

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-529556

(P2021-529556A)

(43) 公表日 令和3年11月4日 (2021.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-522920 (P2021-522920)
 (86) (22) 出願日 令和1年6月28日 (2019.6.28)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月23日 (2021.2.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/039979
 (87) 国際公開番号 WO2020/006509
 (87) 国際公開日 令和2年1月2日 (2020.1.2)
 (31) 優先権主張番号 62/823, 989
 (32) 優先日 平成31年3月26日 (2019.3.26)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/691, 658
 (32) 優先日 平成30年6月29日 (2018.6.29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 521000747
 ジェンサン バイオファーマ、 インコー
 ポレイテッド
 GENSUN BIOPHARMA, I
 NC.
 アメリカ合衆国 91320 カリフォル
 ニア州 ニューベリー パーク、 スーイ
 ト 105、 オールド コネホ ロード
 3537
 3537 Old Conejo Roa
 d, Suite 105, Newbu
 ry Park, CA 91320 (U
 S)
 (74) 代理人 100100181
 弁理士 阿部 正博

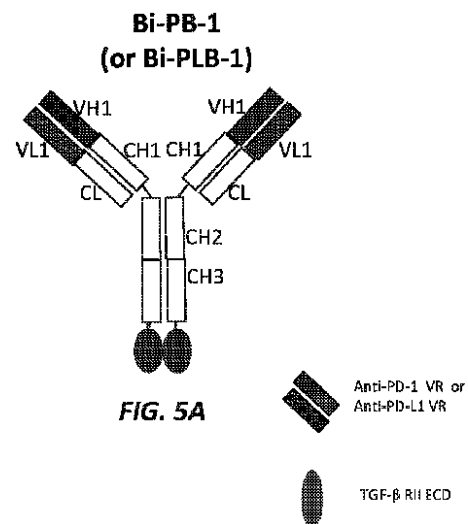
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍アンタゴニスト

(57) 【要約】

免疫チェックポイント調節因子、血管新生経路調節因子、及び/又は TGF 経路調節因子に特異的に結合する、抗腫瘍アンタゴニストが開示される。また、本明細書に記載の腫瘍アンタゴニストを用いて、増殖性障害、感染症、及び免疫障害を治療する方法も開示される。

【選択図】 図 5 A - 5 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T G F 1 R I I 細胞外ドメイン (E C D) を含む、第 1 の標的指向性ドメイン ;
及び

P D 1 結合アンタゴニスト、P D L 1 結合アンタゴニスト、V E G F 結合アンタゴ
ニスト、又は T i e 2 チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニストを含む、第 2 の標的指
向性ドメイン

を含む、抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 2】

前記 E C D は、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗腫瘍アンタゴ
ニスト。

10

【請求項 3】

前記第 2 の標的指向性ドメインは P D 1 に特異的に結合する、請求項 1 又は 2 に記載
の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 4】

前記第 2 の標的指向性ドメインは :

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

前記 H C D R 1 は、配列番号 1、4、7、9、及び 1 2 からなる群から選択されるア
ミノ酸配列を有し、

20

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

前記 H C D R 3 は、配列番号 3、6、8、1 1、及び 1 4 からなる群から選択される
アミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (H C V R) ; 並びに

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

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

前記 L C D R 2 は、配列番号 1 6、1 9、2 4、及び 2 7 からなる群から選択される
アミノ酸配列を有し、

30

前記 L C D R 2 は、配列番号 1 7、2 0、2 5、及び 2 8 からなる群から選択される
アミノ酸配列を有する、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 5】

配列番号 2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、及び 3 9 からなる群から選択されるアミノ酸
配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン H C V R ; 並びに / 又は

配列番号 3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、及び 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸
配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

40

【請求項 6】

配列番号 2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、及び 3 9 からなる群から選択されるアミノ酸
配列を含む、免疫グロブリン H C V R ; 並びに / 又は

配列番号 3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、及び 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸
配列を含む、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 7】

配列番号 3 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、免疫グロブリ
ン H C V R ; 及び / 又は

配列番号 4 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、免疫グロブリ
ン L C V R

50

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 8】

配列番号 39 のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン H C V R ; 及び / 又は

配列番号 40 のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 7 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 9】

配列番号 92 若しくは配列番号 106 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン重鎖 ; 及び / 又は

配列番号 93 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 10】

配列番号 107 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン重鎖 ; 及び / 又は

配列番号 108 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 11】

前記第 2 の標的指向性ドメインは P D L 1 に特異的に結合し、

前記第 2 の標的指向性ドメインは :

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

前記 H C D R 1 は、配列番号 41、44、50、及び 53 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 2 は、配列番号 42、45、47、49、51、及び 54 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 H C D R 3 は、配列番号 43、46、48、52、及び 55 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン H C V R ; 並びに

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

前記 L C D R 1 は、配列番号 56、59、63、66、及び 69 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 2 は、配列番号 57、60、64、67、及び 70 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記 L C D R 3 は、配列番号 58、61、62、65、68、及び 71 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 12】

配列番号 72、74、76、78、80、82、84、及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン H C V R ; 並びに / 又は

配列番号 73、75、77、79、81、83、85、及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン L C V R を含む、請求項 11 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 13】

配列番号 72、74、76、78、80、82、84、及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン H C V R ; 並びに / 又は

配列番号 73、75、77、79、81、83、85、及び 87 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン L C V R

を含む、請求項 12 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン H C V R、及び / 又は配列番号 87 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン L C V R を含む、請求項 13 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 15】

配列番号 94 若しくは配列番号 126 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン重鎖；及び / 又は

配列番号 95 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 11 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

10

【請求項 16】

配列番号 109 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン重鎖；及び / 又は

配列番号 110 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 11 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 17】

前記第 2 の標的指向性ドメインは、V E G F に特異的に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 18】

20

配列番号 88 のアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 19】

前記第 2 の標的指向性ドメインは、配列番号 90 又は配列番号 96 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン H C V R を含む、請求項 17 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 20】

配列番号 105 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 17 又は 18 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 21】

配列番号 102 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；及び / 又は

配列番号 103 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 19 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

30

【請求項 22】

配列番号 104 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；及び / 又は

配列番号 103 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖

を含む、請求項 19 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 23】

V E G F に結合する抗腫瘍アンタゴニストであって、

前記アンタゴニストは、哺乳類細胞中での発現の改善を提供する変異を含む、抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 24】

40

前記アンタゴニストは、配列番号 96 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖を含む、請求項 23 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 25】

前記アンタゴニストは、配列番号 91 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン L C V R を含む、請求項 23 又は 24 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 26】

前記第 1 の標的指向性ドメインは、ペプチドリナーを介して前記免疫グロブリン足場に結合される、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 27】

前記ペプチドリナーは、配列番号 101 又は配列番号 112 のアミノ酸配列を有する

50

、請求項 26 に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 28】

免疫グロブリン足場を含み、

前記免疫グロブリン足場は、IgG1、IgG2、又はIgG4足場である、請求項1～27のいずれか1項に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 29】

前記免疫グロブリン足場は、N297A変異及び/又はK447A変異を含有するIgG1足場である、請求項28に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

【請求項 30】

前記免疫グロブリン足場は、配列番号100、115～122、及び127～129からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項28又は29に記載の抗腫瘍アンタゴニスト。

10

【請求項 31】

被験者の体内の細胞増殖性障害を治療する方法であって、

それを必要とする被験者に、有効量の請求項1～30のいずれか1項に記載の抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む、方法。

【請求項 32】

請求項1～30のいずれか1項に記載の抗腫瘍アンタゴニストをコードする、1つ以上の核酸。

【請求項 33】

20

請求項32に記載の1つ以上の核酸を含む、1つ以上の発現ベクター。

【請求項 34】

請求項33に記載の1つ以上の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

30

【0002】

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

【背景技術】

【0003】

宿主が癌細胞を排除できないことは、大きな問題であり続けている。様々な癌の治療のためにますます多くの治療用モノクローナル抗体が認可されているが、癌の成長、及び転移への進行の根底に、多数の異なる分子経路が存在することを考慮すると、これらの抗体に対する耐性の出現が頻繁に観察される。免疫系は癌予防の腫瘍な機序であるが、癌細胞は免疫監視に対抗する。従って、改良された治療用結合アンタゴニスト又は抗体、並びにこのような試薬を用いて癌及び慢性ウイルス感染を治療する方法が必要とされている。自然の制御メカニズムが同定されており、これは、T細胞の活性化を制限することによって、制約を受けていないT細胞活性化に起因する付随的な損傷を防止するものである。このプロセスを腫瘍細胞が利用して、免疫応答を回避する。免疫エフェクタ細胞、特にT細胞の、癌を認識及び排除する能力を復元することは、免疫療法の主な目的である。TGF及び血管新生経路の両方が、チェックポイント阻害剤に対する耐性に関係するとされている。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

50

TGF 及びVEGF経路の両方を阻害するチェックポイント阻害剤に対する耐性を克服できる、改良された治療用結合アンタゴニスト又は抗体、並びに癌及び慢性ウイルス感染を治療する方法が、必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本出願のある態様は、TGF 1に特異的に結合する第1の標的指向性ドメインと、PD 1又はPD L1に特異的に結合する第2の標的指向性ドメインとを含有する、抗腫瘍アンタゴニストに関する。

【0006】

本出願の別の態様は、TGF 1に特異的に結合する第1の標的指向性ドメインと、VEGFに特異的に結合する第2の標的指向性ドメインとを含有する、抗腫瘍アンタゴニストに関する。

10

【0007】

本出願の別の態様は、哺乳類細胞中での発現が増大した、改良されたバージョンのペバシズマブを含有する、抗腫瘍アンタゴニストに関する。

【0008】

本出願の別の態様は、被験者の体内の細胞増殖性障害の治療方法に関する。上記方法は、このような治療を必要とする被験者に、有効量の本出願の抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む。

【図面の簡単な説明】

20

【0009】

【図1】図1は、特定の抗PD 1 mAbの相補性決定領域(CDR)配列を示す。対応するフレームワーク領域(FR)配列は、図36に配列番号130～159として記載されている。

【図2A】図2A～2Bは、抗PD 1抗体可変ドメイン配列の複数の実施形態を示す。

【図2B】同上。

【図3】図3は、特定の抗PD L1 mAbのCDR配列を示す。対応するFR配列は、図36に配列番号160～182として記載されている。

【図4A】図4A～4Cは、抗PD L1抗体可変ドメイン配列の複数の実施形態を示す。

30

【図4B】同上。

【図4C】同上。

【図5A - 5B】図5A～5Bは、4つの異なる二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト構成であるBi PB 1、Bi PLB 1、Bi PB 2、及びBi PLB 2を示し、これらはそれぞれ、(1)抗PD 1又は抗PD L1可変領域、及び(2)TGF RII ECDドメインを含む。

【図6】図6は、図5の二重特異性抗体に対応する例示的な機能性ドメイン配列を示す。

【図7】図7は、図5の選択された二重特異性抗体に対応する、例示的な重鎖(HC)及び軽鎖(LC)配列を示す。

【図8A - 8C】図8A～8Cは、3つの異なる二重特異性アンタゴニストであるBi AB 1、Bi A1B 1、及びBi ZB 1をそれぞれ示し、これらはそれぞれ、変異型IgG1(K447A)足場(scaffold)にカルボキシ末端TGF 1 RII細胞外ドメイン(ECD)を含む。Bi AB 1及びBi A1B 1はいずれも、Avastin/ペバシズマブからのアミノ末端抗VEGF可変領域(VH1、VL1)を含有し；Bi A1B 1は、VH領域に2つのアミノ酸置換(E6Q、L11V)を含む。Bi ZB 1は、IgG1Fc(K447A)領域の上流に、アミノ末端アフリベルセプトドメインを含有する。

40

【図9A】図9A及び9Bは、図8に示されている二重特異性アンタゴニスト中に存在する様々な機能性ドメイン配列を示す。

【図9B】同上。

50

【図 10】図 10 は、図 8 に示されている二重特異性アンタゴニストに対応する重鎖（H C）及び軽鎖（L C）アミノ酸配列を示す。

【図 11】図 11 は、図 8 に示されている二重特異性アンタゴニストの機能性ドメインの配置をまとめたものである。

【図 12】図 12 は、非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によって決定される、HEK 293 細胞へと一過性トランスフェクションされた場合の、E6Q 及び L11V 変異を含有する二重特異性抗体アンタゴニスト Bi-AB-1 及び Bi-A1B-1 の改善された発現レベルを示す、クマシーブルー染色済みポリアクリルアミドゲルである。

【図 13 A - 13 B】図 13 A は、Bi-AB-1 及び Bi-A1B-1 のサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）プロファイルを示す。図 13 B は、タンパク質 A 精製済み Bi-AB-1 及び Bi-A1B-1 が、高分子量（HMW、それぞれ 1%、1%）種及び低分子量（LMW、それぞれ 0.4%、0.4%）種を、二量体（それぞれ 98.6%、98.7%）に比べて低いレベルで有することを示す。

【図 14 A - 14 B】図 14 A ~ 14 B は、非還元条件（図 14 A）及び還元条件（図 14 B）下での、一過性発現 Bi-ZB-1 の PAGE ゲルを示す。

【図 15】図 15 は、タンパク質 A 精製済み Bi-ZB-1 が、高分子量（HMW、3.4%）種及び低分子量（LMW、0.5%）種を、二量体（96.1%）に比べて低いレベルで有することを示す、サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）プロファイルを示す。

【図 16】図 16 は、細胞ベースアッセイの結果を示し、この細胞ベースアッセイでは、NFAT 応答要素の制御下でヒト VEGFR 2 及びホタルルシフェラーゼを発現する組換え HEK 293 細胞を、2 つの抗 VEGF アンタゴニスト、Bi-A1B-1 及び抗体 A の段階希釈物の存在下で、huVEGF 165 で刺激した。生体活性は、ルシフェラーゼ仲介型発光の量の減少を測定することによって測定した。

【図 17】図 17 は、Bi-A1B-1 による TGF- β 1 及び VEGF 165 の同時結合を実証する ELISA 分析であり、ここでは、huTGF- β 1 コーティング済み 96 ウェルプレートを、段階希釈されたサンプル Bi-A1B-1、及びこれに続いてビオチン化された huVEGF 165 を用いてインキュベーションすることによって、結合した分子を、TMB 基質を用いたストレプトアビジン-HRP によって検出した。

【図 18】図 18 は、細胞ベースアッセイの結果を示し、この細胞ベースアッセイでは、SMA D 応答要素の制御下でヒト TGF- β 1 RII 受容体及びホタルルシフェラーゼを発現する組換え HEK 293 細胞を、Bi-A1B-1、Bi-ZB-1、及び対照の段階希釈物（それぞれ TGF- β 1 RII 細胞外ドメイン（ECD）融合を含む）の存在下で、huTGF- β 1 で刺激した。生体活性は、ルシフェラーゼ仲介型発光の量の減少によって測定した。

【図 19】図 19 は、6 ~ 10 週齢のメス CD1 マウスへの尾静脈注射後の二重特異性アンタゴニスト Bi-A1B-1 の生体内半減期（ $T_{1/2}$ ）を示す薬物動態プロファイルである。血清中の Bi-A1B-1 アンタゴニストを注射後の様々な時点で回収し、ELISA による分析に供した。

【図 20 A - 20 B】図 20 A ~ 20 B は、2 つの二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、Bi-PB-1.2（図 20 A）及び Bi-PLB-1.2（図 20 B）を示し、これらはそれぞれ、抗 PD-1 及び抗 PD-L1 由来の変領域ドメインを有する抗体バックボーン（IgG4-K447A、又は IgG1-K447A）を含み、更に各重鎖 CH3 領域のカルボキシ末端に融合する TGF- β RII ECD を含む。

【図 21】図 21 は、図 20 A 及び 20 B の二重特異性抗体中に存在する機能性ドメイン配列を示す。

【図 22】図 22 は、図 20 A 及び 20 B に示されている二重特異性アンタゴニストに対応する重鎖（H C）及び軽鎖（L C）アミノ酸配列を示す。

【図 23】図 23 は、図 20 A 及び 20 B に示されている二重特異性アンタゴニストの機能性ドメインの配置をまとめたものである。

10

20

30

40

50

【図 2 4 A - 2 4 C】図 2 4 A は、親対照抗体 (2 P 1 7) と比較して、タンパク質 A アフィニティ精製後の一過性発現系における B i P B 1 . 2 及び B i P L B 1 . 2 の発現の増加を示す、非変性ポリアクリルアミドゲル (P A G E) 分析を示す。図 2 4 B は、タンパク質 A 精製済み B i P B 1 . 2、B i P L B 1 . 2、及びベンチマーク抗体 (2 P 1 7) を示す、サイズ排除クロマトグラフィ (S E C) プロファイルを示す。図 2 4 C は、B i P B 1 . 2、B i P L B 1 . 2、及びベンチマーク抗体 (2 P 1 7) が、二量体と比べて低いレベルの高分子量 (H M W) 種及び低分子量 (L M W) 種を有することを示す。

【図 2 5 A - 2 5 B】図 2 5 A ~ 2 5 B は、B i P B 1 . 2 (図 2 5 A) 及び B i P L B 1 . 2 (図 2 5 B) の二量体、H M W、及び L M W 形態が、4 において少なくとも 4 週間にわたって良好な安定性を示すことを示す。

【図 2 6 A - 2 6 E】図 2 6 A ~ 2 6 E は、P D 1 及び T G F 1 の、B i P B 1 . 2 (それぞれ図 2 6 A、2 6 B) 並びに対応する抗 P D 1 及び抗 P D L 1 T G F 1 R I I E C D ベンチマーク分子 (それぞれ図 2 6 C、2 6 D) への結合の結果を、得られた結合親和性定数 (図 2 6 E) と共に示す。

【図 2 7 A - 2 7 E】図 2 7 A ~ 2 7 E は、P D L 1 及び T G F 1 の、B i P L B 1 . 2 (それぞれ図 2 7 A、2 7 B) 並びに抗 P D L 1 T G F 1 R I I E C D ベンチマーク分子 (図 2 7 C、2 7 D) への結合の結果を、得られた結合親和性定数 (図 2 7 E) と共に示す。

【図 2 8 A - 2 8 B】図 2 8 A は、B i P B 1 . 2 による T G F 1 及び P D 1 の同時結合を実証する E L I S A アッセイを示し、ここでは、h u T G F 1 コーティング済み 9 6 ウェルプレートを、段階希釈された B i P B 1 . 2 のサンプル、及びこれに続いてビオチン化された h u P D 1 を用いてインキュベーションすることによって、結合した分子を、T M B 基質を用いたストレプトアビジン H R P によって検出した。図 2 8 B は、B i P L B 1 . 2 による T G F 1 及び P D L 1 の同時結合を実証する E L I S A アッセイを示し、ここでは、h u T G F 1 コーティング済み 9 6 ウェルプレートを、段階希釈された B i P L B 1 . 2 のサンプル、及びこれに続いてビオチン化された h u P D L 1 を用いてインキュベーションすることによって、結合した分子を、T M B 基質を用いたストレプトアビジン H R P によって検出した。

【図 2 9 A - 2 9 B】図 2 9 A は、B i P B 1 . 2 及び抗 P D 1 ベンチマーク抗体の、P D 1 の P D L 1 への結合を遮断する能力を示す。図 2 9 B は、B i P B 1 . 2 及び抗 P D L 1 T G F 1 R I I E C D ベンチマーク分子の段階希釈物の、S M A D 応答要素の制御下でルシフェラーゼ発現を活性化する T G F 1 の能力を遮断する能力を示す、細胞ベースアッセイの結果である。生体活性は、ルシフェラーゼ仲介型発光の量の減少によって測定した。

【図 3 0 A - 3 0 B】図 3 0 A ~ 3 0 B は、B i P B 1 . 2、並びに抗ヒト P D 1 及び抗カニクイザル P D 1 ベンチマーク抗体両方の、ヒト P D 1 (図 3 0 A) 及びカニクイザル P D 1 (図 3 0 B) への結合を、対応する E C 5 0 値と共に示し、これは、ヒト P D 1 及びカニクイザル P D 1 への結合それぞれに関する、ベースライン応答と最大応答との間の半分の応答を生成する半数効果濃度 (E C 5 0) を反映したものである。

【図 3 1 A - 3 1 B】図 3 1 A は、B i P L B 1 . 2 及び抗 P D L 1 ベンチマーク抗体の、P D L 1 の P D 1 への結合を遮断する能力を示す。図 3 1 B は、B i P L B 1 . 2 及び抗 P D L 1 T G F 1 R I I E C D ベンチマーク分子の段階希釈物の、S M A D 応答要素の制御下でルシフェラーゼ発現を活性化する T G F 1 の能力を遮断する能力を示す、細胞ベースアッセイの結果である。生体活性は、ルシフェラーゼ仲介型発光の量の減少によって測定した。

【図 3 2 A - 3 2 B】図 3 2 A ~ 3 2 B は、B i P L B 1 . 2、並びに抗ヒト P D L 1 及び抗カニクイザル P D L 1 ベンチマーク抗体両方の、ヒト P D L 1 (図 3 2 A) 及びカニクイザル P D L 1 (図 3 2 B) への結合を、対応する E C 5 0 値と共に示し

10

20

30

40

50

、これは、ヒトPD L 1及びカニクイザルPD L 1への結合それぞれに関する、ベースライン応答と最大応答との間の半分の応答を生成する半数効果濃度(E C₅₀)を反映したものである。

【図33A - 33D】図33A ~ 33Bは、陰性対照処理に対する、Bi PB 1.2によるヒトPBMC(ドナー1、図33A;ドナー2、図33B)からのIFN 分泌の増大を示す。図33C ~ 33Dは、陰性対照処理に対する、Bi PB 1.2によるヒトPBMC(ドナー1、図33C;ドナー2、図33D)からのIL 2分泌の増大を示す。

【図34A - 34D】図34A ~ 34Bは、親抗PD L 1抗体及び陰性対照処理に対する、Bi PLB 1.2によるヒトPBMC(ドナー8、図34A;ドナー9、図34B)からのIFN 分泌の増大を示す。図34C ~ 34Dは、親抗PD L 1抗体及び陰性対照処理に対する、Bi PLB 1.2によるヒトPBMC(ドナー8、図34C;ドナー9、図34D)からのIL 2分泌の増大を示す。

【図35A - 35F】図35A ~ 35Fは、6 ~ 10週齢のメスCD1マウスへの尾静脈注射後に、Bi PB 1.2及びBi PLB 1.2が、ベンチマーク抗体に対して改善された薬物動態プロファイルを示すことを示す。抗体アンタゴニスト、Bi PB 1.2、Bi PLB 1.2、及びベンチマークを、注射後の様々な時点で血清から回収し、ELISA(それぞれ図35A、35C、35E)及びウエスタンブロット(それぞれ図35B、35D、35F)による分析に供した。

【図36】図36は、図1の抗PD 1 CDR及び図3の抗PD L 1 CDRに対応するフレームワーク領域(FR)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

用語「アンタゴニスト」又は「阻害剤」は、受容体又はリガンドといった別の分子の生

物学的活性又は効果を妨げる、遮断する、阻害する、中和する、又は低減する物質を指す。

【0015】

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

10

【0016】

本出願の抗体又は抗体アンタゴニストとしては、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、二重特異性、三重特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化、キメラ、及び一本鎖抗体が挙げられる。本明細書で開示される抗体は、鳥類及び哺乳類を含むいずれの動物に由来するものであってよい。好ましくは上記抗体は、ヒト、マウス、ラット、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、又はニワトリ抗体である。いくつかの実施形態では、可変領域は軟骨魚類に由来する（例えばサメに由来する）ものであってよい。

20

【0017】

用語「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、 $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、一本鎖 $F v(s c F v)$ 、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 $F v(s d F v)$ 、V L 又は V H ドメインを含む断片、 $F a b$ 発現ライブラリによって生成される断片、及び抗イディオタイプ（抗 I d）抗体といった抗体の一部分を指して使用される。その構造にかかわらず、抗体断片は、完全な状態の抗体が認識する抗原と同一の抗原に結合する。用語「抗体断片」は、D A R T 及びダイアボディを含む。用語「抗体断片」はまた、特異的抗原に結合して複合体を形成することによって抗体と同様に作用する免疫グロブリン可変領域を含む、いずれの合成又は遺伝子操作タンパク質を含む。「一本鎖抗体」又は「 $s c F v$ 」は、免疫グロブリンの重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）の融合タンパク質を指す。いくつかの態様では、上記領域は、10 ~ 約25個のアミノ酸の短鎖リンカーペプチドと接続される。上記リンカーは、柔軟性のためにグリシンを多く含むことができ、また可溶性のためにセリン又はトレオニンを多く含むことができ、V H の N 末端を V L の C 末端と接続できるか、又はその逆である。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。I g G に関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量がおよそ23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量が53,000 ~ 70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチド鎖とを含む。これら4つの鎖は典型的には、「Y」字型構成で、ジスルフィド結合によって接合され、このジスルフィド結合では、軽鎖が重鎖から張り出して支えられ、この張り出した構造が、「Y」字型の最も開いた部分から始まって、可変領域を通して続く。

30

40

【0018】

軽鎖及び重鎖はいずれも、構造的及び機能的に相同である領域に分割される。用語「定常」及び「可変」は、機能に関して使用される。これに関して軽鎖可変（V L）及び重鎖可変（V H）ドメインの部分の両方が、抗原認識及び特異性を決定することが理解されるだろう。対照的に、軽鎖定常（C L）及び重鎖定常（C H 1、C H 2、又は C H 3）ドメ

50

インは、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合等といった重要な生物学的特性を付与する。慣例として、従来の抗体の定常領域ドメインの番号は、抗体の抗原結合部位又はアミノ末端から離れるほど大きくなる。従来の抗体では、N末端部分は可変領域であり、C末端部分には定常領域があり、CH3及びCLドメインは実際には、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0019】

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

10

【0020】

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

20

【0021】

本明細書中で使用される場合、用語「VH1」及び「VH2」は、2つの異なる結合特異性に対応する免疫グロブリン重鎖可変ドメインを指す。同様に、用語「VL1」及び「VL2」は、2つの異なる結合特異性に対応する軽鎖可変ドメインを指す。これらが共に使用される場合、VH1領域及びVL1領域は共通の結合特異性を画定すること、並びにVH2ドメイン及びVL2ドメインは第2の結合特異性を画定することを理解されたい。

