体単独はＣＤ１３７シグナル伝達を誘導しない。さらに、それらは、ＰＢＭＣにおける抗ＣＤ３刺激ＩＦＮγ放出を増強する。より具体的には、二重特異性体は、インビトロでＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅するようにＣＤ８＋を再配向する。一実施形態では、ヒトＣＤ１３７及びヒトＰＤ－Ｌ１ダブルノックインマウスにおいてヒトＰＤ－Ｌ１発現ＭＣ３８マウス腫瘍を使用して、開示されている二重特異性体は、強い抗腫瘍効力を示した。

【０３６１】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変重鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０の可変重鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０の可変重鎖配列を含み、重鎖可変配列において一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３６２】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０において示される結合タンパク質重鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変重鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０において示される可変重鎖配列及び配列番号４０又は４６において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３６３】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０又は４６において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変軽鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０又は４６の可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０又は４６の可変軽鎖配列を含み、軽鎖可変配列において一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例え

ば、１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号４０又は４６の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３６４】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０又は４６において示される結合タンパク質軽鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変軽鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号３８、４４、４５、４７、又は５０において示される可変重鎖配列及び配列番号４０又は４６において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３６５】

ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体

代替的な実施形態では、本開示は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体から由来するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール及びヒトＴＧＦβＲＩＩのＥＣＤから由来する腫瘍微小環境調節因子を含むＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体を提供し、それにおいて、二重特異性体は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１チェックポイントを脱抑制し、腫瘍微小環境においてＴＧＦβの免疫抑制効果を中和する。

【０３６６】

他の実施形態では、本開示は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体から由来するＰＤ－Ｌ１抗体足場モジュール及びヒトＴＧＦβ受容体ＩＩ型のＥＣＤから由来するＴＧＦβの第一の結合モジュールを含むＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体を提供し、それにおいて、二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１及びＴＧＦβの両方に結合し、ＴＭＥにおいてＴＧＦβの生物学的活性を中和することができる。

【０３６７】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性１９２３Ａｂ２０（図１３Ｌ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、及び１９２３Ａｂ３重鎖のＣ末端に付着されたＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ａ）は、１９２３Ａｂ２０の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表６は、重鎖及び軽鎖、それぞれ配列番号５１及び配列番号４０のアミノ酸配列を提供する。

【表６】

表６：ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体

二重特異性体の参照番号	重鎖(HC)	軽鎖(LC)
1923Ab20	配列番号51	配列番号40

【０３６８】

抗ＰＤ－Ｌ１部分の生物活性は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断アッセイを使用してＴＣＲシグナル伝達を回復させる、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を破壊するその能力により決定された。ヒトＴＧＦβの生物活性を中和する、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）の能力は、ＳＢＥ（ＳＭＡＤ結合エレメント）レポーター細胞を使用してＴＧＦβ誘導性シグナル伝達カスケードを遮断するその能力により決定された。

【０３６９】

一部の実施形態では、二重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の特徴の一つ又は複数を示す：（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１について特異的であり、ヒトＴＧＦβに結合する；（ｂ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する；（ｃ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒

介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；（ｄ）ヒトＴＧＦβに結合し、その生物学的活性を中和する；（ｅ）腫瘍微小環境の外側での低下した毒性；（ｆ）腫瘍微小環境においてＣＤ８＋Ｔ細胞を増加させる；又は（ｇ）腫瘍微小環境においてＴｒｅｇ細胞のパーセンテージを低下させる。

【０３７０】

特定の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、免疫細胞の増殖、生存、ＣＤ８　Ｔ細胞の細胞溶解活性、及びサイトカインの分泌を増強する能力を有する。特定の実施形態では、開示されているＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、ＣＭＶリコールアッセイにおいてヒトＴ細胞を活性化することが示されており、単一特異性抗体の組み合わせよりも大きな効力を伴う。

【０３７１】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される結合タンパク質は、以下からなる群から選択される特徴を有する：ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する、Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを除去する、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する、ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる、腫瘍微小環境においてＣＤ８＋Ｔ細胞を増加させる、及び腫瘍においてＴｒｅｇ細胞のパーセンテージを減少させる。

【０３７２】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ二重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の機能的特徴の一つ又は複数を示す：ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊し、Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを除去し、ＴＧＦβシグナル伝達を阻害する。

【０３７３】

特定の実施形態では、開示されているウレルマブ－ＮＲと組み合わせた二重特異性体は、ＣＭＶリコールアッセイにおいてヒトＴ細胞を活性化することが示されている。

【０３７４】

一実施形態では、ＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む、開示されている抗体は、ＳＢＥレポーター遺伝子を担持するＨＥＫ細胞においてＴＧＦβ誘導性シグナル伝達を遮断する。

【０３７５】

特定の実施形態では、二重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１発現細胞に結合する能力を有する。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への二重特異性体の結合は、ＰＤ－１とのその相互作用を破壊し、それによって、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞におけるＴＣＲシグナル伝達の回復がもたらされる。

【０３７６】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号５１において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変重鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号５１の可変重鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号５１の可変重鎖配列を含み、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、重鎖可変配列における１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号５１の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３７７】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号５１において示される結合タンパク質重鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変重鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号５１において示される可変重鎖配列及び配列番号４０において示される可変軽鎖配列を

含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３７８】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変軽鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０の可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０の可変軽鎖配列を含み、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、軽鎖可変配列における１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号４０の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３７９】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号４０において示される結合タンパク質軽鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変軽鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号５１において示される可変重鎖配列及び配列番号４０において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３８０】

ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体

特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、三重特異性体であり、ＰＤ－Ｌ１に結合する抗体足場モジュール（抗体から由来する）、ＴＧＦβ受容体ＩＩ結合タンパク質を含む第一の結合モジュール、及びＣＤ１３７に結合する第二の結合モジュール（抗体から由来する）を含む組換えタンパク質の形態において構築される。

【０３８１】

特定の実施形態では、本開示は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体から由来するＰＤ－Ｌ１に結合する抗体足場モジュール、ＴＧＦβ受容体２型のＥＣＤから由来するＴＧＦβの第一の結合モジュール、及び抗ＣＤ１３７抗体から由来するＣＤ１３７の第二の結合モジュールを含む三重特異性体を提供し、それにおいて、三重特異性体は、ＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７に結合し、また、局所微小環境からＴＧＦβを枯渇させ、それにより、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。

【表７】

表７：ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＤ１３７三重特異性体

三重特異性体の参照番号	重鎖1	重鎖2	軽鎖
1923Ab7	配列番号38		配列番号39
1923Ab9	配列番号41	配列番号42	配列番号39
1923Ab10	配列番号43	配列番号42	配列番号39
1923Ab17	配列番号50		配列番号39
1923Ab19	配列番号51		配列番号52

【０３８２】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ７（図１３Ａ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、１９２３Ａｂ３重鎖のＣ末端に付着している

１９２３Ａｂ４から由来する二つのｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）、及び１９２３Ａｂ３軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ７の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、三重特異性体のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表７は、重鎖及び軽鎖、それぞれ配列番号３８及び配列番号３９のアミノ酸配列を提供する。

【０３８３】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ９（図１３Ｃ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ変異及びノブ・イン・ホール」（ＫｉＨ）変異を伴うヘテロ二量体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、「ノブ」重鎖のＣ末端に付着している１９２３Ａｂ４から由来する一つのｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）、及び１９２３Ａｂ３軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ９の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、三重特異性体のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表７は、重鎖１（ノブ）（配列番号４１）、重鎖２（ホール）（配列番号４２）、及び軽鎖（配列番号３９）のアミノ酸配列を提供する。

【０３８４】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１０（図１３Ｄ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ変異及びノブ・イン・ホール」（ＫｉＨ）変異を伴うヘテロ二量体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、「ノブ」重鎖のＣ末端に付着している１９２３Ａｂ４から由来する一つのｓｃＦｖ断片（ＶＬがＶＨに先行する）、及びＡｂ３軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ１０の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、三重特異性体のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表７は、重鎖１（ノブ）（配列番号４３）、重鎖２（ホール）（配列番号４２）、及び軽鎖（配列番号３９）のアミノ酸配列を提供する。

【０３８５】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１７（図１３Ｉ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、Ａｂ３重鎖のＣ末端に付着している１９２３Ａｂ４から由来する二つのジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）、及びＡｂ３軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ１７の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、三重特異性体のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表７は、重鎖及び軽鎖、それぞれ配列番号５０及び配列番号３９のアミノ酸配列を提供する。

【０３８６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性１９２３Ａｂ１９（図１３Ｋ）は、ＰＤ－Ｌ１に結合する１９２３Ａｂ３からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４ＡＬ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、１９２３Ａｂ３軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする２つのポリペプチド、及び１９２３Ａｂ３重鎖のＣ末端に付着している１９２３Ａｂ４から由来する二つのジスルフィド結合安定化ｓｃＦｖ断片（ＶＨがＶＬに先行する）を含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ１９の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、三重特異性体のサブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表７は、重鎖及び軽鎖、それぞれ配列番号５１及び配列番号５２のアミノ酸配列を提供する。

【０３８７】

天然ＩｇＧ様構造足場に基づく組換え体のヘテロ二量体化を促すために、ＣＨ３ドメインを操作して、各重鎖中に「ノブ」又は「ホール」のいずれかを作製して、ヘテロ二量体化を促すことを含むノブ・イントゥ・ホール（ＫｉＨ）技術が広く適用されてきた。一部

の実施形態では、特に、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質は、非対称設計により特徴付けられる。「ノブ」変異の一例は、ＣＨ３ドメイン中にＴ３６６Ｗを含み、「ホール」変異の一例は、ＣＨ３ドメイン中にＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｙ４０７Ｖを含む。一実施形態では、安定化ジスルフィド結合は、「ノブ」における追加のＳ３５４Ｃ変異、及び「ホール」における追加のＹ３４９Ｃ変異により導入され得る。全ての残基番号はＥＵナンバリング中にある。

【０３８８】

ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の生物活性を、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ又はＣＤ１３７により調節される、対応するシグナル伝達事象により決定した。一部の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１部分は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断アッセイを使用してＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を破壊するその能力により決定された。抗ＣＤ１３７部分の生物活性は、ＣＤ１３７を過剰発現し、ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターを保有するアッセイ細胞を使用して、架橋依存的ＣＤ１３７シグナル伝達を誘導するその能力により決定された。抗ＴＧＦ－β部分の生物活性は、ＳＢＥ（ＳＭＡＤ結合エレメント）レポーター細胞を使用してＴＧＦβ誘導性シグナル伝達カスケードを遮断するその能力により決定された。

【０３８９】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、単独で又は組み合わせにおいて、以下の機能的特徴の一つ又は複数を示す：

（ａ）ヒトＰＤ－Ｌ１、ＣＤ１３７及びＴＧＦβに結合することが可能である；

（ｂ）カニクイザルＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７と交差反応する；

（ｃ）ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊（例、低下又は防止）する；

（ｄ）ＣＤ１３７に結合するヒトＣＤ１３７Ｌを破壊（例、低下又は防止）する；

（ｅ）ＣＤ１３７に対して高速オン及び高速オフ特性を示す；

（ｆ）Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを脱抑制する；

（ｇ）ＴＧＦβシグナル伝達を阻害し、その生物学的活性を中和する；

（ｈ）ＣＤ１３７シグナル伝達へのＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ；

（ｐｉ）ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する；及び

（ｊ）ＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる。

【０３９０】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体は、以下の機能的特徴の一つ又は複数を、単独で又は組み合わせにおいて示す：ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の相互作用を破壊する、Ｔ細胞ＰＤ－Ｌ１媒介性チェックポイント阻害シグナルを除去する、ＴＧＦβシグナル伝達を阻害する、ＣＤ１３７シグナル伝達へのＰＤ－Ｌ１依存的アゴニスト活性を持つ、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する、及びＣＤ８　Ｔ細胞を活性化することによりＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅させる。

【０３９１】

特定の実施形態では、三重特異性体は、免疫細胞増殖、生存、細胞溶解活性ＣＤ８　Ｔ細胞、及びサイトカインの分泌を増強する能力を有する。特定の実施形態では、開示されている三重特異性体は、ＣＭＶリコールアッセイにおいてヒトＴ細胞を活性化することが示されており、単一特異性抗体の組み合わせよりも大きな効力を伴う。

【０３９２】

一実施形態では、三重特異性体は、ＳＢＥレポーター遺伝子を担持するＨＥＫ細胞におけるＴＧＦβ誘導シグナル伝達を遮断する。

【０３９３】

特定の実施形態では、三重特異性体は、ＣＤ１３７及びＰＤ－Ｌ１発現細胞に結合する能力を有する。別の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への三重特異性体の結合は、ＰＤ－１とのその相互作用を破壊し、それによって、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞におけるＴＣＲシグナル伝達の回復がもたらされる。また、ＰＤ－Ｌ１結合二重特異性体は、ＣＤ１３７シグナル伝達を活性化する。さらに、それらは、ＰＢＭＣにおける抗ＣＤ３刺激ＩＦＮγ放出を増強

する。より具体的には、三重特異性体は、インビトロでＰＤ－Ｌ１発現腫瘍細胞を死滅するようにＣＤ８＋を再配向する。

【０３９４】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変重鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１の可変重鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１の可変重鎖配列を含み、重鎖可変配列において一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３９５】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１において示される結合タンパク質重鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変重鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１において示される可変重鎖配列及び配列番号３９又は５２において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３９６】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３９又は５２において示されるアミノ酸配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む可変軽鎖配列を含む。他の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３９又は５２の可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合及び／又は機能的活性を保持する。なおさらなる実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３９又は５２の可変軽鎖配列を含み、軽鎖可変配列において一つ又は複数の保存的アミノ酸置換、例えば、１、２、３、４、５、１～２、１～３、１～４、又は１～５の保存的アミノ酸置換を有する。なおさらなる実施形態では、一つ又は複数の保存的アミノ酸置換は、配列番号３９又は５２の一つ又は複数のフレームワーク領域内に入る（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）。

【０３９７】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号３９又は５２において示される結合タンパク質軽鎖可変領域配列と少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を伴う可変軽鎖配列を含み、フレームワーク領域中に一つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含み（Ｋａｂａｔのナンバリングシステムに基づく）、ならびに配列番号３８、４１、４２、４３、５０、又は５１において示される可変重鎖配列及び配列番号３９又は５２において示される可変軽鎖配列を含む結合タンパク質の結合活性及び／又は機能活性を保持する。

【０３９８】

ＣＤ１３７／ＴＧＦβ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体

特定の実施形態では、本開示の結合タンパク質は、三重特異性であり、ＣＤ１３７に結合する抗体足場モジュール（抗体から由来する）、ＴＧＦβ受容体ＩＩ結合タンパク質を含む第一の結合モジュール、及びＰＤ－Ｌ１に結合する第二の結合モジュール（抗体から由来する）を含む組換えタンパク質の形態において構築される。

【０３９９】

特定の実施形態では、本開示は、抗ＣＤ１３７抗体から由来するＣＤ１３７に結合する抗体足場モジュール、ＴＧＦβ受容体２型のＥＣＤから由来するＴＧＦβの第一の結合モ

ジュール、及び抗ＰＤ－Ｌ１抗体から由来するＰＤ－Ｌ１の第二の結合モジュールを含む三重特異性体を提供し、それにおいて、三重特異性体は、ＣＤ１３７、ＰＤ－Ｌ１に結合し、また、局所微小環境からＴＧＦβを枯渇させ、それにより、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＴ細胞を活性化する。

【表８】

表８：ＣＤ１３７／ＴＧＦβＲＩＩ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性体

三重特異性体の参照番号	重鎖	軽鎖
1923Ab16	配列番号48	配列番号49

【０４００】

一部の実施形態では、ＣＤ１３７／ＴＧＦβＲＩＩ／ＰＤ－Ｌ１三重特異性１９２３Ａｂ１６（図１３Ｈ）は、ＣＤ１３７に結合する１９２３Ａｂ４からの二つのＦａｂ、Ｌ２３４Ａ　Ｌ２３５Ａ変異を伴うヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、１９２３Ａｂ４重鎖のＣ末端に付着している１９２３Ａｂ３から由来する二つのｓｃＦｖ断片（ＶＬがＶＨに先行する）、及びＡｂ４軽鎖のＣ末端に付着しているＴＧＦβＲＩＩの細胞外ドメインをコードする二つのポリペプチドを含む。図１４（Ｂ）は、１９２３Ａｂ１６の重鎖及び軽鎖の説明を提供する。図１５は、サブコンポーネントのより詳細な説明を提供する。表８は、重鎖及び軽鎖、それぞれ配列番号４８及び配列番号４９のアミノ酸配列を提供する。

【０４０１】

結合タンパク質を産生する方法

本明細書中に開示される結合タンパク質は、当技術分野において公知の任意の方法により作製され得る。例えば、レシピエントは、可溶性組換えヒトＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７タンパク質、又はその担体タンパク質とコンジュゲートされた断片もしくはペプチドで免疫化されてもよい。免疫化の任意の適切な方法を使用することができる。そのような方法は、アジュバント、他の免疫刺激剤、反復ブースター免疫化、及び一つ又は複数の免疫化経路の使用を含むことができる。

【０４０２】

ヒトＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７の任意の適切な供給源を、本明細書中に開示される組成物及び方法の非ヒト又はヒト抗ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７抗体の生成のための免疫原として使用することができる。

【０４０３】

ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７抗原の異なる形態を使用して、生物学的に活性な抗体を生成するのに十分である抗体を生成してもよい。このように、誘発性ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７抗原は、単一エピトープ、複数のエピトープ、あるいはタンパク質全体単独、あるいは一つ又は複数の免疫原性増強剤との組み合わせにおいてでもよい。一部の態様では、誘発性抗原は、単離された可溶性完全長タンパク質、又は完全長配列未満を含む可溶性タンパク質である（例、ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７の特定の部分又はエピトープを含むペプチドで免疫化している）。本明細書中で使用される場合、用語「部分」は、適している場合、目的の抗原の免疫原性エピトープを構成する最小数のアミノ酸又は核酸を指す。目的の細胞の形質転換のために適切な任意の遺伝子ベクター用いてもよく、限定されないが、アデノウイルスベクター、プラスミド、及び非ウイルスベクター、例えばカチオン性脂質などを含む。

【０４０４】

様々な哺乳動物宿主、例えばマウス、齧歯類、霊長類、ヒトなどからモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を調製することが望ましい。そのようなモノクローナル抗体を調製するための技術の説明は、例えば、Ｓｔｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．）ＢＡＳＩＣ　ＡＮＤ　ＣＬＩＮＩＣＡＬ　ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ　（４ｔｈ　ｅｄ．）Ｌａｎｃｅ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｌｏｓ　Ａｌｔｏｓ，ＣＡ，及び本明細書中に引用される参考文献；Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅ（１９８８）ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ

ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ；Ｇｏｄｉｎｇ（１９８６）ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：ＰＲＩＮＣＩＰＬＥＳ ＡＮＤ ＰＲＡＣＴＩＣＥ（２ｎｄ ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ．において見出され得る。典型的には、所望の抗原で免疫化された動物からの脾臓細胞は、一般に骨髄腫細胞との融合により不死化される。Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１－５１９を参照のこと。不死化の代替的な方法は、エプスタインバールウイルス、癌遺伝子、もしくはレトロウイルスでの形質転換、又は当技術分野において公知の他の方法を含む。例えば、Ｄｏｙｌｅ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．１９９４ ａｎｄ ｐｅｒｉｏｄｉｃ ｓｕｐｐｌｅ ｓｕｐｐｌｅｓ）ＣＥＬＬ ａｎｄ ＴＩＳＳＵＥ ＣＵＬＴＵＲＥ：ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＰＲＯＣＥＤＵＲＥＳ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ．を参照のこと。単一の不死化細胞から生じるコロニーは、抗原についての所望の特異性及び親和性の抗体の産生についてスクリーニングされ、そのような細胞により産生されるモノクローナル抗体の収率は、脊椎動物宿主の腹腔中への注射を含む様々な技術により増強され得る。あるいは、例えば、Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１により概説されている一般的なプロトコルに従って、ヒトＢ細胞からのＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片をコードするＤＮＡ配列を単離してもよい。このように、抗体は、当技術分野において熟練した研究者が精通している様々な技術により得られ得る。

【０４０５】

他の適切な技術は、ファージ、酵母、ウイルス又は類似のベクター中での抗体のライブラリーの選択を含む。例えば、Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（上記）；Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６を参照のこと。本明細書中に開示されるポリペプチド及び抗体は、キメラ抗体又はヒト化抗体を含む改変を伴って又は伴わずに使用され得る。頻繁に、ポリペプチド及び抗体は、共有結合的に又は非共有結合的に、検出可能なシグナルを提供する物質を連結することにより標識される。多種多様な標識及びコンジュゲーション技術が公知であり、科学文献及び特許文献の両方において広範囲に報告されている。適切な標識は、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光部分、化学発光部分、磁性粒子、及び同様のものを含む。そのような標識の使用を教示する特許は、米国特許第３，８１７，８３７号；第３，８５０，７５２号；第３，９９６，３４５号；第４，２７７，４３７号；第４，２７５，１４９号；及び第４，３６６，２４１号を含む。また、組換え免疫グロブリンが産生されてもよい。Ｃａｂｉｌｌｙの米国特許第４，８１６，５６７号；及びＱｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１００２９－１００２３を参照のこと；又はトランスジェニックマウスにおいて作製され得る。Ｎｉｌｓ Ｌｏｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９４），Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－８５９；及びＭｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６；ＴＲＡＮＳＧＥＮＩＣ ＡＮＩＭＡＬＳ ＡＮＤ ＭＥＴＨＯＤＳ ＯＦ ＵＳＥ（ＷＯ２０１２／６２１１８），Ｍｅｄａｒｅｘ，Ｔｒｉａｎｎｉ，Ａｂｇｅｎｉｘ，Ａｂｌｅｘｉｓ，ＯｍｉｎｉＡｂ，Ｈａｒｂｏｕｒ及び他の技術を参照のこと。