30

【0022】

本明細書中で使用される場合、用語「フレームワーク領域(FR)」は、CDR残基以外の可変ドメイン残基を指す。各可変ドメインは典型的には、対応するCDRに隣接する4つのFRを有する。例えばVHドメインは典型的には、3つのHC DRにHFR1 HC DR 1 HFR2 HC DR 2 HFR3 HC DR 3 HFR4という構成で隣接する、4つのHFR、即ちHFR1、HFR2、HFR3、及びHFR4を有する。同様に、LHドメインは典型的には、3つのLC DRにLFR1 LC DR 1 LFR2 LC DR 2 LFR3 LC DR 3 LFR4という構成で隣接する4つのLFRを有する。本明細書に記載のアンタゴニストで利用できる例示的なFRを図36にまとめる。

40

【0023】

軽鎖は、カッパ又はラムダ(κ 、 λ)として分類される。各重鎖クラスは、カッパ又はラムダ軽鎖と結合できる。一般に軽鎖及び重鎖は互いに共有結合し、2つの重鎖の「後端(tail)」部分は、ハイブリドーマ、B細胞、又は遺伝子操作された宿主細胞によって免疫グロブリンが生成された場合に、共有ジスルフィド結合又は非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y字型構成のフォーク状の端部のN末端から

50

、各鎖の下部のC末端まで連なる。

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「軽鎖定常領域」又は「CL」は、抗体軽鎖由来のアミノ酸配列を指して、相互交換可能なものとして使用される。好ましくは、軽鎖定常領域は、定常カップドメイン及び定常ラムダドメインのうちの少なくとも一方を含む。

【0025】

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

10

20

【0026】

例えば、本開示においてこれ以降で考察されるように、本出願人は、CH3ドメインが、CH3ドメインのFcループ（例えば図5BのBiPB₂、BiPLB₂を参照）への相当な（例えば100aaを超える）挿入に耐えることができる、又はこのような挿入を収容できることを発見した。従って本出願では、配列番号123～125を含むがこれらに限定されない本開示のいずれの阻害性ドメインを、TGFI₁RIIECDドメインをFcループに挿入するのと同様の方法で、同様に重鎖のFcループに挿入できる。

【0027】

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

30

【0028】

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

【0029】

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

40

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、慣用の番号付与スキームを用いた場合に概ね抗体の残基244から残基360にまでわたる（Kababat番号付与体系では残基244～360、EU番号付与体系では残基231～340）、重鎖分子の一部分を含む。CH2ドメインは、別のドメインと密接な対を形成しないという点で独特である。そうではなく、2つのN結合型分岐炭水化物鎖が完全な状態のネイティブIgG分

50

子の2つのCH2ドメインの間に介在する。CH3ドメインは、IgG分子のCH2ドメインからC末端にまでわたりし、およそ108個の残基を含む。

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

本出願の多重特異性抗体の範囲内に含まれるのは、以下を含む様々な組成物及び方法論である：非対称IgG様抗体(例えばトリオマブ/クアドロマ、Trion Pharma/Fresenius Biotech)；ノブ・イントゥ・ホール(knobs into holes)抗体(Genentech)；Cross mAb(Roche)；静電気適合抗体(AMGEN)；LUZ Y(Genentech)；ストランド・エクスチェンジ・エンジニアード(strand exchange engineered)ドメイン(SEED)ボディ(EMD Serono；Biological、Merus)；Fab交換抗体(Genmab)；対照IgG様抗体(例えば二重標的(dual targeting：DT) Ig(GSK/Domantis)；トゥ・イン・ワン(two in one)抗体(Genentech)；架橋mAb(Karmanos Cancer Center)；mAb²(Fstar)；Cov X body

10

20

30

40

50

(Cov X / Pfizer) ; 二重可変ドメイン (DVD) Ig 融合 (Abbott) ; Ig G 様二重特異性抗体 (Eli Lilly) ; Ts2Ab (Medimmune / AZ) ; BsAb (ZymoGenetics) ; HERCULES (Biogen Idec, TvaB, Roche) ; scFv / Fc 融合 ; SCORPION (Emergent BioSolutions / Trubion, ZymoGenetics / BMS) ; 二重親和性標的転換技術 (Fc DART, MacroGenics) ; 二重 (scFv)₂ Fab (National Research Center for Antibody Medicine) ; F(ab)₂ 融合 (Medarex / AMGEN) ; 二重作用又は Bis Fab (Genentech) ; ドック・アンド・ロック (Dock and Lock) (DNL, Immunomedics) ; Fab Fv (UCB Celltech) ; scFv 及びダイアボディベース抗体 (例えば二重特異性 T 細胞エンゲージャ (BiTE, Micromet) ; タンデムダイアボディ (Tandab, Affimed) ; DART (MacroGenics) ; 一本鎖ダイアボディ ; TCR 様抗体 (AIT, Receptor Logistics) ; ヒト血清アルブミン scFv 融合 (Merrimack) ; COMBODIES (Epigen Biotech) ; 及び Ig G / 非 Ig G 融合 (例えば免疫サイトカイン (EMDSerono, Philogen, Immunogene, Immunomedics)) 。

10

【0037】

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

20

30

【0038】

句「免疫チェックポイント調節因子」は、免疫チェックポイントを通したシグナル伝達を阻害又は刺激する作用剤の機能的クラスを指す。「免疫チェックポイント調節因子」は、一体として T 細胞活性化に関連するシグナル伝達経路を阻害又は刺激する手段を提供する、細胞表面受容体及びその関連するリガンドを含む。細胞表面受容体である免疫チェックポイント調節因子は典型的には、免疫応答を抑制するようにチェックポイントシグナル伝達経路を誘導できる、TNF 受容体又は B7 スーパーファミリーのメンバーであり、PD-1、TIGIT、LAG-3、TIM-3、BTLA、VISTA、CTLA-4、及びこれらそれぞれのリガンドを含むがこれらに限定されない負の共刺激分子に結合する作用剤を含む。

40

【0039】

句「チェックポイント調節因子アンタゴニスト」、「免疫チェックポイント結合アンタゴニスト」、及び「免疫チェックポイントアンタゴニスト」は本明細書において、免疫チェックポイント調節因子の活性に干渉する（又はこれを阻害する）ことによって、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を遮断又は阻害する作用剤のクラスに関して、相互交換可能なものとして使用される。このシグナル伝達を阻害することによって、免疫抑制を反転させることができ、これにより、癌細胞に対する T 細胞免疫を再確立又は強化できる。例示的な免疫チェックポイントアンタゴニストとしては、限定するものではないが：PD-1

50

並びにそのリガンドであるPD-L1及びPD-L2；TIM-3及びそのCD155リガンドであるPVR；LAG-3、並びに肝類洞内皮細胞レクチン（LSECtin）及びガレクチン-3を含むそのリガンド；CTLA-4並びにそのリガンドであるB7-1及びB7-2；TIM-3及びそのリガンドであるガレクチン-9；CD122及びそのCD122Rリガンド；CD70、B7H3、B及びTリンパ球減衰因子（BTLA）；並びにVISTAが挙げられる。免疫チェックポイント調節因子アンタゴニストとしては、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤が挙げられる。

【0040】

句「免疫チェックポイント結合アゴニスト」、及び「免疫チェックポイントアゴニスト」は、免疫チェックポイント調節因子の活性を刺激することによって、チェックポイント調節因子又はそのリガンドへの結合の結果として、チェックポイント調節因子受容体を通したシグナル伝達を刺激する作用剤のクラスに関して、相互交換可能なものとして使用される。このシグナル伝達を刺激することによって、癌細胞に対するT細胞免疫を再確立又は強化できる。例示的な免疫チェックポイント調節因子アゴニストとしては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子（TNF）受容体スーパーファミリーのメンバー、例えばCD27、CD40、OX40（CD134）、グルココルチコイド誘導TNFRファミリー関連タンパク質（GITR）、及び4-1BB（CD137）、並びにこれらのリガンドが挙げられる。更なるチェックポイント調節因子アゴニストは、CD28及びICOSを含むB7-CD28スーパーファミリーに属する。免疫チェックポイント調節因子として、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤が挙げられる。

【0041】

用語「アンタゴニスト抗体」は、標的に結合してこの標的の生物学的効果を阻害又は低減する抗体を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、抗体であって、この抗体が結合する標的、例えばPD-1が生物学的機能を実施するのを阻害する、抗体を指すことができる。

【0042】

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

【0043】

本明細書中で使用される場合、「抗PD-L1アンタゴニスト抗体」は、PD-L1の生物学的活性、及び/又はPD-L1によって仲介される1つ以上の下流のイベントを阻害できる抗体を指す。抗PD-L1アンタゴニスト抗体は、PD-L1の生物学的活性を（「ほとんど」を含む何らかの程度まで）遮断する、拮抗する、抑制する、又は低減する抗体を包含し、上記生物学的活性は、PD-L1によって仲介される下流のイベント、例えばPD-L1結合及び下流シグナル伝達、T細胞増殖の阻害、T細胞活性化の阻害、I

F N分泌の阻害、I L 2分泌の阻害、T N F分泌の阻害、I L 10の誘導、及び抗腫瘍免疫応答の阻害を含む。本発明の目的に関して、用語「抗P D L 1アンタゴニスト抗体」（相互交換可能な用語として「アンタゴニストP D L 1抗体」、「アンタゴニスト抗P D L 1抗体」、又は「P D L 1アンタゴニスト抗体」が使用される）は、P D L 1自体、P D L 1の生物学的活性、又は生物学的活性の結果を、略無化する、低減する、又は何らかの意味のある程度に中和する、これまでに同定されているあらゆる用語、名称、並びに機能的状態及び特性を包含することが、明確に理解されるだろう。抗P D L 1アンタゴニスト抗体は、P D L 1に結合して抗腫瘍免疫応答を上方制御するように設計される。

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

句「T i e 2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニスト」は、T i e 2チロシンキナーゼ受容体、又はそのリガンドのうちの1つに結合することによって、この結合の結果として、T i e 2チロシンキナーゼ受容体の、そのリガンド（即ちA n g 1、A n g 2、A n g 3、及びA n g 4）のうちの1つ以上による活性化を遮断又は阻害する、作用剤の機能的クラスを指す。本明細書中で使用される場合、用語「T i e 2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニスト」は、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤を含む。

【0047】

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

【0048】

個々のドメインの間にハイフンを用いてポリペプチドドメインの構成を記述する場合（例えばC H 2 C H 3）、列挙されているドメインの順序は、アミノ末端からカルボキシ末端へのものであることを理解されたい。

【0049】

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

【0050】

「リンカー」は、メイタンシノイド等のペプチド又は小分子薬剤を抗腫瘍アンタゴニストに安定した共有結合で結合するために使用できる。リンカーは、化合物又は抗体が活性のままとなる条件において、酸誘導型切断、光誘導型切断、ペプチダーゼ誘導型切断、エ

10

20

30

40

50

ステラーゼ誘導型切断、及びジスルフィド結合切断に対して、感受性を有してよく、又は実質的な耐性を有してもよい。好適なリンカーは当該技術分野で公知であり、例えばジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基、及びエステラーゼ不安定性基が挙げられる。リンカーは、本明細書に記載され、かつ当該技術分野で公知の、GGGGS、荷電リンカー及びその親水性形態も含む。免疫複合体は更に、抗腫瘍アンタゴニストとペプチド及び/又は小分子薬剤との間に、可撓性3-15アミノ酸ペプチド(又はスペーサ)を含んでよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGSの3、4、5、6、7、又は8回の反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGGGSの3又は4回の反復からなる。

【0051】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫グロブリン足場」は、抗体特異性の付加、抗体機能の強化、又は抗体構造及び安定性の支持を含む、アンタゴニストの機能をサポートするために望ましい特性を示すアミノ酸のいずれのポリマーを指す。免疫グロブリン足場は、免疫グロブリン重鎖由来のCH1、CH2、及び/若しくはCH3領域、並びに/又は免疫グロブリン軽鎖由来のCL領域を含む、1つ以上の免疫グロブリン定常領域を有してよい。免疫グロブリン足場にドナーポリペプチドの結合ドメインを移植することにより、足場にドナーポリペプチドの結合特異性を与えることができる。

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

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

【0056】

例示的な二重特異性としては：非対称IgG様抗体(例えばトリオマブ/クアドローマ、Trion Pharma/Fresenius Biotech); ノブ・イントゥ・ホール(knobs into holes)抗体(Genentech); Cros

10

20

30

40

50

s mAb (Roche) ; 静電気適合抗体 (AMGEN) ; LUZY (Genentech) ; スtrand・exチェンジ・エンジニアード (strand exchange engineered) ドメイン (SEED) ボディ (EMD Serono ; Biolonic、Merus) ; Fab 交換抗体 (Genmab) ; 対照 IgG 様抗体 (例えば二重標的 (dual targeting : DT) Ig (GSK / Domantis) ; トウ・イン・ワン (two in one) 抗体 (Genentech) ; 架橋 mAb (Karmanos Cancer Center) ; mAb² (Fstar) ; Cov X body (Cov X / Pfizer) ; 二重可変ドメイン (DVD) Ig 融合 (Abbott) ; IgG 様二重特異性抗体 (Eli Lilly) ; Ts2 Ab (Medimmune / AZ) ; BsAb (ZymoGenetics) ; HERCULES (Biogen Idec、TvaB、Roche) ; scFv / Fc 融合 ; SCORPION (Emergent BioSolutions / Trubion、ZymoGenetics / BMS) ; 二重親和性標的転換技術 (Fc DART、MacroGenics) ; 二重 (scFv)₂ Fab (National Research Center for Antibody Medicine) ; F(ab)₂ 融合 (Medarex / AMGEN) ; 二重作用又は Bis Fab (Genentech) ; ドック・アンド・ロック (Dock and Lock) (DNL、ImmunoMedics) ; Fab Fv (UCB Celltech) ; scFv 及びダイアボディベース抗体 (例えば二重特異性 T 細胞エンゲージャ (BiTE、Micromet) ; タンデムダイアボディ (Tandab、Affimed) ; DART (MacroGenics) ; 一本鎖ダイアボディ ; TCR 様抗体 (AIT、Receptor Logistics) ; ヒト血清アルブミン scFv 融合 (Merrimack) ; COMBODIES (Epigen Biotech) ; 及び IgG / 非 IgG 融合 (例えば免疫サイトカイン (EMD Serono、Philogen、ImmunoGene、ImmunoMedics)) が挙げられる。

【0057】

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

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

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

、又は成人であってよい。

【0062】

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

【0063】

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

10

【0064】

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

20

30

【0065】

用語「癌腫」は、周辺組織に浸潤して転移を引き起こす傾向を有する、上皮細胞の悪性成長を指す。例示的な癌腫としては例えば、腺房癌 (acinar carcinoma、acinous carcinoma)、腺嚢癌腫、腺様嚢胞癌、腺腫性癌、副腎皮質の癌腫、肺胞癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌 (basal cell carcinoma、carcinoma basocellulare)、類基底細胞癌、基底細胞上皮腫 (basosquamous cell carcinoma)、細気管支肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌、胆管細胞癌、絨毛膜癌、膠様腺癌、面皰癌、子宮体癌、篩状癌、鏝状癌、皮膚癌、円柱腫、円柱細胞癌、乳管癌、硬癌、胎児性癌、脳様癌、類表皮癌、腺様上皮癌 (carcinoma epitheliale adenoides)、外向発育癌、潰瘍癌、線維性癌、膠様癌 (gelatiniform carcinoma、gelatinous carcinoma)、巨細胞癌 (giant cell carcinoma、carcinoma gigantocellular)、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血液様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子様癌 (hyaline carcinoma)、副腎様腫、乳児胎児性癌、非浸潤性癌、表皮内癌、上皮内癌、クロンペッカー癌 (Krompecher's carcinoma)、クルチッキー細胞癌 (Kulchitzky cell carcinoma)、大細胞癌、レンズ状癌 (lenticular carcinoma、carcinoma lenticulare)、脂肪腫様癌、リンパ上皮癌、髄様癌、(carcinoma medullare、medullary carcinoma)、黒色腫 (mela

40

50

notic carcinoma)、軟性腫(carcinoma molle)、粘液性癌腫(mucinous carcinoma)、粘液分泌性癌(carcinoma muciparum)、粘液細胞癌(carcinoma mucocellular e)、粘表皮癌(mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液性癌(mucous carcinoma)、粘液腫様癌(carcinoma myxomatodes)、鼻咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、類骨腫、乳頭状癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、粥状癌腫、腎細胞癌、予備細胞癌、肉腫性癌、シュナイダー膜癌腫、スキルス癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、パレイシヨ状癌(solanoïd carcinoma)、球状細胞癌、紡錘細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、ひも状癌、血管拡張性癌腫、末梢血管拡張性癌腫、移行上皮癌、結節癌(carcinoma tuberosum、tuberous carcinoma)、疣贅性癌、及び絨毛癌が挙げられる。

10

【0066】

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

20

【0067】

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

30

【0068】

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

【0069】

I. TGF 経路を標的とする二重特異性アンタゴニスト

TGF は、T調節性細胞の誘導及び維持、並びにNK、DC、及びT細胞といった自然免疫細胞及び適応免疫細胞の直接的な抑制によって免疫抑制を仲介する、一次サイトカインと考えられている。TGF はまた、血管新生及び腫瘍血管の安定化、並びに細胞の遊走及び浸潤につながる上皮間葉転換によって腫瘍に直接影響を与えることにおいて、役割を果たす。血管新生の強力な誘導因子として、TGF 1は、固形腫瘍の重要なサポートシステムを提供し、腫瘍細胞の播種において重要な役割を果たす。従ってTGF の状態は、抗PD1/PD L1耐性、及び様々な癌に関する全生存の、強力な予測因子である。

40

【0070】

多くの細胞がTGF を合成し、これらのうちのほとんど全てが、これらのペプチドに対する特異的受容体を有する。TGF 1、TGF 2、及びTGF 3は全て、同一の受容体シグナル伝達系を介して機能する。TGF の活性形態は、セリンスレ

50

オニン 1 型及び 2 型受容体、それぞれ TGF β RI 及び TGF β RII で構成される膜結合ヘテロ四量体の形成を介してシグナルを送る二量体である。近年、TGF β 経路阻害剤が、TGF β 1 又は TGF β 1 RII に対する抗体又は結合断片、例えば TGF β 1 RII の細胞外ドメイン (ECD) を含有するドミナントネガティブ融合タンパク質断片の形態で、開発されている。

【0071】

一態様では、本出願は、TGF β 経路及び PD 1 / PD L 1 チェックポイント調節因子経路の両方を阻害する二重特異性アンタゴニストを提供する。

【0072】

別の態様では、本出願は、TGF β 経路及び血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 経路の両方、血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR)、又はこれら全てを阻害する二重特異性アンタゴニストを提供する。

【0073】

A. TGF β 及び PD 1 / PD L 1 経路を標的とする二重特異性アンタゴニスト
いくつかの実施形態では、二重特異性アンタゴニストは、TGF β 経路に特異的に結合する第 1 の標的指向性ドメインと、PD 1 又は PD L 1 に特異的に結合する第 2 の標的指向性ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の標的指向性ドメインは TGF β 経路阻害剤を含む。

【0074】

TGF β 経路阻害剤

TGF β は、細胞増殖及び分化、遊走及び接着、腫瘍間質及び免疫抑制を含む細胞外マトリックス修飾、血管新生及び線維形成、アポトーシス、並びに他の機能を多数の細胞タイプにおいて制御する、ペプチドの多機能セットを含む。TGF β は、T 調節性細胞の誘導及び維持、並びに NK、DC、及び T 細胞といった自然免疫細胞及び適応免疫細胞の直接的な抑制によって免疫抑制を仲介する、一次サイトカインと考えられている。TGF β はまた、血管新生及び腫瘍血管の安定化、並びに細胞の遊走及び浸潤につながる上皮間葉転換によって腫瘍に直接影響を与えることにおいて、役割を果たす。血管新生の強力な誘導因子として、TGF β 1 は、固形腫瘍の重要なサポートシステム、及び腫瘍細胞の播種のための機序を提供する。

【0075】

TGF β の状態は、抗 PD 1 / PD L 1 耐性、及び様々な癌に関する全生存の、強力な予測因子である。例えば、高い TGF β 1 レベルは、転移性尿路上皮癌における PD 1 / PD L 1 阻害に対する応答不良に関連し (Nature (2018) 554 (7693): 544-548)、また高い TGF β シグネチャは、33 種の異なる癌にわたる予後不良に関連する (Immunity (2018) 48: 812-830)。抗 PD 1 / PD L 1 による TGF β の阻害は更に、CD8 エフェクタ細胞を放出して腫瘍細胞を殺滅し、他の細胞タイプを刺激して細胞殺滅能力を高める。

【0076】

多くの細胞が TGF β を合成し、これらのうちのほとんど全てが、これらのペプチドに対する特異的受容体を有する。TGF β 1、TGF β 2、及び TGF β 3 は全て、同一の受容体シグナル伝達系を介して機能する。TGF β の活性形態は、セリンスレオニン 1 型及び 2 型受容体、それぞれ TGF β RI 及び TGF β RII で構成される膜結合ヘテロ四量体の形成を介してシグナルを送る二量体である。

【0077】

本明細書中で使用される場合、TGF β 経路阻害剤は例えば、TGF β 1 又は TGF β 1 RII、TGF β 結合ペプチド、又は TGF β 1 RII の細胞外ドメイン (ECD) 等のドミナントネガティブ融合タンパク質断片に対する、抗体又は可変ドメイン断片の形態であってよい。

【0078】

TGF β 1 RII ECD

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、TGF 経路阻害剤はTGF 1 RII ECDを含む。例示的なヒトTGF 1 RII ECD（野生型）は、配列番号89に記載のアミノ酸配列を有する。

【0079】

いくつかの実施形態では、TGF 経路阻害剤は、例えば図5A～5B及び8A～8Cに示すように、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストのIgGのカルボキシ末端に融合する。あるいは、TGF 1 RII ECDは、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストのIgGのアミノ末端に融合してよい。更に他の実施形態では、TGF 1 RII ECDは、例えば図5Bに示すように、IgGのFc受容体（即ちCH2又はCH3領域）内に挿入される。

10

【0080】

いくつかの実施形態では、抗TGF 1、抗TGF 1 RII抗体、又はその可変領域断片を、TGF 1 RII ECDの代わりに用いてよい。例示的な抗TGF 1抗体は、米国特許第7,067,637号、米国特許第7,494,651号、米国特許第7,527,791号、及び米国特許第7,619,069号に記載されている。例示的な抗TGF 1 RII抗体は、米国特許第7,579,186号に記載されている。あるいは、TGF 1 RII ECDを1つ以上の抗TGF 1及び/又は抗TGF 1 RIIペプチド阻害剤に置き換えてよい。例示的なTGF 1ペプチド阻害剤は、KRIWFIPRSSWYERA（配列番号111）である。

【0081】

20

抗PD 1抗体及び抗PD 1抗体断片

いくつかの実施形態では、二重特異性TGF 経路アンタゴニストは、抗PD 1抗体又は抗体断片を含む。一実施形態では、本出願で使用するためのPD 1阻害剤は：配列番号1、4、7、9、及び12からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖相補性決定領域1（CDR1）配列；配列番号2、5、10、及び13からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖CDR2配列；配列番号3、6、8、11、及び14からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖CDR3配列；配列番号15、18、21～23、及び26からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR1配列；配列番号16、19、24、及び27からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR2配列；又は配列番号17、20、25、及び28からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR3配列を含む、抗体又はその抗原結合部分である。

30

【0082】

別の実施形態では、（例えば第2の標的指向性ドメインとして）本出願で使用するためのPD 1阻害剤は：配列番号1、4、7、9、及び12からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖CDR1配列；配列番号2、5、10、及び13からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖CDR2配列；配列番号3、6、8、11、及び14からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖CDR3配列；配列番号15、18、21～23、及び26からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR1配列；配列番号16、19、24、及び27からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR2配列；並びに配列番号17、20、25、及び28からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖CDR3

40

【0083】

別の実施形態では、本出願で使用するためのPD 1阻害剤は：配列番号29、31、33、35、37、及び39からなる群から選択されるHCVRアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する免疫グロブリン重鎖可変領域（HCVR）；配列番号30、32、34、36、38、及び40からなる群から選択されるLCVRアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域（LCVR）；あるいはこれら両方を含む。

【0084】

50

別の実施形態では、本出願で使用するためのPD 1阻害剤は：配列番号29、31、33、35、37、及び39からなる群から選択されるHCVRAミノ酸配列；配列番号30、32、34、36、38、及び40からなる群から選択されるLCVRAミノ酸配列；又はこれら両方を含む。

【0085】

一実施形態では、PD 1阻害剤は：配列番号39のHCVRAミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するHCVRAミノ酸配列；配列番号40のLCVRAミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するLCVRAミノ酸配列；あるいはこれら両方を含む。更に特定の実施形態では、PD 1阻害剤は：配列番号39のHCVRAミノ酸配列；配列番号40のLCVRAミノ酸配列；又はこれら両方を有する。

10

【0086】

別の実施形態では、PD 1阻害剤は：(1)配列番号12の重鎖CDR1、配列番号13の重鎖CDR2、及び配列番号14の重鎖CDR3と、(2)配列番号150のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する重鎖フレームワーク領域(FR)1、配列番号144のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する重鎖FR2、配列番号155のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するHFR3、配列番号141のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、又は90%の同一性を有するHFR4とを含む、免疫グロブリンHCVRAミノ酸配列；並びに(1)配列番号26の軽鎖CDR1、配列番号27のLCDR2、及び配列番号28のLCDR3と、(2)配列番号156のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するLFR1、配列番号157のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するLFR2、配列番号158のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するLFR3、及び配列番号159のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有するLFR4とを含む、免疫グロブリン重鎖可変領域を有する。

20

【0087】

別の実施形態では、TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号92又は配列番号106のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号93のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する軽鎖；あるいはこれら両方を含む、PD 1阻害剤を含む。更に特定の実施形態では、TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号92又は配列番号106のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号93のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、PD 1阻害剤を含む。

30

【0088】

別の実施形態では、TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号94又は配列番号126のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号95のLCVRAミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、PD 1阻害剤を含む。更に特定の実施形態では、TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号94又は配列番号126のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号95のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、PD 1阻害剤を含む。別の実施形態では、PD 1/TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは、図5Bに示すようにCH3ループ内に挿入されたTGFA 1RIIECDを含む。

40

【0089】

一実施形態では、TGFA 1抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号107のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する重鎖；配

50

列番号 108 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 % の同一性を有する軽鎖；あるいはこれら両方を含む、PD 1 阻害剤を含む。更に特定の実施形態では、TGF 1 抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 107 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号 108 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；又はこれら両方を含む、PD 1 阻害剤を含む。

【0090】

他の PD 1 標的化アンタゴニストとしては、ニボルマブ (BMS 936558、MDX 1106、OPDIVO (商標))、ヒト化免疫グロブリン G4 (IgG4) mAb (Bristol Myers Squibb)；ペンブロリズマブ (MK 3475、ランブロリズマブ、Keytruda (商標)) (Merck)；ビジリズマブ (CT 011) (Medivation)；及び AMP 224 (Merck) といった、抗 PD 1 抗体が挙げられる。抗 PD 1 抗体は例えば、ABCAM (AB137132)、BIOLEGEN D (商標) (EH12、2H7、RMP1 14)、及び AFFY METRIX EBIO SCIENCE (J105、J116、MIH4) から市販されている。抗 PD 1 標的化抗腫瘍アンタゴニストは、図 1～2 に記載されているものを含む本明細書に記載の抗 PD 1 抗体のうちのいずれかに由来する HCV R、LCV R、及び CDR を含んでよい。

【0091】

抗 PD L 1 抗体及び抗 PD L 1 抗体断片

いくつかの実施形態では、二重特異性 TGF 1 経路アンタゴニストは、抗 PD L 1 抗体又は抗体断片を更に含む。一実施形態では、本出願で使用するための PD L 1 阻害剤は：配列番号 41、44、50、及び 53 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 1 配列；配列番号 42、45、47、49、51、及び 54 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 2 配列；配列番号 43、46、48、52、及び 55 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 3 配列；配列番号 56、59、63、66、及び 69 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 1 配列；配列番号 57、60、64、67、及び 70 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 2 配列；又は配列番号 58、61、62、65、68、及び 71 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 3 配列を含む、抗体又はその抗原結合部分である。

【0092】

別の実施形態では、(例えば第 2 の標的指向性ドメインとして) 本出願で使用するための PD L 1 阻害剤は：配列番号 41、44、50、及び 53 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 1 配列；配列番号 42、45、47、49、51、及び 54 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 2 配列；配列番号 43、46、48、52、及び 55 からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖 CDR 3 配列；配列番号 56、59、63、66、及び 69 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 1 配列；配列番号 57、60、64、67、及び 70 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 2 配列；及び配列番号 58、61、62、65、68、及び 71 からなる群から選択される免疫グロブリン軽鎖 CDR 3 配列を含む、抗体又はその抗原結合部分である。

【0093】

別の実施形態では、本出願で使用するための PD L 1 阻害剤は：配列番号 72、74、76、78、80、82、84、及び 86 からなる群から選択される HCV R アミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 % の同一性を有する免疫グロブリン HCV R；配列番号 73、75、77、79、81、83、85、及び 87 からなる群から選択される LCV R アミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 % の同一性を有する免疫グロブリン LCV R；あるいはこれら両方を含む。別の実施形態では、本出願で使用するための PD L 1 阻害剤は：配列番号 72、74、76、78、80、82、84、及び 86 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCV R；配列番号 73、75、77、79、81、83、85、及び 87 からなる群

から選択されるアミノ酸配列を有する L C V R ; 又はこれら両方を含む。

【 0 0 9 4 】

一実施形態では、P D L 1 阻害剤は：配列番号 8 6 の H C V R アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する H C V R ; 配列番号 8 7 の L C V R アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する L C V R ; あるいはこれら両方を含む。更に特定の実施形態では、P D L 1 阻害剤は：配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する H C V R ; 配列番号 8 7 のアミノ酸配列を有する L C V R ; 又はこれら両方を含む。

【 0 0 9 5 】

別の実施形態では、T G F 1 抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 9 4 又は配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号 9 5 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、P D L 1 阻害剤を含む。更に特定の実施形態では、T G F 1 抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 9 4 又は配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号 9 5 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、P D L 1 阻害剤を含む。

10

【 0 0 9 6 】

別の実施形態では、P D L 1 / T G F 1 抗腫瘍アンタゴニストは、図 5 B に示すように C H 3 ループ内に挿入された T G F 1 R I I E C D を含む。

20

【 0 0 9 7 】

ある特定の実施形態では、T G F 1 抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 9 % の同一性を有する免疫グロブリン軽鎖；あるいはこれら両方を含む、P D L 1 阻害剤を含む。更に特定の実施形態では、T G F 1 抗腫瘍アンタゴニストは：配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；又はこれら両方を含む、P D L 1 阻害剤を含む。

30

【 0 0 9 8 】

他の抗 P D L 1 標的化アンタゴニストとしては：アテゾリズマブ (M P D L 3 2 8 0 A、R G 7 4 4 6)、完全ヒト I g G 4 m A b (G e n e n t e c h / R o c h e) ; B M S 9 3 6 5 5 9 (M D X 1 1 0 5)、完全ヒト化 I g G 4 m A b (B r i s t o l M y e r s S q u i b b) ; M E D I 4 7 3 6、ヒト化 I g G 抗体 (M e d i m m u n e / A s t r a Z e n e c a) ; 及び M S B 0 0 1 0 7 1 8 C、完全ヒト I g G 4 モノクローナル抗体 (M e r c k、E M D S e r o n o) といった抗 P D L 1 抗体が挙げられる。抗 P D L 1 標的化抗腫瘍アンタゴニストは、図 3 ~ 4 に記載されているものを含む本明細書に記載の抗 P D L 1 抗体のうちのいずれかに由来する H C V R、L C V R、及び C D R を含んでよい。

40

【 0 0 9 9 】

B、T G F 1 及び 1 つ以上の血管新生経路を標的とする二重特異性アンタゴニスト別の態様では、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、T G F 1 又は T G F 1 R I I に特異的に結合する第 1 の標的指向性ドメインと、V E G F A、V E G F R、A n g 1、A n g 2、T i e 2 R、又はこれらの組み合わせに特異的に結合する第 2 の標的指向性ドメインとを含む。これらの実施形態では、上述の T G F 1 又は T G F 1 R I I 結合断片のうちのいずれを、第 2 の標的指向性ドメインと組み合わせて使用してよい。

【 0 1 0 0 】

血管新生経路

血管新生、即ち既に存在する血管からの新たな血管の発達は、腫瘍の成長及び転移のた

50

めに重要である。血管新生の阻害は、進行（例えば転移）が血管新生に依存する癌等の疾患の治療のための、潜在的に価値のある戦略を提示する。血管新生の阻害は腫瘍細胞の死をもたらし、これにより、腫瘍抗原を宿主の抗原提示経路に供給できる。血管新生経路阻害剤は、例えば抗体、可変ドメイン断片、又はドミナントネガティブ融合タンパク質断片の形態であってよい。

【0101】

1. VEGF / VEGFR 経路

主要な VEGF 経路は、膜透過性チロシンキナーゼ VEGFR2 によって仲介される。VEGF の様々なアイソフォーム、特に VEGF-A は、VEGFR2 に結合して、様々な下流のチロシンキナーゼのリン酸化によって、二量体化及び活性化をもたらす。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、本出願のアンタゴニストは VEGF 経路アンタゴニストを含み、これは、VEGF-A、又はその受容体 VEGFR2 に結合し、この結合の結果として、VEGF-A による VEGFR2 の活性化が遮断又は阻害される。

【0103】

一実施形態では、TGF 経路アンタゴニストは、ヒト VEGF 受容体 1 又は 2 の細胞外ドメイン (ECD) に対応するドミナントネガティブ VEGFR アンタゴニストの形態の、VEGF 経路アンタゴニストを更に含む。ある特定の実施形態では、TGF 経路アンタゴニストとしてはアフリベルセプト (Zaltrap としても知られる) が挙げられ、これは、ヒト IgG1 Fc 部分と融合した、ヒト VEGF 受容体 1 及び 2 の細胞外ドメイン由来の VEGF-A 結合部分を含有する、組換え融合タンパク質である。アフリベルセプト等の VEGFR ECD は、VEGF-A のための可溶性受容体デコイとして作用する。

20

【0104】

一実施形態では、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、TGF 経路阻害剤を含む第 1 の標的指向性ドメインと、VEGF-A に特異的に結合する第 2 の標的指向性ドメインとを含み、上記第 2 の標的指向性ドメインはアフリベルセプトを含む。アフリベルセプトの好適なソースは、配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、図 8C に示すように、IgG1 又は IgG4 Fc 受容体 (BiZB1) を介してカルボキシ末端において TGF1RIIECD に結合されたアミノ末端アフリベルセプトドメインを含む、修飾済み免疫グロブリン重鎖を含む。一実施形態では、この修飾済み免疫グロブリン重鎖は、配列番号 105 のアミノ酸配列を有する。あるいは TGF1RIIECD はアミノ末端に位置してよく、アフリベルセプトドメインがカルボキシ末端に位置してよい。

30

【0105】

別の実施形態では、TGF 経路アンタゴニストは更に、ベバシズマブ由来のもの等の抗 VEGF-A 又は抗 VEGFR2 可変領域配列を含む VEGF 経路アンタゴニストを含む。ベバシズマブ (Avastin (商標)) は、変異したヒト IgG1 フレームワーク領域 (FR) と、VEGFR2 に対するヒト VEGF-A の結合を遮断するマウス抗 hVEGF モノクローナル抗体 A4.6.1 由来の抗原結合相補性決定領域とを含む、ヒト化抗体である。ベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ 93% (フレームワーク領域の大半を含む) は、ヒト IgG1 由来であり、上記配列の約 7% はマウス抗体 A4.6.1 由来である。ベバシズマブは、約 149,000 ダルトンの分子質量を有し、グリコシル化されている。一実施形態では、本出願で使用するためのベバシズマブの HCV R は、配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を有し、ベバシズマブの LCV R は、配列番号 91 に記載のアミノ酸配列を有する。

40

【0106】

いくつかの実施形態では、米国特許第 7,575,893 号に記載されているように、ベバシズマブ / Avastin 抗体又はその断片にアミノ酸置換が含まれていてよい。例示的なアミノ酸置換としては、限定するものではないが、E1Q、E6Q、L11V、Q

50

13K、L18V、R19K、A23K、又はこれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態では、本出願で使用するためのペバシズマブの変異型HCV Rは、配列番号96に記載のアミノ酸配列を有し、これは配列番号91のLCVRと併せて使用できる。

【0107】

一実施形態では、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、TGF β 1RII ECD等のTGF β 1に特異的に結合する（又は抗TGF β 1若しくは抗TGF β 1RII可変ドメインを含有する）第1の標的指向性ドメインと、ペバシズマブ又は他のいずれの抗VEGF若しくは抗VEGFR2抗体、その可変領域断片、若しくはその機能的に活性の変異型断片といった、VEGF A又はVEGFR2に特異的に結合する第2の標的指向性ドメインとを含む。

10

【0108】

ある特定の実施形態では、二重特異性抗腫瘍TGF β / VEGF VEGFR2アンタゴニストは：配列番号102のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号103のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；又はこれら両方を含む（野生型ペバシズマブ可変領域配列を含有するBi AB 1（図8A）等）。

【0109】

別の実施形態では、二重特異性抗腫瘍TGF β アンタゴニストは：配列番号104のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖；配列番号103のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖；又はこれら両方を更に含む（変異型ペバシズマブ可変領域配列を含有するBi A1B 1（図8B）等）。

20

【0110】

更なる抗VEGF若しくは抗VEGFR抗体、又はその断片は：ペバシズマブと同一の親マウス抗体に由来するモノクローナル抗体断片である、ラニズマブ（商品名：Lucentis（商標））；米国公開特許第2006/0280747号、米国公開特許第2007/0141065号、及び/又は米国公開特許第2007/0020267号に記載されているG6又はB20シリーズ抗体（例えばG6 23、G6 31、B20 4.1）；並びに米国特許第7,297,334号、米国特許第7,060,269号、米国特許第6,884,879号、米国特許第6,582,959号、米国特許第6,703,020号、米国特許第6,054,297号、米国特許出願公開第2007/059312号、米国特許出願公開第2006/009360号、米国特許出願公開第2005/0186208号、米国特許出願公開第2003/0206899号、米国特許出願公開第2003/0190317号、及び米国特許出願公開第2003/0203409号に記載の抗体をベースとするものであってよい。

30

【0111】

例示的な抗VEGFR2抗体アンタゴニストは、ヒト化IgG1モノクローナル抗体であるラムシルマブであり、これは、VEGFR2の細胞外ドメインに結合することによって、VEGFR2とVEGF Aとの相互作用を遮断する。更なる抗VEGFR2抗体は、米国特許第7,498,414号、米国特許第6,448,077号、及び米国特許第6,365,157号に記載されている。

40

【0112】

いくつかの実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストは更に、VEGF経路の1つ以上の例示的な小分子アンタゴニスト、例えばスニチニブ、ソラフェニブ、セディナニブ、パゾパニブ、及びニテダニブを含むVEGFR2のマルチキナーゼ阻害剤を含む。

【0113】

2. Ang Tie2 R経路

いくつかの実施形態では、二重特異性アンタゴニストは、少なくとも1つのTie2受容体結合アンタゴニストを含有する標的指向性ドメインを含む。Tie2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニストは、Tie2チロシンキナーゼ受容体又はそのリガンド（即ちAng1、Ang2、Ang3、及びAng4）のうちの1つに結合し、その結合の結果として、そのリガンドのうちの1つ以上によるTie2チロシンキナーゼ受容体の活性

50

化を遮断又は阻害する。VEGFと同様に、アンジオポエチン2 (Ang 2) は腫瘍血管新生において重要な役割を果たす。ANG 2 及びVEGFはまた、連携して、樹状細胞及びマクロファージの抗原提示を防止し、Tregの蓄積を強化し、Teffの蓄積を抑制するように作用する。VEGF及びAng 2の両方を阻害することにより、マウス乳癌モデルTg MMTV PyMTにおける生存が改善されることが既に示されている。更に、抗PD 1を追加すると、応答が更に改善される。

【0114】

本出願で使用するためのTie 2チロシンキナーゼ受容体結合アンタゴニストとしては、単離された形態の、又は融合タンパク質若しくはコンジュゲートの一部としての、抗体断片、ペプチド阻害剤、ドミナントネガティブペプチド、及び小分子薬剤が挙げられる。一実施形態では、Tie 2受容体結合アンタゴニストは、トレバニニブ由来の阻害性ペプチドTBN Pである。ある特定の実施形態では、上記阻害性ペプチドは、アミノ酸配列：AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (配列番号113)を含む。別の実施形態では、Tie 2受容体結合アンタゴニストは配列番号114を含む。

【0115】

本出願で使用するためのTie 2活性化の他のペプチド阻害剤 (Ang 2阻害剤を含む) としては：アミノ酸配列ETFLSTNKLENQ (配列番号123)を含むA 11 (Compugen) ; CVX 060ペプチドQK (Ac) YQPLDEK (Ac) DK (OP) TLYDQFMLQQG (配列番号124、Pfizer) ; CVX 037ペプチド (DFB) TNFMPPMDDLEK (OP) RLYEQFILQQG (配列番号125、Pfizer) ; 及びCGEN 25017 (Compugen) が挙げられる。更なるTie 2活性化のペプチド阻害剤は、米国特許第7, 138, 370号に記載されている。

【0116】

本出願で使用するためのTie 2活性化 (及び/又はアンジオポエチン 2) の抗体阻害剤としては：AMG 780 (Amgen) ; MEDI 3617 (MedImmune / AstraZeneca) ; DX 2240 (Dyax / Sanofi Aventis) ; REGN 910 (Sanofi / Regeneron) ; RG7594 (Roche) ; LC06 (Roche) ; TAvi6 (Roche) ; AT 006 (Roche / Affitech) が挙げられる。更なるTie 2受容体結合抗体アンタゴニスト、及びこれに由来する抗体結合配列は、米国特許第7, 521, 053号、米国特許第7, 658, 924号、及び米国特許第8, 030, 025号、並びに米国特許出願公開第2013/0078248号、米国特許出願公開第2013/0259859号、及び米国特許出願公開第2015/0197578号に記載されている。

【0117】

本出願で使用するためのTie 2結合アンタゴニストとしては更に、小分子分子阻害剤であるCGI 1842 (CGI Pharmaceuticals) 、LP 590 (Locus Pharmaceuticals) 、ACTB 1003 (Act Bio tech / Bayer AG) 、CEP 11981 (Cephalon / Teva) 、MGCD265 (Methylgene) 、レゴラフェニブ (Bayer) 、カボザンチニブ / XL 184 / BMS 907351 (Exelixis) 、フォレチニブ (Exelixis) 、MGCD 265 (MethylGene Inc.) が挙げられる。

【0118】

特定の実施形態では、二重特異性チェックポイント調節因子アンタゴニストは、その2つの結合アームのうち的一方 (1対のHC / LC) においてヒトPD 1又はPD L1に結合し、その第2のアーム (異なる1対のHC / LC) において異なる抗原 (又はエピトープ) に結合する、全長抗体である。これらの実施形態では、二重特異性抗体は、(特異性及びCDR配列の両方において) 別個のものである2つの抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して1価である。

【0119】

いくつかの実施形態では、二重特異性チェックポイント調節因子アンタゴニストは、そ

10

20

30

40

50

の2つの結合アーム(1対のHC/LC)それぞれにおいてヒトPD 1及び/又はPD L 1に結合できる、全長抗体である。これらの実施形態では、二重特異性チェックポイント調節因子アンタゴニストは、同一の特異性及び同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して2価である。

【0120】

免疫グロブリン及び非免疫グロブリン足場

本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、本明細書に記載されているように、免疫グロブリンバックボーン又は非免疫グロブリン足場を用いて構築できる。いくつかの実施形態では、本出願の二重特異性アンタゴニストは、CH1、CH2、及び/又はCH3ドメインを含む、IgG1、IgG2、又はIgG4足場等の免疫グロブリン足場を用いて構築される。IgG1バックボーンの使用は癌治療に好ましく、この場合標的は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性(ADCC)を仲介できる抗原提示細胞上に存在する。IgG4バックボーンを使用すると、抗原結合のみで所望の治療的利益を十分に生成できる場合に、抗原を標的化できる。IgG4系アンタゴニストは、例えばIgG1抗体に関連する、FcR結合及び補体活性化を含む望ましくないエフェクタ機能を排除する。

10

【0121】

好ましくは、第1及び第2の標的指向性ドメインは、ヒト化IgG1又はIgG4足場で提示される。更に、第2の標的指向性ドメインは、IgG1又はIgG4足場のカルボキシ末端に融合できる。更に、IgG1又はIgG4足場は、N297A又はK447Aアミノ酸置換を有してよい。いくつかの実施形態では、第1の標的指向性ドメインは、E1Q、E6Q、L11V、Q13K、L18V、R19K、A23K、又はこれらのいずれの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換を含む、1つ以上のフレームワーク領域を含んでよい。他の実施形態では、IgG1又はIgG4足場の1つ以上のアミノ酸残基を脱グリコシル化又は変異させて、その非グリコシル化多様体を生成する。本明細書に記載の二重特異性分子で使用するための例示的な免疫グロブリン足場は、配列番号103、104、105、115~122、及び127~129からなる群から選択してよい。

20

【0122】

抗体又はアンタゴニストのうちのいずれの1つは、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、scFv、又は多重特異性アンタゴニストの形態とすることができる。更に、本明細書に記載の抗体アンタゴニストのいずれは、PD 1、PD L 1、VEGF、VEGFR、アンジオポエチン、及び/又はTie2Rを標的とする多重結合特異性を有することができる。更に、抗体アンタゴニストのいずれは、所与の標的中の複数のエピトープを標的とするように操作されていてよい。更に、いくつかの実施形態では、チェックポイントアンタゴニスト及び/又は血管新生特異性が、対応する受容体に由来する細胞外ドメイン(ECD)等のドミナントネガティブ融合タンパク質の形態で含まれていてよい。

30

【0123】

本明細書に記載のHCVR及びLCVRは、自然に発生するFc領域、あるいは自然に発生しない若しくは変異したFc領域、例えばエフェクタ機能を有しない若しくはほとんど有しないFc(例えばヒトIgG2若しくはIgG4)、又は腫瘍環境下でのTreg枯渴を強化するために1つ以上の活性化Fc受容体(FcRI、FcRIIa若しくはFcRIIIa)への結合が強化されたFcに結合され得る。従って特定の実施形態では、本明細書に記載の抗PD 1、抗PD L 1、及び/又は抗VEGF HCVR及びLCVRは、典型的には血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、及び/又は抗原依存性細胞傷害性といった抗体の1つ以上の機能的特性を変化させるために、1つ以上の修飾を含むFcに結合され得る。更に、本明細書に記載の抗体は、抗体の1つ以上の機能的特性を変化させるために、化学的に修飾されていてよく(例えば1つ以上の化学的部分を抗体に付着させることができ)、又はそのグリコシル化を変化させるように修飾されていてよい。より具体的には、特定の実施形態では、本出願の抗体は、Fc領域に修飾を含んで

40

50

よく、これにより、親 F c と比較して、(a) 抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (A D C C) が上昇若しくは低下し、(b) 補体介在性細胞傷害性 (C D C) が上昇若しくは低下し、(c) C 1 q に対する親和性が上昇若しくは低下し、及び / 又は (d) F c 受容体に対する親和性が上昇若しくは低下した、F c 多様体が生成される。このような F c 領域多様体は一般に、F c 領域に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含むことになる。複数のアミノ酸修飾を組み合わせることは、特に望ましいものと考えられる。例えば多様体 F c 領域はその中に、例えば本明細書中で同定されている特定の F c 領域の位置の、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ等の置換を含んでよい。

【 0 1 2 4 】

エフェクタ機能が完全に回避されるべき用途、例えば所望の治療的利益の生成には抗原結合だけで十分であり、エフェクタ機能が望ましくない副作用をもたらす (又はそのリスクを上昇させる) だけである場合に関しては、I g G 4 抗体を使用してよく、又は F c 領域若しくはその実質的な部分を欠いた抗体若しくは断片を考慮することができ、又は F c を変異させてグリコシル化 (例えば N 2 9 7 A) を完全に排除してよい。あるいは、エフェクタ機能を欠き、F c R (I g G 2 等) に結合して補体 (I g G 4 等) を活性化する能力を欠いた、ヒト I g G 2 (C H 1 ドメイン及びヒンジ領域) とヒト I g G 4 (C H 2 及び C H 3 ドメイン) とのハイブリッド構築物を生成してよい。I g G 4 定常ドメインを使用する場合、置換 S 2 2 8 P を含むことが好ましい場合が多く、これは、I g G 1 のヒンジ配列を模倣することによって I g G 4 分子を安定させ、治療用抗体と、治療を受ける患者の内因性 I g G 4 との間での、F a b アームの交換を減少させる。

【 0 1 2 5 】

特定の実施形態では、抗 P D 1、抗 P D L 1、抗 V E G F、抗アンジオポエチン、及び / 又は抗 T i e 2 R 抗体、又はこれらの断片を修飾することによって、その生物学的半減期を増大させてよい。例えば F c R n に対する F c 領域の結合親和性を上昇させるアプローチを含む、様々なアプローチを採用できる。一実施形態では、米国特許第 5, 8 6 9, 0 4 6 号、及び米国特許第 6, 1 2 1, 0 2 2 号に記載されているように、I g G の F c 領域の C H 2 ドメインの 2 つのループから得られたサルベージ受容体結合エピートープを含有するように、抗体を C H 1 又は C L 領域内で変化させる。F c 領域内の残基の番号付与は、E U インデックスのものである。本明細書で開示される配列多様体は、残基番号と、これに続く、自然に発生するアミノ酸の代わりとなるアミノ酸とを参照して提供され、必要に応じて、その位置の自然に発生する残基がその前に記載される。所与の位置に複数のアミノ酸が存在し得る場合、例えば配列が自然に発生する複数のアイソタイプ間で異なる場合、又は複数の変異がその位置において置換され得る場合、これらはスラッシュで区切られる (例えば「X / Y / Z」) 。

【 0 1 2 6 】

F c R n への結合を増大させる、及び / 又は薬物動態特性を改善する、例示的な F c 多様体は、2 5 9、3 0 8、及び 4 3 4 位の置換を含み、これらは例えば、2 5 9 I、3 0 8 F、4 2 8 L、4 2 8 M、4 3 4 S、4 3 4 H、4 3 4 F、4 3 4 Y、及び 4 3 4 M を含む。F c R n への F c の結合を増大させる他の多様体としては：2 5 0 E、2 5 0 Q、4 2 8 L、4 2 8 F、2 5 0 Q / 4 2 8 L (H i n t o n e t a l . , 2 0 0 4 , J . B i o l . C h e m . 2 7 9 (8) : 6 2 1 3 - 6 2 1 6、H i n t o n e t a l . 2 0 0 6 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 1 7 6 : 3 4 6 - 3 5 6)、2 5 6 A、2 7 2 A、3 0 5 A、3 0 7 A、3 1 1 A、3 1 2 A、3 7 8 Q、3 8 0 A、3 8 2 A、4 3 4 A (S h i e l d s e t a l . (2 0 0 1) J . B i o l . C h e m . , 2 7 6 (9) : 6 5 9 1 - 6 6 0 4)、2 5 2 F、2 5 2 Y、2 5 2 W、2 5 4 T、2 5 6 Q、2 5 6 E、2 5 6 D、4 3 3 R、4 3 4 F、4 3 4 Y、2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E、4 3 3 K / 4 3 4 F / 4 3 6 H (D a l l ' A c q u a e t a l . (2 0 0 2) J . I m m u n o l . , 1 6 9 : 5 1 7 1 - 5 1 8 0 , D a l l ' A c q u a e t a l . (2 0 0 6) J . B i o l . C h e m . , 2 8 1 : 2 3 5 1 4 - 2 3 5 2 4、及び米国特許第 8, 3 6 7, 8 0 5 号) が挙

げられる。

【0127】

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

10

【0128】

ホモ二量体及びヘテロ二量体

20

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

【0129】

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

30

【0130】

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

40

【0131】

更なるアプローチでは、本出願の二重特異性分子は、ロイシンジッパー(LZ)ドメインを含有する非免疫グロブリン足場を用いて構築してよい。ロイシンジッパーは、典型的には様々な転写因子中のDNA結合ドメインの一部としての、タンパク質中の一般的な3次元構造モチーフである。単一のLZは、典型的には4~5個のロイシン残基をおよそ7残基の間隔で含有し、これは、片側に沿って疎水性領域が延在する両親媒性アルファヘリックスを形成する。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質足場は、c fos 転写因子からのLZに関連する c jun 転写因子からのLZを含む。c jun は、jun jun ホモ二量体を形成することが知られており、c fos はヘテロ二量体を形成しないが、jun fos ホモ二量体の形成は jun jun ヘテロ二量体よりもは