【０４０６】

一部の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７に結合する産生抗体の能力は、標準的な結合アッセイ、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、免疫蛍光法、フローサイトメトリー分析、走化性アッセイ、及び細胞遊走アッセイなどを使用して評価することができる。一部の態様では、産生抗体はまた、ＰＤ－Ｌ１を阻害する、ならびに／あるいはＰＤ－Ｌ１を遮断すること及び／又はＣＤ１３７受容体シグナル伝達を活性化することからＣＤ１３７を活性化するその能力について評価され得る。

【０４０７】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ

ー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーは典型的な精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡを使用して、ヒトγ１、γ２、又はγ４重鎖に基づく抗体を精製することができる（例、Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８３　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３を参照のこと）。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプについて及びヒトγ３について推奨される（例、Ｇｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９８６　ＥＭＢＯ　Ｊ．５：１５６７－１５７５を参照のこと）。親和性リガンドが付着されるマトリックスは、最もしばしば、アガロースであるが、しかし、他のマトリックスが利用可能である。機械的に安定なマトリクス、例えば制御された細孔ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどは、アガロースを用いて達成することができるよりも速い流量及び短い処理時間を可能にする。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ、Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ、Ｎ．Ｊ．）が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂（例えばポリアスパラギン酸カラムなど）でのヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）クロマトグラフィーでのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿などがまた、回収される抗体に依存して利用可能である。

【０４０８】

任意の予備精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合物は、典型的には低塩濃度（例、約０～０．２５Ｍ塩）で実施される、約２．５～４．５の間のｐＨの溶出緩衝液を使用した低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに供され得る。

【０４０９】

また、含まれるのは、本開示の抗体又は抗体断片をコードする単離ポリヌクレオチド配列により表されるヌクレオチド配列の全て又は一部（例、可変領域をコードする部分）に、本明細書中で定義されるように、低、中、及び高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸である。ハイブリダイズ核酸のハイブリダイズ部分は、典型的には、少なくとも１５（例、２０、２５、３０、又は５０）のヌクレオチド長である。ハイブリダイズ核酸のハイブリダイズ部分は、抗ＰＤ－Ｌ１及び／又はＣＤ１３７ポリペプチド（例、重鎖又は軽鎖可変領域）、あるいはその補体をコードする核酸の一部又は全ての配列と、少なくとも８０％、例えば、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９８％同一である。本明細書中に記載される種類のハイブリダイズ核酸は、例えば、クローニングプローブ、プライマー、例えば、ＰＣＲプライマー、又は診断プローブとして使用することができる。

【０４１０】

ポリヌクレオチド、ベクター、及び細胞

他の実施形態は、本明細書中に開示される結合タンパク質又はその断片をコードする配列を含む単離ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞、ならびに開示されている結合タンパク質の産生のための組換え技術を包含する。単離ポリヌクレオチドは、例えば、全長モノクローナル抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖ断片、ダイアボディ、直線状抗体、一本鎖抗体分子、ミニ抗体を含む、結合タンパク質の任意の所望の形態をコードし得る。

【０４１１】

一部の実施形態は、配列番号１、３、１６、１８、及び２０のいずれかのアミノ酸配列を有する結合タンパク質又はその断片の重鎖可変領域をコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態は、配列番号２、４、１７、１９、及び２１のいずれかのアミノ酸配列を有する結合タンパク質又はその断片の軽鎖可変領域をコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。

【０４１２】

一実施形態では、単離ポリヌクレオチド配列は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する結合タンパク質又はその断片をコードする：（ａ）配列番号１を含む重鎖可変領域配列及び配列番号２を含む軽鎖可変領域配列；（ｂ）配列番号３を含む重鎖可変領域配列及び配列番号４を含む軽鎖可変領域配列；（ｃ）配列番号１６を含む重鎖可変領域配列及び配列番号１７を含む軽鎖可変領域配列；（ｄ）配列番号１８を含む重鎖可変領域配列及び配列番号１９を含む軽鎖可変領域配列；又は（ｅ）配列番号２０を含む重鎖可変領域配列及び配列番号２１を含む軽鎖可変領域配列。

【０４１３】

別の実施形態では、単離ポリヌクレオチド配列は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する結合タンパク質又はその断片をコードする：（ａ）配列番号１と９０％、９５％、又は９９％である重鎖可変領域配列及び配列番号２と９０％、９５％、又は９９％同一である軽鎖可変領域配列；（ｂ）配列番号３と９０％、９５％、又は９９％同一である重鎖可変領域配列及び配列番号４と９０％、９５％、又は９９％同一である軽鎖可変領域配列；（ｃ）配列番号１６と９０％、９５％、又は９９％同一である重鎖可変領域配列及び配列番号１７と９０％、９５％、又は９９％同一である軽鎖可変領域配列；（ｄ）配列番号１８と９０％、９５％、又は９９％同一である重鎖可変領域配列及び配列番号１９と９０％、９５％、又は９９％同一である軽鎖可変領域配列；又は（ｅ）配列番号２０と９０％、９５％、又は９９％同一である重鎖可変領域配列及び配列番号２１と９０％、９５％、又は９９％同一である軽鎖可変領域配列。

【０４１４】

本明細書中に開示される結合タンパク質又はその断片をコードする配列を含むポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の一つ又は複数の調節配列又は制御配列に融合することができ、当技術分野において公知の適切な発現ベクター又は細胞中に含むことができる。重鎖又は軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチド分子の各々は、定常ドメイン、例えばヒト定常ドメインなどをコードするポリヌクレオチド配列に独立して融合することができ、インタクトな抗体の産生を可能にする。あるいは、ポリヌクレオチド、又はその一部分は、一緒に融合することができ、一本鎖抗体の産生のための鋳型を提供する。

【０４１５】

組換え産生のために、結合タンパク質又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、クローニング（ＤＮＡの増幅）のために又は発現のために複製可能なベクター中に挿入される。結合タンパク質又はその断片を発現するための多くの適切なベクターが利用可能である。ベクター構成要素は一般的に、限定されないが、以下の一つ又は複数を含む：シグナル配列、複製の起点、一つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列。

【０４１６】

本明細書中に開示される結合タンパク質又はその断片はまた、融合ポリペプチドとして産生することができ、それにおいて、結合タンパク質は、異種ポリペプチド、例えば成熟タンパク質又はポリペプチドのアミノ末端に特定の切断部位を有するシグナル配列又は他のポリペプチドなどと融合される。選択された異種シグナル配列は、典型的には、細胞により認識及び処理される（即ち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものである。原核細胞については、シグナル配列は、原核シグナル配列により置換することができる。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、リポタンパク質、熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダー、及び同様のものであることができる。酵母分泌については、天然シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼアルファ因子（サッカロミセス及びクルイベロマイセスα因子リーダーを含む）、酸ホスファターゼ、Ｃ．アルビカンスグルコアミラーゼ、又はＷＯ９０／１３６４６において記載されるシグナルから得られたリーダー配列で置換することができる。哺乳動物細胞では、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスｇＤシグナルを使用することができる。そのような前駆体領域についてのＤＮＡは、リーディングフレームにおいて結合タンパク質又はその断片をコードするＤＮＡに連結される。

【０４１７】
発現ベクター及びクローニングベクターは、ベクターが一つ又は複数の選択された細胞中で複製することを可能にする核酸配列を含む。一般的に、クローニングベクターにおいて、この配列は、ベクターが宿主染色体ＤＮＡとは独立して複製することを可能にし、複製の起源又は自律的に複製する配列を含むものである。そのような配列は、様々な細菌、酵母、及びウイルスについて周知である。プラスミドｐＢＲ３２２からの複製の起点が、大半のグラム陰性細菌について適切であり、２μプラスミド起点は酵母について適切であり、様々なウイルス起点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ、及びＢＰＶ）が、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターについて有用である。一般的に、複製の起点は、哺乳動物発現ベクターのために必要とされない（ＳＶ４０起点が、典型的には、使用され得る。なぜなら、それは、早期プロモーターを含むからである）。
【０４１８】
発現ベクター及びクローニングベクターは、発現の同定を促進するために、選択マーカーをコードする遺伝子を含み得る。典型的な選択マーカー遺伝子は、抗生物質又は他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与する、又は代替的に、補体栄養要求性欠損である、又は他の代替物において、複合培地中に存在しない特定の栄養素を供給するタンパク質をコードし、例えば、桿菌についてＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。
【０４１９】
細胞培養
本明細書中に開示される結合タンパク質又はその断片を産生するために使用される細胞は、様々な培地中で培養されてもよい。商業的に利用可能な培地、例えばハムＦ１０（Ｓｉｇｍａ）、最小必須培地（（ＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）（Ｃｉｂｃｏ）、及びダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）などが、宿主細胞を培養するために適切である。これらの又は他の培地のいずれかが、必要な場合、ホルモン及び／又は他の成長因子（例えばインスリン、トランスフェリン、又は上皮成長因子など）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など）、緩衝液（例えばＨＥＰＥＳなど）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（例えばゲンタマイシンなど）、微量元素（例えば、通常、マイクロモル又はより低い範囲において最終濃度で存在する無機化合物など）、及びグルコース又は等価のエネルギー供給源を用いて補充され得る。任意の他の必要なサプリメントがまた、当業者に公知であろう適した濃度で含まれてもよい。培養条件、例えば温度、ｐＨ、及び同様のものは、発現のために選択された細胞で以前に使用されたものを含み、当業者には明らかであろう。
【０４２０】
非治療的な使用
本明細書中に記載される結合タンパク質は、親和性精製薬剤として有用である。このプロセスでは、結合タンパク質は、当技術分野において周知の方法を使用して、固相、例えばプロテインＡ樹脂などの上に固定化される。固定化結合タンパク質を、精製されるＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７タンパク質（又はその断片）を含むサンプルと接触させ、その後、支持体を、固定化結合タンパク質に結合される、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７タンパク質を除き、サンプル中の実質的に全ての物質を除去する適切な溶媒を用いて洗浄した。最後に、担体は、結合タンパク質からＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７タンパク質を放出する別の適切な溶媒で洗浄される。
【０４２１】
本明細書中に開示される結合タンパク質はまた、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７タンパク質を検出及び／又は定量化するための診断アッセイにおいて、例えば、特定の細胞、組織、又は血清中のＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７発現を検出するために有用である。結合タンパク質は、例えば、所与の治療及び／又は予防レジメンの有効性を決定するために、例えば、臨床検査手順の一部として疾患の発生又は進行を

モニターするために診断的に使用することができる。検出は、結合タンパク質を、検出可能な物質に共役することにより促進することができる。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、様々な陽電子放出断層撮影を使用した陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンを含む。例えば、本開示に従った診断薬としての使用のために結合タンパク質にコンジュゲートすることができる金属イオンについては、米国特許第４，７４１，９００号を参照のこと。

【０４２２】

結合タンパク質は、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７関連障害（例、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７の異常発現により特徴付けられる障害）を診断するための、又は対象がＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７関連障害を発症する増加したリスクを有するか否かを決定するための方法において使用することができる。そのような方法は、対象からの生物学的サンプルを、本明細書中に開示される結合タンパク質と接触させること、ならびにＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７への分子の結合を検出することを含む。「生物学的サンプル」により、個体、細胞株、組織培養物、あるいはＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７を潜在的に発現する細胞の他の供給源から得られた任意の生物学的サンプルを意図する。哺乳動物から組織生検及び体液を得るための方法は、当技術分野において周知である。

【０４２３】

一部の実施形態では、方法は、患者サンプル中のＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７のレベルを、対照サンプル（例、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７関連障害を有さない対象）と比較して、患者がＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７関連障害を有するか否か、あるいはＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７関連障害を発生するリスクがあるか否かを決定することをさらに含み得る。

【０４２４】

一部の実施形態では、例えば、診断目的のために、結合タンパク質を検出可能な部分で標識することが有利であろう。多数の検出可能な標識が利用可能であり、放射性同位体、蛍光標識、酵素基質標識及び同様のものを含む。標識は、様々な公知の技術を使用して、結合タンパク質と間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、結合タンパク質は、ビオチンとコンジュゲートすることができ、上に言及する三つの広範なカテゴリーの標識のいずれかは、アビジンとコンジュゲートする、又はその逆であることができる。ビオチンは、アビジンに選択的に結合し、このように、標識は、この間接的な様式において結合タンパク質とコンジュゲートさせることができる。あるいは、結合タンパク質との標識の間接的なコンジュゲートを達成するために、結合タンパク質は、小さなハプテン（例えばジゴキシンなど）とコンジュゲートすることができ、上に言及される異なる種類の標識の一つは、抗ハプテン抗体（例、抗ジゴキシン抗体）とコンジュゲートされる。このように、結合タンパク質との標識の間接的なコンジュゲーションを達成することができる。

【０４２５】

例示的な放射性同位体標識は、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉを含む。結合タンパク質は、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，１９９１，Ｃｏｌｉｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄ．Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，Ｐｕｂｓにおいて記載されている技術を使用して放射性同位体で標識することができる。放射活性は、例えば、シンチレーションカウントにより測定することができる。

【０４２６】

例示的な蛍光標識は、希土類キレート（ユーロピウムキレート）から由来する標識を含み、又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、及びテキサスレッドが利用可能である。蛍光標識は、公知の技術、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙにおいて開示されるものなどを介して結合タンパク質にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光計を使用して定量化することができる。

【０４２７】
当技術分野において公知の様々な十分に特徴付けられた酵素－基体標識がある（例、米国特許第４，２７５，１４９号を参照のこと）。酵素は一般的に、様々な技術を使用して測定することができる発色基質の化学的変化を触媒する。例えば、変化は、分光光度的に測定することができる基質における色変化であり得る。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変化させ得る。蛍光における変化を定量化するための技術が、上に記載される。化学発光基質は、化学反応により電子的に励起され、次に、例えば、化学発光計を使用して測定することができる光を放射し得る、又は蛍光アクセプターにエネルギーを供与し得る。
【０４２８】
酵素標識の例は、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼなど（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）など、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼなど）、ヘテロサイクリックオキシダーゼ（例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ及び同様のものを含む。酵素を結合タンパク質にコンジュゲートするための技術は、例えば、Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ－Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ ｕｓｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍ．（Ｊ．Ｌａｎｇｏｎｅ＆Ｈ．Ｖａｎ Ｖｕｎａｋｉｓ，ｅｄｓ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，７３：１４７－１６６において記載されている。
【０４２９】
酵素－基体の組み合わせの例は、例えば、以下を含む：基質として水素ペルオキシダーゼを伴うホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）、それにおいて、水素ペルオキシダーゼは、色素前駆体、例えばオルトフェニレンジアミン（ＯＰＤ）又は３，３，５，５－テトラメチルベンジジン塩酸塩（ＴＭＢ）などを酸化する；発色基質としてパラニトロフェニルリン酸を伴うアルカリホスファターゼ（ＡＰ）；及び発色基質、例えばｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ又は蛍光発生基質４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼなどを伴うβ－Ｄ－ガラクトシダーゼ（β－Ｄ－Ｇａｌ）。
【０４３０】
別の実施形態では、本明細書中に開示される結合タンパク質は、非標識で使用され、結合タンパク質に結合する標識抗体で検出される。
【０４３１】
本明細書中に記載される結合タンパク質は、任意の公知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接的及び間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイなどにおいて用いてもよい。例えば、Ｚｏｌａ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．１９８７）を参照のこと。
【０４３２】
本明細書中に開示される結合タンパク質を使用して、ＰＤ－Ｌ１、ＴＧＦβ、及び／又はＣＤ１３７の、それぞれの受容体への結合を阻害することができる。そのような方法は、本明細書中に開示される結合タンパク質を細胞（例、哺乳動物細胞）又は細胞環境に投与することを含み、それにより、受容体により媒介されるシグナル伝達が阻害される。これらの方法は、インビトロ又はインビボで実施することができる。「細胞環境」により、細胞を囲む組織、培地、又は細胞外マトリックスを意図する。
【０４３３】

治療の組成物及び方法
本開示はまた、例えば、本明細書中に開示される結合タンパク質を含む医薬組成物を含む組成物を提供する。そのような組成物は、疾患又は障害、例えば癌などの治療、予防、又は寛解のための多数の治療的使用を有する。
【０４３４】
本開示はまた、本明細書中に開示される結合タンパク質を含む組成物又は製剤、及び、場合により、別の免疫ベースの治療を、それを必要とする対象に投与することを含む、癌の治療又は予防のための方法を提供する。
【０４３５】
開示されている結合タンパク質はまた、単独で（例、単剤療法として）、又は他の免疫療法剤及び／又は化学療法との組み合わせにおいて、癌の治療の方法において有用である。
【０４３６】
結合タンパク質は、単独で、又は免疫媒介性炎症性障害もしくは自己免疫疾患を治療するために有用な他の組成物との組み合わせにおいて投与することができる。
【０４３７】
一部の態様では、本明細書中に開示される一つ又は複数の結合タンパク質を含む組成物、例えば、医薬組成物が提供される。医薬組成物は、従来の技術、例えばＲｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，１９ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９９５において開示されているものなどに従って、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤ならびに任意の他の公知のアジュバント及び賦形剤を用いて製剤化され得る。
【０４３８】
典型的には、注射による投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、医薬品はまた、注射の部位での痛みを和らげるために、可溶化剤及び局所麻酔剤、例えばリグノカインなどを含むことができる。一般的に、成分は、密封容器、例えば、活性薬剤の量を示すアンプル又はサシェなどの中の乾燥凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別々に又は単位投薬形態中で混合されて供給される。医薬品が注入により投与される場合、それは、滅菌医薬品グレードの水又は生理食塩水を含む注入ボトルで分注され得る。医薬品が注射により投与される場合、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルが、成分を投与前に混合することができるように提供され得る。
【０４３９】
本明細書中で使用される場合、「医薬的に許容可能な担体」は、生理学的に適合性である、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに同様のものを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊椎又は上皮投与（例、注射又は注入による）のために適切である。投与の経路に依存して、活性化合物、即ち、抗体、二重特異性及び多特異性分子は、化合物を不活化し得る酸及び他の天然条件の作用から化合物を保護するための材料中でコーティングされ得る。
【０４４０】
組成物は、当技術分野において公知の様々な方法により投与することができる。当業者により理解されるように、投与の経路及び／又は様式は、所望の結果に依存して変動する。活性化合物は、迅速放出、例えばインプラント、経皮パッチ、及びマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤などに対して化合物を保護する担体を用いて調製することができる。生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができ、例えばエチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などである。そのような製剤の調製のための方法は、一般的に、当業者に公知である。例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，Ｍ

ａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９７８を参照のこと。

【０４４１】

医薬組成物中での活性成分の投薬レベルは、対象に毒性であることを伴わず、特定の対象、組成物、及び投与の様式について所望の治療応答を達成するために有効な活性成分の量を得るように変動し得る。選択された投与量レベルは、用いられる特定の組成物の活性、投与の経路、投与の時間、用いられる特定の化合物の排泄の速度、処置の持続期間、用いられる特定の組成物との組み合わせにおいて使用される他の薬物、化合物及び／又は材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康及び以前の病歴、ならびに医療技術分野において周知の同様の因子を含む、様々な薬物動態因子に依存するであろう。

【０４４２】

本明細書中に記載される医薬組成物は、有効量で投与され得る。「有効量」は、所望の反応又は所望の効果を単独で、又はさらなる用量と一緒に達成する量を指す。特定の疾患の又は特定の状態の治療の場合では、所望の反応は、好ましくは、疾患の経過の阻害に関係する。これは、疾患の進行を遅らせること、及び、特に、疾患の進行を中断又は逆転させることを含む。

【０４４３】

一部の態様では、本明細書中に記載される組成物は、様々な障害、例えば本明細書中に記載されるものなどを治療又は予防するために、例えば、インビボで患者に投与される。好ましい患者は、本明細書中に開示される結合タンパク質を投与することにより修正又は改善され得る障害を有するヒト患者を含む。

【０４４４】

一部の態様では、従来のウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用して、本明細書中に記載される抗体又はその誘導体をコードする核酸を、哺乳動物細胞又は標的組織において導入することができる。そのような方法を使用して、抗体をコードする核酸をインビトロで細胞に投与することができる。一部の実施形態では、抗体又はその誘導体をコードする核酸は、インビボ又はエクスビボ遺伝子療法の使用のために投与される。他の実施形態では、遺伝子送達技術は、細胞ベース又は動物モデルにおける抗体の活性を試験するために使用される。非ウイルスベクター送達系は、ＤＮＡプラスミド、ネイキッド核酸、及び送達媒体、例えばリポソームなどと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、ＤＮＡ及びＲＮＡウイルスを含み、それらウイルスは、細胞への送達後にエピソームゲノム又は組み込みゲノムのいずれかを有する。そのような方法は、当技術分野において周知である。

【０４４５】

本開示の操作ポリペプチドをコードする核酸の非ウイルス送達の方法は、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドＤＮＡ、人工ビリオン、及びＤＮＡの薬剤増強取り込みを含む。リポフェクション方法及びリポフェクション試薬は、当技術分野において周知である（例、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）及びＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションのために適切であるカチオン性及び中性脂質は、Ｆｅｌｇｎｅｒ、ＷＯ９１／１７４２４、ＷＯ９１／１６０２４の脂質を含む。送達は、細胞（エクスビボ投与）又は標的組織（インビボ投与）であることができる。標的化リポソーム、例えば免疫脂質複合体などを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である。