50

るかに好ましい。

【0132】

ロイシンジッパードメインは、タンパク質足場中にCH₂ CH₃配列の代わりに組み込むことができ、又は二重特異性抗腫瘍アンタゴニストの2つの重鎖のカルボキシ末端に配置できる。後者の場合、フリン切断部位をCH₃のカルボキシ末端とロイシンジッパーのアミノ末端との間に導入してよい。これにより、適切な哺乳類細胞発現系において二重特異性抗腫瘍アンタゴニストの重鎖及び軽鎖が同時発現されたときに、ヘテロ二量体化ステップの後に、ロイシンジッパーのフリン仲介型切断を促進できる。(Wraniak et al., J. Biol. Chem., 287(5):43331-43339, 2012を参照)。

10

【表1】

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

20

【0133】

表1のアミノ酸の番号付与は、Kabatt番号付与スキームに従っており、本明細書に記載の抗体の重鎖アミノ酸配列に適用できる。表1に記載の変異は、いずれの免疫グロブリンIgG1重鎖、並びに本明細書中の他の免疫グロブリンクラス及びサブクラス（又はアイソタイプ）の配列（公開されているもの又はそうではないもの）に適用され得る。

30

【0134】

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

【0135】

軽鎖の誤った対合の問題には、複数の方法で対処できる。いくつかの実施形態では、立体的相補性変異及び/又はジスルフィド架橋を2つのVL/VH境界に組み込むことができる。他の実施形態では、変異を、イオン性又は静電的相互作用に基づいて組み込むことができる。いくつかの実施形態では、軽鎖の誤った対合は、重鎖のCH1ドメインのS183E変異と、軽鎖のCLドメインのS176K変異とを伴う第1のアームを採用することによって、防止又は低減できる。第2のアームは、重鎖のCH1ドメインのS183K変異と、軽鎖のCLドメインのS176E変異とを含んでよい。他の実施形態では、「CrossMab」アプローチが採用され、ここでは、二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト中の一方のアーム（例えばFab）は触られないままであるが、他の結合特異性を有する他方のアームでは、軽鎖の1つ以上のドメインが、重鎖：軽鎖の境界において、重鎖の1つ以上のドメインと交換される。

40

50

【0136】

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

【0137】

コンジュゲート

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

10

【0138】

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

20

【0139】

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

30

【0140】

本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストのサイズは、50kD~300kD、50kD~250kD、60kD~250kD、80kD~250kD、100kD~250kD、125kD~250kD、150kD~250kD、60kD~225kD、75kD~225kD、100kD~225kD、125kD~225kD、150kD~225kD、60kD~200kD、75kD~200kD、100kD~200kD、125kD~200kD、150kD~200kD、60kD~150kD、75kD~150kD、100kD~150kD、60kD~125kD、75kD~125kD、75kD~100kD、又は上述の範囲内で挙げられている整数のいずれの組み合わせによって包含されるいずれの範囲、又は上述の範囲のうちのいずれかの間の整数のいずれの組み合わせによって指定されるいずれの範囲内であってよい。

40

【0141】

キット

本出願は更に、本出願のチェックポイント調節因子アンタゴニスト又は抗腫瘍アンタゴニストを含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、上記キットは、少なくとも1

50

つの TGF 経路阻害性ドメインを含有する、1つ以上の二重特異性免疫チェックポイント調節因子を含む。いくつかの実施形態では、上記キットは更に、検出用の二次抗体、及び本明細書に記載の追加のヒト抗体（例えば同一の抗原中の異なるエピトープに結合する、相補的活性を有するヒト抗体等）を内包する。キットは典型的には、キットの内容物の用途を指示する説明書を伴うラベルを含む。用語「ラベル (label)」には、キット上に若しくはキットと共に供給される、又は他の方法でキットに付属している、いずれの記述、又は記録された資料が含まれる。

【0142】

II. 抗腫瘍アンタゴニストの使用法

本出願の抗腫瘍アンタゴニストは、例えば免疫応答の強化、及び癌、感染症、又は自己免疫疾患の治療を含む、多数の試験管内及び生体内利用法を有する。

10

【0143】

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

20

【0144】

いくつかの実施形態では、上述の方法におけるチェックポイント調節因子アンタゴニストは、TGFRII ECD、VEGFR ECD、又はこれら両方と組み合わされた、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、VEGF抗体、VEGFR抗体、又はこれらのいずれの断片である。

【0145】

本明細書に記載の抗体の実施形態のいずれにおいて、抗体は好ましくはヒト抗体又はヒト化抗体である。

30

【0146】

また、サンプル中の標的分子の存在を検出及び/又は測定するための方法も、本出願の範囲に包含され、上記方法は、上記サンプル及び対照サンプルを、標的分子に特異的に結合するその本出願の抗体、抗体断片、又は二重特異性アンタゴニストと、上記アンタゴニストと上記標的分子との間での複合体の形成が可能な条件下で接触させるステップを含む。続いて複合体の形成が検出され、ここでサンプルと対照サンプルとの間での複合体形成の差は、サンプル中の標的分子の存在の指標となる。

【0147】

本出願の抗腫瘍アンタゴニストの、T細胞応答、例えば抗原特異的T細胞応答の阻害又は同時阻害を遮断する能力を考えると、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗体を用いて抗原特異的T細胞応答、例えば抗腫瘍T細胞応答を刺激する、強化する、又は上方制御する、試験管内及び生体内方法である。特定の実施形態では、（膜CD3を発現する細胞との同時インキュベーションによって）CD3刺激も提供され、この刺激は、チェックポイント調節因子アンタゴニストによる治療と同時に、該治療の前に、又は該治療の後に提供できる。例えば本明細書で提供されるのは、抗原特異的T細胞応答を強化する方法であり、上記方法は、上記T細胞を本明細書に記載のチェックポイント調節因子アンタゴニスト、及び任意にCD3と接触させて、例えばチェックポイント調節因子仲介型阻害効果を除去することによって、抗原特異的T細胞応答を強化するステップを含む。抗原

40

50

特異的 T 細胞応答のいずれの好適なインジケータを用いて、抗原特異的 T 細胞応答を測定できる。このような好適なインジケータの非限定的な例としては、抗体の存在下での T 細胞増殖の増大、及び / 又は抗体の存在下でのサイトカイン産生の増大が挙げられる。ある好ましい実施形態では、抗原特異的 T 細胞によるインターロイキン 2 及び / 又はインターフェロン 産生が強化される。

【0148】

本出願に更に包含されるのは、被験者の免疫応答（例えば抗原特異的 T 細胞応答）を強化する方法であって、上記方法は、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを被験者に投与することによって、該被験者の免疫応答（例えば抗原特異的 T 細胞応答）を強化するステップによるものである。ある好ましい実施形態では、被験者は担腫瘍被験者であり、腫瘍に対する免疫応答が強化される。腫瘍は固形腫瘍であっても、液体腫瘍、例えば血液学的悪性腫瘍であってもよい。特定の実施形態では、腫瘍は免疫原性腫瘍である。他の実施形態では、腫瘍は非免疫原性である。特定の実施形態では、腫瘍は P D L 1 陽性である。他の実施形態では、腫瘍は P D L 1 陰性である。被験者は担ウイルス被験者であってもよくこの被験者の体内では、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストの投与の結果として、ウイルスに対する免疫応答が強化される。

10

【0149】

一実施形態では、被験者の体内での腫瘍の成長を阻害するための方法は、上記被験者に、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者の体内で腫瘍の成長を阻害するステップを含む。また、被験者の慢性ウイルス感染を治療する方法も提供され、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者の体内で慢性ウイルス感染を治療するステップを含む。

20

【0150】

また本明細書には、腫瘍、例えば癌性腫瘍を有する被験者の腫瘍微小環境から、T_{r e g} 細胞を枯渇させるための方法も包含され、上記方法は、上記被験者に、腫瘍微小環境中の T_{r e g} 細胞の枯渇を刺激する F c を含む、治療有効量の、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む。F c は例えば、エフェクタ機能又は強化されたエフェクタ機能を有する、例えば 1 つ以上の活性化 F c 受容体に結合するか又はこのような結合が強化されている、F c であってよい。

30

【0151】

ある好ましい実施形態では、T_{r e g} 枯渇は、腫瘍微小環境における T_{e f f} の大幅な枯渇又は阻害を伴わず、また腫瘍微小環境の外での T_{e f f} 細胞及び T_{r e g} 細胞の大幅な枯渇又は阻害を伴わずに、発生する。特定の実施形態では、被験者は、例えば腫瘍微小環境中において、T_{e f f} 細胞に比べて T_{r e g} 細胞において高いレベルの 1 つ以上のチェックポイント調節因子を有する。特定の実施形態では、二重特異性アンタゴニストは、腫瘍中の T_{r e g}、及び / 又は腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 中の T_{r e g} を枯渇させることができる。例えば C T 2 6 腫瘍モデルでは、(エフェクタ機能を示す) マウス I g G 2 a としてフォーマットされた抗マウス T I G I T 抗体は、T_{r e g} 及び C D 8 + T 細胞の両方を部分的に枯渇させるが、C D 4 + T 細胞を枯渇させることが発見された。これに対応する、マウス I g G 1 D 2 6 5 A としてフォーマットされたエフェクタ機能を有しない抗体又はアンタゴニストは、T 細胞を枯渇させなかった。

40

【0152】

特定の実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、補助療法として被験者に投与される。本出願による二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いた癌患者の治療は、現在の標準的な治療と比較して長期間持続する反応、少なくとも 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、10 年、又はそれ以上の長期生存、少なくとも 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、若しくは 10 年、又はそれ以上の無再発生存をもたらすことができる。特定の実施形態では、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いた癌患者の治療は、癌の再発を防止するか、又は癌の再発を例えば 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、10 年、若しくはそ

50

れ以上遅延させる。よって、これらのアンタゴニストを用いた治療は、一次治療又は二次治療として使用できる。

【0153】

特定の好ましい実施形態では、被験者は、細胞増殖性疾患又は癌を有する。本明細書で提供されるのは、癌を有する被験者を治療するための方法であって、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者を治療する、例えば癌性腫瘍の成長を阻害若しくは低減する、及び／又は癌を退縮させるステップを含む。本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、単独で使用して癌性腫瘍の成長を阻害できる。あるいは、これらの抗腫瘍アンタゴニストのうちのいずれを、別の作用剤、例えばこれ以降に記載される他の抗癌標的、免疫原性剤、標準的な癌治療、又は他の抗体と組み合わせて使用できる。

10

【0154】

従って、本明細書で提供されるのは、例えば腫瘍細胞の成長を阻害することによって、被験者の体内の癌を治療する方法であり、上記方法は、上記被験者に、本明細書に記載の治療有効量の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与するステップを含む。好ましくは、抗体はヒト又はヒト化免疫グロブリン配列を含有する。

【0155】

本発明の抗体を用いて成長を阻害できる癌としては、免疫療法に典型的な応答を示す癌が挙げられる。治療対象の癌の非限定的な例としては、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平上皮非小細胞肺癌 (NSCLC)、非NSCLC、神経膠腫、胃腸癌、腎臓癌 (renal cancer) (例えば淡明細胞癌)、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌 (kidney cancer) (例えば腎細胞癌 (RCC))、前立腺癌 (例えばホルモン不応性前立腺癌)、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、膠芽腫 (多形膠芽腫)、子宮頸癌、胃癌 (stomach cancer)、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、及び頭頸部癌 (又は癌腫)、胃癌 (gastric cancer)、胚細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫 (例えば転移性悪性黒色腫、例えば皮膚又は眼内悪性黒色腫)、骨癌、皮膚癌、子宮癌、肛門領域の癌、精巣癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、軟組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、小児期の固形腫瘍、尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系 (CNS) の新生物、中枢神経系原発リンパ腫、腫瘍血管新生、脊椎軸腫瘍、脳幹部神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮嚢癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境誘発型癌、ウイルス関連癌 (例えばヒトパピローマウイルス (HPV) 関連腫瘍)、並びに2つの主要な血球系統のいずれか、即ち (顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージ、及び肥満細胞を産生する) 骨髄細胞株又は (B、T、NK、及び形質細胞を産生する) リンパ系細胞株に由来する血液悪性腫瘍、例えばあらゆるタイプの白血病、リンパ腫、及び骨髄腫、例えば急性、慢性、リンパ性及び／又は骨髄性白血病、例えば急性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、及び慢性骨髄性白血病 (CML)、未分化AML (MO)、骨髄芽球性白血病 (M1)、骨髄芽球性白血病 (M2; 細胞成熟を伴う)、前骨髄球性白血病 (M3、又はM3多様体 [M3V])、骨髄単球性白血病 (M4、又は好酸球増加症を伴うM4多様体 [M4E])、単球性白血病 (M5)、赤白血病 (M6)、巨核芽球性白血病 (M7)、限局顆粒球性肉腫、及び緑色腫; リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫 (HL)、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、単球様B細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ組織 (MALT) リンパ腫、未分化 (例えばKi1+) 大細胞リンパ腫、成人T細胞リンパ腫 / 白血病、マンツル細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、腸管T細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、Tリンパ芽球性; 及びリンパ腫 / 白血病 (T Lbly / T ALL)、末梢T細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、臓器移植後リンパ増殖性疾患、真の組織球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫 (L

20

30

40

50

B L)、リンパ系の造血器腫瘍、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性組織球性リンパ腫(DHL)、免疫芽球性大細胞リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫(CTLC)(菌状息肉症又はセザリー症候群とも呼ばれる)、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症を伴うリンパ形質細胞性リンパ腫(LPL); 骨髄腫、例えばIgG骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌型骨髄腫、くすぶり型骨髄腫(無症候性骨髄腫とも呼ばれる)、孤立性形質細胞腫、及び多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリー細胞リンパ腫; 骨髄系の造血器腫瘍、間葉系起源の腫瘍(線維肉腫及び横紋筋肉腫を含む); 精上皮腫、奇形癌腫、中枢及び末梢神経の腫瘍(星状細胞腫、神経鞘腫を含む); 間葉系起源の腫瘍(線維肉腫、横紋筋肉腫、及び骨肉腫を含む); 並びに他の腫瘍(黒色腫、色素性乾皮症、ケラトアカントーマ、精上皮腫、甲状腺濾胞癌、及び奇形癌腫を含む)、リンパ系の造血器腫瘍、例えばT細胞及びB細胞腫瘍(限定するものではないが、小細胞及び大脳様細胞型のものを含むT前リンパ球性白血病(TPLL)等のT細胞障害を含む); 好ましくはT細胞型の、大顆粒リンパ球性白血病(LGL); a / d T NHL肝脾リンパ腫; 末梢性 / 成熟T細胞リンパ腫(多形性及び免疫芽球性サブタイプ); 血管中心性(鼻)T細胞リンパ腫; 頭頸部の癌、腎臓癌(renal cancer)、直腸癌、甲状腺の癌; 急性骨髄性リンパ腫、並びに以上の癌のいずれの組み合わせが挙げられる。本明細書に記載の方法は、転移性癌、難治性癌(例えば、例えば遮断CTLA 4又はPD 1抗体を用いた過去の免疫療法に対して、抵抗性を有する癌)、及び再発癌の治療にも使用してよい。

10

20

【0156】

本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、単独で、別の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせ、又は別の抗腫瘍アンタゴニストと同時に投与できる。あるいは、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストもまた、免疫原性剤、例えば癌性細胞、腫瘍ワクチン、精製腫瘍抗原(組換えタンパク質、ペプチド、及び炭水化物分子を含む)、癌ワクチン戦略において免疫刺激性サイトカインをエンコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞(He et al. (2004) J. Immunol. 173: 4919-28)、又は腫瘍溶解性ウイルスと、組み合わせ、又は同時に投与できる。

【0157】

腫瘍に対するワクチン接種のための多数の実験的戦略が考案されている。これらの戦略のうちの1つでは、ワクチンは、自家腫瘍又は同種異系腫瘍細胞を用いて調製される。これらの細胞ワクチンのいくつかは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するように形質導入される場合に、最も効果的であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている(Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 3539-43)。前臨床モデルにおいて、癌ワクチンは、腫瘍内へのエフェクタT細胞浸潤を強化することが示されている。癌ワクチンの主要なタイプとしては、ペプチドワクチン、ベクターベースの抗原特異的ワクチン、全細胞ワクチン、及び樹状細胞ワクチンが挙げられる。全てのワクチンベースの療法は、単一又は複数の抗原性エピトープ又は抗原を、全細胞から患者に送達して、腫瘍特異的エフェクタT細胞を誘導するように設計されている。よって、ワクチンベースの療法は、腫瘍へのT細胞浸潤を誘発するための最も効率的な方法である可能性がある。

30

40

【0158】

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

【0159】

50

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

10

【0160】

腫瘍ワクチンの非限定的な例としては、転移性前立腺癌のためのFDA認可済み腫瘍ワクチンであるシプリューセル T (Provenge (登録商標))；顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) を発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞、例えば全細胞 GM-CSF 分泌性被照射同種異系膵臓癌ワクチン (GVAX; Johns Hopkins)；乳癌抗原、neu、レグマイン、及びカテニンに由来する免疫原性ペプチドからなるマルチペプチドワクチン (これを抗 PD-1 抗体と組み合わせて投与すると、担乳がんマウスの、ワクチンによって誘発される無進行生存が延長された (Karyampudi L. et al. (2014) Cancer Res 74: 2974-2985))；黒色腫抗原のペプチド、例えば gp100、MAGE 抗原、Trp2、MART1 及び/又はチロシナーゼのペプチドが挙げられる。他の腫瘍ワクチンとしては、ヒトの癌に関与するウイルスからのタンパク質が挙げられ、上記ウイルスは例えば：ヒトパピローマウイルス (HPV) (例えば Gardasil (登録商標)、Gardasil 9 (登録商標)、及び Cervarix (登録商標))；B型肝炎ウイルス (例えば Engerix B 及び Recombivax HB)；C型肝炎ウイルス (HCV)；カポジ肉腫関連ヘルペス肉腫ウイルス (KSHV) である。TIGIT 阻害と組み合わせて使用できる別の形態の腫瘍特異的抗原は、腫瘍組織自体から単離された精製済み熱ショックタンパク質 (HSP) である。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞由来のタンパク質の断片を含有し、これらの HSP は、腫瘍免疫を誘発するための抗原提示細胞への送達において非常に効率的である。タリモジーン・ラハーバレブベック (T-VEC、又は Imlygic (登録商標)) は、手術で除去できない転移性黒色腫を有する一部の患者の治療のための、FDA 認可済みの腫瘍溶解性ウイルスである。

20

30

【0161】

樹状細胞 (DC) は、抗原特異的応答のプライミングに使用できる、強力な抗原提示細胞である。DC を生体外で生成して、様々なタンパク質及びペプチド抗原、並びに腫瘍細胞抽出物を担持させることができる (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332)。また、DC を、これらの腫瘍抗原を発現するように、遺伝的手段で形質導入することもできる。また DC は、免疫化を目的として、腫瘍細胞に直接融合されている (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6: 332-336)。ワクチン接種の方法として、DC 免疫化をチェックポイント調節因子遮断と効果的に組み合わせることにより、より強力な抗腫瘍応答を活性化する (引き出す) ことができる。

40

【0162】

チェックポイント調節因子経路、TGF 経路、及び/又は血管新生経路の阻害は、標準的な癌治療 (例えば手術、放射線、及び化学療法) と組み合わせることもできる。特にチェックポイント調節因子阻害は、化学療法レジメンと効果的に組み合わせることができる。これらの例では、投与される化学療法試薬の用量を削減できる可能性がある (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304)。このような組み合わせの例は、黒色腫の治療のための抗腫瘍アンタゴ

50

ニストとダカルバジンとの組み合わせである。このような組み合わせの別の例は、黒色腫の治療のためのチェックポイント調節因子アンタゴニスト又は抗腫瘍アンタゴニストとインターロイキン 2 (IL 2) との組み合わせである。例えば、チェックポイント調節因子阻害、TGF β 1 / TGF β 1 RII 阻害、及び / 又は血管新生阻害と、化学療法とを組み合わせることによって、大半の化学療法用化合物の細胞傷害作用と、それによる抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルの上昇とにより、細胞死を促進できる。細胞死によるチェックポイント調節因子阻害、TGF β 1 / TGF β 1 RII 阻害、及び / 又は血管新生阻害との相乗効果をもたらすことができる他の併用療法は、放射線、手術、及びホルモン抑制である。これらのプロトコルはそれぞれ、宿主の腫瘍抗原のソースを生成する。

10

【0163】

本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、Fc 又はFc 受容体発現性エフェクタ細胞を腫瘍細胞に対して標的化するように構築してもよい (例えば米国特許第5,922,845号、及び米国特許第5,837,243号を参照)。例えば、抗Fc受容体 / 抗腫瘍抗原 (例えばHer 2/neu) 二重特異性抗体は、マクロファージを腫瘍の複数の部位に対して標的化するために使用されている。このタイプの標的化を、本実施形態に適合させることにより、腫瘍特異的応答をより効果的に活性化できる。これらの応答のT細胞アームは、本明細書に記載の1つ以上のチェックポイント調節因子アンタゴニストの阻害によって増強されることになる。あるいは、腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体と、樹状細胞特異的細胞表面マーカーとを使用することによって、抗原をDCに直接送達できる。

20

【0164】

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

【0165】

宿主の免疫応答性を活性化する他の抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせ使用できる。これらには、DC機能及び抗原提示を活性化する、樹状細胞の表面上の分子が含まれる。抗CD40抗体は、T細胞ヘルパー活性を効果的に代替でき (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478)、本明細書に記載の二重特異性アンタゴニストと組み合わせ使用できる。OX40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169)、CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997)、及びICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266) といったT細胞共刺激分子に対する活性化抗体も、T細胞活性化のレベルの上昇を提供できる。更に、これ以降で更に説明されるように、他の免疫チェックポイント調節因子の阻害剤も、本明細書に記載の他の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせ使用してよい。

30

40

【0166】

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

【0167】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストを、感染性疾患、特に慢性感染を有する被験者に投与してよい。この場合、癌への応用と同様に、抗体仲介型チェックポイント調節因子阻害を単独で、又はアジュバントとしてワクチンと組み合わせ使用して、病原体、毒素、及び自己抗原に対する免疫応答性を強化できる。この治療アプロ

50

ーチを適用できる例示的な病原体としては、限定するものではないが、H I V、肝炎（A、B、及びC）、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌、及び緑膿菌が挙げられる。チェックポイント調節因子阻害、T G F 1 / T G F 1 R I I 阻害、及びノ又は血管新生阻害は、感染の経過にわたって新規の又は変化した抗原を提示するH I V等の病原体による、確立された感染に対して、特に有用である。二重特異性抗腫瘍アンタゴニストの投与により、これらの抗原を外来性として認識させることで、適切なT細胞応答を誘発できる。

【0168】

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

【0169】

本明細書に記載の方法によって治療可能であり得る、例示的な病原性細菌又はそれらによって引き起こされる疾患としては、クラミジア、リケッチア、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ属、プロテウス属、セラチア属、シュドモナス属、レジオネラ菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、桿菌、コレラ菌、レプトスピラ症、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽、ペスト、及びライム病が挙げられる。

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

上述の方法の全てにおいて、チェックポイント調節因子阻害、T G F 1 / T G F 1 R I I 阻害、及びノ又は血管新生阻害を、サイトカイン治療（例えばインターフェロン、G M C S F、G C S F、I L 2）、又は2つの異なる結合特異性を用いる二重特異性抗体療法といった、他の形態の免疫療法と組み合わせることにより、腫瘍抗原の提示の強化を提供できる。

【0173】

本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、これらの抗体のうちのいずれか1つ以上と、関心対象の抗原（例えばワクチン）との同時投与によって、抗原特異的免疫応答を強化するために使用できる。従って、本明細書で提供されるのは、被験者の体内での抗原に対する免疫応答を強化する方法であって、上記方法は、上記被験者に：（i）上

10

20

30

40

50

記抗原；及び（i i）二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを投与することによって、上記被験者の体内での上記抗原に対する免疫応答を強化するステップを含む。上記抗原は例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、又は病原体由来の抗原とすることができる。このような抗原の非限定的な例としては、上述のセクションに記載したもの、例えば上述の腫瘍抗原（若しくは腫瘍ワクチン）、又は上述のウイルス、細菌、若しくは他の病原体由来の抗原が挙げられる。

【0174】

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

10

【0175】

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

【0176】

併用療法

別の態様では、本出願は、被験者の体内での抗原特異的T細胞応答を強化するための併用療法を提供する。一実施形態では、上記方法は、T細胞を、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストと、第2の抗体、抗体断片、アンタゴニスト、又は薬剤との組み合わせと接触させることによって、抗原特異的T細胞応答又はアポトーシス経路を強化するステップを含む。例えばいくつかの実施形態では、第1の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、PD-1又はPD-L1等の第1のチェックポイント調節因子に特異的に結合し、第2の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、異なるチェックポイント調節因子又は異なるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第2の抗体又は抗体断片は、PD-1及び／又はPD-L1由来の1つ以上の異なるHCVR、LCVR、又は1つ以上のCDRを含む。

20

【0177】

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

30

【0178】

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

【0179】

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

【0180】

40

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

50

【0181】

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

10

【0182】

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

20

【0183】

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

30

40

50

【0184】

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

10

【0185】

従って一実施形態では、被験者の体内での免疫応答を刺激する方法は、上記被験者に、本明細書に記載の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを、本明細書中で上述されている別の免疫チェックポイント調節因子と組み合わせて投与することによって、上記被験者の体内において免疫応答を刺激して、例えば腫瘍成長を阻害するか、又は抗ウイルス応答を刺激する、ステップを含む。特に、1つ以上の上記二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、別個のアンタゴニストとして、又は複数の産物に対する結合特異性を有する多重特異性アンタゴニストとして、投与できる。

【0186】

いくつかの実施形態では、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、免疫応答を刺激するために：(i) T細胞活性化を阻害するIgSFファミリータンパク質、B7ファミリー、若しくはTNFファミリーのアンタゴニスト、若しくはT細胞の活性化を阻害するサイトカイン(例えばIL6、IL10、TGF、VEGF、若しくは他の免疫抑制性サイトカイン)のアンタゴニスト；及び/又は(ii)免疫応答を刺激するために、T細胞活性化を刺激するための、IgSFファミリー、B7ファミリー、若しくはTNFファミリー、若しくはサイトカインの刺激性受容体のアゴニストと組み合わせることができる。他の実施形態では、被験者には、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを抗CTLA4抗体又はCTLA4アンタゴニストと組み合わせて投与する。本出願に従って使用するための例示的な抗CTLA4抗体としては、イピリムマブ、トレビリズマブ、及びトレメリムマブが挙げられる。

20

30

【0187】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント調節因子のリガンドの高発現を示す癌を有する被験者に、異なるチェックポイント調節因子アンタゴニストを標的とする二重特異性アンタゴニストを投与してよい。例えば一実施形態では、PVR(CD155)及び/若しくはネクチン2(CD112)の高発現、並びに/又はPD1の低発現を示す癌を有する被験者は、本出願の抗TIGIT若しくは抗LAG3抗体、若しくはその断片のみを用いた単剤療法、又はPD1アンタゴニスト若しくは他の免疫チェックポイント調節因子を用いた併用療法のために選択できる。本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、免疫応答及び/又はアポトーシスを刺激するのに有効な1つ以上の量の、いずれの1つ以上の更なる作用剤、例えば抗体、アンタゴニスト、又は薬剤と、同時投与してよく、これにより、被験者の体内での免疫応答及び/又はアポトーシスが更に強化される、刺激される、又は上方制御される。

40

【0188】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、異なる抗腫瘍アンタゴニストを用いた治療の後に投与される。例えばいくつかの実施形態では、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストは、単一特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いた治療が失敗した後；治療応答が不完全となった後；又は腫瘍の再発若しくは再燃があった(例えば「PD1失敗」となった)後でのみ、投与され得る。いくつかの実施形態では、このような失敗を示す癌を、例えばPVR及び/又はネクチン2の発現に関してスクリーニングし、高レベルの発現を有するものだけを、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストを用いて

50

治療する。

【0189】

特定の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストは、免疫チェックポイント調節因子のドミナントネガティブタンパク質ドメインを含む。特定の実施形態では、ドミナントネガティブタンパク質は、PD L1、PD L2、PD 1、B7 1、B7 2、B7 H3、CTLA 4、LAG 3、TIM 3、TIGIT、BTLA、VISTA、CD70、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーに由来する、細胞外ドメインを含む。特定の実施形態では、これらの細胞外ドメインは、本明細書に記載の抗体の免疫グロブリン定常領域又はFc受容体に融合する。このような変異体は、内因性受容体に結合でき、これにより、シグナル伝達が不足した複合体が形成される。特定の実施形態では、細胞外ドメインは、免疫グロブリン定常領域若しくはFc断片、又はオリゴマータンパク質複合体中のモノマーに融合する。

10

【0190】

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

20

【0191】

例示的な免疫チェックポイント調節因子アゴニストとしては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーのメンバー、例えばCD27、CD40、OX40、GITR、及び4 1BB(CD137)、並びにこれらのリガンド、又はCD28及びICOS(CD278)を含むB7 CD28スーパーファミリーのメンバーが挙げられる。更なるチェックポイント調節因子アゴニストとしては、CD2、CD5、ICAM 1、LFA 1(CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160、B7 H3、CD83リガンドが挙げられる。免疫チェックポイントアゴニストとしては、1つ以上の共刺激ドメインを含む抗体又は可溶性融合タンパク質アゴニストが挙げられる。アゴニスト抗体としては、限定するものではないが：抗CD40 mAb、例えばCP 870、893、ルカツマブ、及びダセツズマブ；抗CD137 mAb、例えばBMS 663513ウレルマブ、及びPF 05082566；抗OX40 mAb；抗GITR mAb、例えばTRX518；抗CD27 mAb、例えばCDX 1127；並びに抗ICOS mAbが挙げられる。

30

【0192】

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

40

【0193】

50

共刺激又は共阻害性受容体に結合する別の膜結合型リガンドのファミリーは、コグネイトTNF受容体ファミリーメンバーに結合する分子のTNFファミリーであり、これは、CD40及びCD40L、OX40、OX40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、41BBL、CD137/41BB、TRAIL/Apo2L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT α R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEG1/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンフォトキシン β /TNF β 、TNFR2、TNF α 、LT α R、リンフォトキシン α 1(32、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR(例えばTansey, M. G. et al. (2009) Drug Discovery Today, 14(23-24):1082-1088を参照)を含む。

【0194】

免疫チェックポイントアゴニスト、又は共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体以外の細胞表面分子又はそのリガンドを含み、限定するものではないが、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM1、LFA1(CD11a/CD18)、41BB(CD137)、B7H3、CDS、ICAM1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCEND/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTBA、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP76、PAG/Cbp、CD19a、及びCD83に特異的に結合するリガンドを含む。

【0195】

一態様では、T細胞応答は、本発明の抗PD1、又は抗PD1 mAbと、(i) T細胞活性化を阻害するタンパク質のアнтаゴニスト(例えば免疫チェックポイント阻害剤)、例えばCTLA4、PD1、PD1L、PD1L2、LAG3、TIM3、ガレクチン9、CEACAM1、BTLA、CD69、ガレクチン1、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM1、CD96、及びTIM4、並びに(ii) T細胞活性化を刺激するタンパク質のアゴニスト、例えばB71、B72、CD28、41BB(CD137)、41BBL、ICOS、CD40、ICOSL、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3、及びCD28Hのうちの1つ以上との組み合わせによって、刺激できる。

【0196】

上述のタンパク質のうちの1つを調節する例示的な作用剤を、癌治療のために本出願の抗PD1抗体又は抗PD1L抗体と組み合わせることができ、上記作用剤としては例

例えば、(CTLA 4 に対する) Y E R V O Y (商標) / イピリムマブ又はトレメリムマブ、(B7 . 1 に対する) ガリキシマブ、(PD 1 に対する) O P D I V O (商標) / ニボルマブ / B M S 9 3 6 5 5 8、(PD 1 に対する) ビジリズマブ / C T 0 1 1、(PD 1 に対する) K E Y T R U D A (商標) / ペンプロリズマブ / M K 3 4 7 5、(B7 DC / PD L 2 に対する) A M P 2 2 4、(B7 H 1 に対する) B M S 9 3 6 5 5 9、(B7 H 1 に対する) M P D L 3 2 8 0 A、(ICOS に対する) M E D I 5 7 0、(B7 H 2 に対する) A M G 5 5 7、(B7 H 3 に対する) M G A 2 7 1、(LAG 3 に対する) I M P 3 2 1、(CD 1 3 7 / 4 1 B B に対する) ウレルマブマブ / B M S 6 6 3 5 1 3 及び P F 0 5 0 8 2 5 6 6、(CD 2 7 に対する) C D X 1 1 2 7、(OX 4 0 に対する) M E D I 6 3 8 3 及び M E D I 6 4 6 9、(OX 4 0 L に対する) R G 7 8 8 8、(T A C I に対する) アタシセプト、(CD 4 0 に対する) C P 8 7 0 8 9 3、(CD 4 0 に対する) ルカツムマブ、(CD 4 0 に対する) ダセツズマブ、(CD 3 に対する) ムロモナブ C D 3 が挙げられる。

【0197】

癌の治療のために本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせることができる他の分子としては、NK細胞の阻害性受容体のアンタゴニスト、又はNK細胞の活性化受容体のアゴニストが挙げられる。例えば、アンタゴニスト抗PD 1 及び / 又は抗PD L 1 抗体を、K I R のアンタゴニスト (例えばリリルマブ)、R G 7 1 5 5 等のC S F 1 R アンタゴニストと組み合わせることができる。

【0198】

腫瘍は、多様な機序によって宿主の免疫監視を回避する。これらの機序の多くは、腫瘍が発現する免疫抑制タンパク質の不活性化によって克服される可能性がある。これらには特に、T G F、I L 1 0、及びF a s リガンドが含まれる。これらの実体それぞれに対する抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用することにより、免疫抑制剤の効果を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進できる。

【0199】

宿主の免疫応答性を活性化する他の抗体を、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用できる。これらには、DC機能及び抗原提示を活性化する、樹状細胞の表面上の分子が含まれる。抗CD 4 0 抗体は、T細胞ヘルパー活性を効果的に代替でき、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストと組み合わせて使用できる。OX 4 0、CD 1 3 7 / 4 1 B B、及びI C O S といったT細胞共刺激分子に対する活性化抗体も、T細胞活性化のレベルの上昇を提供できる。

【0200】

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

【0201】

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

【0202】

本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニストは、抗癌剤、例えば：アルキル化剤；アントラサイクリン抗生物質；代謝拮抗剤；解毒剤；インターフェロン；ポリクローナル若しくはモノクローナル抗体；E G F R 阻害剤；H E R 2 阻害剤；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；ホルモン；有糸分裂阻害剤；ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (P I 3 K

10

20

30

40

50

）阻害剤；Akt阻害剤；哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR）阻害剤；プロテアソーム阻害剤；ポリ（ADP リボース）ポリメラーゼ（PARP）阻害剤；Ras/MAPK経路阻害剤；中心体クラスター分離剤；マルチキナーゼ阻害剤；セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤；チロシンキナーゼ阻害剤；VEGF/VEGFR阻害剤；タキサン若しくはタキサン誘導体、アロマターゼ阻害剤、アントラサイクリン、微小管標的化剤、トポイソメラーゼ毒型薬剤、分子標的若しくは酵素（例えばキナーゼ若しくはタンパク質メチルトランスフェラーゼ）の阻害剤、シチジン類似体、又はこれらの組み合わせと組み合わせることができる。

【0203】

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

10

【0204】

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

20

【0205】

例示的な代謝拮抗剤としては、限定するものではないが：フルオロウラシル（Atracil）；カペシタピン（Xeloda）；ヒドロキシ尿素（Hydrea）；メルカプトプリン（Purinethol）；ベメトレキセド（Alimta）；フルダラビン（Fludara）；ネララビン（Arranon）；クラドリビン（Cladribine Novaplus）；クロファラビン（Clolar）；シタラビン（Cytosar U）；デシタピン（Dacogen）；シタラビンリボソーム（DepoCyt）；ヒドロキシ尿素（Droxia）；プララトレキサート（Folotyn）；フロクスウリジン（FUDR）；ゲムシタピン（Gemzar）；クラドリビン（Leustatin）；フルダラビン（Oforta）；メトトレキサート（MTX；Rheumatrex）；メトトレキサート（Trexall）；チオグアニン（Tabloid）；TS1又はシタラビン（Tarabine PFS）が挙げられる。

30

【0206】

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

40

【0207】

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

【0208】

例示的なポリクローナル又はモノクローナル抗体としては、限定するものではないが：トラスツズマブ（Herceptin）；オフアツムマブ（Arzerra）；ベバシズマブ（Avastin）；リツキシマブ（Rituxan）；セツキシマブ（Erbib

50

ux) ; パニツムマブ (Vectibix) ; トシツモマブ / ヨウ素 131 トシツモマブ (Bexxar) ; アレムツズマブ (Campath) ; イブリツモマブ (Zevalin ; In 111 ; Y 90 Zevalin) ; ゲムツズマブ (Mylotarg) ; エクリズマブ (Soliris) ; 又はデノスマブが挙げられる。

【0209】

例示的なEGFR阻害剤としては、限定するものではないが：ゲフィチニブ (Iressa) ; ラパチニブ (Tykerb) ; セツキシマブ (Erbix) ; エルロチニブ (Tarceva) ; パニツムマブ (Vectibix) ; PKI 166 ; カネルチニブ (CI 1033) ; マツズマブ (Emd 7200) ; 又はEKB 569が挙げられる。

10

【0210】

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

【0211】

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

【0212】

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

20

30

【0213】

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

【0214】

40

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

【0215】

例示的なAkt阻害剤としては、限定するものではないが、ミルテフォシン、AZD5

50

363、GDC 0068、MK2206、ペリフォシン、RX 0201、PBI 05204、GSK2141795、及びSR13668が挙げられる。

【0216】

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

【0217】

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

【0218】

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

【0219】

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

【0220】

例示的な中心体クラスター分離剤としては、限定するものではないが：グリセオフルビン；ノスカピン、ノスカピン誘導体、例えば臭素化ノスカピン(例えば9 プロモノスカピン)、還元型プロモノスカピン(RBN)、N (3 プロモベンジル)ノスカピン、アミノノスカピン、及びこれらの水溶性誘導体；CW069；フェナントリジン由来ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ阻害剤、PJ 34；N2 (3 ビリジルメチル) 5 ニトロ 2 フラミド、N2 (2 チエニルメチル) 5 ニトロ 2 フラミド、並びにN2 ベンジル 5 ニトロ 2 フラミドが挙げられる。

【0221】

例示的なマルチキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：レゴラフェニブ；ソラフェニブ(Nexavar)；スニチニブ(Sutent)；BI BW2992；E 7080；Zd6474；PKC 412；モテサニブ；又はAP24534が挙げられる。

【0222】

例示的なセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：ルボキシスタウリン；塩酸エリルノースジル；フラボピリドール；セリシクリブ(CYC202；Roscovitrine)；SNS 032(BMS 387032)；Pkc 412；プリオスタチン；KAI 9803；SF1126；VX 680；Azd1152；Arry 142886(AZD 6244)；SCIO 469；GW681323；CC 401；CEP 1347；又はPD332991が挙げられる。

【0223】

例示的なチロシンキナーゼ阻害剤としては、限定するものではないが：エルロチニブ(Tarceva)；ゲフィチニブ(Iressa)；イマチニブ(Gleevec)；ソラフェニブ(Nexavar)；スニチニブ(Sutent)；トラスツズマブ(Herceptin)；ベバシズマブ(Avastin)；リツキシマブ(Rituxan)；

10

20

30

40

50

ラパチニブ (Tykerb) ; セツキシマブ (Erbix) ; パニツムマブ (Vectibix) ; エベロリムス (Afinitor) ; アレムツズマブ (Campath) ; ゲムツズマブ (Mylotarg) ; テニシロリムス (Torisel) ; パゾパニブ (Votrient) ; ダサチニブ (Sprycel) ; ニロチニブ (Tasigna) ; パタラニブ (Pt k 7 8 7 ; Z K 2 2 2 5 8 4) ; CEP 7 0 1 ; SU 5 6 1 4 ; MLN 5 1 8 ; XL 9 9 9 ; VX 3 2 2 ; Azd 0 5 3 0 ; BMS 3 5 4 8 2 5 ; SKI 6 0 6 CP 6 9 0 ; AG 4 9 0 ; WHI P 1 5 4 ; WHI P 1 3 1 ; AC 2 2 0 ; 又は AMG 8 8 8 が挙げられる。

【0224】

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

10

【0225】

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

【0226】

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

20

【0227】

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

【0228】

例示的な一般的化学療法剤、抗新生物剤、抗増殖剤としては、限定するものではないが、アルトレタミン (Hexalen) ; イソトレチノイン (Accutane ; Amnesteam ; Claravis ; Sotret) ; トレチノイン (Vesanoïd) ; アザシチジン (Vidaza) ; ボルテゾミブ (Velcade) ; アスパラギナーゼ (Elspar) ; レバミソール (Ergamisol) ; ミトタン (Lysodren) ; プロカルバジン (Matulane) ; ペガスパルガーゼ (Oncaspar) ; デニロイキンディフチトクス (Ontak) ; ボルフィマー (Photofrin) ; アルデスロイキン (Proleukin) ; レナリドミド (Revlimid) ; ベキサロテン (Targretin) ; サリドマイド (Thalomid) ; テニシロリムス (Torisel) ; 三酸化ヒ素 (Trisenox) ; ベルテボルフィン (Visudyne) ; ミモシン (Leucenol) ; (1 M テガフル 0 . 4 M 5 クロロ 2 , 4 ジヒドロキシピリミジン 1 M カリウムオキシソネート)、又はロバスタチンが挙げられる。

30

【0229】

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

40

【0230】

特定の実施形態では、TGF / TGF R II、チェックポイント調節因子、及び / 又は血管新生経路の阻害を、従来の化学療法レジメンに従って、標準的な癌治療 (例えば手術、放射線、及び化学療法) と組み合わせる。これらの例では、投与される化学療法試薬の用量を削減できる可能性がある。このような組み合わせの例は、黒色腫の治療のための、本出願のチェックポイント調節因子アンタゴニストと、ダカルバジンとの組み合わせである。このような組み合わせの別の例は、黒色腫の治療のための、本出願のチェ

50

ックポイント調節因子アンタゴニストと、インターロイキン 2 (I L 2) との組み合わせである。チェックポイント調節因子阻害と化学療法とを組み合わせることで、アポトーシスを強化でき、また細胞傷害性免疫のための腫瘍抗原提示を増大させることができると考えられる。他の相乗的併用療法としては、放射線、手術、又はホルモン抑制と組み合わせる使用した場合の、細胞死によるチェックポイント調節因子阻害が挙げられる。これらのプロトコルはそれぞれ、宿主の腫瘍抗原のソースを生成する。

【 0 2 3 1 】

特定の実施形態では、本明細書に記載のチェックポイント調節因子アンタゴニストは、多重特異性アンタゴニスト中で、又は F c 若しくは F c 受容体発現性エフェクタ細胞を腫瘍細胞に対して標的化する二重特異性抗体と組み合わせ、使用できる (例えば米国特許第 5, 9 2 2, 8 4 5 号、及び米国特許第 5, 8 3 7, 2 4 3 号を参照)。二重特異性抗体は、2つの別個の抗原を標的とするために使用できる。例えば、抗 F c 受容体 / 抗腫瘍抗原 (例えば H e r 2 / n e u) 二重特異性抗体は、マクロファージを複数の癌細胞又は腫瘍に対して標的化するために使用されている。この標的化により、腫瘍特異的応答をより効果的に活性化できる。これらの応答の T 細胞アームは、チェックポイント調節因子阻害によって増強されることになる。あるいは、腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体と、樹状細胞特異的細胞表面マーカーとを使用することによって、抗原を D C に直接送達できる。

10

【 0 2 3 2 】

I I I . 抗腫瘍アンタゴニストを発現するための核酸及び宿主

20

別の態様では、本出願は、重鎖及び軽鎖を含む本出願の抗腫瘍アンタゴニストをコードする核酸、並びにこのような核酸を含む発現ベクターを提供する。特に、核酸は、本明細書に記載の抗体、アンタゴニスト、又は断片のうちのいずれに対応する 1 つ以上の H C D R、L C D R、H C V R 及び / 又は L C V R をコードする。

【 0 2 3 3 】

従って一態様では、本出願は、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニスト、抗体、又はその抗原結合部分のうちのいずれをコードする、1 つ以上の核酸を提供する。

【 0 2 3 4 】

別の態様では、本出願は、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニスト、抗体、又はその抗原結合部分のうちのいずれをコードする 1 つ以上の核酸を含む、1 つ以上の発現ベクターを提供する。

30

【 0 2 3 5 】

別の態様では、本出願は、本明細書に記載の抗腫瘍アンタゴニスト、抗体、又はその抗原結合部分のうちのいずれをコードする 1 つ以上の核酸を含む 1 つ以上の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を提供する。

【 0 2 3 6 】

抗原結合部位をコードする 1 つ以上の D N A は、従来の手順を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)、ハイブリドーマ細胞で産生されたモノクローナル抗体から単離して配列決定できる。あるいは、関心対象の免疫グロブリンからのアミノ酸配列を、タンパク質の直接の配列決定によって決定でき、好適なコードヌクレオチド配列は、普遍的なコドン表に従って設計できる。他の場合においては、定常領域、ヒンジ領域等を含む、抗原結合部位のヌクレオチド及びアミノ酸配列、又は他の免疫グロブリン配列は、当業者に公知の、公開されているソースから得ることができる。

40

【 0 2 3 7 】

一態様では、本出願の結合アンタゴニスト断片のうちのいずれは、例えば抗体可変ドメイン等に対応する、コドン最適化済み合成 D N A 断片の使用を含んでよい。例えば、免疫グロブリン V H、V L、H C、L C、C H 1、C H 2、C H 3、及び / 又はフレームワーク領域をコードする c D N A 配列を、様々なヒト、霊長類、又は哺乳類細胞、例えば H E K 又は C H O 細胞での発現のために、コドン最適化できる。本発明はまた、本明細書に記

50

載の抗 P D L 1 抗体分子の重鎖及び軽鎖可変領域、C D R、超可変ループ、フレームワーク領域をコードする、一方又は両方の核酸配列を含む、核酸分子を特徴とする。

【0238】

特定の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストをコードする発現ベクターを用いて、本開示の抗腫瘍アンタゴニストを、試験管内の培養細胞中で合成してよく、あるいは上記発現ベクターを患者に直接投与して、生体内又は生体外で抗腫瘍アンタゴニストを発現させてよい。本明細書中で使用される場合、「発現ベクター」は、本開示の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストに対応する1つ以上のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを含む、ウイルス又は非ウイルスベクターであって、抗体の調製を目的として、又は治療剤としての直接投与のために、宿主細胞中で1つ以上の上記ポリヌクレオチドから発現させるのに好適な形態の、ウイルス又は非ウイルスベクターを指す。

10

【0239】

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

20

【0240】

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

30

【0241】

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

40

【0242】

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

【0243】

本明細書中で使用される場合、用語「プロモータ」は、その最も広い文脈において解釈されるべきであり、ゲノム遺伝子由来の転写調節性要素(TRE)、又はそれ由来のキメラTREを含み、これは、正確な転写開始のためのTATAボックス又はイニシエータ要素を含み、またこれは、発達刺激及び/又は外部刺激に応答してそれに作動可能に結合さ

50

れる遺伝子の活性化又は抑制を調節する更なる T R E (即ち上流活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサ、及びサイレンサ)、並びにトランス作用性調節性タンパク質又は核酸を、伴っても伴わなくてもよい。プロモータは、ゲノム断片を含有してよく、又は組み合わせられる 1 つ以上の T R E のキメラを含有してよい。

【0244】

好ましいプロモータは、関心対象の標的細胞中での高レベルの発現を指示できるプロモータである。プロモータとしては、構成的プロモータ(例えば H C M V、S V 4 0、伸長因子 1 (E F 1))、又は関心対象の特定の細胞タイプにおいて優先的な発現を示すプロモータが挙げられる。エンハンサは一般に、転写開始部位から離れて機能する、転写ユニットに対して 5' 又は 3' となることができる D N A 配列を指す。更にエンハンサは、イントロン内及びコード配列内に存在してよい。これらの長さは通常 1 0 ~ 3 0 0 b p であり、シスで機能する。エンハンサは、近隣のプロモータからの転写を増大させる、及び/又は調節するように機能する。好ましいエンハンサは、抗体産生細胞中での高レベルの発現を指示するものである。細胞又は組織特異的転写調節性要素(T R E)は、発現ベクターに組み込むことによって、発現を所望の細胞タイプに制限できる。P o l I I I プロモータ(H 1 又は U 6)は、s i R N A が発現される s h R N A の発現に特に有用である。発現ベクターは、1 つ以上の細胞タイプでの抗腫瘍アンタゴニストの発現を促進するように設計できる。

10

【0245】

特定の実施形態では、1 つ以上の発現ベクターを操作して、抗腫瘍アンタゴニストと、T i e 2 経路、V E G F 経路、又は免疫チェックポイント調節因子を標的とする 1 つ以上の s i R N A との両方を発現させることができる。

20

【0246】

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

30

【0247】

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

40

【0248】

発現ベクターは、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターを含んでよい。ウイルスベクターは、アデノ関連ウイルス(A A V)、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス(H I V 1 及び H I V 2 等のレンチウイルスを含む)、シンドビス及び他の R N A ウイルス、アルファウイルス、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポーウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、トガウイルス等に由来する

50

ものであってよい。非ウイルスベクターは単に、ウイルス由来成分（例えばカプシド及び／又はエンベロープ）でパッケージされていない「裸の」発現ベクターである。

【0249】

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

10

【0250】

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

【0251】

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

20

【0252】

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

30

【0253】

IV. 二重特異性アンタゴニストの製造方法

別の態様では、本出願は、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストをコードする核酸又は発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。宿主細胞は、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト（その免疫グロブリン重鎖及び軽鎖を含む）を発現できるいずれの真核又は原核細胞とすることができる。

【0254】

更なる態様では、抗腫瘍アンタゴニストの製造方法は、好適な細胞で発現されたアンタゴニスト、抗体、又はその断片の産生及び精製が可能な条件下で、本出願の二重特異性抗腫瘍アンタゴニストをコードする1つ以上の核酸又は発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養するステップを含む。

40

【0255】

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

50

するベクターで安定的に形質転換される。

【0256】

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

10

【0257】

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

20

【0258】

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

30

【0259】

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

40

【0260】

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

【0261】

いくつかの実施形態では、上記細胞株は、培養物1リットルあたり、少なくとも1mg

50

、少なくとも2 mg、少なくとも5 mg、少なくとも10 mg、少なくとも20 mg、少なくとも50 mg、少なくとも100 mg、少なくとも200 mg、少なくとも300 mg、少なくとも400 mg、又は少なくとも500 mgの抗体を発現する。

【0262】

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

【0263】

10

V. 医薬組成物及び治療方法

本出願の別の態様は、癌、慢性感染症、又は易感染性疾患状態といった細胞増殖性障害を治療するための、医薬組成物及び方法に関する。一実施形態では、上記医薬組成物は、本出願の1つ以上の抗腫瘍アンタゴニストを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の上記抗腫瘍アンタゴニストは：（1）PD-1阻害剤若しくはPD-L1阻害剤；又は（2）1つ以上の血管新生阻害剤、例えばVEGF阻害剤、VEGFR2阻害剤、アンジオポエチン1/2阻害剤、及びTie2阻害剤と組み合わせられた、1つ以上のTGF

β1阻害剤又はTGFβ1RII阻害剤を含む。1つ以上の上記アンタゴニストは、薬学的に許容可能な担体と共に処方される。本出願の医薬組成物は、本明細書に記載されるように、1つ以上の異なる抗体、1つ以上の多重特異性抗体、1つ以上の免疫複合体、又はこれらの組み合わせを含んでよい。

20

【0264】

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

【0265】

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

30

【0266】

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

40

【0267】

抗腫瘍アンタゴニストは、非経口投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。好適な緩衝剤としては、限定するものではないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、又はリン酸カリウムが挙げられる。塩化ナトリウムは、溶液の毒性を改変するために、0～300 mM（最適には液体剤形に関して150 mM）の濃度で

50

使用できる。凍結乾燥剤形には凍結防止剤、主に0～10%のスクロース（最適には0.5～1.0%）を含めることができる。他の好適な凍結防止剤としては、トレハロース及びラクトースが挙げられる。凍結乾燥剤形には増量剤、主に1～10%のマニトール（最適には2～4%）を含めることができる。安定剤は、液体剤形及び凍結乾燥剤形の両方で使用でき、主に1～50mMのL-メチオニン（任意に5～10mM）である。他の好適な増量剤としては、グリシン、アルギニンが挙げられ、これらは0～0.05%のポリソルベート80（最適には0.005～0.01%）として含めることができる。更なる界面活性剤としては、限定するものではないが、ポリソルベート20及びBRI界面活性剤が挙げられる。