【０４４６】

本明細書中に記載される抗体をコードする核酸の送達のためのＲＮＡ又はＤＮＡウイルスベースのシステムの使用は、ウイルスを身体中の特定の細胞に標的化し、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接的に投与することができ（インビボ）、又はそれらは、細胞をインビトロで処理するために使用することができ、改変細胞は患者に投与される（エクスビボ）。本開示

のポリペプチドの送達のための従来的なウイルスベースの系は、遺伝子移入のためのレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター及び単純ヘルペスウイルスベクターを含み得る。ウイルスベクターは、現在、標的細胞及び組織における遺伝子移入の最も効率的かつ多用途の方法である。宿主ゲノム中での組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルス遺伝子導入方法を用いて可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。加えて、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型及び標的組織において観察されている。特定された全ての特許及び刊行物は、例えば、本開示との関連において使用され得るそのような刊行物において記載される方法論を記載及び開示する目的のために、参照により本明細書中に明示的に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日前にそれらの開示のためにのみ提供される。この点において、本発明者らが、先行する発明により、又は任意の他の理由のために、そのような開示に先行する権利を有していないという許可とは解釈されるべきことは何もない。これらの文書の内容に関する日付又は表明に関する全ての記述は、申請者に利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付又は内容の正確性に関する任意の承認を構成しない。

【実施例】

【０４４７】

一般的な方法

免疫沈降、クロマトグラフィー、及び電気泳動を含むタンパク質精製のための方法が記載されている。例えば、Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと。化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の産生、及びタンパク質のグリコシル化が記載されている。例えば、Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ．２，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．３，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，ｐｐ．１６．０．５－１６．２２．１７；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｃｏ．（２００１）Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｆｏｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．；ｐｐ．４５－８９；Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ（２００１）ＢｉｏＤｉｒｅｃｔｏｒｙ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，ｐｐ．３８４－３９１を参照のこと。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の産生、精製、及び断片化が記載されている。Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９９９）Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ、上記。

【０４４８】

抗ＰＤ－Ｌ１又は抗ＣＤ１３７抗体を含むハイブリドーマ又は細胞培養上清を、ＨｉＴｒａｐプロテインＧカラム（ＧＥ、カタログ番号１７０４０４０１）を介して、製造元の手順に従って精製した。簡単には、上清を、ＤＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０－１３６）を用いて５ＣＶについて平衡化し、周囲温度及び３分の滞留時間でシリンジ／注入ポンプ（Ｌｅｇａｔｏ ２００、ＫＤＳ）を介して充填した。カラムを５ＣＶのＤＰＢＳで洗浄し、溶出を、４ＣＶのｐＨ２．８溶出緩衝液（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＰＩ２１００４）で実施した。溶出物を分画し、分画を、１ＭＴｒｉｓ－ＨＣＬ、ｐＨ８．５（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号５０－８４３－２７０）を用いて中和し、Ａ２８０（Ｄｒｏｐｓｅｎｓｉｔｉ９６、Ｔｒｉｎｅａｎ）によりアッセイした。ピーク画分をプールし、緩衝液をＤＰＢＳ中で交換した

。遠心フィルター（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ８０３０２４）を、４，０００×ｇで２分間にわたりＤＰＢＳ中で平衡化した。精製サンプルを充填し、ＤＰＢＳを加えて、サンプルを、全ＤＰＢＳ容積が≧６ＤＶに達するまで、４，０００×ｇで５～１０分間にわたりスピンした。最終プールをＡ２８０により分析した。

【０４４９】

分子生物学における標準的な方法が記載されている。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ　ｅｔａｌ．（１９８２）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ａｎｄ　Ｒｕｓｓｅｌｌ（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，３ｒｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．；Ｗｕ（１９９３）Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮＡ，Ｖｏｌ．２１７，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆを参照のこと。標準的な方法はまた、Ａｕｓｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｓ．１－４，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．において見られ、それは、細菌細胞におけるクローニング及びＤＮＡ変異誘発（Ｖｏｌ．１）、哺乳動物細胞及び酵母におけるクローニング（Ｖｏｌ．２）、糖コンジュゲート及びタンパク質発現（Ｖｏｌ．３）、ならびにバイオインフォマティクス（Ｖｏｌ．４）を記載する。

【０４５０】

ヒトＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７を発現する安定細胞株は、選択された宿主細胞（即ち、ＣＨＯ－Ｋ１又はＨＥＫ２９３）を、エレクトロポレーション又は脂質ベースのトランスフェクションを使用してホモサピエンス標的タンパク質を発現するｐｃＤＮＡ３．１ベースのプラスミドでトランスフェクトすることにより生成された。ゲネチシン又はピューロマイシンを使用して、組み込み細胞を選択した。７～１０日間の抗生物質選択後、安定クローンを、標識抗体を使用したＦＡＣＳ又は段階希釈により単離した。増殖後、安定クローンを、フローサイトメトリーにより標的タンパク質発現についてさらに確認した。マウス及びカニクイザルの標的は、脂質ベースのトランスフェクションを使用してＨＥＫ２９３Ｔ細胞においてそれぞれ一過性に発現された。

【０４５１】

ハイブリドーマクローンについての重鎖及び軽鎖可変領域の配列を、下に記載されるように決定した。全ＲＮＡを、ＱｉａｇｅｎからのＲＮｅａｓｙ　ＰｌＵＳＭｉｎｉ　Ｋｉｔ（米国メリーランド州ジャーマンタウン）を使用して、１～２×10^6個のハイブリドーマ細胞から抽出した。ＣＤＮＡは、ＴａｋａｒａからのＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　５’／３’キット（Ｍｏｕｎｔａｉｎｖｉｅｗ、米国カリフォルニア州）を使用して、５’ＲＡＣＥ反応を実施することにより生成された。ＰＣＲは、ＮＥＢ（米国マサチューセッツ州イプソウィッチ）からのＱ５　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを使用して実施され、適した免疫グロブリンの３’マウス定常領域についての遺伝子特異的プライマーとの組み合わせにおいてＴａｋｒａ　Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ｍｉｘを使用して重鎖及び軽鎖から可変領域を増幅した。重鎖及び軽鎖についての増幅された可変領域を、２％アガロースゲル上で泳動させ、適したバンドを切除し、次にＱｉａｇｅｎからのＭｉｎｉ　Ｅｌｕｔｅ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔを使用してゲル精製した。精製されたＰＣＲ産物を、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎからのＺｅｒｏ　Ｂｌｕｎｔ　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃａｒｌｓｂａｄ、米国カリフォルニア州）を使用してクローニングし、ＴａｒｏｒａからのＳｔｅｌｌａ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｅ．Ｃｏｌｉ細胞中に形質転換し、ＬＢ　Ａｇａｒ＋５０ｕｇ／ｍｌカナマイシンプレート上に播種した。直接コロニーサンガー配列決定を、ＧｅｎｅＷｉｚ（Ｓｏｕｔｈ　Ｐｌａｉｎｆｉｅｌｄ、米国ニュージャージー州）により実施した。結果として得られたポリヌクレオチド配列を、ＩＭＧＴ　Ｖ－ＱＵＥＳＴを使用して分析して、生産的な再構成を

特定し、翻訳されたタンパク質配列を分析した。ＣＤＲ決定は、Ｋａｂａｔナンバリングに基づいた。

【０４５２】

選択されたＶＨ鎖又はＶＬ鎖をＰＣＲ増幅し、ｐｃＤＮＡ３．４ベースの発現ベクター中にクローニングし、それは、ヒトＩｇＧ１（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０１８５７）又はヒトカッパ軽鎖（ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０１８３４）からの定常領域を保持する。対になった重鎖発現プラスミド及び軽鎖発現プラスミドを、供給元のＥｘｐｉ２９３発現系プロトコルに従って、Ｅｘｐｉ２９３細胞（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中にトランスフェクトした。トランスフェクションの五日後に、培養上清を遠心分離により収集した。発現抗体を、プロテインＡカラム及びＰＢＳ　ｐＨ７．２に交換された緩衝液を使用した１工程の親和性精製により精製した。

【０４５３】

フローサイトメトリーのための方法が、蛍光活性化細胞ソーティング検出系（ＦＡＣＳ（登録商標））を含め、利用可能である。例えば、Ｏｗｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｆｏｒ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｈｏｂｏｋｅｎ，Ｎ．Ｊ．；Ｇｉｖａｎ（２００１）Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ，２ｎｄ　ｅｄ．；Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｈｏｂｏｋｅｎ，Ｎ．Ｊ．；Ｓｈａｐｉｒｏ（２００３）Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｈｏｂｏｋｅｎ，Ｎ．Ｊ．を参照のこと。例えば、診断試薬としての使用のための、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチド、ならびに抗体を含む、核酸を修飾するために適切な蛍光試薬が利用可能である。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（２００３）Ｃａｔａｌｏｇｕｅ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇ．；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（２００３）Ｃａｔａｌｏｇｕｅ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．

【０４５４】

リガンド／受容体相互作用を特徴付けるための標準的な技術が利用可能である。例えば、Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．４，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋを参照のこと。特定の作用機構を伴う抗体の特徴付けのために適した抗体機能特徴付けの標準的な方法が、当業者に周知である。

【０４５５】

例えば、抗原断片、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能ドメイン、ＣＤＲアノテーション、グリコシル化部位、及び配列アライメントを決定するためのソフトウェアパッケージ及びデータベースが利用可能である。

【０４５６】

本明細書中で「アベルマブ－ＮＲ」（ＰＣ１）として言及される抗ＰＤ－Ｌ１抗体（アベルマブ）に基づく自家抗ＰＤ－Ｌ１抗体を、ＵＳ１０，７５９，８５６において公開されている、公的に利用可能な情報（その中のＶＨ配列番号２４及びＶＬ配列番号２５）に基づいて調製した。ＰＣ１抗体を使用して、本明細書中に開示される抗ＰＤ－Ｌ１特異的抗体を評価及び特徴付けるために使用される機能アッセイを確立した。

【０４５７】

本明細書中で「ウレルマブ－ＮＲ」（ＰＣ２）として言及される抗ＣＤ１３７抗体（ウレルマブ）に基づく自家抗ＣＤ１３７抗体を、ＵＳ７，２８８，６３８において公開されている、公的に利用可能な情報（その中のＶＨ配列番号３及びＶＬ配列番号６）に基づいて調製した。本明細書中で「ウトミルマブ－ＮＲ」（ＰＣ３）として言及される、第二の自家ＣＤ１３７反応性抗体（ウトミルマブ）を、ＵＳ８，３３７，８５０において公開されている、公的に利用可能な情報（その中のＶＨ配列番号４３及びＶＬ配列番号４５）に基づいて調製した。ＰＣ２抗体及びＰＣ３抗体を使用して、実施例において使用される細胞株におけるＣＤ１３７発現を確認し、本明細書中に開示される抗ＣＤ１３７特異的抗体

を評価及び特徴付けするために使用される結合アッセイ及び機能アッセイを確立した。本出願における実施例１８及び２２は、開示されている二重特異性体及び三重特異性体が、ウレルマブ－ＮＲ及びウトミルマブ－ＮＲと比較して、より強いＣＤ１３７シグナル伝達及びＴ細胞活性化を誘導したことを例証する。

【０４５８】

本明細書中で利用される参照配列を表９中に例証する。

【表９】

表９：参照配列

配列番号	NCBI参照 配列	アミノ酸配列
配列番号68	NP_054862.1 ヒトPD-L1	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLA ALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQIT DVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHEL TCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTN EIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVAL TFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
配列番号69	XP_005581836.1 カニクイザルPD-L1 〔予測〕	MRIFAVFIFTIYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLT SLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRIT DVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHEL TCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTAN EIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVAL TFIFYLRKGRMMDMKKCGIRVTNSKKQRDTQLEET
配列番号70	NP_068693.1 マウスPD-L1	MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLL ALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQIT DVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELI CQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATAND VFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVVST VLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET
配列番号71	NP_001552.2 ヒトCD137	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPN SFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKE RDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLF FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号72	XP_005544945.1 カニクイザル CD137 〔予測〕	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPN SFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMC EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKE RDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFLALTSTVVLFLLFF LVLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号73	NP_001070977.1 マウスCD137	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPN SFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKE RDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLF FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
配列番号74	NP_003233.4 ヒトTGF-ベータ受容体2型アイソフォームB	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCH DPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEY NTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETG KTRKLMEFSEHCAIILEDDRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRF AEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQ FLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARG IAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTL SVDDLANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTS RCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLNHQGI QMVCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDG SLNTTK

【０４５９】

実施例１：ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の生成

完全ヒト抗ヒトＰＤ－Ｌ１抗体は、ヒトＩｇトランスジェニックマウス、ヒト抗体ＶＨ

及びＶＬ遺伝子を発現するＴｒｉａｎｎｉマウス（例、ＷＯ２０１３／０６３３９１、ＴＲＩＡＮＮＩ（登録商標）マウスを参照のこと）を免疫化することにより生成された。

【０４６０】

免疫化－上に記載されるＴＲＩＡＮＮＩマウスを、。腹腔内（ＩＰ）、皮下（ＳＣ）、尾の付け根又は足蹠注射を介した組換えヒトＰＤ－Ｌ１タンパク質を用いた注射により免疫化した。

【０４６１】

免疫応答を眼窩後出血によりモニタリングした。血漿を、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）、又は撮像（下に記載するとおり）によりスクリーニングした。十分な抗ＰＤ－Ｌ１力価を伴うマウスを、融合のために使用した。マウスを、　殺ならびに脾臓及びリンパ節の除去前に、免疫原を用いて腹腔内に、尾の付け根、足蹠で、又は静脈内にブーストした。

【０４６２】

抗ＰＤ－Ｌ１抗体を産生するマウスの選択－ＰＤ－Ｌ１に結合した抗体を産生するマウスを選択するために、免疫化マウスからの血清を、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、又は撮像により、ヒトＰＤ－Ｌ１タンパク質への結合についてスクリーニングし、ＰＤ－Ｌ１タンパク質を発現する細胞（ＰＤ－Ｌ１遺伝子でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ）であり、ＰＤ－Ｌ１を発現しない対照細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）ではない。

【０４６３】

ＥＬＩＳＡについては、簡単には組換えヒトＰＤ－Ｌ１（ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号：ＰＤ１－Ｈ５２２９）でコーティングされたＥＬＩＳＡプレートを、免疫化マウスからの血清の希釈物を用いて、室温で一時間にわたりインキュベートし、アッセイプレートを洗浄し、特異的抗体結合を、室温での一時間のインキュベーション後に、ＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号：１０９－０３５－０８８）を用いて検出し、洗浄し、室温で３０分間にわたるＡＢＴＳ基質（Ｍｏｓｓ、カタログ番号：ＡＢＴＳ－１０００）のインキュベーションが続いた。プレートを、ＥＬＩＳＡプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用して読み取った。

【０４６４】

ＦＡＣＳについては、簡単には、ＰＤ－Ｌ１－ＨＥＫ２９３Ｔ細胞又は親ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、免疫化マウスからの血清の希釈物を用いて、４℃で２時間にわたりインキュベートした。細胞を、２％ＰＦＡ（Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ、カタログ番号：Ｊ６１８９９）で４℃で１５分間にわたり固定し、次に洗浄した。特異的抗体結合を、４℃での一時間のインキュベーション後、Ａｌｅｘａ　６４７標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（ＴｈｅｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ａ－２１４４５）を用いて検出した。フローサイトメトリー分析を、フローサイトメトリー機器（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔｅ、ＩＱｕｅ　ｐｌｕｓ、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）上で実施した。

【０４６５】

また、マウス血清を撮像によりテストした。簡単には、ＰＤ－Ｌ１－ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、免疫化マウスからの血清の希釈物とインキュベートした。細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、洗浄し、特異的抗体結合を二次Ａｌｅｘａ４８８ヤギ抗マウス抗体及びＨｏｅｃｈｓｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で検出した。プレートをスキャンし、撮像装置（Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５、Ｂｉｏｔｅｋ）上で分析した。

【０４６６】

ＰＤ－Ｌ１に対する抗体を産生するハイブリドーマの生成－本発明のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、脾細胞及びリンパ節細胞を免疫化マウスから単離し、適した不死化細胞株、例えばマウス骨髄腫細胞株などに融合させた。結果として得られたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングした。例えば、免疫化マウスからの脾細胞、リンパ節細胞の単一細胞懸濁液を、等しい数のＳｐ２／０非分泌マウスＩｇＧ骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ　１５８１）に電気融合により融合した。細胞

を平底９６ウェル組織培養プレート中に播種し、選択培地（ＨＡＴ培地）中での約一週間のインキュベーションが続き、次にハイブリドーマ培養培地に切り替えた。細胞播種後の約１０～１４日に、個々のウェルからの上清を、上に記載されるようにＥＬＩＳＡ、撮像、又はＦＡＣＳによりスクリーニングした。抗体分泌ハイブリドーマを２４ウェルプレートに移し、再びスクリーニングし、抗ＰＤ－Ｌ１について依然として陽性である場合、陽性ハイブリドーマを、単一細胞ソーターを使用したソーティングによりサブクローニングした。サブクローンを、上に記載されるように、ＥＬＩＳＡ、撮像又はＦＡＣＳにより再度スクリーニングした。安定なサブクローンを次に、インビトロで培養して、精製及び特徴付けのために少量の抗体を生成した。

【０４６７】

実施例２：ＰＤ－Ｌ１をヒト、マウス、及びカニクイザルＰＤ－Ｌ１タンパク質に結合させるｍＡｂの結合特異性

異なる種のＰＤ－Ｌ１タンパク質に対する、開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体（１９２３Ａｂ２及び１９２３Ａｂ３）の結合特異性を、ＥＬＩＳＡにより評価した。簡単には、ヒト組換えＰＤ－Ｌ１タンパク質（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号：ＰＤ１－Ｈ５２２９）、カニクイザルＰＤ－Ｌ１タンパク質（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号：ＰＤ１－Ｃ５２Ｈ４）、及びマウスＰＤ－Ｌ１タンパク質（Ａｃｒｏ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号：ＰＤ１－Ｍ５２２０）をＥＬＩＳＡプレートに直接的にコーティングした。１９２３Ａｂ２及び１９２３Ａｂ３を次にプレートに加えて、ペルオキシダーゼＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｆ（ａｂ’）$_2$断片ヤギ抗マウスＩｇＧ、Ｆｃγ断片特異性体（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１１５－０３６－０７１）又はペルオキシダーゼＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｆ（ａｂ’）$_2$断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ、Ｆｃγ断片特異性体（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９－０３６－０９８）による検出が続いた。ＡＢＴＳ基質（Ｍｏｓｓ、カタログ番号：ＡＢＴＳ－１０００）の添加後、ＥＬＩＳＡプレートを、Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｎｅｏ２マルチモードリーダー（Ｂｉｏｔｅｃｋ、ＳＮ＃：１８０２１３Ｆ）を使用して読み取った。

【０４６８】

図２Ａ＆Ｂは、用量依存的な様式における、ヒト及びカニクイザルＰＤ－Ｌ１タンパク質に対する、開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体の結合活性を示すが、しかし、マウスＰＤ－Ｌ１に対してではない；アイソタイプ対照ｍＩｇＧ又はｈＩｇＧ１は、任意の種のＰＤ－Ｌ１に結合しない。ヒト、カニクイザルＰＤ－Ｌ１タンパク質に対する、開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体のＥＬＩＳＡ結合ＥＣ５０値を、図２Ａ及び図２Ｂ中に提供する。

【０４６９】

実施例３：ヒトＰＤ－Ｌ１への組換え抗ＰＤ－Ｌ１の結合親和性

組換え抗ＰＤ－Ｌ１抗体を、ヒトＩｇＧ１又はヒトＩｇＧ１バリアントの定常領域を用いて、Ｅｘｐｉ２９３から発現及び精製した。抗ＰＤ－Ｌ１抗体の結合親和性を、免疫蛍光撮像アッセイを使用して評価した。

【０４７０】

抗ＰＤ－Ｌ１抗体の細胞結合親和性を、ＨＥＫ２９３Ｔ－ＰＤ－Ｌ１細胞上でテストした。細胞を、１０％ＦＢＳを伴うＤＭＥＭを含む完全培地中に播種し、次に３７℃で一晩インキュベートした。抗ＰＤ－Ｌ１抗体を連続希釈し、アッセイプレートに加えて、４℃で２時間にわたりインキュベートし、続いて、細胞を室温で１５分間にわたり固定した。固定細胞をＰＢＳで三回にわたり洗浄し、続いて、検出のためにＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ－１１０１３）を用いて室温で１時間にわたり染色した。結合シグナルを、細胞を撮像し、Ｃｙｔａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｔｅｋ、ＶＴ）を使用して蛍光強度を定量化することにより評価した。

【０４７１】

結合結果は、１９２３Ａｂ３が、細胞表面上に発現されるＰＤ－Ｌ１への強い結合を示

すことを示した。１９２３Ａｂ３の結合親和性は、参照抗体アテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ）と類似している。ヒトＰＤ－Ｌ１への１９２３Ａｂ３及びアテゾリズマブの結合ＥＣ５０を、それぞれ０．１８ｎＭ及び０．２１ｎＭとして決定した（図３を参照のこと）。