【0268】

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

【0269】

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

【0270】

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

【0271】

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

【0272】

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

10

20

30

40

50

g 体重 / 日、約 100 ng / kg 体重 / 日 ~ 約 1 μg / kg 体重 / 日、約 1 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 mg / kg 体重 / 日、約 1 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 10 mg / kg 体重 / 日、約 1 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 μg / kg 体重 / 日、約 1 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 10 μg / kg 体重 / 日、約 10 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 mg / kg 体重 / 日、約 10 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 1 mg / kg 体重 / 日、約 10 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 μg / kg 体重 / 日、約 100 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 mg / kg 体重 / 日、約 100 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 10 mg / kg 体重 / 日、約 100 μg / kg 体重 / 日 ~ 約 1 mg / kg 体重 / 日、約 1 mg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 mg / kg 体重 / 日、約 1 mg / kg 体重 / 日 ~ 約 10 mg / kg 体重 / 日、約 10 mg / kg 体重 / 日 ~ 約 100 mg / kg 体重 / 日の範囲内で投与される。

10

【0273】

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

【0274】

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

20

30

40

【0275】

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

【0276】

50

特定の実施形態では、抗腫瘍アンタゴニストのコード配列を、細胞増殖性障害を有する患者の体内で有効量の抗腫瘍アンタゴニストを発現するために、好適な発現ベクター（例えばウイルス又は非ウイルスベクター）に組み込む。例えば1つ以上の組換えAAV（rAAV）ウイルスの投与を含む特定の実施形態では、医薬組成物は、1kgあたり少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、少なくとも 10^{13} 、又は少なくとも 10^{14} 個のゲノムコピー（GC）又は組換えウイルス粒子を含む量、又はそのいずれの範囲の量の、rAAVを含んでよい。特定の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、少なくとも 10^{13} 、少なくとも 10^{14} 、少なくとも 10^{15} 個のゲノムコピー又は組換えウイルス粒子を含む量、又はそのいずれの範囲の量の、有効量のrAAV等の組換えウイルスを含む。

10

【0277】

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

【0278】

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

20

【0279】

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

【実施例】

【0280】

実施例1：モノクローナル抗体の生成

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

30

【0281】

実施例2：二重特異性抗腫瘍アンタゴニストの設計

図5A及び5Bは、それぞれ2つの二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、BiPB1（又はBiPLB1）及びBiPB1（又はBiPLB2）を示す。これらのアンタゴニストは、チェックポイント調節因子抗体バックボーン（抗PD1又は抗PD-L1）を：（i）2つの重鎖それぞれのCH3領域のカルボキシ末端に融合した（図5A）；又は（ii）FcループのCH3領域内に挿入された（図5B）、TGFR1細胞外ドメイン（TGFR1ECD）と共に含む。

40

【0282】

図5A及び5Bに示されている実施形態では、二重特異性抗体はIgG1又はIgG4バックボーンを有することができる。更に、抗体特異性のうちのいずれの1つ以上を、他のいずれのチェックポイント調節因子アンタゴニスト特異性、及び/又はいずれの腫瘍標的化抗体特異性、例えばCD20、EGFR等で置き換えてよい。

【0283】

図6は、図5A及び5Bの二重特異性抗体に対応する例示的な機能性ドメイン配列を示す。

50

【0284】

図7A～7Bは、図5A及び5Bに示されている二重特異性抗体に対応する、例示的な重鎖（HC）及び軽鎖（LC）配列を示す。

【0285】

実施例3：更なる二重特異性アンタゴニストの設計

図8A～8Cは、3つの異なる二重特異性アンタゴニスト、Bi AB 1、Bi A 1 B 1、及びBi Z B 1の設計をそれぞれ示し、これらはそれぞれ、変異型IgG 1（K447A）足場にカルボキシ末端TGF 1 RII細胞外ドメイン（ECD）を含む。Bi AB 1及びBi A 1 B 1はいずれも、Avastin/ペバシズマブ由来のアミノ末端抗VEGF可変領域（VH1、VL1）を含有し、Bi A 1 B 1は、VH領域の2つのアミノ酸置換（E6Q、L11V）を含む。Bi Z B 1は、IgG 1 Fc（K447A）領域の上流にアミノ末端アフリベルセプトドメインを含有する。他の実施形態では、変異型IgG 1（K447A）足場の代わりに、二重特異性アンタゴニストは、野生型IgG 1足場、異なる変異型IgG 1足場、IgG 2足場、変異型IgG 2足場、IgG 4足場、又は変異型IgG 4足場を含む。

【0286】

図9A及び9Bは、図8A～8Cに示されている二重特異性アンタゴニスト中に存在する様々な機能性ドメイン配列を示す。

【0287】

図10は、図8A～8Cに示されている二重特異性アンタゴニスト荷対応する重鎖（HC）及び軽鎖（LC）アミノ酸配列を示す。

【0288】

図11は、図8A～8Cに示されている二重特異性アンタゴニストの機能性ドメインの配置をまとめたものである。

【0289】

実施例4：図10～11のアンタゴニストの発現及び精製

図12は、非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によって決定される、HEK293細胞へと一過性トランスフェクションされた場合の、wt VEGF A又は変異型E6Q及びL11V変異を含有するアンタゴニスト（即ちそれぞれBi AB 1及びBi A 1 B 1）の改善された発現レベルを示す、クマシーブルー染色済みポリアクリルアミドゲルである。図12に示されている力価は、POROS Aカラム（Applied Biosystems）を用いて細胞上清を定量することによって決定された。この分析の結果により、Bi A 1 B 1の発現レベルが、Bi AB 1に比べて167%上昇することが示された。

【0290】

図13Aは、タンパク質A精製済みBi AB 1及びBi A 1 B 1から得られた高分子量（HMW）種、低分子量（LMW）種、及び二量体の相対レベルを示す、サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）プロファイルを示す。図13Bは、Tosoh TSK gel UP G3000SWXLカラムを用いてSEC UP LCによって決定されるように、二量体のパーセンテージ（Bi AB 1に関して98.6%；Bi A 1 B 1に関して98.7%）が、HMW種（1%）及びLMW種（0.4%）を大幅に上回ることを示している。これらの結果は、TGF 1 RII細胞外ドメイン（ECD）のBi AB 1及びBi A 1 B 1への融合が、明らかなレベルの高分子量（HMW）種又は低分子量（LMW）種をもたらさなかったことを示す。

【0291】

図14A～14Bは、Bi Z B 1の一過性トランスフェクションの後に得られた上清からの、それぞれ非還元条件及び還元条件下での、クマシーブルー染色済みPAGE分析を示す。この分析の結果により、試験管内での8日間の細胞の成長の後、Bi Z B 1の良好な一過性発現レベル（220 µg/ml）が確認された。

【0292】

10

20

30

40

50

図15は、タンパク質A精製済みBi-ZB1が、高分子量(HMW、3.4%)種及び低分子量(LMW、0.5%)種を、二量体(96.1%)に比べて低いレベルで有することを示す、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)プロファイルを示す。

【0293】

実施例5：図8A～8Cの抗腫瘍アンタゴニストの機能的特性決定

抗VEGFアンタゴニストBi-A1B1の、VEGFR2(即ちコグネイト受容体)のVEGF仲介型活性化に拮抗する能力を評価するために、細胞ベースルシフェラーゼアッセイを実施した。この実験では、NFAT応答要素の制御下でヒトVEGFR2及びホタルルシフェラーゼ構築物を発現する組換えHEK293細胞株を、抗VEGFアンタゴニスト(Bi-A1B1)の段階希釈物の存在下で、huVEGF165を用いて刺激した。このアッセイの結果を図16に示す。予想されたように、抗VEGFアンタゴニストのレベルの上昇により、VEGF165の、VEGFR2を活性化してNFAT仲介型ルシフェラーゼ活性を誘導する能力が、徐々に無効化された。

10

【0294】

二重特異性アンタゴニストBi-A1B1の、TGF β 1及びVEGF165に同時に結合する能力を評価するために、サンドイッチELISAアッセイを実施した。この実験では、huTGF β 1を96ウェルプレート上にコーティングして5%BSAでブロッキングした後、Bi-A1B1の段階希釈サンプルを追加してインキュベーションし、続いてビオチン化huVEGF165を加えた。結合した分子を、TMB基質を用いたストレプトアビジンHRPで検出した。図17のこの分析の結果は、二重特異性アンタゴニストBi-A1B1がTGF β 1及びVEGF165の両方に同時に結合できることを示す。

20

【0295】

TGF β 1RIIECDの、ヒトTGF β 1RII(即ちコグネイト受容体)のTGF β 1仲介型活性化に拮抗する能力を評価するために、細胞ベースルシフェラーゼアッセイを実施した。この実験では、SMAD応答要素の制御下でヒトTGF β 1RII受容体及びホタルルシフェラーゼ構築物を発現する組換えHEK293細胞を、TGF β 1RIIECDに融合した抗体(Bi-A1B1、Bi-ZB1)の段階希釈物の存在下で、huTGF β 1を用いて刺激した。この分析の結果を図18に示す。予想されたように、TGF β 1RIIECDを含有する抗体のレベルの上昇により、TGF β 1の、ヒトTGF β 1RIIを活性化してNFAT仲介型ルシフェラーゼ活性を誘導する能力が、徐々に無効化された。このケースでは、Bi-A1B1及びBi-ZB1は同等の拮抗能力を示したが、これはBi-A1B1に関する0.32nMのIC50、及びBi-ZB1に関する0.31のIC50に反映されている。これらのIC50は、対照TGF β BR2融合産物(IC50=0.20nM)と同等であった。

30

【0296】

Bi-A1B1の生体内薬物動態特性を評価するために、薬物動態プロファイルを生成した。簡潔に述べると、10mg/kgの各アンタゴニストを、6～10週齢のメスのCD1マウスの尾部静脈に静脈内注射した(n=マウス2頭/分子)。注射の3分後、3時間後、1日後、3日後、7日後、及び10日後に血清を回収した。血清中の抗体を検出するために、96ウェルELISAプレートを、5 μ g/mlのヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂断片でコーティングした後、PBS中で5%のミルクでブロッキングした。5%のミルク中の、段階希釈されたマウス血清、並びに標準として段階希釈及び精製されたタンパク質分子を、プレートに加えた。ペルオキシダーゼコンジュゲートマウス抗ヒトIgGとのインキュベーション、及び更なる洗浄に続いて、TMB-ELISA基質とのインキュベーションの後二重特異性アンタゴニストBi-A1B1(図19)抗体を検出した。この分析の結果は、二重特異性アンタゴニストBi-A1B1の半減期(T_{1/2})が7.4～16日であることを示した。

40

【0297】

50

実施例 6 : TGF β 1 ECD を有する二重特異性 PD 1 / PD L 1 アンタゴニストの設計

図 20 A ~ 20 B は、2 つの二重特異性抗腫瘍アンタゴニスト、Bi PB 1.2 (図 20 A) 及び Bi PLB 1.2 (図 20 B) を示し、これらはそれぞれ抗 PD 1 及び抗 PD L 1 由来の変領域ドメインを有する抗体バックボーン (IgG4 K447A 又は IgG1 K447A) を含み、更に各重鎖 CH3 領域のカルボキシ末端に融合した TGF β RII ECD を含む。

【0298】

図 21 は、図 20 A 及び 20 B の二重特異性抗体中に存在する機能性ドメイン配列を示す。図 22 は、図 20 A 及び 20 B に示されている二重特異性アンタゴニストに対応する重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) アミノ酸配列を示す。図 23 は、図 20 A 及び 20 B に示されている二重特異性アンタゴニストの機能性ドメインの配置をまとめたものである。

【0299】

実施例 7 : 図 20 A ~ 20 B の二重特異性アンタゴニストの発現及び精製

図 24 A は、親対照抗体 (2P17) と比較して、タンパク質 A アフィニティ精製後の一過性発現系における Bi PB 1.2 及び Bi PLB 1.2 の発現の増加を示す、非変性ポリアクリルアミドゲル (PAGE) 分析を示す。図 24 B は、一過性トランスフェクション済み HEK293 細胞由来のタンパク質 A 精製済み Bi PB 1.2、Bi PLB 1.2、及び 2P17 (ベンチマーク) が、図 24 C に示すように二量体化分子 (Dimer) に比べて低いレベルの高分子量 (HMW) 種及び低分子量 (LMW) 種を有することを示す、サイズ排除クロマトグラフィ (SEC) プロファイルを示す。図 25 A ~ 25 B は、Bi PB 1.2 及び Bi PLB 1.2 の二量体、HMW、及び LMW 形態が、4 において少なくとも 4 週間にわたって良好な安定性を示すことを示す。

【0300】

実施例 8 : 図 20 A ~ 20 B の Bi PB 1.2 及び Bi PLB 1.2 アンタゴニストの機能的特性決定

1. バイオレイヤー干渉法による Bi PB 1.2 の PD 1 及び TGF β 1 への結合

Octet RED96 システム (ForteBio Octet RED96 System) を用いてバイオレイヤー干渉法を実施し、His タグ付与ヒト PD 1 タンパク質又は His タグ付与 TGF β 1 に対する抗体の結合動態を特性決定した。20 nM の抗体を、抗ヒト IgG キャプチャバイオセンサに装入した。バイオセンサを、分析物の 2 倍又は 3 倍段階希釈物 (最高濃度 72 nM) を内包するウェルに 5 分間入れることによって、分析物 (His タグ付与ヒト PD 1 又は TGF β 1 タンパク質) の会合を観察した。バイオセンサを動態緩衝液のみの中に移し、干渉法のシグナルを 10 分間監視した後で、解離を測定した。観察されたオン及びオフレート (K_a 及び K_d) を、試験した少なくとも 5 つの濃度を含む 1 : 1 結合グローバルフィットモデルを用いてフィッティングし、平衡結合定数 K_D を計算した。

【0301】

図 26 A ~ 26 E は、PD 1 及び TGF β 1 の、Bi PB 1.2 (それぞれ図 26 A、26 B) 並びに対応する抗 PD 1 抗体及びベンチマーク (Merck KGaA からの M7824) (それぞれ図 26 C、26 D) への結合の結果を、得られた結合親和性定数 (図 26 E) と共に示す。この結果は、Bi PB 1.2 の PD 1 及び TGF β 1 に対する結合親和性が、抗 PD 1 ベンチマーク及び M7824 ベンチマークより良好であることを示す。

【0302】

2. バイオレイヤー干渉法による Bi PLB 1.2 の PD L 1 及び TGF β 1 への結合

バイオレイヤー干渉法による Bi PLB 1.2 の PD L 1 及び TGF β 1 への

結合を、B i P B 1 . 2 に関して上述したように実施した。図 2 7 A ~ 2 7 E は、P D 1 及び T G F 1 の、B i P B 1 . 2 (それぞれ図 2 7 A、2 7 B) 並びに対応する抗 P D 1 及び抗 T G F 1 ベンチマーク抗体 (それぞれ図 2 7 C、2 7 D) への結合の結果を、得られた結合親和性定数 (図 2 7 E) と共に示す。この結果は、B i P L B 1 . 2 の T G F 1 に対する結合親和性が、T G F 1 E C D ベンチマークより良好であること、及び B i P L B 1 . 2 の P D L 1 に対する結合親和性が、抗 P D L 1 ベンチマークと同等であることを示す。

【0303】

3 . B i P B 1 . 2 及び B i P L B 1 . 2 による P D 1 / P D L 1 への同時結合

図 2 8 A は、B i P B 1 . 2 による T G F 1 及び P D 1 の同時結合を実証する E L I S A アッセイを示し、ここでは、h u T G F 1 コーティング済み 9 6 ウェルプレートに、段階希釈された B i P B 1 . 2 のサンプル、及びこれに続いて h i s タグ付与 h u P D 1 を用いてインキュベーションすることによって、結合した分子を、T M B 基質を用いた抗 H i s タグ H R P によって検出した。図 2 8 B は、B i P L B 1 . 2 による T G F 1 及び P D L 1 の同時結合を実証する E L I S A アッセイを示し、ここでは、h u T G F 1 コーティング済み 9 6 ウェルプレートに、段階希釈された B i P L B 1 . 2 のサンプル、及びこれに続いて H i s タグ付与 h u P D L 1 を用いてインキュベーションすることによって、結合した分子を、T M B 基質を用いた抗 H i s タグ H R P によって検出した。E C 5 0 値は、ヒト P D 1 又は P D L 1 への結合に関する、ベースライン応答と最大応答との間の半分の応答を生成する半数効果濃度を反映したものである。

【0304】

4 . B i P B 1 . 2 は、P D L 1 及び T G F 1 両方の、その受容体への結合を、強力に遮断する

遮断アッセイを実施し、B i P B 1 . 2 と P D L 1 との間の結合に対応する I C 5 0 値を、抗 P D 1 ベンチマーク抗体と比較して計算した。簡潔に述べると、B i P B 1 . 2 又はベンチマーク抗体の 2 倍段階希釈物 (最高 A b 濃度 : 1 2 8 n M ; 各 m A b について 3 回) を調製した。ヒト P D 1 トランスフェクト済み C H O K 1 細胞を、F A C S 緩衝液 (P B S 中の 0 . 5 % B S A 2 m M E D T A) で洗浄し、 10^6 細胞 / m l の濃度で再懸濁した。F I T C 標識ヒト P D L 1 F c タンパク質を、ヒト P D 1 トランスフェクト済み C H O K 1 細胞に、最終濃度 $7 \mu g / m l$ で加え、よく混合した。インキュベーションせずに、 $20 \mu l$ の F A C S 緩衝液中の 2 , 0 0 0 個のこれらの C H O K 1 細胞 (P D L 1 タンパク質を含む) を、9 6 ウェル丸底プレートに即座に加え、 $20 \mu l$ の、又は 2 倍に段階希釈した抗体を、上記細胞に即座に加えて、4 で 3 0 分間インキュベーションした。続いて細胞を洗浄し、 $30 \mu l$ の 7 A A D 溶液中で再懸濁し ; 続いて $35 \mu l$ の 1 0 % 中性緩衝ホルマリン溶液を加えて 1 5 分間インキュベーションした後、i Q u e i n t e l l i c y t システムを用いて分析した。この分析の結果を図 2 9 A に示す。予想されたように、B i P B 1 . 2 のレベルの上昇により、P D L 1 の、受容体に結合する能力が、徐々に遮断された。更に、計算された B i P B 1 . 2 の P D L 1 に関する I C 5 0 は、抗 P D 1 ベンチマークの P D L 1 に関する I C 5 0 と同等であることが分かった。

【0305】

T G F 1 R I I E C D の、ヒト T G F 1 R I I (即ちコグネイト受容体) の T G F 1 仲介型活性化に拮抗する能力を評価するために、細胞ベースルシフェラーゼアッセイを実施した。この実験では、S M A D 応答要素の制御下でヒト T G F 1 R I I 受容体及びホタルルシフェラーゼ構築物を発現する組換え H E K 2 9 3 細胞を、T G F 1 R I I E C D を含有する B i P B 1 . 2 の段階希釈物の存在下で、h u T G F 1 を用いて刺激した。生体活性は、ルシフェラーゼ仲介型発光の量の減少によって測定した。

10

20

30

40

50

【0306】

このアッセイの結果を図29Bに示す。予想されたように、TGF β 1 RII EC Dを含有する抗体のレベルの上昇により、TGF β 1の、ヒトTGF β 1 RIIを活性化してNFAT仲介型ルシフェラーゼ活性を誘導する能力が、徐々に無効化された。更に、計算されたBi PB 1.2のTGF β 1に関するIC50は、抗PD 1ベンチマークのTGF β 1に関するIC50と同等であることが分かった。

【0307】

5. Bi PB 1.2は、ヒト及びカニクイザルPD 1の両方に同様の活性で結合する

Bi PB 1.2の、ヒト及びカニクイザルPD 1の両方に結合する能力を評価するために、Bi PB 1.2の段階希釈物を、ヒト又はカニクイザルPD 1を過剰発現するCHO K1細胞(20,000細胞/ウェル)に加えた。混合物を4℃で20分間インキュベーションし、3回洗浄し、二次抗体であるPE標識F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG Fc(Thermo H10104)を用いて4℃で20分間染色した。細胞を洗浄して7AAD溶液中に再懸濁し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で15分間固定した後、iQue Intellicytシステムで分析した。図30A~30Bは、Bi PB 1.2の、ヒトPD 1(図30A)及びカニクイザルPD 1(図30B)両方への結合を示す。予想されたように、抗ヒトPD 1ベンチマーク抗体は、ヒトPD 1(図30A)及びカニクイザルPD 1(図30B)に同様に結合することが分かった。ヒトPD 1及びカニクイザルPD 1への結合それぞれに関するベースライン応答と最大応答との間の半分の応答を生成する半数効果濃度(EC₅₀)を反映した、対応するEC50値も決定した。このケースでは、EC50値は、Bi PB 1.2の、ベンチマーク抗体と同様の結合特性を示す。

10

20

【0308】

6. Bi PLB 1.2は、PD 1及びTGF β 1両方の、その受容体への結合を、強力に遮断する

基本的な実施例8のセクション4で上述したように、遮断アッセイを実施し、Bi PLB 1.2とPD L1との間の結合に対応するIC50値を、抗PD L1ベンチマーク抗体と比較して計算した。図31Aは、Bi PLB 1.2又は抗PD L1ベンチマーク抗体の濃度の上昇により、PD 1の、PD L1 TGFBR2に結合する能力が、徐々に遮断されたことを示す。得られたIC50値に反映されているように、二重特異性は抗PD L1ベンチマークと同等である。

30

【0309】

Bi PLB 1.2とTGF β 1との間の結合に対応するIC50値を、抗TGF β 1ベンチマーク抗体と比較して計算するために、実施例8のセクション4に記載の細胞ベースアッセイを実施した。図31Bは、Bi PLB 1.2及び抗PD L1 TGFBR2ベンチマーク抗体の段階希釈物の、SMAD応答要素の制御下でルシフェラーゼ発現を活性化するTGF β 1の能力を遮断する能力を示す。得られたIC50値に反映されているように、二重特異性抗体は抗TGF β 1ベンチマークと同様の結合特性を示した。

40

【0310】

7. Bi PLB 1.2は、ヒト及びカニクイザルPD 1の両方に同様の活性で結合する

Bi PLB 1.2の、ヒト及びカニクイザルPD L1の両方に結合する能力を評価するために、基本的な実施例9のセクション5で上述したように、Bi PLB 1.2の段階希釈物を、ヒト又はカニクイザルPD L1を過剰発現するCHO K1細胞(20,000細胞/ウェル)に加えた。図32A~32Bは、Bi PLB 1.2がヒトPD L1(図32A)及びカニクイザルPD L1(図32B)の両方に結合したことを示す。ヒトPD 1及びカニクイザルPD 1への結合それぞれに関するベースライン応答と最大応答との間の半分の応答を生成する半数効果濃度(EC₅₀)を反映した、

50

結果的なEC50値も決定した。

【0311】

8. Bi PB 1.2はT細胞活性化を強化する

ヒトT細胞アッセイを実施して、Bi PB 1.2抗体の機能性を示した。簡潔に述べると、ドナー1及び2から収集した正常で健康なヒトPBMCそれぞれを、SEB (Toxin Technology、Cat#: BT202) SEBで活性化した。IFN 産生を評価するために、96ウェルプレート中で、100,000個の細胞を0.5 µg/mlのSEBで刺激した。25,000個の腫瘍抑制性SHP77細胞を加え、阻害性シグナルを提供した。66 nMのBi PB 1.2 mAb、又はアイソタイプ対照Abを加えた。5日後、上清をELISAによってIFN 及びIL 2に関して検査した。図33A~33Bは、陰性対照処理に対する、Bi PB 1.2による増大したIFN (ドナー1、図33A; ドナー2、図33B)、及びIL 2 (ドナー1、図33C; ドナー2、図33D)を示す。

10

【0312】

9. Bi PLB 1.2はT細胞活性化を強化し、腫瘍細胞によるT細胞抑制を親抗PD L1抗体より良好に克服する

図34A~34Bは、陰性対照及び親抗PD L1抗体処理に対する、Bi PLB 1.2によるヒトPBMC (ドナー8、図34A; ドナー9、図34B)からのIFN 分泌の増大を示す。図34C~34Dは、陰性対照及び親抗PD L1抗体処理に対する、Bi PLB 1.2によるヒトPBMC (ドナー8、図34C; ドナー9、図34D)からのIL 2分泌の増大を示す。これらの結果は、「Bi PLB 1.2が、腫瘍細胞によるT細胞抑制を親抗PD L1抗体より良好に克服する」という考えと一致している。

20

【0313】

11. ベンチマーク抗体に比べて改善された、Bi PB 1.2及びBi PLB 1.2に関するマウスにおける薬物動態プロファイル

Bi PB 1.2、Bi PLB 1.2、及びベンチマーク抗体の生体内薬物動態特性を評価するために、薬物動態プロファイルを生成した。簡潔に述べると、10 mg/kgの各アントゴニストを、6~10週齢のメスのCD1マウスの尾部静脈に静脈内注射した (n = マウス2頭/分子)。注射の3分後、3時間後、1日後、3日後、7日後、及び10日後に血清を回収した。血清中の抗体を検出するために、96ウェルELISAプレートを、5 µg/mlのヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂断片でコーティングした後、PBS中で5%のミルクでブロッキングした。5%のミルク中の、段階希釈されたマウス血清、並びに標準として段階希釈及び精製されたタンパク質分子を、プレートに加えた。

30

【0314】

ペルオキシダーゼコンジュゲートマウス抗ヒトIgGとのインキュベーション、及び更なる洗浄に続いて、TMB ELISA基質とのインキュベーションの後、Bi PB 1.2 (図35A)、Bi PLB 1.2 (図35C)、及びベンチマーク (図35E) 抗体 (PD L1 TGFBR2、M8724)を検出した。マウス血清中に注射された抗体Bi PB 1.2 (図35B)、Bi PLB 1.2 (図35D)、及びベンチマーク (図35F)の完全性及びクリッピングも、抗ヒトFcウエスタンブロットで分析した。この分析の結果は、ベンチマーク抗体に比べて改善された、Bi PB 1.2及びBi PLB 1.2に関するマウスにおける薬物動態プロファイルを示す。

40

【0315】

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

50

る構成要素及びステップを、意図されている目的を達成するために有効ないずれの順序で、包含することを意図している。

【 図 1 】

Anti-PD1 mab sequences					
Mab	Heavy Chain CDR1		Heavy Chain CDR2		Heavy Chain CDR3
PD-01	NFLMS	(SEQ ID:1)	TISGGGRDITYVDSVKG	(SEQ ID:2)	RTTVSMDY
PD-02	NSLYL	(SEQ ID:4)	GINPSNGGTNFEKEKT	(SEQ ID:5)	RDYNYDGGGIDS
PD-03	NSYIV	(SEQ ID:7)	GINPSNGGTNFEKEKT	(5)	RRDYRYDGGGIDS
PD-04	NSYIV	(7)	GINPSNGGTNFEKEKT	(5)	RDYNYDGGGIDS
PD-05	TYIYI	(SEQ ID:9)	GINPSNGGTNFEKEKT	(SEQ ID:10)	RYHGYDGGIDY
PD-06	SYIYH	(SEQ ID:12)	WIFPGSGSKYENFEKG	(SEQ ID:13)	SETYDYGIDY
Mab	Light Chain CDR1		Light Chain CDR2		Light Chain CDR3
PD-01	LASQTGTWLA	(SEQ ID:15)	AATSLAD	(SEQ ID:16)	QQFYSDPWT
PD-02	RASSTLYSNYLH	(SEQ ID:18)	RASFLAS	(SEQ ID:19)	QQGSSIPLT
PD-03	RASSTLYSNYLH	(SEQ ID:21)	RASFLAS	(19)	QQGSSIPLT
PD-04	RASSTLYSNYLH	(SEQ ID:22)	RASFLAS	(19)	QQGSSIPLT
PD-05	RASKSVTSYSGSYH	(SEQ ID:23)	LASNLES	(SEQ ID:24)	QHTWEIPNT
PD-06	KASQNVGTVNA	(SEQ ID:26)	SASRYTS	(SEQ ID:27)	QQYYSYPVT

FIG. 1

【 図 2 A 】

anti-PD-1 Antibody Variable Domain Sequences

PD-01

VH (SEQ ID NO: 29):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFLMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGR
DTYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRTTYSMDYWGQGT
SVTVSS

VL (SEQ ID NO: 30):

DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITTCASQTIGTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAATSLADG
VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFY SIPWTFGGGTKLEIK

PD-02

VH (SEQ ID NO: 31):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASDYTFTNSYLYWLRQAPGQGLEWMGGINPSN
GGTNFNEKFKTRITSTRDTSISTAYMELSRLRSDDTVYYCTRRDYNVDGGFDSWG
QGTLTVSS

VL (SEQ ID NO: 32):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASSTLYSNYLHWYQKPGKAPKLLIYRASFLAS
GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGSSIPLTFGGGTKVEIK

PD-03

VH (SEQ ID NO: 33):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASDYTFTNSYIYWVRQAPGQGLEWMGGINPSN
GGTNFNEKFKTRITSTRDTSISTAYMELSRLRSDDTVYYCARRDYRYDGGFDSWG
QGTLTVSS

VL (SEQ ID NO: 34):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCASSTLYSSYLHWYQKPGKAPKLLIYRASFLASG
VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGSSIPLTFGAGTKLDLK

FIG. 2A

【 図 2 B 】

PD-04
 VH (SEQ ID NO: 35):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYFTFTNSYIYVVRQAPGQGLEWMGGINPSN
 GGTNFKFKTRVTSTRDTSISTAYMELSLRSDDTVYVYCARRDYNYDGGFDWG
 QGTLVTSS

VL (SEQ ID NO: 36):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASSLSYSLHWYQKPGKAPKLLIYRASFLAS
 GVPSPRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGGSSIPITFGGGTKVEIK

PD-05 (2P16)
 VH (SEQ ID NO: 37):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIYVVRQAPGQGLEWMGGINPGN
 GGTNFKFKIRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSEDATVYVYCARRYHGYDGGLDYWG
 QGTLVTSS

VL (SEQ ID NO: 38):
 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGFSYIHWYQKPGQPPKLLIYASNLN
 SGVSPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCYQHTWELPNTFGGGTKVEIK

PD-06 (2P17)
 VH (SEQ ID NO: 39):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIHWVVRQAPGQGLEWMGWIFPGS
 GSKYTNENFKGRVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDATVYVYCASETYDYGWYWGQT
 LVTSS

VL (SEQ ID NO: 40):
 DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQNVGTNAVWYQKPGKAPKALIYSASYRYSG
 VPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQYYSYPTFGGGTKLEIK

FIG. 2B

【 図 3 】

Anti-PD-L1 mab sequences			
Mab	Heavy Chain CDR1	Heavy Chain CDR2	Heavy Chain CDR3
PL-01	NYWMH (SEQ ID: 41)	MHPNTNNYNYNEKFS (SEQ ID: 42)	SDYGSPPYFDY (SEQ ID: 43)
PL-02	SYWMH (SEQ ID: 44)	MHPNVGNNYNYNEKFS (SEQ ID: 45)	SRYGSPYFDY (SEQ ID: 46)
PL-03	SYWMH (44)	MHPNSGNNYNYNEKFS (SEQ ID: 47)	SWYGSPPYFDY (43)
PL-04	SYWMH (44)	MHPITGVSTDYNYNEKFS (SEQ ID: 49)	SDYGSPPYFDY (43)
PL-05	SDYAWN (SEQ ID: 50)	YSDSGSTSNFSLKS (SEQ ID: 51)	SFLRLSYFDH (SEQ ID: 52)
PL-06	SYGIN (SEQ ID: 53)	CYVGNBYTNYNEKFKG (SEQ ID: 54)	AYYGSRDY (SEQ ID: 55)
PL-07	SYGIN (53)	CYVGNBYTNYNEKFKG (54)	AYYGSRDY (55)
PL-08	SYWMH (44)	MHPNSGNNYNYNEKFS (47)	SWYGSPPYFDY (48)
Mab	Light Chain CDR1	Light Chain CDR2	Light Chain CDR3
PL-01	RASQIDNLYN (SEQ ID: 56)	YTSRLHS (SEQ ID: 57)	QGGYTLPTWT (SEQ ID: 58)
PL-02	RASQIDNLYN (SEQ ID: 59)	YTSRLHS (SEQ ID: 60)	QGGYTLPTWT (61)
PL-03	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)
PL-04	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)
PL-05	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)
PL-06	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)
PL-07	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)
PL-08	RASQIDNLYN (59)	YTSRLHS (57)	QGGYTLPTWT (61)

FIG. 3

【 図 4 A 】

anti-PD-L1 Antibody Variable Domain Sequences

PL-01
 VH (SEQ ID NO: 72):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWKQAPGQGLEWMGMHPNPT
 NNYNYNEKFKSRVTSTRDTSISTAYMELSLRSDDTVYVYCARSDYGSPPYFDYWGQ
 GTLVTSS

VL (SEQ ID NO: 73):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIDNLYNLYWYQKPGKAPKLLIKYTSRLHSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGYTLPTWTFGGGKVEIK

PL-02
 VH (SEQ ID NO: 74):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGMHPNVG
 STNYNEKFKSKATMTDRKSSSTVYMESSLRSEDATVYVYCARSYGSSPYFDYWGQ
 TLVTSS

VL (SEQ ID NO: 75):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIDNLYNLYWYQKPGKAPKLLIYTSRLHSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIK

PL-03
 VH (SEQ ID NO: 76):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGMHPNSG
 GNNYNEKFKSRVTMTDRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYVYCARSWYGSPPYFDYWGQ
 GTLVTSS

VL (SEQ ID NO: 77):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIDNLYNLYWYQKPGKAPKLLIYTSRLHSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIK

FIG. 4A

【 図 4 B 】

PL-04
 VH (SEQ ID NO: 78):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVRQAPGQGLEWMGMHPNPTGV
 STDYNEKFKSRVTMTDRDTSISTAYMELSLRSEDATVYVYCARSDYGSPPYFDYWGQ
 GTLVTSS

VL (SEQ ID NO: 79):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIDNLYNLYWYQKPGKAPKLLIKYTSRLHSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGDTLPWTFGGGKVEIK

PL-05
 VH (SEQ ID NO: 80):
 DVQLQESGPGLVKPKSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPNGKLEWMGYISDSGTS
 YNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQLNSVTDDTATYVYCANSEFLRLSYFDHWGQGITLTVS
 S

VL (SEQ ID NO: 81):
 DIVMTQSHKFMSTSVGDRTVITCRASQDIDNLYNLYWYQKPGQSPKLLIFWASTRHIGV
 PDRFTGSGSGTDYTLTISVQAEDLALYYCQHHSTPYTFGGGKVEIK

PL-06
 VH (SEQ ID NO: 82):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINVVRQAPGQRLWGMWCYIGND
 YTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSLRSEDATVYVYCARAYYGSRDYWGQGTILV
 TVSS

VL (SEQ ID NO: 83):
 DIQMTQSPSSLSAFVGDRTVITCRASQDINKYIAWYQKPGKAPKLLIHYTSLQPGVPS
 RFSGSGSGRDTFTLTISLQPEDATYVYCLQYDNLVYTFGGGKVEIK

PL-07
 VH (SEQ ID NO: 84):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINVVRQAPGQRLWGMWCYIGND
 YTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSLRSEDATVYVYCARAYYGSRDYWGQGTILV
 TVSS

VL (SEQ ID NO: 85):
 EIVLTQSPVTLSPGERATLSCQSIDYHLHWYQKPGQAPRLLIKASQSIGIPARFSGS
 GSGSDFTLTISLEPEDFAYVYVYCNHGFYTFGGGKVEIK

FIG. 4B

【 図 5 A - 5 B 】

PL-08
VH (SEQ ID NO: 86):
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMHPNSG
GNNYNEKFKSRVTMTIRDTSTISATYMELSRLRSDDTAVYYCARSWYGGSPYYFDYWGQ
GTLTVVSS

VL (SEQ ID NO: 87):
DIQMTQSPSSLSASVGRVTISCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIKYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYFCQQGYTLPTWFGGGTKVEIK

FIG. 4C

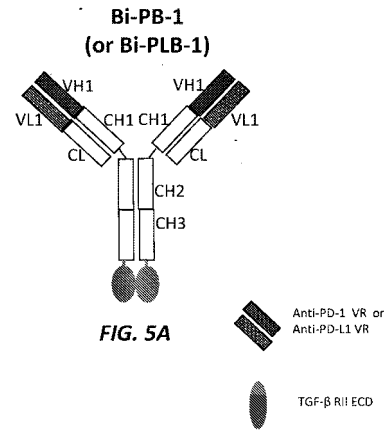


FIG. 5A

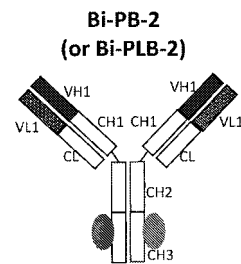


FIG. 5B

【 図 6 】

Exemplary Functional Domain Sequences in FIG. 5

VH/VL or Fusion Protein Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains
Anti-PD-1 HCVR (2P17)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKASCSASGYTFTSYIIHVVRRQAPGGLEWMGWIFP GSGNSKYNENFKGRVTLTADTSTSTVYMWELSLRSEDATVYVCASETYDYGDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 39)
Anti-PD-1 LCVR (2P17)	DIQMTQSPSFLASVSGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALISYASYR GVPSRFSGSGSGETFTLTISLQPEDFATYVCQQYSPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 40)
Anti-PD-L1 HCVR (PL-08)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHVVRRQAPGGLEWMGMGI HPNSGGNNYNEFKFSRVTMTRDTSTISATYMELSLRSLDDATVYVCARSWYGGSPY YFDYWGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 86)
Anti-PD-L1 LCVR (PL-08)	DIQMTQSPSSLASVSGDRVTISCRASQIDINLYNWYQQKPGKAPKLLIKYTSRLHS GVPSRFSGSGSGETDFTLTISLQPEDFATYFCQQGYTLPTWTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 87)
TGF- β RII-ECD	IPHPVQKSVNNNDIMVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRSTCDNQKSCMSNCSITSICEN PQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPLKPYHDFLEDAASPCKIMKEKKPGETFFM CSCSDECDNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 89)

FIG. 6

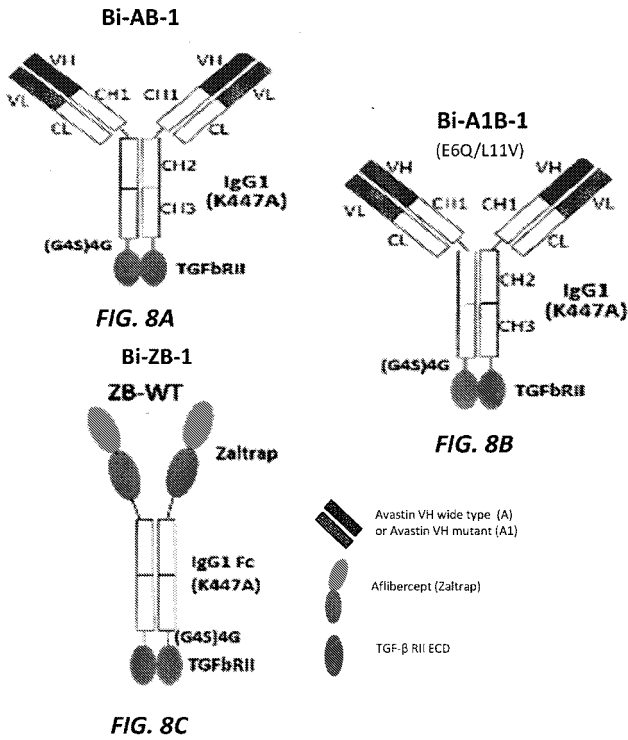
【圖 7】

Exemplary heavy chain (HC) and light chain (LC) sequences in FIG. 5

[illegible]

FIG. 7

【 図 8 A - 8 C 】



【 図 9 A 】

Functional Domain Sequences in FIGs. 8A-8C

Functional Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains	Antagonist(s)
Bevacizumab (Avastin) VH (wt)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNYGMNWRQAPGKGL EWVGVWINTYTGEPTAAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDT AVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 90)	Bi-AB-1
Bevacizumab (Avastin) VH (mt)	EVQLVQSGGGYVQPGGSLRLSCAASGYTFNYGMNWRQAPGKGL LEWVGWINTYTGEPTAAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDT AVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 96)	Bi-A1B-1
Bevacizumab (Avastin) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAQDISNLYNWYQKPGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYCYQQYSTVPW TFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 91)	Bi-AB-1 Bi-A1B-1
IgG1 CH1-CH2-CH3 (N297A HC)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHFTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SGSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 97)	
IgG1 CH1-CH2-CH3 (K447A HC)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHFTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SGSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 98)	Bi-AB-1 Bi-A1B-1
IgG1 Fc (CH2-CH3) (K447A HC)	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA (SEQ ID NO: 99)	Bi-ZB-1

FIG. 9A

【 図 9 B 】

Functional Domain Sequences in FIGs. 8A-8C (CONT)

Functional Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains	Antagonist(s)
CL (LC)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGSLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)	Bi-AB-1 Bi-A1B-1
(G4S) ₄ G	GGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 101)	Bi-AB-1 Bi-A1B-1 Bi-ZB-1
TGF-β RII-ECD	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSC MSNCISITCEKPEQVCVAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFIL EDAASPKCMKEKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 89)	Bi-AB-1 Bi-A1B-1 Bi-ZB-1
VEGF binding domain from Aflibercept	SDTGRPFVEMYSEIPIHMTGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDT LIPDGKRIIWDNRKGIISNATYKEIGLTCEATVNGHLYKTNLTHR QTNTIIVDVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVDGIFNWEYPS KHQHKLVNDRDLTQSGSEMKKFLSTLTDIGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO: 88)	Bi-ZB-1

FIG. 9B

【 図 1 0 】

Heavy chain (HC) and light chain (LC) sequences in FIG. 8

Antibody (HC/LC) in FIGs. 12-13	HC or LC amino acid sequence	Functional Domains
Bi-AB-1 HC (FIG. 8A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNYGMNWRQAPGKGLVWGV WINTYTGEPTAAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPHY GSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPTVSWNSGALTSGVHFTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCISIT SICEKPEQVCVAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILDAASPKCMKEKK PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 107)	Anti-VEGF (bevacizumab) TGFβRII ECD
Bi-AB-1 LC (FIG. 8A)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAQDISNLYNWYQKPGKAPKVLIFFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYCYQQYSTVPWTFGGGTKEIKR TVAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 91)	
Bi-A1B-1 HC (FIG. 8B)	EVQLVQSGGGYVQPGGSLRLSCAASGYTFNYGMNWRQAPGKGLVWGV WINTYTGEPTAAADFKRRFTSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPHY GSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPTVSWNSGALTSGVHFTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCISIT SICEKPEQVCVAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILDAASPKCMKEKK PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 104)	Anti-VEGF (mutant E6Q/L11V bevacizumab) TGFβRII ECD
Bi-A1B-1 LC (FIG. 8B)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAQDISNLYNWYQKPGKAPKVLIFFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYCYQQYSTVPWTFGGGTKEIKR TVAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 91)	
Bi-ZB-1 HC (FIG. 8C)	SDTGRPFVEMYSEIPIHMTGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTLIPDGKRII WDSRKGFIISNATYKEIGLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNTIIVDVLSPSHGIE LSVGEKLVNCTARTELNVDGIFNWEYPSKHQHKLVNDRDLTQSGSEMKKFL LSTLTDIGVTRSDQGLYTCAASGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCISIT SICEKPEQVCVAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILDAASPKCMKEKK PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 105)	VEGFR-Fc (Zaltrap; aflibercept) TGFβRII ECD

FIG. 10

【 図 1 1 】

Antagonist Configurations in FIG. 10				
Antagonist construct	IgG	Binding moieties	Antagonist polypeptide chain	Arrangement of functional domains (NH2--COOH)
Bi-AB-1	IgG1 (K447A) IgG2 or IgG4	Avastin (wt) TGFβRII ECD	Bi-AB HC	VH-CH1-CH2-CH3-TGFβRII ECD
			Bi-AB LC	VL-CL
Bi-A1B-1	IgG1 (K447A) IgG2 or IgG4	Avastin (mt) TGFβRII ECD	Bi-A1B HC	VH-CH1-CH2-CH3-TGFβRII ECD
			Bi-A1B LC	VL-CL
Bi-ZB-1	IgG1 (K447A) IgG2 or IgG4	Aflibercept (Zaltrap) TGFβRII ECD	Bi-ZB HC	VEGFR-Fc-CH2-CH3-TGFβRII ECD

FIG. 11

【 図 1 2 】

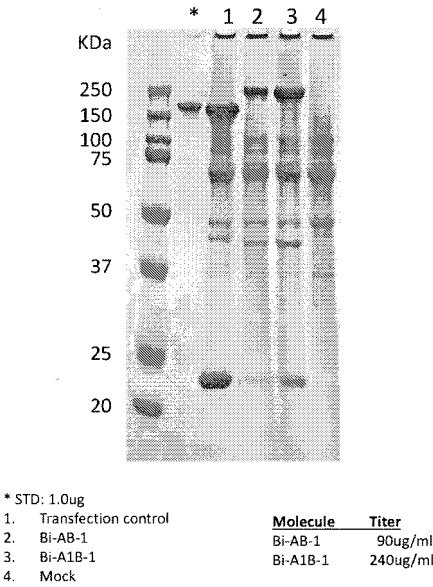


FIG. 12

【 図 1 3 A - 1 3 B 】

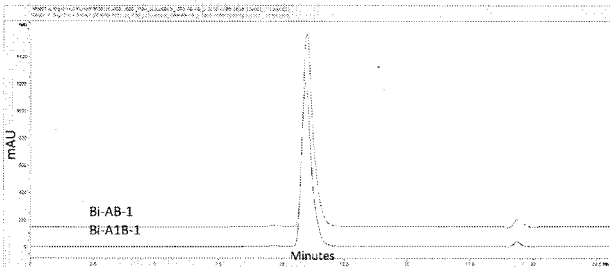


FIG. 13A

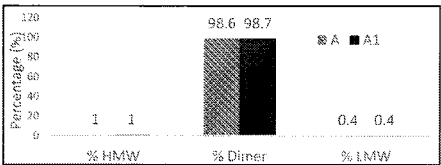


FIG. 13B

【 図 1 4 A - 1 4 B 】

Transient Expression of Bi-ZB-1

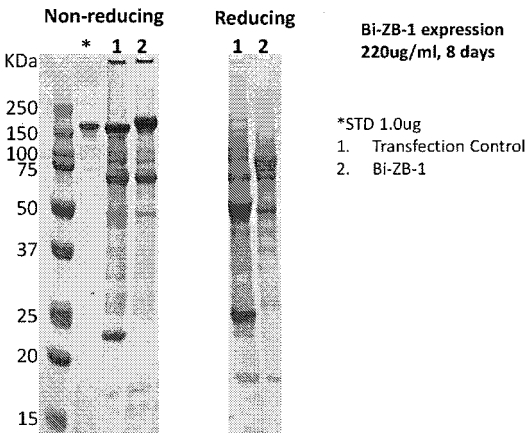


FIG. 14A

FIG. 14B

【 図 1 5 】

Protein A purified Bi-ZB-1 has low levels of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) species in comparison to dimers

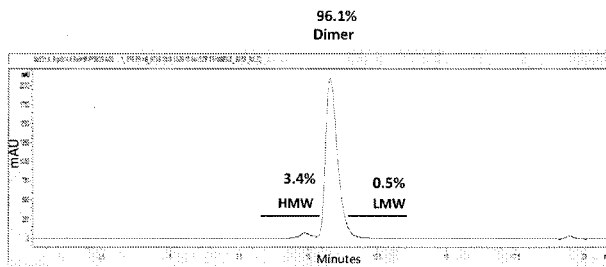
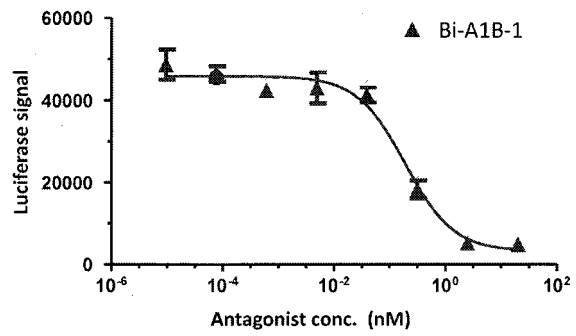


FIG. 15

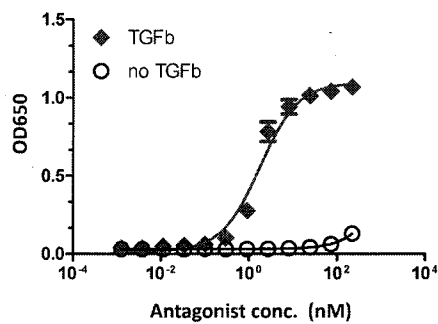
【 図 1 6 】



Antagonist	IC50 (nM)
Bi-A1B-1	0.19

FIG. 16

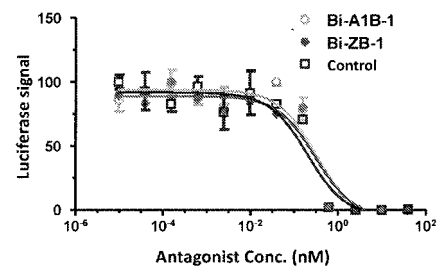
【 図 1 7 】



Antagonist	EC50 (ug/ml)	EC50 (nM)
Bi-A1B-1	0.09	1.80

FIG. 17

【 図 1 8 】



Antagonist	IC50 (nM)
Bi-A1B-1	0.32
Bi-ZB-1	0.31
Control TGFBR2 fusion	0.20

FIG. 18

【 図 1 9 】

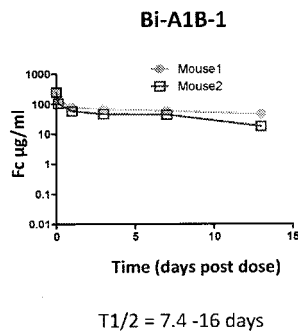


FIG. 19

【 図 2 0 A - 2 0 B 】

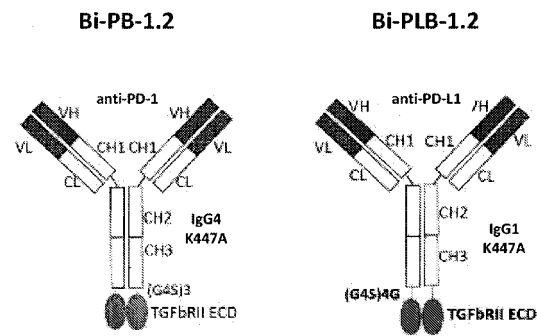


FIG. 20A

FIG. 20B

【 図 2 1 】

Functional Domain Sequences in FIGs. 20A, 20B

Functional Domain	Amino Acid Sequences of Functional Domains	Antagonist(s)
Anti-PD-1 VH (2P17)	TSQVLVSGSGAEVKKPGASVKYVSKASGYFTTSYHHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSGNSKYNEFKGRVLTADTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYFCASEYTDYGDYWGQGLTLTVTSY (SEQ ID NO: 39)	Bi-PB-1.1, -1.2
Anti-PD-1 LH	QVQLVSGSGAEVKKPGASVKYVSKASGYFTTSYWMHWRQAPGQGLEWMGMIHPSVSGGNNYNEFKSRVTMTDTSISTAYMELSLRSDSDTAVYCARCVSGSSPYFDYWGQGLTLTVTSY (SEQ ID NO: 86)	Bi-PLB-1.1, -1.2
IgG4 CH1-CH2-CH3 (k447A) HC	ASTSGKGSVFLPACSRSTSESTAALGCLVDFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSVTPSSGLTKTICNVNDHKRPSNTKVDKRPEYKGPCCPPCPAPEFLGGSPVFLPPPKDGLTMSRPTVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAAKTPRREEQFNSTYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKCAAGKQRPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSLRTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTKSLSLSPGA (SEQ ID NO: 130)	Bi-PB-1.2
IgG1 CH1-CH2-CH3 (k447A) HC	ASTSGKGSVFLPAAVSLSTSGGTAALGCLVDFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSVTPSSGLTKTICNVNHNKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTPCPPCAPELLGGGSPVFLPPPKDGLTMSRPTVEVTCVVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPRREEQFNSTYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKCAAGKQRPREQVYTLPPSRSEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSLRTVDKSRWQQGNVFCVSMVHEALHNHYTKSLSLSPGA (SEQ ID NO: 129)	Bi-PLB-1.2
(G4S) ₃	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 114)	Bi-PB-1.1, -1.2
(G4S) ₄ G	GGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 101)	Bi-PLB-1.1, -1.2
TGF-β RIi-ECD	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKQPEVCAVWVSGGSDTCDLNDKPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGFTFFMKCSSDDECNHINSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 89)	Bi-PB-1.1, -1.2 Bi-PLB-1.1, -1.2
Anti-PD-1 VL (2P17)	DIQMCTQSPSLASVSGDRVITTCASQNVGTNVAWYQKPGKPAKALINYSARYSVGPSRFSGSGSGTEFTLTISSQLPEDFATFYCCQYYSVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 40)	Bi-PB-1.1, -1.2
Anti-PD-1 LH	DIQMCTQSPSLASVSGDRVITTCRASQDNLNVAWYQKPGKPAKLIKITSLRLHSGVPSRFSGSGSGTDTFTLTISSQLPEDFATFYCQGYTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)	Bi-PLB-1.1, -1.2
CL (LC)	RTVAAPSVPFSDSEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWQVVDNALQSGNSIFQPSDEVDQSKDSYTSLSLTCLADKEYHKHYACVEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 100)	Bi-PB-1.1, -1.2 Bi-PLB-1.1, -1.2