【０４７２】

実施例４：ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用に対するＰＤ－Ｌ１抗体の効果

ＰＤ－Ｌ１とＰＤ－ＬＰＤ－１の相互作用に対するＰＤ－Ｌ１抗体の効果は、Ｐｒｏｍｅｇａ（米国マディソン）により開発されたＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害バイオアッセイにより決定された。このアッセイは、二つの遺伝子操作された細胞株からなるルシフェラーゼ細胞ベースのアッセイである。ＰＤ－１エフェクター細胞は、細胞表面上のヒトＰＤ－１及びＮＦＡＴ応答エレメント（ＮＦＡＴ－ＲＥ）により駆動される安定的に組み込まれたルシフェラーゼレポーターを発現するＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞であり、ならびに人工ＡＰＣ細胞は、細胞表面ヒトＰＤ－Ｌ１及び抗原非依存的な様式において同族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を発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞である。これらの二つの細胞型が共培養される場合、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用はＴＣＲシグナル伝達を阻害し、発光シグナルにおける低下をもたらす。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を遮断する抗体の添加は、阻害シグナルを除去し、ＴＣＲの活性化をもたらし、発光を増加させる。

【０４７３】

人工ＡＰＣ　ＣＨＯ－Ｋ１細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｊ１０９Ａ）を、１０％熱不活化ウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号：１７Ｈ１６５）を含むハムＦ－１２Ｋ培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号：２１１２７０２２）を使用して、製造元のプロトコルに従って培養した。これらの人工ＡＰＣ細胞を、３８４ウェルの白色ＴＣ処理プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号３５７０）中に播種した。プレートを、３７℃、５％CO_2で１６時間にわたりインキュベートした。上清を除去し、連続希釈抗体を加えた。ＰＤ－１エフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｊ１１５Ａ）を、１０％熱不活化ウシ胎児血清を含むＲＰＭＩ－１６４０（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号：１１８７５－０８５）を使用して、製造元のプロトコルに従って培養した。エフェクター細胞を、人工ＡＰＣ細胞及び抗体を含む白色３８４ウェルプレートに加えた。プレートを、３７℃、５％CO_2で６時間にわたりインキュベートした。室温まで平衡化した後、Ｏｎｅ－Ｇｌｏルシフェラーゼ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ６１３０）を各ウェルに加えた。プレートを次に、室温で５分間にわたりインキュベートし、発光を、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２プレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用して測定した。データを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアで分析した。

【０４７４】

図４は、１９２３Ａｂ２抗体及び１９２３Ａｂ３抗体の両方が、ＰＤ１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を効率的に阻害し、それによって、アッセイにおいて発光シグナルの回復がもたらされたことを示す。ＰＤ１／ＰＤ－Ｌ１遮断に対する１９２３Ａｂ２、１９２３Ａｂ３及びアテゾリズマブのＩＣ５０を、それぞれ０．９０ｎＭ、０．４３ｎＭ、及び０．２９～０．３１ｎＭとして決定した。

【０４７５】

実施例５：ＣＤ１３７に結合する結合タンパク質の生成

完全ヒト抗ヒトＣＤ１３７抗体は、ヒトＩｇトランスジェニックマウス、ヒト抗体ＶＨ及びＶＬ遺伝子を発現するＴｒｉａｎｎｉマウスを免疫化することにより生成された（例、ＷＯ２０１３／０６３３９１、ＴＲＩＡＮＮＩ（登録商標）マウスを参照のこと）。

【０４７６】

上に記載される免疫化－ＴＲＩＡＮＮＩマウスを、免疫原を用いた注射により免疫化し、それは、ヒトＣＤ１３７遺伝子及び組換えヒトＣＤ１３７　ＥＣＤタンパク質を用いて安定的にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞を含んだ。ＴＲＩＡＮＩマウスを、腹腔内（ＩＰ）、皮下（ＳＣ）、尾の付け根又は足蹠注射を介して免疫化した。

【０４７７】

免疫応答を眼窩後出血によりモニタリングした。血漿を、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）、又は撮像（下に記載するとおり）によりスクリーニングした。十分な抗ＣＤ１３７力価を伴うマウスを、融合のために使用した。マウスを、　殺ならびに脾臓及びリンパ節の除去前に、免疫原を用いて腹腔内に、尾の付け根又は足蹠にブーストした。

【０４７８】

抗ＣＤ１３７抗体を産生するマウスの選択－ＣＤ１３７に結合した抗体を産生するマウスを選択するために、免疫化マウスからの血清を、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、又は撮像によりヒトＣＤ１３７タンパク質への結合についてスクリーニングし、ＣＤ１３７タンパク質を発現する細胞（ＣＤ１３７遺伝子でトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ）であり、ＣＤ１３７を発現しない対照細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）ではない。

【０４７９】

ＥＬＩＳＡについては、簡単には組換えヒトＣＤ１３７（Ｒ＆Ｄ、カタログ番号：９２２０－４Ｂ）でコーティングされたＥＬＩＳＡプレートを、免疫化マウスからの血清の希釈物を用いて、室温で一時間にわたりインキュベートし、アッセイプレートを洗浄し、特異的抗体結合を、室温での一時間のインキュベーション後に、ＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号：１０９－０３５－０８８）を用いて検出し、洗浄し、室温で３０分間にわたるＡＢＴＳ基質（Ｍｏｓｓ、カタログ番号：ＡＢＴＳ－１０００）のインキュベーションが続いた。プレートを、ＥＬＩＳＡプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用して読み取った。

【０４８０】

ＦＡＣＳについては、簡単には、ＣＤ１３７－ＨＥＫ２９３Ｔ細胞又は親ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、免疫化マウスからの血清の希釈物を用いて、４℃で２時間にわたりインキュベートした。細胞を、２％ＰＦＡ（Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ、カタログ番号：Ｊ６１８９９）で４℃で１５分間にわたり固定し、次に洗浄した。特異的抗体結合を、４℃での一時間のインキュベーション後、Ａｌｅｘａ　６４７標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（ＴｈｅｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ａ－２１４４５）を用いて検出した。フローサイトメトリー分析を、フローサイトメトリー機器（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔｅ、ＩＱｕｅ　ｐｌｕｓ、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）上で実施した。

【０４８１】

また、マウス血清を撮像によりテストした。簡単には、ＣＤ１３７－ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、免疫化マウスからの血清の希釈物とインキュベートした。細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、洗浄し、特異的抗体結合を二次Ａｌｅｘａ４８８ヤギ抗マウス抗体及びＨｏｅｃｈｓｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で検出した。プレートをスキャンし、撮像装置（Ｃｙｔａｔｉｏｎ　５、Ｂｉｏｔｅｋ）上で分析した。

【０４８２】

ＣＤ１３７に対する抗体を産生するハイブリドーマの生成－本発明のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、脾細胞及びリンパ節細胞を免疫化マウスから単離し、適した不死化細胞株、例えばマウス骨髄腫細胞株などに融合させた。結果として得られたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングした。例えば、免疫化マウスからの脾細胞、リンパ節細胞の単一細胞懸濁液を、等しい数のＳｐ２／０非分泌マウスＩｇＧ骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ　１５８１）に電気融合により融合した。細胞を平底９６ウェル組織培養プレート中に播種し、選択培地（ＨＡＴ培地）中での約一週間のインキュベーションが続き、次にハイブリドーマ培養培地に切り替えた。細胞播種後の約１０～１４日に、個々のウェルからの上清を、上に記載されるように撮像又はＦＡＣＳによりスクリーニングした。抗体分泌ハイブリドーマを２４ウェルプレートに移し、再びスクリーニングし、抗ＣＤ１３７について依然として陽性である場合、陽性ハイブリドーマを、単一細胞ソーターを使用したソーティングによりサブクローニングした。サブクローンを、上に記載されるように、撮像又はＦＡＣＳにより再度スクリーニングした。安定なサブクローンを次に、インビトロで培養して、精製及び特徴付けのために少量の抗体を

生成した。

【０４８３】

実施例６：ヒト、マウス及びカニクイザルＣＤ１３７に対する組換え抗ＣＤ１３７抗体の結合親和性

免疫蛍光撮像アッセイを用いた抗ＣＤ１３７　ｍＡｂの結合親和性の分析を、ヒト、マウス又はカニクイザルＣＤ１３７発現構築物を用いて安定的にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を使用して実施した。これらの細胞株は、細胞表面上にＣＤ１３７タンパク質の種特異的形態を発現する。細胞を、１０％ＦＢＳを伴うＤＭＥＭを含む完全培地中に播種し、次に３７℃で一晩インキュベートした。細胞を、抗ＣＤ１３７の段階希釈を用いて４℃で２時間にわたり染色し、続いて、細胞を室温で１５分間にわたり固定した。固定細胞をＰＢＳで三回洗浄し、続いて、検出のためのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ－１１０１３）を用いて、室温で１時間にわたり染色した。結合シグナルを、細胞を撮像し、Ｂｉｏｔｅｋ　Ｃｙｔａｔｉｏｎを使用して蛍光強度を定量化することにより評価した。

【０４８４】

結果は、１９２３Ａｂ４（図５Ａ）、１９２３Ａｂ５（図５Ｂ）、及び１９２３Ａｂ６（図５Ｃ）抗体が、細胞表面上のヒト及びカニクイザルＣＤ１３７に効率的に結合したことを示す。しかし、これらはいずれも、マウスＣＤ１３７への結合を示さない。ヒトＣＤ１３７への１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５、及び１９２３Ａｂ６の結合ＥＣ５０を、それぞれ０．２９ｎＭ、１．６２ｎＭ、及び１０．５ｎＭとして決定した。カニクイザルＣＤ１３７への１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５、及び１９２３Ａｂ６の結合ＥＣ５０を、それぞれ０．２２ｎＭ、２．７７ｎＭ、及び４．２３ｎＭとして決定した。

【０４８５】

実験はまた、１９２３Ａｂ４抗体、１９２３Ａｂ５抗体、及び１９２３Ａｂ６抗体の結合親和性を、ＰＣ２ウレルマブ－ＮＲ（ＢＭＳ）及びＰＣ３ウトミルマブ－ＮＲ（Ｐｆｉｚｅｒ）を含む参照抗体と比較するために実施された。１９２３Ａｂ４抗体は、ヒトＣＤ１３７へのウレルマブ－ＮＲ及びウトミルマブ－ＮＲの類似の結合親和性を示した（図６）。１９２３Ａｂ５抗体及び１９２３Ａｂ６抗体は、参照抗体と比較し、より弱い結合を示した。

【０４８６】

実施例７：ＣＤ１３７リガンド競合

ＣＤ１３７へのＣＤ１３７リガンド結合を遮断する、開示されている抗ＣＤ１３７抗体の能力を評価するために、開示されている抗体である１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ５、及び１９２３Ａｂ６、ならびに二つの参照抗体であるＰＣ２ウレルマブ－ＮＲ及びＰＣ３ウトミルマブ－ＮＲを、バイオレイヤーインターフェロメトリー（Ｇａｔｏｒ　Ｂｉｏ、カリフォルニア州）によりテストした。ウレルマブ－ＮＲ及びウトミルマブ－ＮＲは、それぞれ、非リガンド及びリガンド遮断抗体であると報告されている。

【０４８７】

簡単には、ストレプトアビジンプローブ（Ｐｒｏｂｅ　Ｌｉｆｅ、カタログ番号：ＰＬ１６８－１６０００２）を、最初に、アッセイ緩衝液（０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０及び０．０５％アジ化ナトリウムを含むＰＢＳ）を含む９６ウェルプレート中に３０秒間にわたり添加した（ベースライン工程）。プローブを次に、ＣＤ１３７Ｌ　Ｈｉｓ－Ａｖｉ－Ｔａｇタンパク質（ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号１００２３８；１０ｕｇ／ｍｌ）を含む９６ウェル中に１８０秒間にわたり添加し（充填工程、ビオチン－ＣＤ１３７Ｌを捕捉するため）、３０秒のベースライン工程が続いた。その後、ＣＤ１３７Ｌ添加プローブを、ＣＤ１３７タンパク質（Ｒ＆Ｄ、カタログ番号：９２２０－４Ｂ、１０ｕｇ／ｍｌ）に１８０秒間にわたり結合させ、続いて、１０ｕｇ／ｍｌの濃度で、開示されている抗体又は参照抗体と１８０秒間会合させた。

【０４８８】

データを、製造元（Ｇａｔｏｒ　Ｂｉｏ、ＣＡ）により提供されたソフトウェアを使用して処理した。１９２３Ａｂ５、１９２３Ａｂ６、及びウレルマブ－ＮＲは、プローブ上に添加されたＣＤ１３７／ＣＤ１３７Ｌの複合体に結合した。しかし、１９２３Ａｂ４及びウトミルマブ－ＮＲは、プローブ上に添加されたＣＤ１３７／ＣＤ１３７Ｌの複合体への結合を示さなかった。これらの結果は、１９２３Ａｂ４及びウトミルマブ－ＮＲがリガンド遮断活性を有することを意味した。１９２３Ａｂ５、１９２３Ａｂ６、及びウレルマブ－ＮＲは、リガンド結合部位において位置しないＣＤ１３７の領域に結合した（図７）。

【０４８９】

実施例８：ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターアッセイにおける抗ＣＤ１３７抗体の架橋依存的アゴニスト活性

抗体のアゴニスト活性を、ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して評価した。ヒトＣＤ１３７発現プラスミド及びＮＦκＢルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて安定的にトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞を使用して、抗ＣＤ１３７抗体のアゴニスト活性を測定した。これらのレポーター細胞（ＨＥＫ－ＣＤ１３７レポーター細胞）を、抗ＣＤ１３７抗体又はテストされた抗ＣＤ１３７抗体及び３：１比率の架橋抗体（抗ヒトＦｃγ断片特異性体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂ、カタログ番号：１０９－００５－０９８）を含む混合物のいずれかを用いて刺激し、３７℃、５％CO_2で１６時間にわたりインキュベートした。ＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｅ６１３０）を加えて、プレートを室温で１０分間にわたりインキュベートした。発光シグナルをＳｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２プレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ）により測定し、データをＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにより分析した。

【０４９０】

ＰＣ３ウトミルマブ－ＮＲは、対照抗体として使用されたが、ＣＤ１３７シグナル伝達に対する架橋依存的アゴニスト抗体であることが報告されている。図８中に示されるように、アイソタイプ対照と比較して、全てのテストされた抗体は、架橋抗体の非存在において非常に最小限のアゴニスト活性を示した。しかし、全てのテストされた抗体は、抗ヒトＦｃγにより架橋されたアイソタイプ対照を除き、ＮＦκＢルシフェラーゼ遺伝子発現を強く活性化した。結果は、１９２３Ａｂ４抗体、１９２３Ａｂ５抗体、及び１９２３Ａｂ６抗体のアゴニスト活性が架橋依存的であることを実証する。

【０４９１】

実施例９：ヒト初代Ｔ細胞活性化アッセイにおける抗ＣＤ１３７抗体の架橋依存的アゴニスト活性

抗体のアゴニスト活性は、Ｔ細胞活性化アッセイにおいてさらに確認された。ヒトＰＢＭＣを健康なドナーから調製した。これらのヒトＰＢＭＣを、１０％ＦＢＳ及び０．５ｕｇ／ｍｌのマウス抗ｈＣＤ３クローンＯＫＴ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３２５）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中で1×10^6個細胞／ｍＬの密度で培養した。抗ＣＤ１３７抗体、又はテストされた抗ＣＤ１３７抗体及び３：１比率の架橋抗体を含む混合物のいずれかを加えて、Ｔ細胞を刺激した。プレートを、３７℃で、５％CO_2で３日間にわたりインキュベートした。７２時間のインキュベーション後、上清を使用して、分泌ＩＦＮγを、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、カタログ番号ＡＬ２１７Ｃ／Ｆ）により、製造元の指示に従ってプロトコルを使用して測定した。

【０４９２】

ＰＣ３ウトミルマブ－ＮＲは、陽性対照抗体として使用されたが、Ｔ細胞活性化に対する架橋依存的アゴニスト抗体であることが報告されている。図９中に示すように、アイソタイプ対照と比較して、開示されている抗体で処理されたＰＢＭＣは、架橋抗体の非存在においてＩＦＮγの産生を増加させなかった。しかし、抗ヒトＦｃγにより架橋された、アイソタイプ対照を除く全てのテストされた抗体が、ＩＦＮγの産生を強く刺激した。この結果は、１９２３Ａｂ４抗体、１９２３Ａｂ５抗体、及び１９２３Ａｂ６抗体が、架橋

依存的な様式においてＴ細胞を活性化したことを実証する。
【０４９３】
実施例１０：ヒトＣＤ１３７上の１９２３Ａｂ４の結合エピトープ領域の同定
ＣＤ１３７の細胞外領域は、種間で保存されている四つのシステインリッチドメイン（ＣＲＤ１－４）を含む。１９２３Ａｂ４抗体への結合のためにどのＣＲＤドメインが要求されるかを特定するために、ヒト／マウスハイブリッドＣＤ１３７発現構築物を、個々のヒトＣＲＤドメインをマウス対応物と交換することにより作製した（図１０Ａ）。実施例６は、１９２３Ａｂ４が、細胞表面上のヒトＣＤ１３７に結合しているが、しかし、マウスＣＤ１３７には結合していないことを示す。
【０４９４】
ヒトＣＤ１３７（ＷＴ）又はヒト／マウスハイブリッドＣＤ１３７発現構築物（ｍｓＣＲＤ１－４）のいずれかを用いて一過的にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞への抗ＣＤ１３７　１９２３Ａｂ４の結合の分析を、フローサイトメトリーベースの結合アッセイにより実施した。細胞を、４℃で２時間にわたり１９２３Ａｂ４で染色し、続いて、細胞を室温で１５分間にわたり固定した。固定細胞をＰＢＳで三回洗浄し、続いて、検出のためのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ－１１０１３）を用いて、室温で１時間にわたり染色した。結合シグナルを、ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　ＰＬＵＳ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、ＭＩ）を使用して蛍光強度を定量化することにより評価した。
【０４９５】
ＰＣ２ウレルマブ－ＮＲ及びＰＣ３ウトミルマブ－ＮＲの両方が、ヒトＣＤ１３７に結合するが、しかし、マウスＣＤ１３７には結合しない。ヒトＣＤ１３７へのＰＣ２及びＰＣ３の結合は、それぞれ、ＣＲＤ１ドメイン及びＣＲＤ３／４ドメインを通じていた。この結合実験では、ＰＣ２は、ヒトＣＲＤ１ドメインがマウスＣＲＤ１ドメインに交換された場合にのみＣＤ１３７への結合を失ったのに対し、ＰＣ３は、ヒトＣＲＤ３又はＣＲＤ４ドメインのいずれかがマウス対応物に交換された場合にＣＤ１３７への結合を失った（図１０Ｂ～Ｆ）。開示されている抗体１９２３Ａｂ４は、ｍｓＣＲＤ２、ｍｓＣＲＤ３、及びｍｓＣＲＤ４発現構築物でトランスフェクトされた細胞への低下した結合を示す（図１０Ｂ～Ｆ）。この結果は、１９２３Ａｂ４が、ＣＲＤ２、ＣＲＤ３、及びＣＲＤ４領域を通じてヒトＣＤ１３７に結合することを示唆する。
【０４９６】
図１１Ａでは、ヒト及びマウスＣＲＤ４領域の配列アライメントは、５つの別個の差を明らかにした。追加の発現構築物（Ｍ１～Ｍ５）を、ヒトアミノ酸配列をマウスのものに変化させることにより作製した。例えば、Ｍ１領域中のヒト「ＣＦ」配列を、部位特異的変異誘発によりマウス「ＳＬ」配列に変異させた。
【０４９７】
ヒトＣＤ１３７（ＷＴ）又は変異ＣＤ１３７発現構築物（Ｍ１～Ｍ５）のいずれかを用いて一過的にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞への抗ＣＤ１３７　１９２３Ａｂ４の結合の分析を、フローサイトメトリーベースの結合アッセイにより実施した。細胞を、４℃で２時間にわたり１９２３Ａｂ４で染色し、続いて、細胞を室温で１５分間にわたり固定した。固定細胞をＰＢＳで三回洗浄し、検出のためのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ－１１０１３）を用いた室温で１時間にわたる染色が続いた。結合シグナルを、ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　ＰＬＵＳ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、ＭＩ）を使用して蛍光強度を定量化することにより評価した。
【０４９８】
図１１Ｄでは、ＰＣ２ウレルマブ－ＮＲを発現対照として使用し、その結合エピトープをＣＲＤ１ドメインにマッピングした（Ｃｈｉｎ，ＳＭ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ，２０１８　Ｎｏｖ　８；９（１）：４６７９）。ＣＤ１３７のＣＲＤ４ドメインのＭ２領域中で「ＫＲＧＩ」のヒトアミノ酸配列（配列番号８１）を「ＮＧＴＧＶ」のマウ

スアミノ酸配列（配列番号７７）に変化させることによって、開示されている抗体１９２３Ａｂ４へのその結合が大幅に低下した。Ｍ１、Ｍ３、Ｍ４、及びＭ５上の変異誘発によって、細胞表面上に発現されたＣＤ１３７タンパク質への１９２３Ａｂ４の結合活性は変化しなかった（図１１Ｂ、１１Ｃ、＆１１Ｅ～Ｇ）。

【０４９９】

実施例１１：ＨＤＸ質量分析を使用したヒトＣＤ１３７上での１９２３Ａｂ４のエピトープマッピング

ドメインスワッピング及び変異誘発試験を使用して、１９２３Ａｂ４は、ＣＲＤ２、ＣＲＤ３及びＣＲＤ４ドメインを通じてヒトＣＤ１３７に結合することが示された（実施例１０）。ヒトＣＤ１３７への１９２３Ａｂ４の結合部位をさらに同定するために、水素重水素交換（ＨＤＸ）質量分析を使用した。抗体により結合されるヒトＣＤ１３７の領域は、それはエピトープとして定義され、水素／重水素交換から保護される。消化ペプチドの質量差を、ＬＣ－ＭＳにより明らかにした。