FIG. 21

【 図 2 2 】

Heavy chain (HC) and Light chain (LC) Sequences of Antagonists in FIGs. 20A, 20B

[illegible]

FIG. 22

【 図 2 3 】

Antagonist Configurations in FIGs. 20A, 20B

Antagonist construct	IgG	Binding moieties	Antagonist polypeptide chain	Arrangement of functional domains (NH ₂ -COOH)
Bi-PB-1.2	IgG4 (K447A)	Anti-PD-1 (2P17) TGFβRII ECD	Bi-PB-1.2 HC TGFβRII ECD	VH-CH1-CH2-CH3-linker-TGFβRII ECD
			Bi-PB-1.2 LC	VL-CL
Bi-PLB-1.2	IgG1 (K447A)	Anti-PD-L1 (PL-03) TGFβRII ECD	Bi-PLB-1.2 HC TGFβRII ECD	VH-CH1-CH2-CH3-linker-TGFβRII ECD
			Bi-PLB-1.2 LC	VL-CL

FIG. 23

【 図 2 4 A - 2 4 C 】

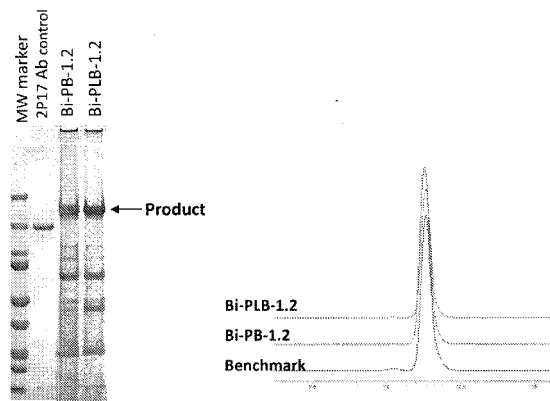


FIG. 24A

FIG. 24B

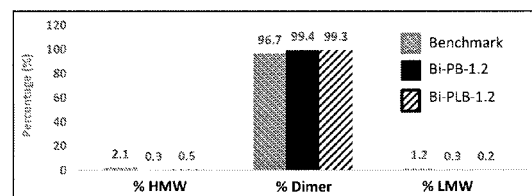


FIG. 24C

【 図 2 5 A - 2 5 B 】

Bi-PB-1.2

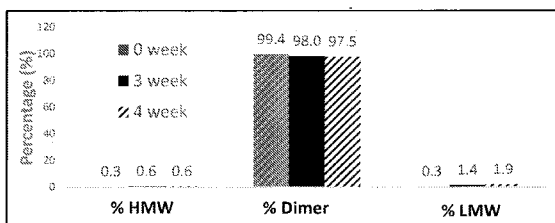


FIG. 25A

Bi-PLB-1.2

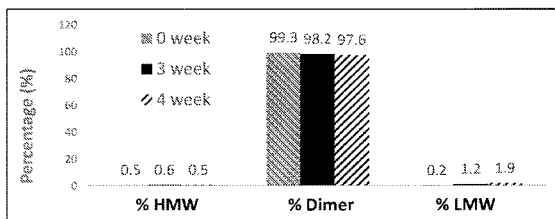


FIG. 25B

【 図 2 6 A - 2 6 E 】

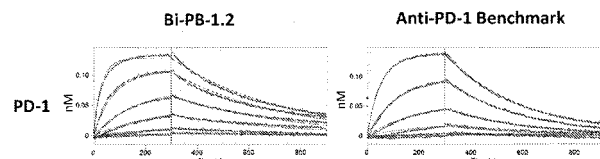


FIG. 26A

FIG. 26C

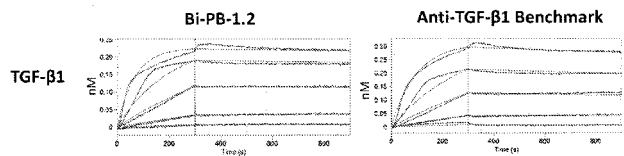


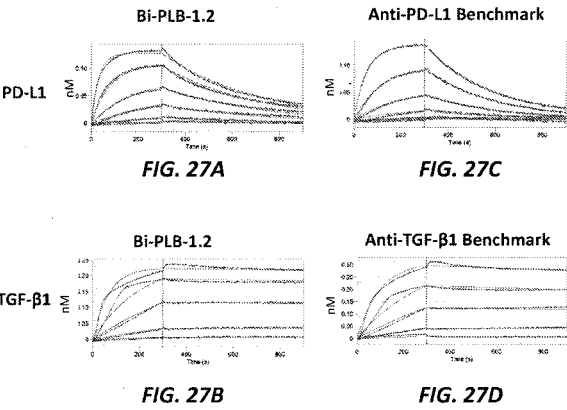
FIG. 26B

FIG. 26D

	Soluble Human PD-1		
Antagonist	K _D (nM)	K ₃ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K ₄ (s ⁻¹)
Bi-PB-1.2	3.0	3.84E+05	1.16E-03
Anti-PD-1 Benchmark	8.8	1.88E+05	1.66E-03
TGF-β1 Benchmark	NR		
	Soluble Human TGF-β1		
Bi-PB-1.2	0.14	3.76E+05	5.10E-05
Anti-PD-1 Benchmark	NR		
TGF-β1 Benchmark	0.48	2.60E+05	1.25E-04

FIG. 26E

【 27 A - 27 E 】



Antagonist	Soluble Human PD-L1		
	K_D (nM)	K_3 ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Bi-PLB-1.2	0.83	$9.04E+05$	$7.50E-04$
Anti-PD-L1 benchmark	0.75	$1.71E+06$	$1.28E-03$
Antagonist	Soluble Human TGF-β1		
	K_D (nM)	K_3 ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Bi-PLB-1.2	0.28	$2.78E+05$	$7.78E-05$
Anti-TGF-β1 benchmark	0.48	$2.60E+05$	$1.25E-04$

FIG. 27E

【 28 A - 28 B 】

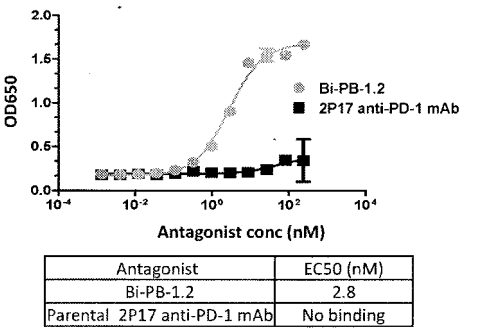


FIG. 28A

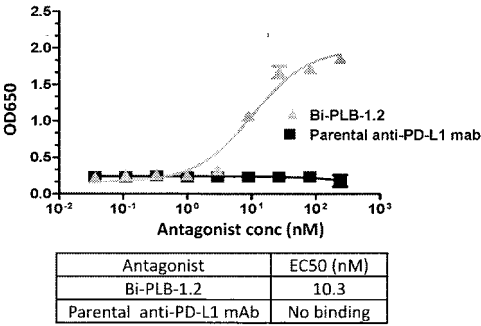


FIG. 28B

【 29 A - 29 B 】

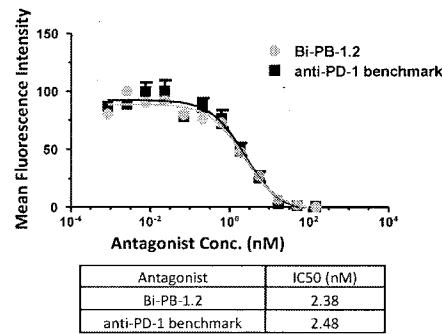


FIG. 29A

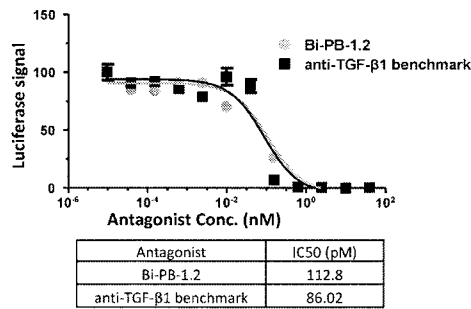


FIG. 29B

【 30 A - 30 B 】

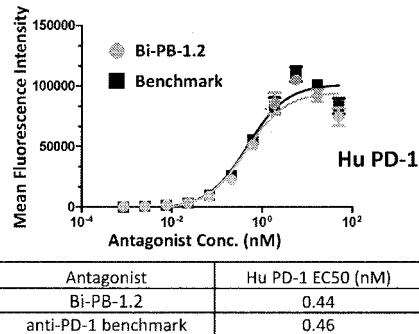


FIG. 30A

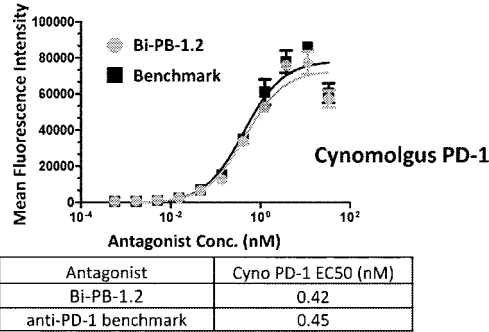


FIG. 30B

【 図 3 1 A - 3 1 B 】

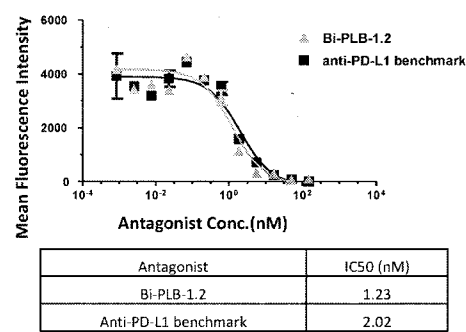


FIG. 31A

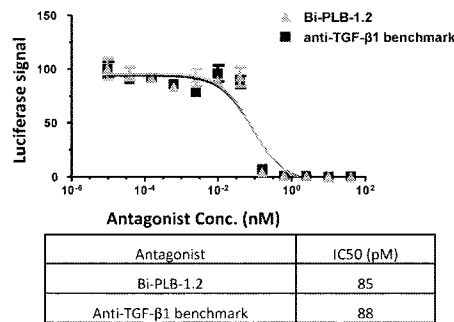


FIG. 31B

【 図 3 2 A - 3 2 B 】

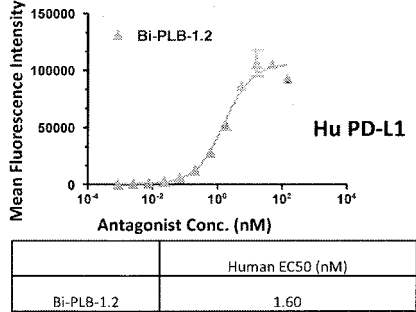


FIG. 32A

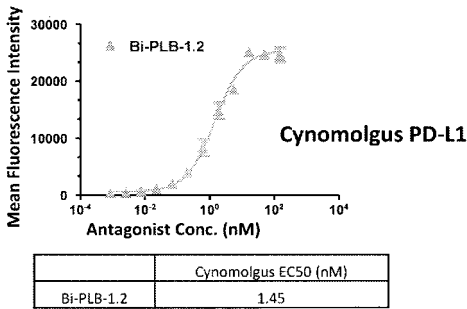


FIG. 32B

【 図 3 3 A - 3 3 D 】

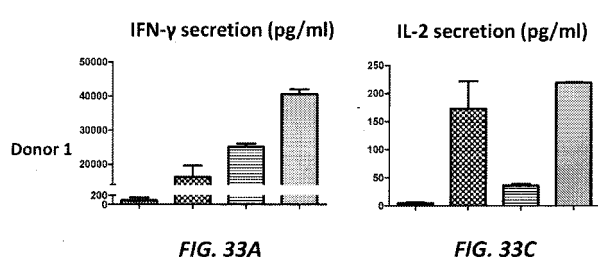


FIG. 33A

FIG. 33C

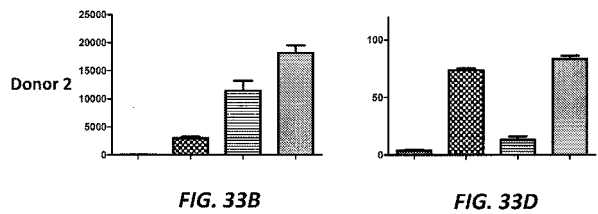


FIG. 33B

FIG. 33D

Legend for FIG. 33A - 33D:

- PBMC with SEB and SHP77 cells and Bi-PB-1.2
- ▨ PBMC with SEB and SHP77 cells and isotype control
- PBMC with SEB stimulation
- PBMC with no treatment

【 図 3 4 A - 3 4 D 】

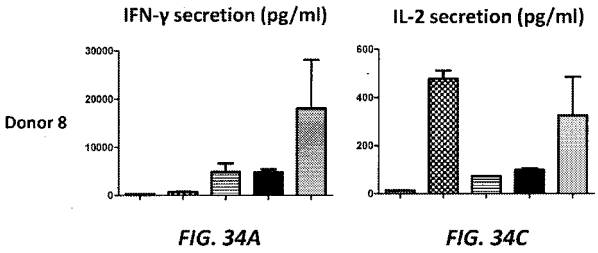


FIG. 34A

FIG. 34C

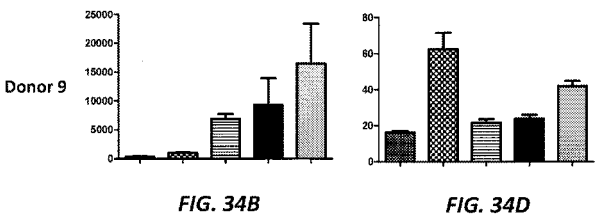


FIG. 34B

FIG. 34D

Legend for FIG. 34A - 34D:

- PBMC with SEB and SHP77 cells, and Bi-PLB-1.2
- ▨ PBMC with SEB and SHP77 cells, and parental anti-PD-L1 Ab
- PBMC with SEB and SHP77 cells, and isotype control
- PBMC with SEB stimulation
- PBMC with no treatment

【 3 5 A - 3 5 F 】

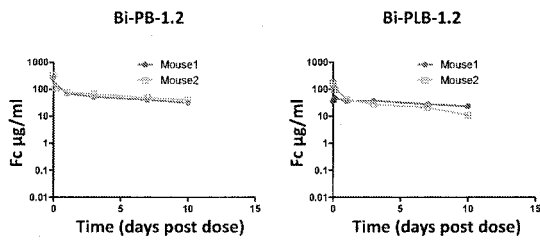


FIG. 35A

FIG. 35C



FIG. 35B

FIG. 35D

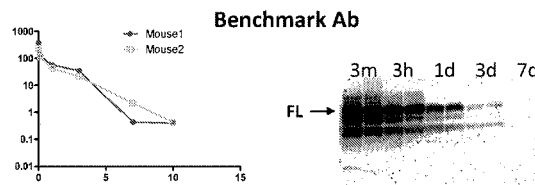


FIG. 35E

FIG. 35F

【 3 6 】

SEQ ID NO	Sequence	Description
130	EVQLVPSGSGELVQPGGSLRSCASGFTFS	PD-01 HFR1
131	WVRQAPGQGLEWVS	PD-01 HFR2
132	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PD-01 HFR3
133	WGQGTSVTVSS	PD-01 HFR4
134	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PD-01 LFR1
135	NYQDQPKGAPKLLF	PD-01, 02, 03, 04, PL-02, 03 LFR2
136	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PD-01, 02, 03, 04 LFR3
137	FGGGTKLEIK	PD-01, PL-05 LFR4
138	EVSLVDSGAEVWPKGASVYKSKASDFTT	PD-02, 03, 04 HFR1
139	NLRQAPGQGLEWMS	PD-02 HFR2
140	KTTSTRTDSSTAYMELSLRSDTAVYYCTR	PD-02 HFR3
141	WGQGTSVTVSS	PD-02, 04, 05, 06, PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR4
142	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PD-02, 04 LFR1
143	FGGGTKLEIK	PD-02, 04, 05, PL-03, 04, 06, 07, 08 LFR4
144	WVRQAPGQGLEWMS	PD-02, 04, 05, 06, PL-02, 03, 04, 08 HFR2
145	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PD-03, 04, PL-01 HFR3
146	WGQGTSVTVSS	PD-03, PL-05 HFR4
147	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PD-03 LFR1
148	FGGGTKLEIK	PD-03 LFR4
149	FGGGTKLEIK	PD-04, 05, PL-01, 04, 06, 07, 08 LFR4
150	EVSLVDSGAEVWPKGASVYKSKASDFTT	PD-05, 06, PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR1
151	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PD-05 HFR3
152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PD-05 LFR1
153	NYQDQPKGAPKLLF	PD-05 LFR2
154	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PD-05 LFR3
155	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PD-06 HFR3
156	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PD-06 LFR1
157	NYQDQPKGAPKLLF	PD-06 LFR2
158	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PD-06 LFR3
159	FGGGTKLEIK	PD-06 LFR4
160	WVRQAPGQGLEWMS	PL-01 HFR2
161	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PL-01, 02, 03, 04, 08 LFR1
162	NYQDQPKGAPKLLF	PL-01, 04, 08 LFR2
163	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PL-01, 04, 08 LFR3
164	KATMTROKSSSTVYMELSLRSDTAVYYCAR	PL-02 HFR3
165	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PL-02, 03 LFR3
166	FGGGTKLEIK	PL-02, 03 LFR4
167	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PL-03, 08 HFR3
168	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PL-04 HFR3
169	WVRQAPGQGLEWMS	PL-05 HFR2
170	WVRQAPGQGLEWMS	PL-05 HFR2
171	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PL-05 HFR3
172	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PL-05 LFR1
173	NYQDQPKGAPKLLF	PL-05 LFR2
174	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PL-05 LFR3
175	WVRQAPGQGLEWMS	PL-06, 07 HFR2
176	RFTSRDNGKHTLYLQVINGSLRSDTAVYYCAR	PL-06, 07 HFR3
177	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	PL-06 LFR1
178	NYQDQPKGAPKLLF	PL-06 LFR2
179	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PL-06 LFR3
180	EVSLVDSGAEVWPKGASVYKSKASDFTT	PL-07 LFR1
181	NYQDQPKGAPKLLF	PL-07 LFR2
182	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	PL-07 LFR3

FIG. 36

【 配 列 表 】

2021529556000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/39979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/16, 38/17, 39/395; A61P 35/00 (2019.01)

CPC - A61K 38/17, 38/1764, 38/1774, 39/39558, 2039/507; A61P 35/00; C07K 16/2803, 16/2818

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- A	US 2015/0225483 A1 (MERCK PATENT GMBH) 13 August 2015; abstract; paragraphs [0007], [0037], [0224]	1-2 --- 11/1-2, 12/11/1-2, 13/12/11/1-2, 15/11/1-2 11/1-2, 12/11/1-2,
A	WO 2014/062859 A4 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 24 April 2014; claim 5	13/12/11/1-2, 15/11/1-2
A	US 2011/0217318 A1 (TAKAYAMA et al.) 08 September 2011; paragraph [0243]	11/1-2, 12/11/1-2, 13/12/11/1-2, 15/11/1-2
A	WO 2017/161976 A1 (MABSPACE BIOSCIENCES (SUZHOU) CO., LTD) 28 September 2017; paragraph [0039]	11/1-2, 12/11/1-2, 13/12/11/1-2, 15/11/1-2

☐ 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

28 October 2019 (28.10.2019)

Date of mailing of the international search report

12 NOV 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/39979

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-10, 20, 26-34
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.:
-***Please See Supplemental Page-***.

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/39979

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

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

Group I+, Claims 1-3, 11-19, 21-22: PD-L1 binding antagonist (binding antagonist) encompassing SEQ ID NO: 41 (HCDR1); SEQ ID NO: 42 (HCDR2); SEQ ID NO: 43 (HCDR3); SEQ ID NO: 56 (LCDR1); SEQ ID NO: 57 (LCDR2); SEQ ID NO: 58 (LCDR3); SEQ ID NO: 72 (HCVR); SEQ ID NO: 73 (LCVR); SEQ ID NO: 94 (heavy chain); SEQ ID NO: 95 (light chain) are directed toward antitumor antagonists that bind specifically to immune checkpoint regulators, angiogenesis pathway regulators and/or TGF pathway regulators.

The antitumor antagonists will be searched to the extent that they encompass a PD-L1 binding antagonist (first exemplary binding antagonist) encompassing SEQ ID NO: 41 (first exemplary HCDR1); SEQ ID NO: 42 (first exemplary HCDR2); SEQ ID NO: 43 (first exemplary HCDR3); SEQ ID NO: 56 (first exemplary LCDR1); SEQ ID NO: 57 (first exemplary LCDR2); SEQ ID NO: 58 (first exemplary LCDR3); SEQ ID NO: 72 (first exemplary HCVR); SEQ ID NO: 73 (first exemplary LCVR); SEQ ID NO: 94 (first exemplary heavy chain); and SEQ ID NO: 95 (first exemplary light chain). Applicant is invited to elect additional binding antagonist(s), with specified associated VL and VH, and associated CDR(s) thereof, 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 available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional binding antagonist(s) and associated set(s) of sequences will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-2 (each in-part) and 11-13 (each in-part), and 15 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 41 (HCDR1); SEQ ID NO: 42 (HCDR2); SEQ ID NO: 43 (HCDR3); SEQ ID NO: 56 (LCDR1); SEQ ID NO: 57 (LCDR2); SEQ ID NO: 58 (LCDR3); SEQ ID NO: 72 (HCVR); SEQ ID NO: 73 (LCVR); SEQ ID NO: 94 (heavy chain); and SEQ ID NO: 95 (light chain). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a PD-L1 binding antagonist (binding antagonist) encompassing SEQ ID NO: 44 (HCDR1); SEQ ID NO: 45 (HCDR2); SEQ ID NO: 46 (HCDR3); SEQ ID NO: 59 (LCDR1); SEQ ID NO: 60 (LCDR2); SEQ ID NO: 61 (LCDR3); SEQ ID NO: 74 (HCVR); SEQ ID NO: 75 (LCVR); SEQ ID NO: 126 (heavy chain).

Group II, Claims 23-25 are directed toward an antitumor antagonist that binds VEGF, wherein the antagonist comprises mutations that provide improved expression in mammalian cells.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a first and second targeting domain and first targeting domain comprising a TGF- β 1 RII extracellular domain (ECD), not present in any of Groups II; the special technical features of Groups II include a VEGF antagonist comprising mutations that provide improved expression in mammalian cells, not present in any of Groups I+.

However, these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled 'M7824, a Novel Bifunctional Anti-PD-L1/TGF β Trap Fusion Protein, Promotes Anti-tumor Efficacy as Monotherapy and in Combination with Vaccine' by Knudson, et al. (hereinafter 'Knudson').

Knudson discloses an antitumor antagonist (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph).

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

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: an antitumor antagonist comprising: a first targeting domain comprising a TGF- β 1 RII extracellular domain (ECD); and a second targeting domain that comprises a PD-1 binding antagonist, a PD-L1 binding antagonist, a VEGF binding antagonist, or a Tie2 tyrosine kinase receptor binding antagonist; these shared technical features are previously disclosed by Knudson, as above.

Knudson discloses an antitumor antagonist (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph) comprising: a first targeting domain comprising a TGF- β 1 RII extracellular domain (ECD) (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph); and a second targeting domain that comprises a PD-L1 binding antagonist (abstract; page e1426519-8, column 2, first paragraph).

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 Knudson reference, unity of invention is lacking.

No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 11-19, 21-22: PD-L1 binding antagonist (binding antagonist) encompassing SEQ ID NO: 41 (HCDR1); SEQ ID NO: 42 (HCDR2); SEQ ID NO: 43 (HCDR3); SEQ ID NO: 56 (LCDR1); SEQ ID NO: 57 (LCDR2); SEQ ID NO: 58 (LCDR3); SEQ ID NO: 72 (HCVR); SEQ ID NO: 73 (LCVR); SEQ ID NO: 94 (heavy chain); SEQ ID NO: 95 (light chain); Exemplary election: PD-L1 binding antagonist (binding antagonist) encompassing SEQ ID NO: 44 (HCDR1); SEQ ID NO: 45 (HCDR2); SEQ ID NO: 46 (HCDR3); SEQ ID NO: 59 (LCDR1); SEQ ID NO: 60 (LCDR2); SEQ ID NO: 61 (LCDR3); SEQ ID NO: 74 (HCVR); SEQ ID NO: 75 (LCVR); SEQ ID NO: 126 (heavy chain)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/55 (2017.01)	A 6 1 K 47/55	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/44 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/44	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 14/71	
	C 1 2 N 15/13	
	C 1 2 N 15/12	

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . B R I J

(72)発明者 シェン ジャッキー ズイー
アメリカ合衆国 9 1 3 6 2 カリフォルニア州 サウザンド オークス、 ローン オーク ド
ライヴ 5 5 9

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

(72)発明者 カロウ マーガレット
アメリカ合衆国 9 3 0 1 2 カリフォルニア州 サンタ ローザ ヴァリィ、 リッジ ドライ
ヴ 1 2 6 5 5

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 CC41 EE59
4C084 AA19 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZC202 ZC412
4C085 AA13 AA14 BB11 BB12 CC01 CC31 EE01 GG01 GG02 GG03
GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA50 DA75
DA76 EA20 EA50 FA74