【０５００】

組換えＣＤ１３７を、最初に、酸化重水素中で、単独で又は１９２３Ａｂ４抗体との複合体においてインキュベートした。重水素交換を、２０℃で０秒、１５秒、６０秒、６００秒、又は３６００秒にわたり行った。交換反応を低ｐＨによりクエンチし、タンパク質をペプシン／プロリルエンドペプチダーゼ／ＸＩＩＩで消化した。ＣＤ１３７の消化ペプチドでの重水素レベルを、ＬＣ－ＭＳ上の質量シフトからモニタリングした。

【０５０１】

組換えＣＤ１３７は、配列ＡＡ４６－５１（ＫＧＶＦＲＴ；配列番号７８）、ＡＡ６５－９０（ＣＴＰＧＦＨＣＬＧＡＧＣＳＭＣＥＱＤＣＫＱＧＱＥＬＴ；配列番号７９）及びＡＡ１０４－１０７（ＤＱＫＲ；配列番号８０）（図１２中で影付きのバーとして描写される領域）での１９２３Ａｂ４抗体への結合時に重水素取り込みにおける有意な低下を示した。このデータは、実施例１０中に例証したドメインスワッピング実験と一致する。組換えＣＤ１３７は、配列ＡＡ４６－５１（ＫＧＶＦＲＴ；配列番号７８）、ＡＡ６５－９０（ＣＴＰＧＦＨＣＬＧＡＧＣＳＭＣＥＱＤＣＫＱＧＱＥＬＴ；配列番号７９）及びＡＡ１０４－１０７（ＤＱＫＲ；配列番号８０）での１９２３Ａｂ４抗体への結合時に重水素取り込みにおける有意な低下を示した。影付きのバーとして描写されているエピトープマッピング結果を、図１２中に要約する。このデータは、実施例１０中に例証したドメインスワッピング実験と一致する。

【０５０２】

実施例１２：ＰＤ－Ｌ１又はＣＤ１３７に対して結合するｓｃＦｖの調製

（Ｎ）－ＶＬ－リンカー－ＶＨ－（Ｃ）又は（Ｎ）－ＶＨ－リンカー－ＶＬ－（Ｃ）の構造を伴ってＰＤ－Ｌ１に結合するｓｃＦｖを、図１Ａ中に示されるＰＤ－Ｌ１に対する完全ヒトモノクローナル抗体の可変領域を使用して調製した。

【０５０３】

（Ｎ）－ＶＬ－リンカー－ＶＨ－（Ｃ）又は（Ｎ）－ＶＨ－リンカー－ＶＬ－（Ｃ）の構造を伴ってＣＤ１３７に結合するｓｃＦｖを、図１Ｂ及び１Ｃ中に示されるＣＤ１３７に対する完全ヒトモノクローナル抗体の可変領域を使用して調製し、ここで、重鎖可変領域の４４の位置でのアミノ酸残基「Ｇ」は「Ｃ」で置換されてもよく、及び軽鎖可変領域の１００の位置でのアミノ酸残基「Ｇ」は「Ｃ」で置換されてもよい。ｓｃＦｖ中の「Ｇ」から「Ｃ」へのそのようなアミノ酸置換は、二重特異性抗体又は三重特異性抗体の一つの標的特異的部分としてのｓｃＦｖの安定性を改善することができ得る。

【０５０４】

実施例１３：ＰＤ－Ｌ１／ＣＤ１３７二重特異性体の分子設計及び産生

ＰＤ－Ｌ１に結合する結合タンパク質の代表的な例として、図１３及び１４中に要約されるサブユニット／成分を含む、図１３Ｊ中に描写される分子フォーマットにより特徴付けられる対称二重特異性体（ＰＤ－Ｌ１×ＣＤ１３７）を調製した：

１９２３Ａｂ１８

１．重鎖：成分：抗ＰＤ－Ｌ１抗体の重鎖、リンカー及び抗ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＣＣを伴うＶＨ－ＶＬ）（Ｎ→Ｃ）を含む配列番号５０；ならびに
２．軽鎖：抗ＰＤ－Ｌ１抗体軽鎖を含む配列番号４０。
【０５０５】
１９２３Ａｂ１８の重鎖成分をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント１（配列番号５０）を発現ベクター中に挿入し、１９２３Ａｂ１８の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント２（配列番号４０）を発現ベクター中に挿入した。
【０５０６】
構築された発現ベクターをＥｘｐｉ２９３細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で一過性に発現させ、CO_2インキュベーター中で、３７℃の条件下で５日間にわたり、Ｅｘｐｉ２９３発現培地中で培養した。二重特異性抗体を、組換えプロテインＡ親和性クロマトグラフィー（Ｈｉｔｒａｐ　Ｍａｂｓｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ、ＧＥ）、及び、必要な場合、イオン交換クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィーによる第二工程精製により、細胞培養上清から精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　（ＢｉＲａｄ）、ＳＥ－ＨＰＬＣカラム（ＴＯＳＯ、Ｇ３０００ＳＷＸＬ）を用いたサイズ排除ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ、１１００　シリーズ）分析及びＣＥ－ＳＤＳ（ＳＣＩＥＸ、ＰＡ８００　Ｐｌｕｓ）を実施して、二重特異性抗体のサイズ及び純度を検出及び確認した。精製タンパク質を所望の緩衝液中に緩衝液交換し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５　３０Ｋ装置を使用した限外濾過により濃縮し、タンパク質濃度をドロップセンス（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂ）を使用して推定した。一過性トランスフェクションは、２ベクター系において、又は一つの単一ベクター中に重鎖成分及び軽鎖成分の両方を含む１ベクター系を用いて使用することができ得る。あるいは、二重特異性抗体は、安定ＣＨＯ発現細胞株の上清から精製することができ得る。
【０５０７】
実施例１４：非対称ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の分子設計及び産生
ＰＤ－Ｌ１に結合する非対称結合タンパク質の代表的な例として、図１３及び１４中に要約されるサブユニット／成分を含む、図１３Ｃ中に描写される分子フォーマットにより特徴付けられる三重特異性体（ＰＤ－Ｌ１×ＣＤ１３７×ＴＧＦβＲＩＩ）を調製した：１９２３Ａｂ９
１．重鎖（ノブ）：成分：抗ＰＤ－Ｌ１抗体の重鎖、リンカー及び抗ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＣＣを伴うＶＨ－ＶＬ）（Ｎ→Ｃ）を含む配列番号４１；
２．重鎖（ホール）：抗ＰＤ－Ｌ１抗体成分（Ｎ→Ｃ）の重鎖を含む配列番号４２；及び
３．軽鎖：抗ＰＤ－Ｌ１抗体軽鎖を含む配列番号３９。
【０５０８】
１９２３Ａｂ９の重鎖（ノブ）成分をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント１（配列番号４１）を発現ベクター中に挿入し、１９２３Ａｂ９の重鎖（ホール）成分をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント２（配列番号４２）を発現ベクター中に挿入し、及び１９２３Ａｂ９の軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント３（配列番号３９）を発現ベクター中に挿入した。
【０５０９】
構築された発現ベクターをＥｘｐｉ２９３細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で一過性に発現させ、CO_2インキュベーター中で、３７℃の条件下で５日間にわたり、Ｅｘｐｉ２９３発現培地中で培養した。二重特異性抗体を、組換えプロテインＡ親和性クロマトグラフィー（Ｈｉｔｒａｐ　Ｍａｂｓｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ、ＧＥ）、及び、必要な場合、イオン交換クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィーによる第二工程精製により、細胞培養上清から精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　（ＢｉｏＲａｄ）、ＳＥ－ＨＰＬＣカラム　（ＴＯＳＯ、Ｇ３０００ＳＷＸＬ）を用いたサイズ排除ＨＰＬＣ　（Ａｇｉｌｅｎｔ、１１００　シリーズ）分析及びＣＥ－ＳＤＳ　（ＳＣＩＥＸ、ＰＡ８００　Ｐｌ

ｕｓ）を実施して、三重特異性抗体のサイズ及び純度を検出及び確認した。精製タンパク質を所望の緩衝液中に緩衝液交換し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５　３０Ｋ装置を使用した限外濾過により濃縮し、タンパク質濃度をドロップセンス（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂ）を使用して推定した。一過性トランスフェクションは、３ベクター系において、又は一つの単一ベクター中に重鎖成分及び軽鎖成分の両方を含む１ベクター系を用いて使用することができ得る。あるいは、二重特異性抗体は、安定ＣＨＯ発現細胞株の上清から精製することができ得る。

【０５１０】

実施例１５：ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦβ／ＣＤ１３７三重特異性体の分子設計及び産生

ＰＤ－Ｌ１に結合する対称結合タンパク質の代表的な例として、図１３及び１４中に要約されるサブユニット／成分を含む、図１３Ｉ中に描写される分子フォーマットにより特徴付けられる三重特異性体（ＰＤ－Ｌ１×ＣＤ１３７×ＴＧＦβＲＩＩ、１９２３Ａｂ１７）を調製した：

１９２３Ａｂ１７

１．重鎖：成分、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の重鎖、リンカー及び抗ＣＤ１３７　ｓｃＦｖ（ＣＣを伴うＶＨ－ＶＬ）（Ｎ→Ｃ）を含む配列番号５０；ならびに

２．軽鎖：成分、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の軽鎖、リンカー及びＴＧＦβＲＩＩ　ＥＣＤを含む配列番号３９。

【０５１１】

１９２３Ａｂ１７の重鎖成分をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント（１）（配列番号５０）を発現ベクター中に挿入し、及び１９２３Ａｂ１７の軽鎖成分をコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡセグメント（２）（配列番号３９）を発現ベクター中に挿入した。

【０５１２】

構築された発現ベクターをＥｘｐｉ２９３細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で一過性に発現させ、CO_2インキュベーター中で、３７℃の条件下で５日間にわたり、Ｅｘｐｉ２９３発現培地中で培養した。三重特異性抗体を、組換えプロテインＡ親和性クロマトグラフィー（Ｈｉｔｒａｐ　Ｍａｂｓｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ、ＧＥ）、及び、必要な場合、イオン交換クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィーによる第二工程精製により、細胞培養上清から精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　（ＢｉｏＲａｄ）、ＳＥ－ＨＰＬＣカラム　（ＴＯＳＯ、Ｇ３０００ＳＷＸＬ）を用いたサイズ排除ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ、１１００　シリーズ）分析及びＣＥ－ＳＤＳ（ＳＣＩＥＸ、ＰＡ８００　Ｐｌｕｓ）を実施して、三重特異性抗体のサイズ及び純度を検出及び確認した。精製タンパク質を所望の緩衝液中に緩衝液交換し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１５　３０Ｋ装置を使用した限外濾過により濃縮し、タンパク質濃度をドロップセンス（Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂ）を使用して推定した。一過性トランスフェクションは、２ベクター系において、又は一つの単一ベクター中に重鎖成分及び軽鎖成分の両方を含む１ベクター系を用いて使用することができ得る。あるいは、二重特異性抗体は、安定ＣＨＯ発現細胞株の上清から精製することができ得る。

【０５１３】

実施例１６：ＰＤ－Ｌ１に結合する二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け：ＣＤ１３７への結合

二重特異性抗体及び三重特異性抗体を、実施例１３から１５までにおいて記載されるように生成、産生、及び精製した。ＣＤ１３７に対するこれらの抗体の結合活性を調べるために、免疫蛍光撮像アッセイを、ヒトＣＤ１３７発現構築物で安定的にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を使用して実施した。この細胞株は、細胞表面上にヒトＣＤ１３７タンパク質を発現した。細胞を、１０％ＦＢＳを伴うＤＭＥＭを含む完全培地中に播種し、次に３７℃で一晩インキュベートした。細胞を、４℃で２時間にわたりこれらの抗体で染色し、続いて、細胞を室温で１５分間にわたり固定した。固定細胞をＰＢＳで三回洗浄し、続いて、検出のためのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８ヤギ抗ヒトＩ

ｇＧ（Ｈ＋Ｌ）二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ－１１０１３）を用いて、室温で１時間にわたり染色した。結合シグナルを、細胞を撮像し、Ｃｙｔａｔｉｏｎ５（Ｂｉｏｔｅｋ、ＶＴ）を使用して蛍光強度を定量化することにより評価した。

【０５１４】

図１６Ａでは、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ９、１９２３Ａｂ１０及び１９２３Ａｂ１１を含む、開示されている全ての二重特異性抗体及び三重特異性抗体が、１９２３Ａｂ４と比較して、細胞表面上のヒトＣＤ１３７に類似的に結合した。この結果は、抗ＣＤ１３７のＳｃＦｖフォーマットが、ＣＤ１３７への結合活性を保持したことを示す。

【０５１５】

本発明者らはまた、ＳｃＦｖフォーマットとして１９２３Ａｂ３を使用して三重特異性抗体を生成した。図１６Ｂでは、１９２３Ａｂ７及び１９２３Ａｂ１６の両方が、フローサイトメトリーにより測定された、細胞表面上のヒトＰＤ－Ｌ１と類似して結合した。この結果は、１９２３Ａｂ３及び１９２３Ａｂ４の両方が、開示されている二重特異性抗体及び三重特異性抗体においてＳｃＦｖフォーマットとして使用され得ることを示す。

【０５１６】

実施例１７：ＰＤ－Ｌ１に結合する二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け：ＣＤ１３７シグナル伝達

これらの抗体を、ＮＦκＢルシフェラーゼレポーターアッセイを使用してＣＤ１３７シグナル伝達に対するアゴニスト活性を測定することによりさらに評価した。ヒトＣＤ１３７発現プラスミド及びＮＦκＢルシフェラーゼレポータープラスミドで安定的にトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞を、レポーター細胞として使用した。これらのレポーター細胞を、ＰＤ－Ｌ１を発現する２９３Ｔ細胞と共培養し、抗体で刺激し、３７℃で、５％CO_2で１６時間にわたりインキュベートした。ＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ６１３０）を加えて、プレートを室温で１０分間にわたりインキュベートした。発光シグナルを、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２プレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ、バーモント州）により測定し、データをＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍにより分析した。ＣＤ１３７シグナル伝達の活性化は、発光シグナルの増加をもたらした。

【０５１７】

図１７Ａでは、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ９、１９２３Ａｂ１０及び１９２３Ａｂ１１を含む全ての開示されている抗体が、アイソタイプ対照抗体と比較して、ＣＤ１３７シグナル伝達を活性化した。１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、及び１９２３Ａｂ１１は、１９２３Ａｂ９及び１９２３Ａｂ１０と比較して、より強いアゴニスト活性を示した（図１７Ａ）。結果は、抗ＣＤ１３７の二価結合が、抗ＣＤ１３７の一価結合よりも強い抗ＣＤ１３７シグナル伝達を誘導したことを実証する。

【０５１８】

本発明者らはまた、ＳｃＦｖフォーマットとして１９２３Ａｂ３を使用して三重特異性抗体を生成した。ＣＤ１３７シグナル伝達に対するこれらの抗体のアゴニスト活性がまた、組換えＣＤ１３７及びＮＦ　Ｂルシフェラーゼレポーターを発現するＪｕｒｋａｔ　ＴＣＤ１３７レポーター細胞を使用して比較された。簡単には、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ　ＮＦκＢレポート細胞株を使用して、ＣＤ１３７シグナル伝達の活性を測定し、ＰＤ－Ｌ１発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を標的細胞として使用して、ＰＤ－Ｌ１を提供した。図１７Ｂでは、１９２３Ａｂ７及び１９２３Ａｂ１６の両方が、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞により測定されたＣＤ１３７シグナル伝達と類似のアゴニスト活性を示した。１９２３Ａｂ１６は、ヒトＰＤ－Ｌ１に効果的に結合して、ＣＤ１３７シグナル伝達を活性化する。

【０５１９】

実施例１８：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け－ＣＤ１３７シグナル伝達のＰＤ－Ｌ１依存的活性化

開示されている抗体を、ＰＤ－Ｌ１依存的ＣＤ１３７アゴニズムを誘導するそれらの能力について評価した。図１８は、標的細胞の存在（１８Ａ）又は非存在（１８Ｂ）においてＪｕｒｋａｔ　Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞を使用して、ＣＤ１３７シグナル伝達を誘導する１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８の能力を実証する。簡単には、ＣＤ１３７発現Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ　ＮＦｋＢレポート細胞株を使用して、ＣＤ１３７シグナル伝達の活性を測定し、ＰＤ－Ｌ１発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を標的細胞として使用して、ＰＤ－Ｌ１を提供した。レポーター細胞を標的細胞と共培養した場合、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ１７、１９２３Ａｂ１８、及びウレルマブ－ＮＲを含む、開示されている抗体は、ＣＤ１３７シグナル伝達の活性化を示した（図１８Ａ）。しかし、開示されている抗体のいずれも、ウレルマブ－ＮＲを除いて、標的細胞の非存在においてＣＤ１３７シグナル伝達を誘導しなかった（図１８Ｂ）。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ　Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂにより開発された架橋非依存的抗体である。この抗体は臨床的有効性を示すが、しかし、その発生は、肝毒性により限定される。図１８Ａ、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８は、ウレルマブと比較して、ＰＤ－Ｌ１依存的なＣＤ１３７シグナル伝達のより強い誘導（Ｅｍａｘ）を実証した。

【０５２０】

実施例１９：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け－抗ＣＤ１３７のｓｃＦｖの位置

開示されている二重特異性抗体及び三重特異性抗体における異なる位置において抗ＣＤ１３７のＳｃＦｖを融合することによりＣＤ１３７アゴニズムに対する効果を調べるために、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ　ＣＤ１３７レポーター細胞を、ＰＤＬ１発現細胞の存在又は非存在において使用した。テスト抗体の構造を図１３及び１４中に例証する。１９２３Ａｂ１９は、抗体軽鎖のＣ末端に融合された１９２３Ａｂ４のＳｃＦｖフォーマットを含む。１９２３Ａｂ１２及び１９２３Ａｂ１３は、それぞれ抗体軽鎖及び重鎖のＮ末端に融合された１９２３Ａｂ４のＳｃＦｖフォーマットを含む。１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ７は対照三重特異性抗体である。図１９Ａは、二重特異性Ａｂ　１９２３Ａｂ１９が、ＰＤＬ１発現細胞の存在においてのみＣＤ１３７シグナル伝達を誘導することができることを実証する。類似的に、ｎ１９２３Ａｂ１２及び１９２３Ａｂ１３はまた、ＰＤ－Ｌ１依存的な様式においてＣＤ１３７シグナル伝達を誘導した（図１９Ｂ）。

【０５２１】

実施例２０：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け－ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用の遮断

ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を遮断するための二重特異性抗体及び三重特異性抗体におけるＰＤＬ１結合アームの効果を調べるために、Ｐｒｏｍｅｇａ（米国マディソン）により開発されたＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害バイオアッセイを、実施例４において記載されるように使用した。図２０は、１９２３Ａｂ３、１９２３Ａｂ７、１９２３Ａｂ８、１９２３Ａｂ１７、及び１９２３Ａｂ１８を含む、全ての開示されている抗体が、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の間での相互作用を効果的に遮断することを実証する。遮断活性は、臨床的に承認された抗ＰＤ－Ｌ１抗体、例えばＰＣ１アベルマブ－ＮＲ及びアテゾリズマブなどと等価である。

【０５２２】

実施例２１：三重特異性体の特徴付け－ＴＧＦβ活性の遮断

高レベルの形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦβ）は、進行した悪性腫瘍における免疫回避、療法抵抗性（化学療法、放射線、チェックポイント阻害剤）、及び不良な転帰と関連付けられる。腫瘍微小環境（ＴＭＥ）においてＴＧＦβを隔絶することによりＴＧＦβシグナル伝達を阻害することによって、非免疫細胞における表現型変化及び免疫細胞の増強された活性化に導かれる。従って、ＴＧＦβの遮断は、免疫系と完全に係合するために、本発明者らの開示されている二重特異性抗体に利益を提供する。そのようにするために、本発明者らは、三重特異性抗体、例えば１９２３Ａｂ７及び１９２３Ａｂ１７などを生成した。これらの抗体のＴＧＦβ遮断活性を、ＴＧＦ／ＳＭＡＤシグナル伝達経路ＳＢＥレ

ポーターーＨＥＫ２９３細胞株（ＢＰＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カリフォルニア州）を使用して調べた。図２１は、１９２３Ａｂ７及び１９２３Ａｂ１７の両方が、それぞれ、３．６ｐＭ及び２．８ｐＭのＩＣ５０値を伴って、ＴＧＦβ誘導シグナル伝達を効果的に遮断したことを実証する。

【０５２３】

実施例２２：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付けーヒトＰＢＭＣを使用したＴ細胞活性化

Ｔ細胞活性化を測定するために、健康なドナーから調製されたヒトＰＢＭＣを使用した。これらのヒトＰＢＭＣを、１０％ＦＢＳ及び０．５ｕｇ／ｍｌのマウス抗ｈＣＤ３クローンＯＫＴ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３２５）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中で1×10^{6}個細胞／ｍＬの密度で培養した。開示されている抗体を加えて、Ｔ細胞を刺激した。プレートを、３７℃で、５％CO_2で３日間にわたりインキュベートした。７２時間のインキュベーション後、上清を使用して、分泌ＩＦＮγを、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、カタログ番号ＡＬ２１７Ｃ／Ｆ）により、製造元の指示に従ってプロトコルを使用して測定した。

【０５２４】

図２２Ａ中に示されるように、ＣＤ３で同時処理された場合、二重特異性Ａｂ　１９２３Ａｂ８は、モノクローナル抗ＣＤ１３７　Ａｂ　１９２３Ａｂ４＋Ｆｃ架橋剤又はＰＣ２ウレルマブーＮＲ単独のいずれかで処理されたＰＢＭＣと等価の強いＴ細胞活性化を誘導した。実施例１８における以前のデータによって、１９２３Ａｂ８の活性がＰＤＬ－１依存的であることが実証された。ＰＢＭＣ及び活性化Ｔ細胞における抗原提示細胞上のＰＤＬ１の発現が報告されているため、このデータは、二重特異性Ａｂが、免疫細胞上のＰＤＬ１に結合し、腫瘍微小環境、及び腫瘍抗原経験Ｔ細胞が存在する流入領域リンパ節においてＴ細胞を活性化することができ得ることを示唆する。

【０５２５】

図２２Ｂは、三重特異性１９２３Ａｂ７及び二重特異性１９２３Ａｂ８の両方が、強いＴ細胞活性化を誘導したことを実証する。しかし、抗ＰＤＬ１及びＴＧＦｂＲＩＩを含む二重特異性Ａｂ　１９２３Ａｂ２０は、Ｔ細胞活性化を示さなかった。ＰＤ１経路を遮断すること及びＣＤ１３７を活性化することは両方とも、Ｔ細胞を活性化することができる。結果は、検出されたＴ細胞活性化が、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用の阻害よりむしろ、ＣＤ１３７シグナル伝達の活性化に起因することを例証する。

【０５２６】

実施例２３：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付けーＴ細胞媒介性細胞傷害性及びＣＤ８　Ｔ細胞活性化

ＰＤ－Ｌ１を発現する腫瘍細胞に対するＴ細胞媒介性細胞傷害性効果を調べるために、ＧＦＰを発現するＮＵＧＣ－４胃腫瘍細胞を使用した。簡単には、ＮＵＧＣ４　ＧＦＰ細胞を、ＩＦＮγで４８時間にわたり前処理して、ＰＤ－Ｌ１発現を誘導した。前処理後、細胞を洗浄し、マウス抗ｈＣＤ３クローンＯＫＴ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３２５）及び開示されている二重特異性又は三重特異性抗体で刺激されたＣＤ８　Ｔ細胞と７２時間にわたり共培養した。緑色蛍光シグナルを、Ｃｙｔａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｔｅｋ、ＶＴ）を使用して測定した。死滅のパーセンテージを、以下の式により計算した：

死滅の％＝（ＧＦＰシグナル抗体なしー抗体で処理されたＧＦＰシグナル）／ＧＦＰシグナル抗体なし＊１００％。

【０５２７】

図２３Ａは、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８が、強いＴ細胞媒介性細胞傷害性を誘導したことを実証する。腫瘍細胞の約５０％を、１９２３Ａｂ１７又は１９２３Ａｂ１８で刺激されたＣＤ８　Ｔ細胞との７２時間のインキュベーション時に殺した。同じ実験からの培地を使用して、Ｔ細胞活性化の指標としてＩＦＮγの量を測定した。図２３Ｂは、１９２３Ａｂ１７処理及び１９２３Ａｂ１８処理の両方が、アイソタイプ対照処理と

比較して、強いＴ細胞活性化を誘導したことを実証する。これらの結果は、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８がＣＤ８　Ｔ細胞を活性化するだけでなく、しかし、また、ＣＤ８　Ｔ細胞媒介性死滅を誘導したことを例証する。

【０５２８】

実施例２４：二重特異性体及び三重特異性体の特徴付け－ＣＭＶリコールアッセイにおけるＰＢＭＣを使用した抗原特異的Ｔ細胞活性化

開示されている二重特異性抗体及び三重特異性抗体の抗原特異的Ｔ細胞活性化を調べるために、健康なドナーから調製されたヒトＰＢＭＣを使用した。ＣＭＶ溶解物を、Ｍｉｃｒｏｂｉｘ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（カタログ番号ＥＬ－０１－０２－００１．０）から購入した。ＣＭＶリコールアッセイを、ＣＭＶ溶解物及び抗体で刺激されたヒトＰＢＭＣを使用して５日間にわたり実施した。プレートを、５％CO_2を伴って３７℃でインキュベートした。５日間のインキュベーション後、上清を収集し、ＩＦＮγを、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、カタログ番号ＡＬ２１７Ｃ／Ｆ）により、製造元の指示に従ってプロトコルを使用して測定した。ＩＦＮγの量は、Ｔ細胞活性化に直接的に比例する。

【０５２９】

図２４は、全ての開示されている抗体が、抗原特異的なＴ細胞活性化を活性化したことを実証する。とりわけ、１９２３Ａｂ７及び１９２３Ａｂ１７は、インビトロで最も強いＴ細胞活性化を誘導した。この結果は、三重特異性抗体が、二重特異性抗体、又は「ＰＣ２ウレルマブ－ＮＲ＋１９２３Ａｂ３」もしくは「ＰＣ２ウレルマブ－ＮＲ＋１９２３Ａｂ２０」の組み合わせ処理よりも強い抗原特異的Ｔ細胞活性化を活性化したことを示す。

【０５３０】

実施例２５：ヒトＰ－Ｌ１及びヒトＣＤ１３７に対する１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８の結合動態

ヒトＰＤ－Ｌ１及びＣＤ１３７に結合する、１９２３Ａｂ３、１９２３Ａｂ４、１９２３Ａｂ１７及び１９２３Ａｂ１８を含む、開示されている抗体の能力を評価するために、結合動態実験をＢｉａｃｏｒｅ３０００によりテストした。簡単には、ＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＢＲ－１０００－１２）を、フローセル２上のアプリケーションウィザードに従って、抗ヒトＩｇＧ抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＢＲ－１００８－３９）とのアミンカップリング化学を介して固定化した。フローセル１は、体系的な機器ノイズ及びドリフトの減算のための参照セルとしての役割を果たすように、未改変のままであった。二重ブランク（Ｆｃ１及びブランク分析物緩衝液）を用いてＦｃ２－１検出を実行し、抗体サンプルをＨＢＳ－ＥＰ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＢＲ－１００３－６９）中で１ｕｇ／ｍｌに希釈し、１０ｕｌ／ｍｌの流量で１分間捕捉のために注射した。ＨＢＳ－ＥＰ中で１：４希釈、５ポイントでＰＤ－Ｌ１については１０ｎＭ及びＣＤ１３７については８０ｎＭから０ｎＭまで希釈された抗原ヒトＰＤ－Ｌ１（Ａｃｒｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＰＤ１－Ｈ５２２９）及び　ＣＤ１３７（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、カタログ番号１００４１－Ｈ０８Ｈ）を、５０μｌ／分で２分間にわたり注射し、その後６分間解離させた。

【０５３１】

データは、質量移動モデルを用いた１：１結合によりＢＩＡＥｖａｌｕｔｉｏｎソフトウェアにおいて分析された。平衡解離定数（ＫＤ）が報告された。結果を表１０及び１１中に要約する。

【表１０】

表１０：ヒトＰＤ－Ｌ１への結合。

	ka (1/Ms)	kd (1/秒)	KD (M)
1923Ab3	8.14E+05	2.40E-03	2.95E-09
1923Ab17	1.20E+06	2.67E-03	2.22E-09
1923Ab18	6.59E+05	2.30E-03	3.49E-09

【表１１】

表１１：ヒトＣＤ１３７への結合。

	ka (1/Ms)	kd (1/秒)	KD (M)
1923Ab4	3.05E+06	2.19E-02	7.18E-09
1923Ab17	2.50E+06	4.83E-02	1.93E-08
1923Ab18	1.70E+06	3.80E-02	2.23E-08

【０５３２】

実施例２６：ＭＣ３８－ｈＰＤ－Ｌ１マウス腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果及び腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）分析

６～８週齢の、１６～２０ｇの間の体重を伴う雌Ｂ－ｈＰＤ－Ｌ１／ｈ４－１ＢＢマウス（Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ）を、試験登録前の７日間にわたり順応させた。マウスは、全試験期間の間に、オートクレーブ滅菌された乾燥顆粒食品及び水への自由なアクセスを有し、相対的湿度４０～７０％を伴って、２０～２６℃で１２時間の明／暗サイクルで収容された。ＭＣ３８マウス結腸癌細胞株を遺伝的に改変して、マウスＰＤ－Ｌ１の代わりにヒトＰＤ－Ｌ１を過剰発現させた。細胞は、１０％熱不活化ＦＢＳを補充したＤＭＥＭ中で、３７℃で、５％の雰囲気中で、単層培養物としてインビトロで維持される。細胞を回収し、１００μｌのＰＢＳ中の5×10^5個の細胞を、腫瘍発生のために右前脇腹中に皮下移植した。７日目に、腫瘍担持マウスを、約１００～１５０mm^3の平均腫瘍サイズを伴う２つの試験群中に無作為に登録する。各群は５匹のマウスからなった。腫瘍サイズは、キャリパーを使用して二次元において週に二回測定され、容積は、以下の式を使用してmm^3で表現される：Ｖ＝０．５ａ×ｂ２、式中、ａ及びｂはそれぞれ腫瘍の長寸法及び短寸法である。処置を、５ｍｇ／ｋｇの１９２３Ａｂ１８又は陰性対照としてのＰＢＳの腹腔内注射を用いて、７、１１、１４、及び１８日目に開始した。試験は２１日目に終了した。最終的な出血を実施して、ＡＳＴ測定用の血清を調製した。腫瘍を回収し、ＴＩＬ分析のために組織保存緩衝液中に保存した。

【０５３３】

図２５は、両方の処置群についての腫瘍成長曲線を示す。１９２３Ａｂ１８は、媒体対照と比較して腫瘍成長を有意に阻害した。それは７８％の腫瘍成長阻害に達した。

【０５３４】

腫瘍微小環境において免疫細胞に対する１９２３Ａｂ１８抗体の効果を決定するために、腫瘍サンプルを、上に記載される試験において回収した。免疫細胞の全体的な浸潤を、ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋腫瘍浸潤リンパ球の量を測定することにより決定した。図２６Ａ中に示されるように、１９２３Ａｂ１８は、腫瘍微小環境中へのＣＤ３＋免疫細胞の浸潤を有意に増加させた。ＣＤ３＋細胞を、ＣＤ４＋又はＣＤ８＋ＴＩＬにさらに分割した。図２６Ｂ＆Ｃは、１９２３Ａｂ１８が、ＣＤ８＋細胞の浸潤を有意に誘導したが、しかし、ＣＤ４＋細胞は誘導しなかったことを実証する。腫瘍微小環境におけるＴｒｅｇ細胞のレベルは、ＣＤ２５＋ＦＯＸＰ３＋ＣＤ３＋腫瘍浸潤リンパ球の量を測定することにより決定された。図２６Ｄ中に示されるように、１９２３Ａｂ１８は、腫瘍微小環境におけるＴｒｅｇのレベルを有意に低下させた。従って、ＣＤ８／Ｔｒｅｇ比率は、１９２３Ａｂ１８で処置されたマウスの腫瘍微小環境において有意に増加した（図２６Ｅ）。

【０５３５】
他に示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される成分の量、特性、例えば分子量、反応条件などを表現する全ての数が、全ての例において用語「約」により修飾されるとして理解されるべきである。したがって、反対に示されない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲において示される数値パラメータは、本開示により得られることが求められる所望の特性に依存して変動し得る近似である。最低限、特許請求の範囲に対する均等論の適用を限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効桁数に照らして、通常の四捨五入技術を適用することにより解釈されるべきである。
【０５３６】
本開示の広範な範囲を示す数値範囲及びパラメータが近似であるにもかかわらず、特定の実施例において示される数値は、可能な限り正確に報告される。任意の数値は、しかし、それらのそれぞれのテスト測定値において見出される標準偏差から必然的にもたらされる特定の誤差を本質的に含む。
【０５３７】
本開示を記載する文脈において使用される用語「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」、及び類似の参照対象（特に以下の特許請求の範囲の文脈において）は、本明細書中で他に示されない、又は文脈により明確に矛盾しない限り、単数及び複数の両方を網羅すると解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入る各々の別々の値に個別に言及する簡潔な方法として役立つことが意図されている。本明細書中で他に示されない限り、各々の個々の値は、本明細書中に個別に列挙されているかのように本明細書中に組み入れられる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中で他に示されない、又は文脈により明確に矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書中に提供される任意の及び全ての実施例、又は例示的な言語（例、「例えば、など」）の使用は、単に本開示をより良く明らかにすることを意図しており、他に特許請求される本開示の範囲に対する限定を提起しない。本明細書中のいかなる文言も、本開示の実施に必須の任意の特許請求されていない要素を示しているとして解釈されるべきではない。
【０５３８】
本明細書中に開示される本開示の代替的な要素又は実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各グループメンバーは、個別に、又は本明細書中に見出されるグループもしくは他の要素の他のメンバーとの任意の組み合わせにおいて参照及び特許請求することができる。グループの一つ又は複数のメンバーは、利便性及び／又は特許性の理由のために、グループ中に含まれる、又はそこから削除することができることが予想される。任意のそのような包含又は削除が生じた場合、本明細書は、修正された群を含むと見なされ、このように、添付の特許請求の範囲において使用される全てのマーカッシュ群の書面による説明を満たす。
【０５３９】
本開示の特定の実施形態は、本明細書中に記載されており、本開示を行うための、発明者らに公知の最良の様式を含む。もちろん、これらの記載された実施形態のバリエーションは、前述の説明を読む際に当業者に明らかになるであろう。本発明者らは、当業者が、そのようなバリエーションを、適する場合に用いることを期待し、本発明者らは、本開示が、本明細書中に具体的に記載されていない他の方法で実施されることを意図する。したがって、本開示は、適用法により許容されるとおり、本明細書に添付される特許請求の範囲において列挙される主題の全ての修正及び等価物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションにおける上に記載される要素の任意の組み合わせが、本明細書中で他に示されない、又は文脈により明確に矛盾しない限り、本開示により包含される。
【０５４０】
本明細書中に開示される特定の実施形態は、「からなるか」又は「本質的になる」言語を使用して、特許請求の範囲においてさらに限定されることができる。特許請求の範囲に

おいて使用される場合、修正毎に出願される又は追加される、転換語「からなる」は、特許請求の範囲において特定されていない任意の要素、工程、又は成分を除外する。転換語「から本質的になる」は、特許請求の範囲を、特定された材料又は工程ならびに基本的及び新規の特徴に実質的に影響を及ぼさないものに限定する。そのように特許請求される本開示の実施形態は、本明細書中に固有に又は明示的に記載され、有効化される。

【０５４１】

本明細書中に開示される本開示の実施形態は、本開示の原理の例証であることが理解されるべきである。用いられ得る他の改変は、本開示の範囲内である。このように、例として、しかし、限定ではなく、本開示の代替的な構成が、本明細書中の教示に従って利用され得る。したがって、本開示は、正確に示され、記載されるようなものに限定されない。

【０５４２】

本開示は、様々な特定の材料、手順、及び実施例への参照により本明細書中に記載及び例証されている一方で、本開示は、その目的のために選択された材料及び手順の特定の組み合わせに制限されないことが理解される。そのような詳細の多数のバリエーションが、当業者により理解されるように意味され得る。本明細書及び実施例は、例示のみとして考えられ、本開示の真の範囲及び精神は、以下の特許請求の範囲により示されることが意図される。本出願において言及される全ての参考文献、特許、及び特許出願は、参照により、それらの全体において本明細書中に組み入れられる。

【図面】

【図１Ａ】

図 1A

配列番号 1　> 1923Ab2 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSSSPFDFWGQGTLVT
VSS

NYGMH	VIWFDGINKYYADSVKG	DRSSSPFDF
配列：5	配列：6	配列：7

配列番号 2　> 1923Ab2 VL

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNFSNNYLSWYQQTPGQAPRLLIYGASTRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLFTFGPGTKVDIK

RASQNFSNNYLS	GASTRAT	QQDYNLFT
配列：8	配列：9	配列：10

配列番号 3　> 1923Ab3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSS

SYDIN	WMNPNSGITGYAQRFQG	HRWGKGYLDL
配列：11	配列：12	配列：13

配列番号 4　> 1923Ab3 VL

EIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIK

RASQSVSSSYLS	GASTRAT	QQDYNLPYT
配列：14	配列：9	配列：15

【図１Ｂ】

図 1B

配列番号 16　> 1923Ab4 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSS

NYGMH	IIWYDGINKYYADSVKG	DQDYDILTGYYKEDYFDF
配列：5	配列：22	配列：23

配列番号 17　> 1923Ab4 VL

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER
FSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVL

SGDALPKKYAY	EDSKRPS	YSTDSSGNRV
配列：24	配列：25	配列：26

配列番号 18　> 1923Ab5 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN
EYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERWQWLVLFDYWGQGT
LVTVSS

SYGMH	VIWYDGSNEYYADSVKG	ERWQWLVLFDY
配列：27	配列：28	配列：29

配列番号 19　> 1923Ab5 VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTITSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFALYFCQQDFNLPYTFGQGTKLEIK

RASQTITSSYLS	GASTRAT	QQDFNLPYT
配列：30	配列：9	配列：31

【図１Ｃ】

図 1C

配列番号 20 > 1923Ab6 VH

EVHLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWVRQAPGKGLEWVSIIGGGGGST
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVGYSGTYGGWFDPWGQG
TLVTVSS

SYAMG	IIGGGGGSTYYADSVKG	VGYSGTYGGWFDP
配列：32	配列：33	配列：34

配列番号 21 > 1923Ab6 VL

DIQMTQSPSSLSASIGDRVAITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSK
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

RASQGISNYLA	AASSLQS	QQYNSYPLT
配列：35	配列：36	配列：37

配列番号 38 > 1923Ab7 及び 1923Ab8 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV
ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGINKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDFWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQ
QKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNR
VFGGGTKLTVL

配列番号 39 > 1923Ab7 及び 1923Ab9, 1923Ab10, 1923Ab17 軽鎖

EIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQK
SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPD

【図１Ｄ】

図 1D

配列番号 40 > 1923Ab8 及び 1923Ab11, 1923Ab13, 1923Ab18, 1923Ab20 軽鎖

EIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 41 > 1923Ab9 重鎖 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSQVQL
VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGINKYYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDFWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWY
QQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGN
RVFGGGTKLTVL

配列番号 42 > 1923Ab9 及び 1923Ab10 重鎖 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１Ｅ】

図 1E

配列番号 43 > 1923Ab10 重鎖 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSSYELT
QPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSS
SGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGINK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDF
WGQGTLVTVSS

配列番号 44 > 1923Ab11 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSSYELT
QPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSS
SGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQ
VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGINK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDF
WGQGTLVTVSS

【図１Ｆ】

図 1F

配列番号 45 > 1923Ab12 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 46 > 1923Ab12 軽鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA
YWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDS
SGNRVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMAQSPATLSLSPGERATLSCR
ASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
VYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

配列番号 47 > 1923Ab13 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA
YWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDS
SGNRVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC
KASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTA
YMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１Ｇ】

図 1G

配列番号 48 ＞1923Ab16 重鎖

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGG
GSEIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
PARFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGS
GGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWM
NPNSGITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLW
GRGTLVTVSS

配列番号 49 ＞1923Ab16 軽鎖

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER
FSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKS
VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPD

配列番号 50 ＞1923Ab17 及び 1923Ab18 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV
ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGINKYYADS
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDFWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA
YWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDS
SGNRVFGCGTKLTVL

【図１Ｈ】

図 1H

配列番号 51 ＞1923Ab19 及び 1923Ab20 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSG
ITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGRGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHV
QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNI
IFSEEYNTSNPD

配列番号 52 ＞1923Ab19 軽鎖

EIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESG
GGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGINKYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFDFWGQGTLV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYW
YQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSG
NRVFGCGTKLTVL

配列番号 53 ＞scFv それが融合する CD137

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA
YWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDS
SGNRVFGGGTKLTVL

配列番号 54 ＞scFv (LH) それが融合する CD137

YELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERF
SGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYD
GINKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKED
YFDFWGQGTLVTVSS

【図１Ｉ】

図 1I

配列番号 55 ＞scFv* 伴う 4x (G4S) 結合するリンカー CD137

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDAL
PKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYY
CYSTDSSGNRVFGCGTKLTVL

配列番号 56 ＞scFv* 伴う 3x (G4S) 結合するリンカー CD137

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKCLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYA
YWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDS
SGNRVFGCGTKLTVL

配列番号 57 ＞scFv (LH) それが融合する PD-L1

EIVMAQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
RFGGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPYTFGQGTKLEIK*GGGGSGGGGSGG*
*GGS*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNP
NSGITGYAQRFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHRWGKGYLDLWGR
GTLVTVSS

配列番号 58 ＞3x (G4S) リンカー

GGGGSGGGGSGGGGS

配列番号 59 ＞4x (G4S) リンカー

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号 60 ＞ヒト IgG1 定常領域

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPK

【図１Ｊ】

図 1J

配列番号 61 ＞ヒト IgG1 定常領域 LALA

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPK

配列番号 62 ＞ヒト IgG1 LALA 及び「ノブ」を伴う定常領域

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC
RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

配列番号 63 ＞ヒト IgG1 LALA 及び「ホール」を伴う定常領域

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS
RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 64 ＞ヒト IgG4 定常領域 S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

配列番号 65 ＞ヒトカッパ定常領域

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

【図１Ｋ】

図 1K

配列番号 66　>ヒトラムダ定常領域

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

配列番号 67　>ヒト TGF-ベータ受容体 2 型 ECD

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD
ECNDNIIFSEEYNTSNPD

配列番号 75　>結合する重鎖　　CD137 (Ab4 VH-hIgG1 LALA)

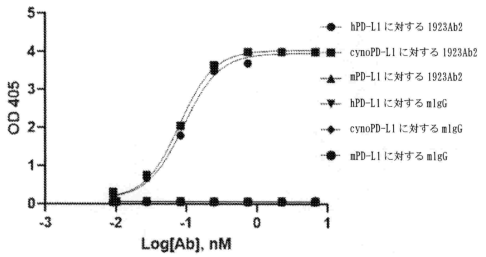
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGIN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDQDYDILTGYYKEDYFD
FWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

配列番号 76　>結合する軽鎖　　CD137 (Ab4 VL-ラムダ　)

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER
FSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

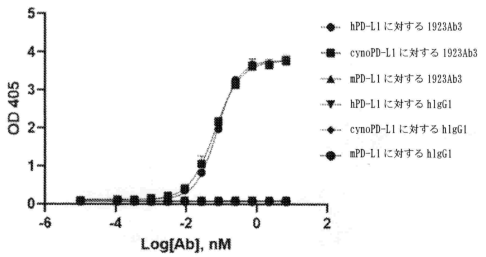
【図２】

図 2A



	EC50
hPD-L1 に対する 1923Ab2	0.09 nM
cynoPD-L1 に対する 1923Ab2	0.08 nM

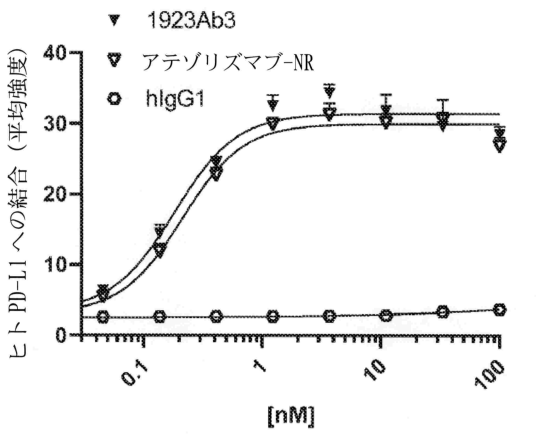
図 2B



	EC50
hPD-L1 に対する 1923Ab3	0.08 nM
cynoPD-L1 に対する 1923Ab3	0.07 nM

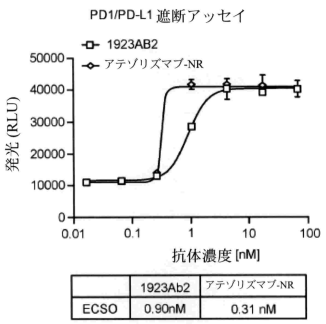
【図３】

図 3



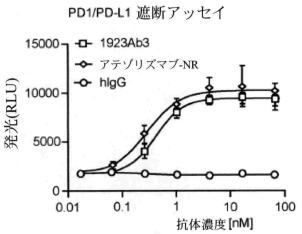
	1923Ab3	アテゾリズマブ-NR
EC50	0.18 nM	0.21 nM

【図４】



	1923Ab2	アテゾリズマブ-NR
EC50	0.90nM	0.31 nM

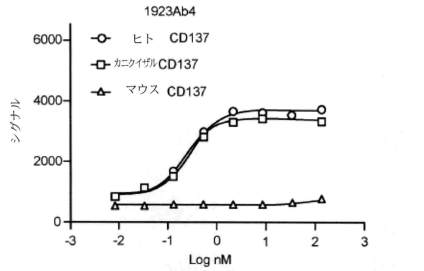
図4A



	1923Ab3	アテゾリズマブ-NR
EC50	0.43nM	0.29 nM

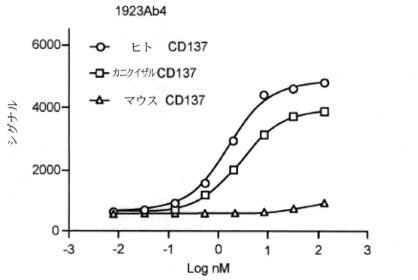
図4B

【図５－１】



	ヒト CD137	カニクイザル CD137
EC50	0.29nM	0.22 nM

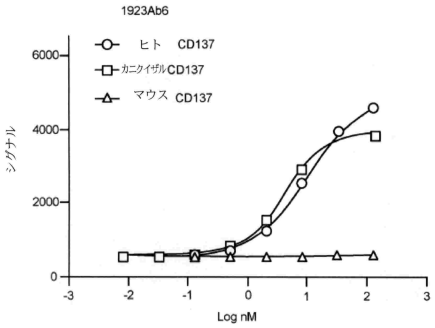
図5A



	ヒト CD137	カニクイザル CD137
EC50	1.62nM	2.77 nM

図5B

【図５－２】

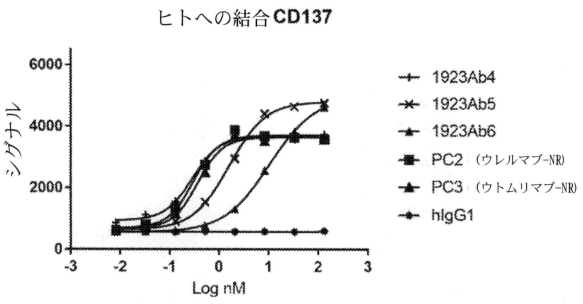


	ヒト CD137	カニクイザル CD137
EC50	10.5 nM	4.23 nM

図5C

【図６】

図 6



	EC50
1923Ab4	0.29 nM
1923Ab5	1.6 nM
1923Ab6	11 nM
PC2 （ウレルマブ-NR）	0.30 nM
PC3 （ウトムリマブ-NR）	0.37nM

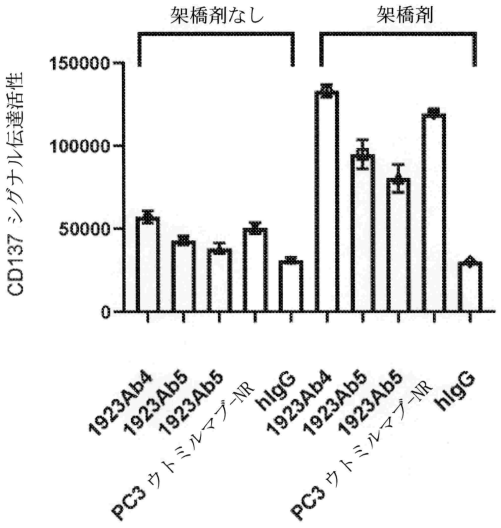
【図７】

図 7

クローン	リガンド遮断
1923Ab4	はい
1923Ab5	いいえ
1923Ab6	いいえ
PC2 ウレルマブ-NR	いいえ
PC3 ウトミルマブ-NR	はい

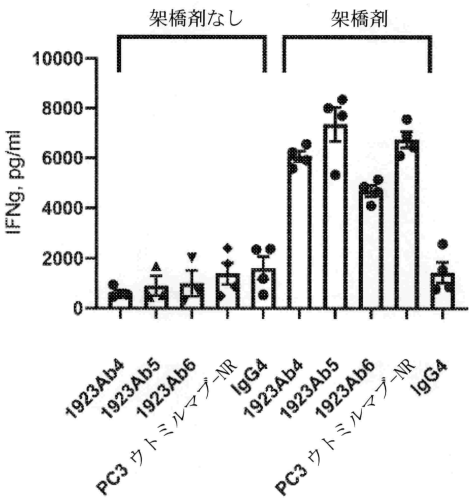
【図８】

図８



【図９】

図９



【図１０－１】

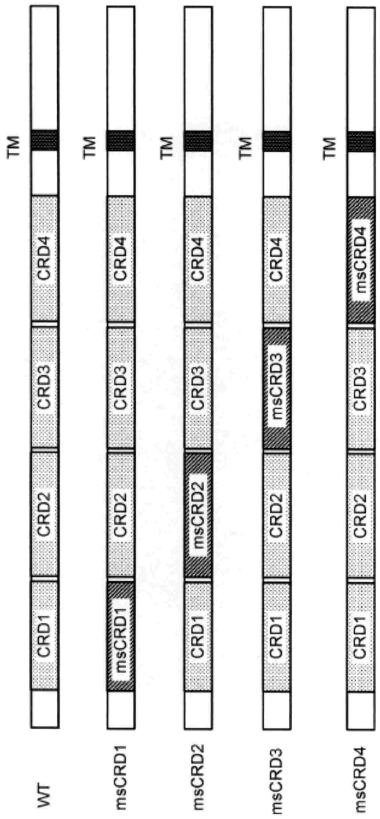


図10A

【図１０－２】

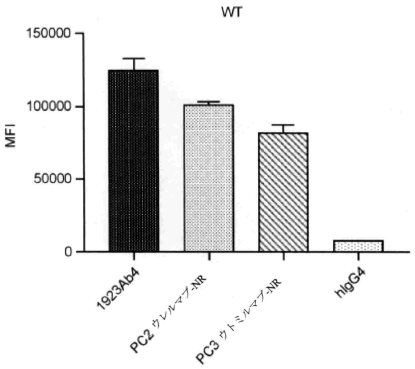


図10B

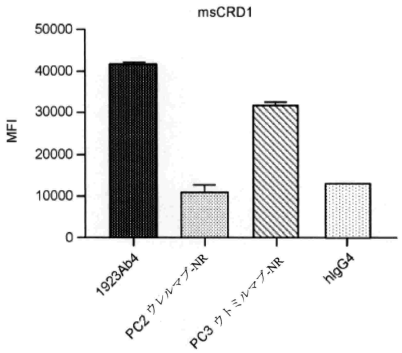


図10C

【図１０－３】

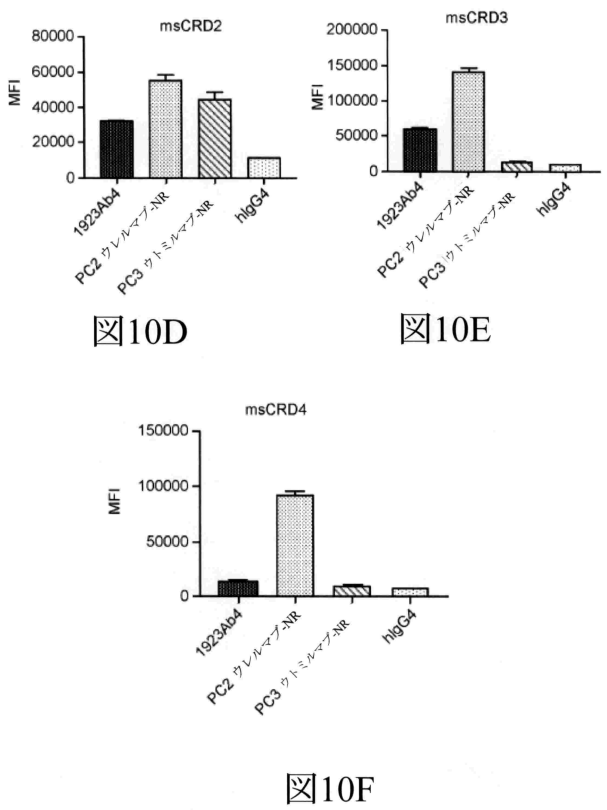


図10D　図10E

図10F

【図１１－１】

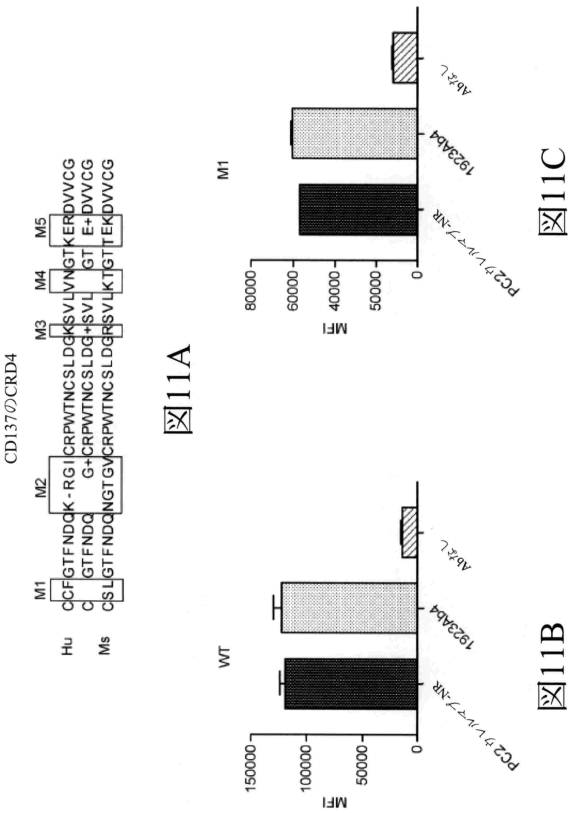


図11A　図11B　図11C

【図１１－２】

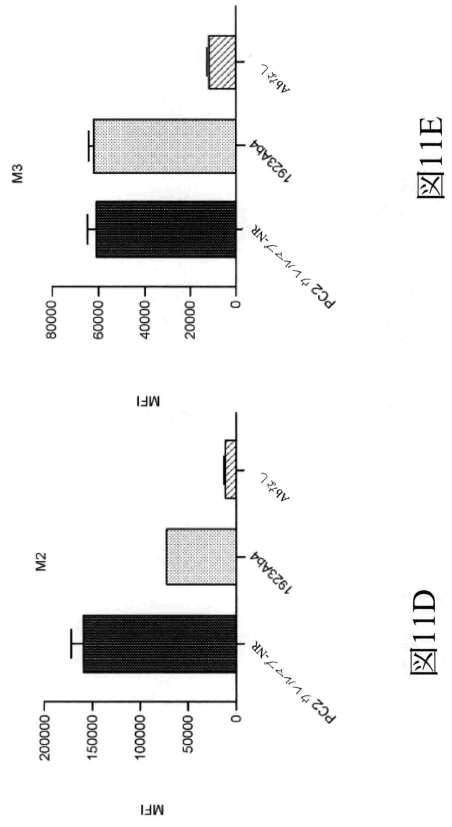


図11E　図11D

【図１１－３】

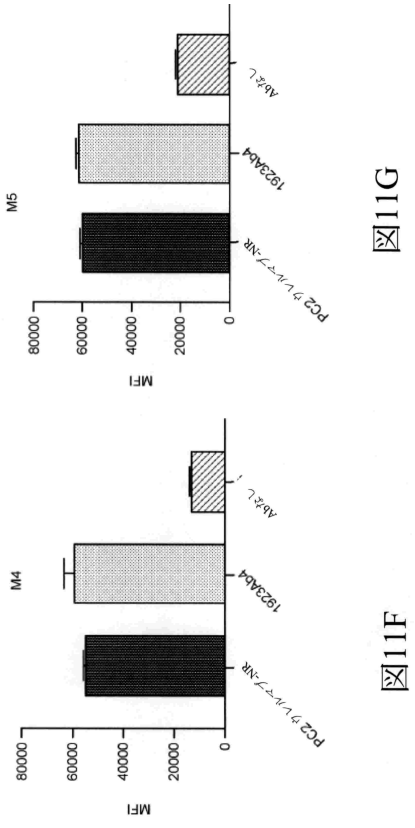


図11G　図11F

【図１２】

図12

【図１３－１】

図13A

図13B

図13C

図13D

【図１３－２】

図13E

図13F

図13G

図13H

【図１３－３】

図13I

図13J

図13K

図13L

*：scFvはシングルアイド結合によって安定化される。；（LH：VL－VHの順）

【図１４】

図 14A

二重特異性（*scFv を安定化するための、導入されたジスルフィド結合）

タンパク質性分子	重鎖 (HC)	軽鎖 (LC)
1923Ab8	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-Ab4 VH-3x(G4S)-Ab4 VL	Ab3 VL-カッパ
1923Ab11	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-Ab4 VL-3x(G4S)-Ab4 VH	Ab3 VL-カッパ
1923Ab12	Ab3 VH-hIgG1 LALA	Ab4 VH*-3x(G4S)-Ab4 VL*-4x(G4S)-Ab3 VL-カッパ
1923Ab13	Ab4 VH*-3x(G4S)-Ab4 VL*-4x(G4S)-Ab3 VH-hIgG1 LALA	Ab3 VL-カッパ
1923Ab18	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-Ab4 VH*-4x(G4S)-Ab4 VL*	Ab3 VL-カッパ
1923Ab20	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-TGFBRII	Ab3 VL-カッパ

図 14B

三重特異性（*scFv を安定化するための、導入されたジスルフィド結合）

タンパク質性分子	重鎖 (HC) 1	重鎖 (HC) 2	軽鎖 (LC)
1923Ab7	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)- Ab4 VH-3x(G4S)-Ab4 VL		Ab3 VL-カッパ -3x(G4S)-TGFbRII
1923Ab9	Ab3 VH-hIgG1 LALA Knob-3x(G4S)-Ab4 VH-3x(G4S)-Ab4 VL	Ab3 VH-hIgG1 LALA ホール	Ab3 VL-カッパ -3x(G4S)-TGFbRII
1923Ab10	Ab3 VH-hIgG1 LALA Knob-3x(G4S)-Ab4 VL-3x(G4S)-Ab4 VH	Ab3 VH-hIgG1 LALA ホール	Ab3 VL-カッパ -3x(G4S)-TGFbRII
1923Ab16	Ab4 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-Ab3 VL-3x(G4S)-Ab3 VH		Ab4 VL-カッパ -3x(G4S)-TGFbRII
1923Ab17	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-Ab4 VH*-4x(G4S)-Ab4 VL*		Ab3 VL-カッパ -3x(G4S)-TGFbRII
1923Ab19	Ab3 VH-hIgG1 LALA-3x(G4S)-TGFbRII		Ab3 VL-カッパ -3x(G4S)-Ab4 VH*-4x(G4S)-Ab4 VL*

【図１５】

図 15

Ab	対称性	特異性	抗体足場モジュール 1 (IgG)			結合モジュール (scFv)					結合モジュール (TME モジュレーター)		
			標的	Fc	IgG に対する結合モジュール位置	リンカー間	標的	scFv フォーマット	安定化	IgG に対する結合モジュール位置	リンカー間
1923Ab7	対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	CD137	VH-3x(G4S)-VL	いいえ	LC C 末端	3x (G4S)
1923Ab8	対称	二重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	CD137	VH-3x(G4S)-VL	いいえ		
1923Ab9	非対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA, ノブ・イン・ホール	肽ノブに未端	3x (G4S)	CD137	VH-3x(G4S)-VL	いいえ	LC C 末端	3x (G4S)
1923Ab10	非対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA, ノブ・イン・ホール	肽ノブに未端	3x (G4S)	CD137	VL-3x(G4S)-VH	いいえ	LC C 末端	3x (G4S)
1923Ab11	対称	二重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	CD137	VL-3x(G4S)-VH	いいえ		
1923Ab12	対称	二重	PD-L1	hIgG1 LALA	LC N 末端	4x (G4S)	CD137	VH-3x(G4S)-VL	はい		
1923Ab13	対称	二重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 N 末端	4x (G4S)	CD137	VH-3x(G4S)-VL	はい		
1923Ab16	対称	三重	CD137	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	PD-L1	VL-3x(G4S)-VH	いいえ	LC C 末端	3x (G4S)
1923Ab17	対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	CD137	VH-4x(G4S)-VL	はい	LC C 末端	3x (G4S)
1923Ab18	対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA	肽 C 末端	3x (G4S)	CD137	VH-4x(G4S)-VL	はい		
1923Ab19	対称	三重	PD-L1	hIgG1 LALA	LC C 末端	3x (G4S)	CD137	VH-4x(G4S)-VL	はい	肽 C 末端	3x (G4S)
1923Ab20	対称	二重	PD-L1	hIgG1 LALA						肽 C 末端	3x (G4S)

【図１６】

図 16A

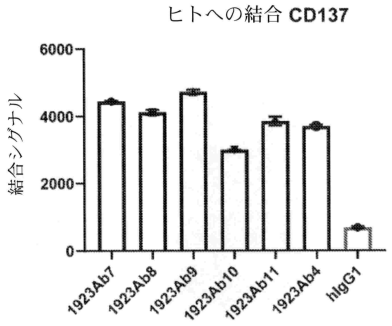
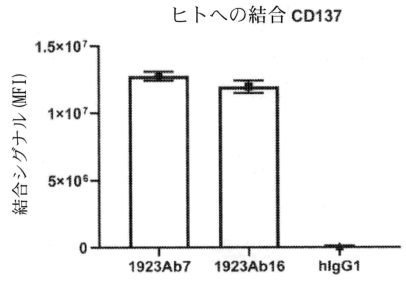


図 16B



【図１７】

図 17A

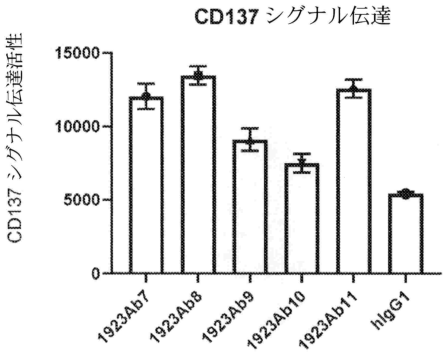
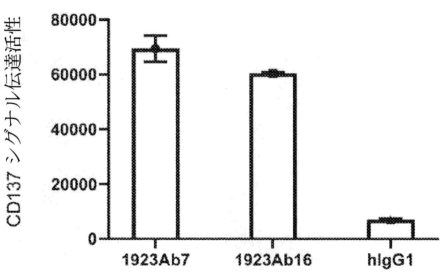


図 17B



【図１８Ａ】

	EC50 (nm)
1923Ab7	0.43
1923Ab8	1.1
1923Ab17	0.19
1923Ab18	0.21
ウレルマブ-NR	0.46

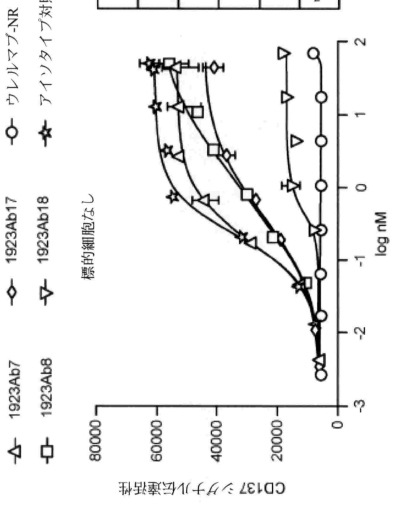


図18A

【図１８Ｂ】

	EC50 (nm)
1923Ab7	不活性
1923Ab8	不活性
1923Ab17	不活性
1923Ab18	不活性
ウレルマブ-NR	0.57

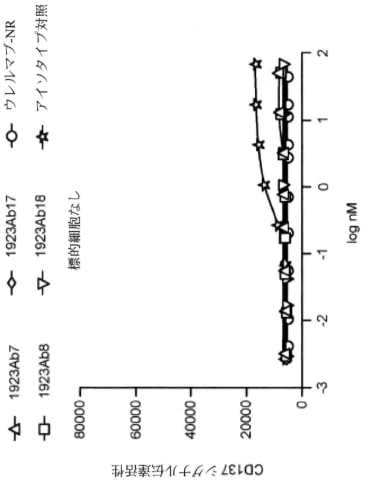


図18B

【図１９】

図 19A

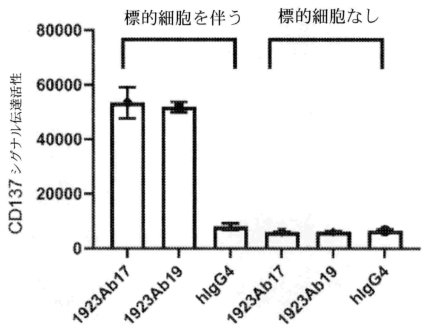
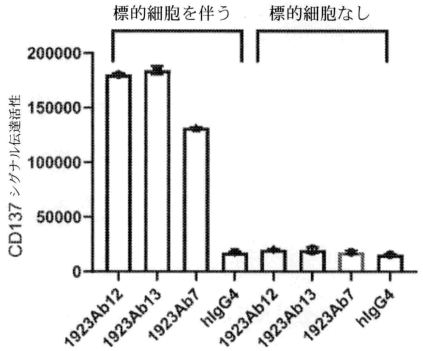
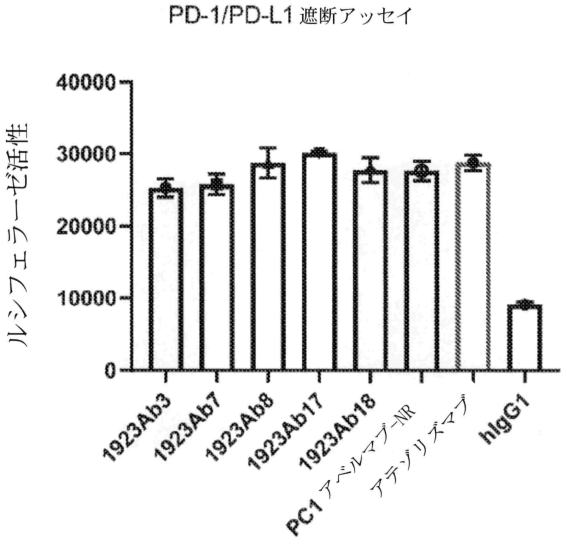


図 19B



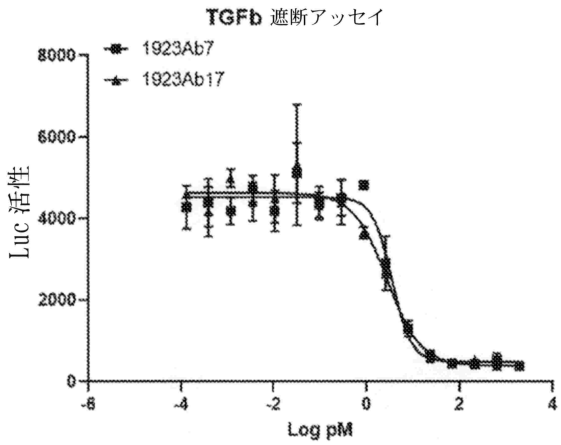
【図２０】

図 20



【図２１】

図 21



	1923Ab7	1923Ab17
IC50	3.6pM	2.8pM

【図２２】

図 22A

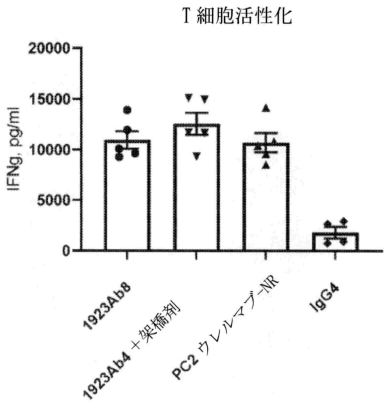
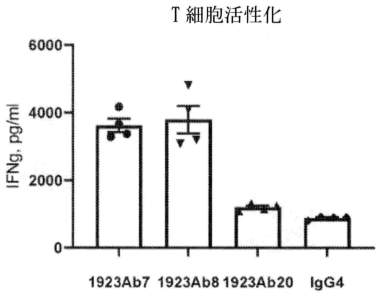


図 22B



【図２３】

図 23A

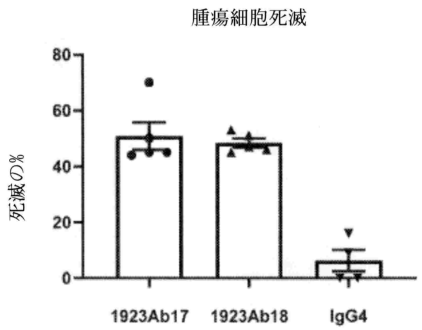
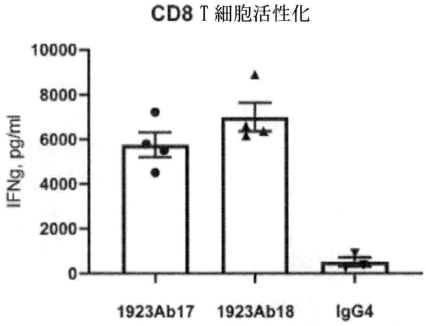
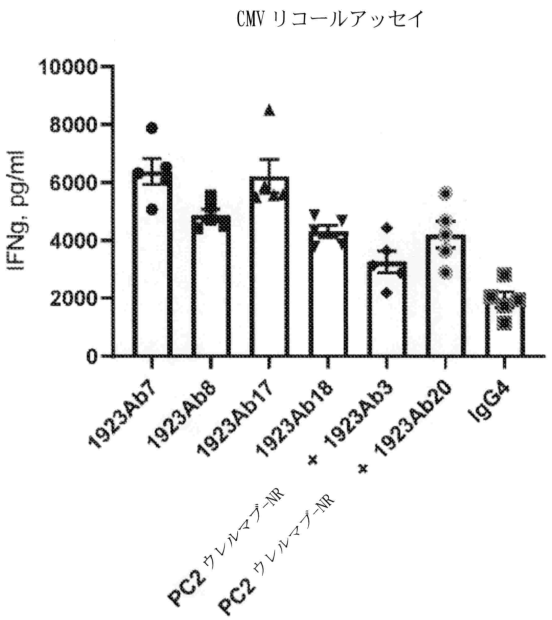


図 23B



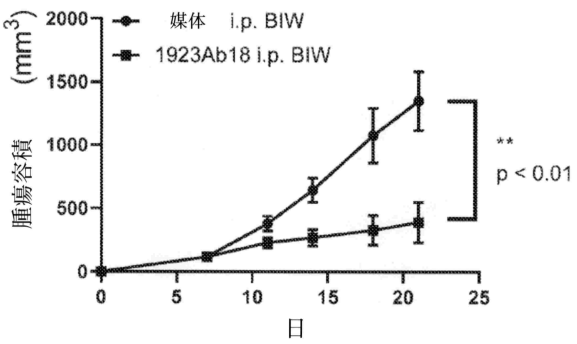
【図２４】

図 24



【図２５】

図 25



【図２６－１】

図 26A

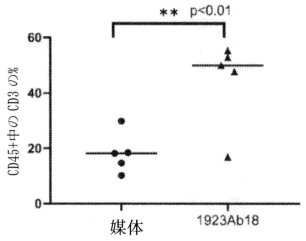


図 26B

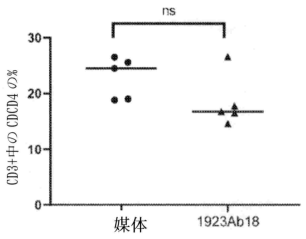
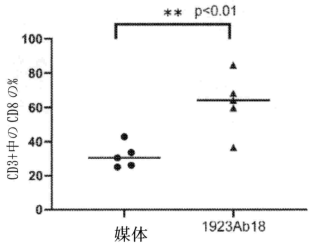


図 26C



【図２６－２】

図 26D

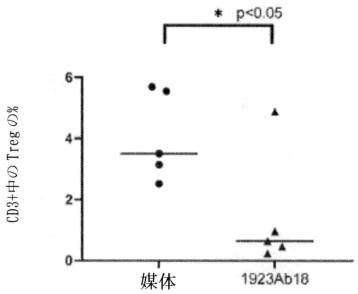
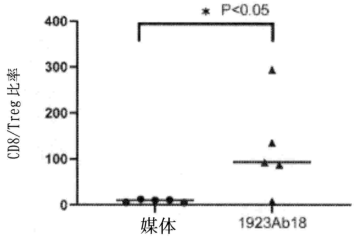


図 26E



【配列表】

<u>２０２４５３６７１６０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 14/495; C07K 14/71; C07K 16/28 (2022.01)
ADD.
CPC - INV. A61K 39/3955; A61P 35/00; C07K 14/495; C07K 14/71; C07K 16/2878
ADD. A61K 2039/505; C07K 2317/76; C07K 2319/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	US 2020/0002425 A1 (ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION) 02 January 2020; Paragraph: [0010], [0012], [0059], [0269]; claims: 14, 15, 17; FIG. 1	1, 7/1, 8/1 — 26, 32/26, 57/26, 59/26 — 2-6, 7/2-6, 8/2-6, 27-31, 32/27-31, 57/27-31, 58/57/26-31, 59/27-31
Y — A	WO 2020/011964 A1 (F-STAR BETA LIMITED) 16 January 2020; Title; abstract; page 1, lines 8-14; claim 1	26, 32/26, 57/26, 59/26 — 27-31, 32/27-31, 57/27-31, 58/57/26-31, 59/27-31
A	US 2004/0097712 A1 (VARNUM BRIAN) 20 May 2004; FIG. 10	2, 7/2, 8/2, 27, 32/27, 57/27, 58/57/27, 59/27
A	J.W. AUSTIN ET AL. "Accumulation of T-bet+ B cells outside germinal centers linked to poor affinity maturation" 1. GenBank. Web. 17 January 2019; Entire Document	2, 7/2, 8/2, 27, 32/27, 57/27, 58/57/27, 59/27
A	WO 2020/140090 A1 (GIGAGEN, INC.) 02 July 2020; Table 9, table 10; claim 7	35-, 7/3-5, 8/3-5, 28-30, 32/28-30, 57/28-30, 58/57/28-30, 59/28-30
A	C. SCHEEPERS ET AL. "Paired Heavy and Light Chain Sequences from Donor CT15" 1-3.	3-5, 7/3-5, 8/3-5, 28-30,

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 November 2022 (16.11.2022)	MAR 22 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
—	GenBank. Web. 17 September 2019; Entire Document	32/28-30, 57/28-30, 58/57/28-30, 59/28-30
A	US 2018/0016346 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD) 18 January 2018; Page 128-129	6, 7/6, 8/6, 31, 32/31, 57/31, 58/57/31, 59/31
A	J.E. STEFANO. "A highly potent CD73 biparatopic antibody blocks organization" 1-4. GenPept. Web. 29 December 2020; Entire Document	6, 7/6, 8/6, 31, 32/31, 57/31, 58/57/31, 59/31
A	US 2016/0009807 A1 (BIOCON LTD.) 14 January 2016; Figure 14	58/57/26
A	R. YAN ET AL. "Structural basis for bivalent binding and inhibition of SARS-CoV-2 infection" 1-5. GenPept. Web. 22 May 2021; Entire Document	58/57/26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

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 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 9-25, 34-56, 69-91, 94-105
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-8, 26-33, 57-60, and SEQ ID NOs: 5-10 (CDRs), SEQ ID NO: 1 (heavy chain variable region), SEQ ID NO: 2 (light chain variable region), SEQ ID NO: 60 (heavy chain constant region), SEQ ID NO: 65 (light chain constant region), SEQ ID NO: 38 (heavy chain scaffold and second binding module), SEQ ID NO: 39 (light chain scaffold and first binding module)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

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

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

Groups I+, Claims 1-8, 26-33, 57-60, and SEQ ID NOs: 5-10 (CDRs), SEQ ID NO: 1 (heavy chain variable region), SEQ ID NO: 2 (light chain variable region), SEQ ID NO: 60 (heavy chain constant region), SEQ ID NO: 65 (light chain constant region), SEQ ID NO: 38 (heavy chain scaffold and second binding module), SEQ ID NO: 39 (light chain scaffold and first binding module) are directed towards binding proteins with scaffold modules for PD-L1, and binding modules for TGFB and/or CD137.

Groups II+, Claims 61-68, 92-93, and SEQ ID NOs: 5, 22-26 (CDRs), SEQ ID NO: 16 (heavy chain variable region), SEQ ID NO 17 (light chain variable region), SEQ ID NO: 60 (heavy chain constant region), SEQ ID NO: 65 (light chain constant region) are directed towards binding proteins with scaffold modules for CD137, and binding modules for TGFB and PD-L1.

The binding proteins of Claims 1, 2-5 (each in-part), 6-8, 26, 27-30 (each in-part), 31-32, 57, 58 (in-part), 59 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 5-10 (first exemplary CDRs), SEQ ID NO: 1 (first exemplary heavy chain variable region), SEQ ID NO: 2 (first exemplary light chain variable region), SEQ ID NO: 60 (first exemplary heavy chain constant region), SEQ ID NO: 65 (first exemplary light chain constant region), SEQ ID NO: 38 (first exemplary heavy chain scaffold and second binding module), SEQ ID NO: 39 (first exemplary light chain scaffold and first binding module).

This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 2, 3, 5, and 58 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s), heavy chain scaffold and second binding module(s), light chain scaffold and first binding module(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s), heavy chain scaffold and second binding module(s), light chain scaffold and first binding module(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s), heavy chain scaffold and second binding module(s), light chain scaffold and first binding module(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NOs: 9, 11-15 (CDRs), SEQ ID NO: 3 (heavy chain variable region), SEQ ID NO: 4 (light chain variable region), SEQ ID NO: 61 (heavy chain constant region), SEQ ID NO: 66 (light chain constant region), SEQ ID NO: 50 (heavy chain scaffold and second binding module), SEQ ID NO: 39 (light chain scaffold and first binding module).

Groups I+ share the technical features including: a binding protein that binds PD-L1 and TGFB or PD-L1 and CD137, comprising: a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds PD-L1 and a second antigen-binding site that binds PD-L1; b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site that binds TGFB or CD137; a binding protein that binds PD-L1, TGFB, and CD137, comprising: (a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds PD-L1 and a second antigen-binding site that binds PD-L1; (b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site that binds TGFB; and (c) at least one second binding module comprising a fourth antigen-binding site that binds CD137; these shared technical features are previously disclosed by WO 2021/148006 A1 to ADAGENE AG (hereinafter 'ADAGENE') in view of WO 2021/142448 A2 to SCHOLAR ROCK, INC. (hereinafter 'ROCK').

ADAGENE discloses a binding protein that binds PD-L1 and TGFB or PD-L1 and CD137 (bispecific antibodies that bind PD-L1 and CD137; paragraph [0031]; figure 2), comprising: a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds PD-L1 and a second antigen-binding site that binds PD-L1 (a PD-L1 antibody scaffold which comprises two binding sites for PD-L1; paragraphs [0031], [00139]; figure 2); b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site that binds TGFB or CD137 (a CD137 binding site; paragraphs [0031], [00139]; figure 2); a binding protein that binds PD-L1 and CD137 (a trispecific antibody that binds PD-L1, CD137 and CTLA4; paragraphs [0032], [0172]; figure 3), comprising: (a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds PD-L1 and a second antigen-binding site that binds PD-L1 (a PD-L1 antibody scaffold which comprises two binding sites for PD-L1; paragraphs [0032], [00139], [0172]; figure 3); (b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site (a second target binding site; paragraphs [0032], [00139]; figure 3); and (c) at least one second binding module comprising a fourth antigen-binding site that binds CD137 (a fourth target binding site which binds CD137; paragraphs [0032], [00139], [0172]; figure 3).

ADAGENE does not disclose a binding protein binds TGFB.

ROCK discloses a binding protein binds TGFB (a TGFB inhibitor and a checkpoint inhibitor are in a bispecific antibody or multispecific construct; paragraph [456]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the binding protein, as previously disclosed by ADAGENE, to include a binding protein that binds TGFB, as previously disclosed by ROCK, to provide the benefit of including TGFB which can help overcome tumor resistance to checkpoint inhibitors (ROCK reference; paragraph [11]) such as a PD-L1 antibody.

The binding proteins of claims 61, 62-65 (each in-part), 66-68, 92-93 are believed to encompass the first named invention of Groups II+ and are the claims that can be searched with payment of a fee for Groups II+, to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 5, 22-26 (first exemplary CDRs), SEQ ID NO: 16 (first exemplary heavy chain variable region), SEQ ID NO 17 (first exemplary light chain variable

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/75847

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

region), SEQ ID NO: 60 (first exemplary heavy chain constant region), SEQ ID NO: 65 (first exemplary light chain constant region).

This first named invention of Group II+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 62, 63, and 65 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s) with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s) *will be searched upon the payment of additional fees.* Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected CDRs, heavy chain variable region(s), light chain variable region(s), light chain constant region(s), heavy chain constant region(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention of Groups II+, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention of Groups II+ to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NOs: 9, 27-31 (CDRs), SEQ ID NO: 18 (heavy chain variable region), SEQ ID NO: 19 (light chain variable region), SEQ ID NO: 61 (heavy chain constant region), SEQ ID NO: 66 (light chain constant region).

Groups II+ share the technical features including: a binding protein that binds CD137, TGFB, and PD-L1, comprising: (a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds CD137 and a second antigen-binding site that binds CD137; (b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site that binds TGFB; and (c) at least one second binding module comprising a fourth antigen-binding site that binds PD-L1; these shared technical features are previously disclosed by ADAGENE in view of ROCK.

ADAGENE discloses a binding protein that binds CD137, TGFB, and PD-L1 (a trispecific antibody that binds PD-L1, CD137 and CTLA4; paragraphs [0032]; figure 3), comprising: (a) an antibody scaffold module comprising a first antigen-binding site that binds CD137 and a second antigen-binding site that binds CD137 (a CD137 antibody scaffold which comprises two binding sites for PD-L1; paragraphs [0032], [00139]; figure 3); (b) at least one first binding module comprising a third antigen-binding site (a second target binding site; paragraphs [0032], [00139]; figure 3); and (c) at least one second binding module comprising a fourth antigen-binding site that binds PD-L1 (a fourth target binding site which binds PD-L1; paragraphs [0032], [00139], [0172]; figure 3).

ADAGENE does not disclose a binding protein binds TGFB.

ROCK discloses a binding protein binds TGFB (a TGFB inhibitor and a checkpoint inhibitor are in a bispecific antibody or multispecific construct; paragraph [456]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the binding protein, as previously disclosed by ADAGENE, to include a binding protein that binds TGFB, as previously disclosed by ROCK, to provide the benefit of including TGFB which can help overcome tumor resistance to checkpoint inhibitors (ROCK reference; paragraph [11]) such as a PD-L1 antibody.

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the ADAGENE and ROCK references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
C07K 14/71 (2006.01)		C07K	14/71	
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	D
C12P 21/02 (2006.01)		A61K	39/395	E
		A61K	39/395	N
		A61K	39/395	T
		C12P	21/02	C

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９３０１，パオリ，グレンウォルド ドライブ １８３６
(72)発明者 ファン，ハイチュン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４５３８，フレモント，クレストウッド ストリート ４３２９
(72)発明者 ロイ，イック
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０８８１６，イースト ブランズウィック，ウィンザー ドライブ ２３
(72)発明者 チェン，チャン フン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ２０８７４，ジャーマンタウン，パルメト サークル １３６２３
(72)発明者 リ，ハン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １８９４０，ニュータウン，クレア ドライブ １
(72)発明者 シェン，ディ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０８８５４，ピスカタウェイ，ベッドフォード カウンティ １１９
(72)発明者 レイ，ミン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ０８５４０，プリンストン，ロックウッド ドライブ ２０

Ｆターム（参考） 4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA05
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 MA55 MA66 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB36 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA42 DA50 DA76 EA28 FA74